

بررسی و ارزیابی کیفیت محیط کشت‌های مصرفی آزمون‌های میکروبیولوژی بر اساس استاندارد ۱۷۰۲۵

بهاره گودرزی^{۱*}، کاظم جعفری^۲، فهیمه امیری^۳، مهدیه دیان^۱، الهام یزدانی^۱، معصومه
صادقی^۱، شورش وزیر^۱

۱- کارشناس آزمایشگاه مرکزی شرکت آبفاز استان اصفهان

baharehgoodarzy@yahoo.com, mahdiyendayyan@yahoo.com, lahmyazdani@yahoo.com,
massoumeh.sadeghi@yahoo.com, shorshvaziri@yahoo.com

۲- معاون نگهداری و نظارت بر بهره‌برداری شرکت آبفاز استان اصفهان، kazemjafari@yahoo.com

۳- رئیس کنترل کیفی شرکت آبفاز استان اصفهان، fahimiamiri@yahoo.com

چکیده

اولین گام برای تولید داده‌هایی با دقت و صحت مناسب در آزمایشگاه، آگاهی از روش‌های صحیح انجام آزمون و پیاده‌سازی مستمر سیستم تضمین کیفیت است. برای اطمینان از تحت کنترل بودن فرآیندها، فعالیت‌های کنترل کیفیت برای به حداقل رساندن خطاهای تصادفی و سیستماتیک انجام می‌شود. محیط کشت بخش مهمی از فرآیند آزمون‌های میکروبیولوژی را تشکیل می‌دهند و بررسی کیفیت آنها بسیار حائز اهمیت است. با توجه به تعدد وجود محیط کشت با نشان‌های تجاری مختلف در سطح بازار کشور آشنایی با برنامه‌های کنترل کیفیت داخلی آزمایشگاه به منظور اطمینان از صحت و دقت نتایج ضروری است. هدف از این مطالعه، ارزیابی کیفیت محیط کشت مصرفی است. به جهت تصدیق و اطمینان از توانایی محیط کشت‌ها در رشد همه باکتری‌های مورد نظر، از سویه‌های مرجع کنترلی مثبت، منفی و شاهد استفاده شد و نتایج به دست آمده در آزمون MPN با میزان قابل قبول از سویه مرجع مقایسه گردید. یافته‌های این بخش از مطالعه نشان داد که نتایج آزمون MPN در محدوده قابل قبول سویه کنترلی است. جهت بررسی و مقایسه محیط کشت مصرفی جدید به عنوان منبع جدید مورد استفاده در آزمایشگاه، از آزمون آماری Use test (student's t) استفاده شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که محیط کشت خریداری شده جدید با محیط کشت قدیمی مورد استفاده اختلاف معناداری ندارند و آزمایشگاه مجاز به استفاده در دو دوره متوالی از این محیط کشت‌ها می‌باشد.

واژه های کلیدی: سویه، محیط کشت، میکروبیولوژی

۱- مقدمه

با توجه به اهمیت نتایج آزمایشگاه میکروبیولوژی و تاثیر بر سلامت جامعه، پیاده سازی سیستم کیفیت ضرورت دارد. اهداف اصلی سیستم کنترل کیفیت ارائه نتایج با کیفیت مناسب، اطمینان از کیفیت بالای عملکرد، ارزیابی مداوم عملیات آزمایشگاه، شناخت نقاط ضعف فعالیت های آزمایشگاه، شناسایی آموزش های مورد نیاز پرسنل، بهبود مستندات و سیستم گزارش دهی و همچنین حصول اطمینان از انطباق گزارشات با مقررات و استانداردها می باشد. انجام برخی از فعالیت های کنترل کیفیت داخلی نشان دهنده کارایی روش و عملکرد آزمایشگاه و برای به حداقل رساندن خطاهای تصادفی و سیستماتیک است. این خطاها می تواند ناشی از اختلاف در عملکرد اپراتورها، ابزار، تجهیزات، معرف ها، نمونه برداری و روش آزمون باشد.

از آنجایی که صحت نتایج آزمایشگاه بستگی به مناسب بودن محیط کشت آماده شده دارد، استفاده از بهترین مواد و روش های صحیح آماده سازی محیط کشت و ذخیره سازی و کنترل کیفیت آنها ضروری است. توجه داشته باشید که

محیط کشت ممکن است به لحاظ کیفیت در بین شرکت های سازنده مختلف با یکدیگر تفاوت داشته باشند و یا حتی ممکن است کیفیت آن ها در سری های مختلف تولیدی یک کارخانه یکسان نباشد. بنابراین آزمایشگاه باید مطمئن شود که محیط کشت های مصرفی توانایی رشد اعضای گروه کلی فرم مورد نظر را دارند. این کار با استفاده از سویه های کنترلی که غلظت مشخصی از باکتری را روی محیط کشت ایجاد می کند انجام گرفت. همچنین در استاندارد متد به منظور اطمینان از عدم وجود اختلاف معنا دار در بین محیط کشت ها به منظور استفاده در دو دوره متوالی، بررسی و مقایسه هر منبع جدید محیط کشت با محیط کشت موجود در آزمایشگاه پیشنهاد شده است که بدین منظور محیط کشت های مصرفی با هم مقایسه شدند. (۱)

