بسم الله الرحمن الرحیم

شمارش باکتریهای هتروتروفیک

(HPC)

معاونت بهداشتی اصفهان

تابستان ۱۳۹۸

مقدمه:

- ارزیابی کیفیت زیست شناختی آب براساس
- شناسایی و شمارش میکروارگانیسم های آبزی
- ترکیب گونه ها
- تولید مثل
- شرایط فیزیکوشیمیایی محیط زندگی موجودات ساکن در آب
- در این میان باکتری ها جمعیت غالب را در مقایسه با جلبک ها، قارچها، و تک یاخته ها در آب
- در این میان باکترهای هتروتروف به علت ویژگی های تغذیه ای خود قادربه رشد در شرایط مساعد در تاسیسات آبرسانی

اهمیت باکترهای هتروتروف:

- با توجه به ساختار ژنتیکی قدرتمند و نقش اصلی و تعیین کننده باکتری در تغییرات کیفی اکوسیستم های آبی بالاخص آب شرب و اینکه باکترهای هتروتروف به علت ویژگی های تغذیه ای خود قادرند در شرایط مساعد در تاسیسات آبرسانی رشد نمایند. هرچند اغلب باکتر های هتروتروف آب آشامیدنی بومی و غیر بیماری زا محسوب می شوند اما برخی از باکتری های هتروتروفیک آب آشامیدنی به صورت فرصت طلبانه قادرند در افراد دارای نقص سیستم ایمنی و یا افراد مسن و نوزادان یا افراد مبتلا به سوختگی های شدید یا افرادی که از داروهای تضعیف کننده سیستم ایمنی استفاده میکنند پاره ای از بیماریها را ایجاد نمایند.

- **سازمان بهداشت جهانی تکنیک شمارش باکترهای هتروتروفیک را بعنوان یک شاخص عمومی کیفی سیستم های توزیع مورد توجه قرار داده است.**

- از جایگاههای مناسب رشد و تکثیر باکترهای هتروتروف
- نقاطی از شبکه های توزیع آب با جریان کم خصوصا نقاط کور و انتهای شبکه توزیع
- مناطقی که لوله ها دچار خوردگی
- بستر صافی غشایی و ماسه ای
- مخازن تحت فشار
- بستر های کربن فعال
- بستر های رزینی
- مجاری دستگاهای سختی گیر
- صافی به کار رفته در دستگاهای اتوماتیک فروش و تحویل آب

- از عوامل تاثیر گذار برای تکثیر هترتروف ها یا تشکیل بیوفیلم در شبکه های آبرسانی
- غلظت کلر باقی مانده (کمتر از ۰/۲ میلی گرم در لیتر)
- دمای آب (بالاتر از ۱۰ درجه)
- غلظت AOC (بیش از ۵۰ میکرو گرم در لیتر)
- جنس لوله های آب
- نوع و غلظت ترکیبات تجزیه پذیر آب
- نوع و نحوه پوشش دهی داخل لوله ها و مخازن
- ضریب اصطکاک داخلی لوله ها
- نسبت حجم آب داخل لوله به سطح داخلی لوله
- مدت زمان ماند آب درلوله
- فشار جریان آب

- **کاربرد شمارش باکتر های هتروتروف در مدیریت تامین آب آشامیدنی**

- ارزیابی کار آمدی فرآیندهای تصفیه آب نظیر انعقاد– گندزدایی - صاف سازی
- تعیین کیفیت میکروبی آب در شبکه توزیع، مخازن ذخیره و تعیین الزام در شست شوی آن
- تعیین راندمان شستشوی شبکه و مخزن
- تعیین پتانسیل تشکیل فیلم میکروبی در تاسیسات آبرسانی
- تعیین کیفیت آب بسته بندی شده