۲- روش کار

ابتدا به منظور آماده سازی محیط های کشت برای آزمون MPN مطابق با دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده میزان $71/2$ و $35/6$ گرم لوریل سولفات برات برای مرحله احتمالی در روش ۱۵ لوله ای ، میزان 40 گرم برلیان گرین برای مرحله تاییدی و میزان 37 گرم EC برات برای مرحله تکمیلی به صورت جداگانه توزین و به هر کدام یک لیتر آب مقطر با مشخصات ارائه شده در جدول شماره ۱ اضافه شد. محیط کشتهای در دمای 121 درجه به مدت 12 تا 15 دقیقه استریل گردیده شد. PH محیط کشت پس از استرالیزاسیون به ترتیب فاز آزمون $6/8 \pm 0/2$ ، $7/2 \pm 0/2$ و $6/9 \pm 0/29$ می باشد.

به منظور آماده سازی سویه مورد استفاده که مشخصات آن در جدول شماره ۲ آمده است، طبق دستورالعمل ارائه شده توسط سازنده پس از هم دما شدن سوش و محلول بافر با دمای اتاق، ویال نمونه سوش باز و با دقت به بافر اضافه شد و به مدت 15 دقیقه تا حل شدن کامل به صورت ملایم همزده شد. سپس ظرف مدت کمتر از ۱ ساعت به دلیل حساسیت ارگانیسم ها آزمون را به روش ۱۵ لوله ای انجام گرفت. برای مرحله احتمالی آزمون از محیط کشت لوریل سولفات برات استفاده شد و لوله های تلقیح شده را به منظور انکوبه شدن، به دمای $35 \pm 0/5$ درجه سانتیگراد انکوباتور انتقال داده شد. پس از گذشت زمان 24 ± 2 ساعت هریک از لوله ها به آرامی تکان داده شد و از نظر وجود رشد و تولید گاز یا انجام واکنش اسیدی بررسی شد. اگر تولید اسید و گاز در لوله ها مشاهده نگردد اجازه می دهیم زمان کل انکوباسیون به مدت 48 ± 3 ساعت طی شود. ایجاد واکنش اسیدی یا تولید گاز در لوله های آزمایش نشاندهنده مثبت بودن مرحله احتمالی آزمون است برای اثبات، لوله ها به مرحله تاییدی برده میشود عدم ایجاد واکنش اسیدی یا گاز تخمیر در پایان زمان 48 ± 3 انکوباسیون نشاندهنده منفی بودن آزمون است. این در حالی ست که لوله های مثبت وارد مرحله تاییدی (جهت اثبات حضور کلی فرم کل) میشوند. لوله های مثبت مرحله احتمالی را میتوان بطور همزمان در محیط کشت برلیان گرین برای تایید باکتری های کل کلیفرم و ECbrath برای تایید باکتری های مقاوم به گرما (فکال کلیفرم) تلقیح کنیم که بعد از 24 ساعت تشکیل گاز نشاندهنده واکنش مثبت و حضور کلی فرم ها میباشد. و در آخر میزان دانسیته کلی فرم ها را تحت عنوان MPN به ازای 100 CC نمونه ثبت گردیده میشود.

جدول ۱- مشخصات آب مقطر مصرفی برای ساخت محیط کشت

آزمون	مقدار اندازه گیری شده	حداکثر مقدار قابل قبول مطابق با استاندارد
هدایت الکتریکی	0.6	≤ 2
کل کربن آلی	0.18	≤ 1
فلزات سنگین	<0.1	≤ 0.1
کل کلر آزاد باقیمانده	0.02	≤ 0.1
HPC	40	≤ 500

جدول ۲- مشخصات سوبه کنترلی برای محیط کشت های مصرفی در آزمون MPN

Quantitative MPN Results	Unite	Standard Deviation	Acceptance Interval
	MPN/100ml		
Sample1			
Total Coliforms	MPN/100ml	24.8	33.2-132
Fecal Coliforms	MPN/100ml	24.8	33.2-132
Sample2:			
Total Coliforms	MPN/100ml	13.8	15.4-70.6
Fecal Coliforms	MPN/100ml	0	0
Sample3:Blank (No organisms)			
Total Coliforms	MPN/100ml	Blank (No organisms)	
Fecal Coliforms	MPN/100ml	Blank (No organisms)	

Product ID: QCMIC001-10EA

LOT: LRA0492

۲- نتایج

نتایج و محدوده قابل قبول سویه کنترلی مصرفی در جدول شماره ۳ ارائه شده است.

جدول ۳- نتایج آزمون MPN

Sample3		Sample2		Sample1		نتایج بر حسب MPN/100ml
Fecal Coliforms	Total Coliforms	Fecal Coliforms	Total Coliforms	Fecal Coliforms	Total Coliforms	
0	0	0	23	49	49	
Blank		0	15.4-70.6	33.2-132	33.2-132	محدوده قابل قبول

جدول ۴- نتایج آزمون USE TEST

محیط کشت قدیمی	محیط کشت جدید	محیط کشت قدیمی با منبع جدید
Merk VM75786641	Ibresco968L3B	کد نامبر
<1.8	<1.8	نتیجه آزمون

۴- بحث و نتیجه گیری

مطابق استاندارد متد به منظور تصدیق محیط کشت های خریداری شده، کلیه آزمایشگاهها ملزم به استفاده از سویه های مرجع گواهی شده از منابع معتبر ملی و بین المللی می باشند که نتایج آزمون بایستی در محدوده قابل قبول سویه مصرفی قرار گیرد. ارزیابی محیط کشت مصرفی جهت آزمون MPN باید با سویه های کنترلی مثبت و منفی مناسب و کاربردی برای ارگانیسم های هدف تصدیق شود براین اساس مطابق داده های ارائه شده در جدول شماره ۳ نتایج نشان داد که محیط کشت در محدوده قابل قبول است. همچنین علاوه بر آزمون کنترل کیفیت مذکور آزمایشگاه بایستی عملکرد سری های جدید محیط کشت خریداری شده را با سری های قبلی مقایسه کند، زیرا کیفیت نشان های تجاری مختلف و همچنین سری های مختلف تولید محیط کشت ممکن است با هم تفاوت داشته باشد. بنابراین بعد از انجام آزمون Use test نباید اختلاف معنا داری بین محیط های کشت استفاده شده در دو دوره متوالی در آزمایشگاه باشد. (tcal < ttable). که با توجه به نتایج بدست آمده در جدول شماره ۴ نشان داد شد که بین محیط کشت ها با برندهای مختلف تفاوت معنا داری وجود ندارند در نتیجه آزمایشگاه مجاز به استفاده در دو دوره ی متوالی از محیط کشت ها می باشد.

۶- تشکر و قدردانی

به این وسیله مراتب سپاس خود را از جناب آقای مهندس محمد حسین قرائتی مدیر عامل شرکت آب و فاضلاب روستایی استان اصفهان تقدیم می دارم.

دومین کنگره علوم و مهندسی آب و فاضلاب ایران
و دومین همایش ملی عرضه و تقاضای آب شرب و بهداشتی
دانشگاه صنعتی اصفهان
۲۲ الی ۲۴ آبان ماه ۱۳۹۷



۷- فهرست منابع

1. **Standard Methods for Examination of water and wastewater, 22.nd, 2012, part 9000**

Evaluation and evaluation of the quality of the culture medium of the microbiological tests

**Bahareh Godarzi^{1*}, Kazem Jafari², Fahimeh Amiri³
Mahdiyendayyan¹, el.yazdani¹, m.sadeghi¹, , Shoosh Vaziri¹**

1-Expert of the Central Laboratory of Rural Water and Wastewater Company of Isfahan Province

**Baharehgoodarzy@yahoo.com, mahdiyendayyan@yahoo.com,
el.yazdani@yahoo.com, m.sadeghi@yahoo.com, shorshvaziri@yahoo.com**

2-Deputy Head of Surveillance and Surveillance of Rural Wastewater Company of Isfahan Province

Kazem jafariI@yahoo.com

3- Head of quality control of Isfahan Rural Water and Wastewater Company

Fahimi Amiri@yahoo.com

Abstract

In the lab, the first step in generating accurate and accurate data is to know the correct way to conduct the test and to implement the quality assurance system continuously. To ensure that processes are controlled, quality control activities are performed to minimize random and systematic errors. The culture medium is an important part of the process of microbiological testing and its quality is very important. Therefore, due to the multiplicity of culture media with different trade marks in the country's market, familiar with the internal quality control program of the laboratory, it is necessary to ensure the accuracy and accuracy of the results. The purpose of this study was to evaluate the quality of the culture medium used to confirm and ensure the ability of the culture medium to grow all the bacteria in question. Positive and negative control The results of the MPN test were compared with the acceptable level of .and control strains were used reference strain The findings of this part of the study showed that the MPN test results are within the acceptable range of control Also, to test and compare the new culture medium as a new source used in the laboratory, the use test (Student's t) test was used. Results showed that the newly purchased medium was not significantly different from the old culture medium and the laboratory Allowed for use in two .consecutive periods of this culture.

Key words: strain, culture medium, microbiology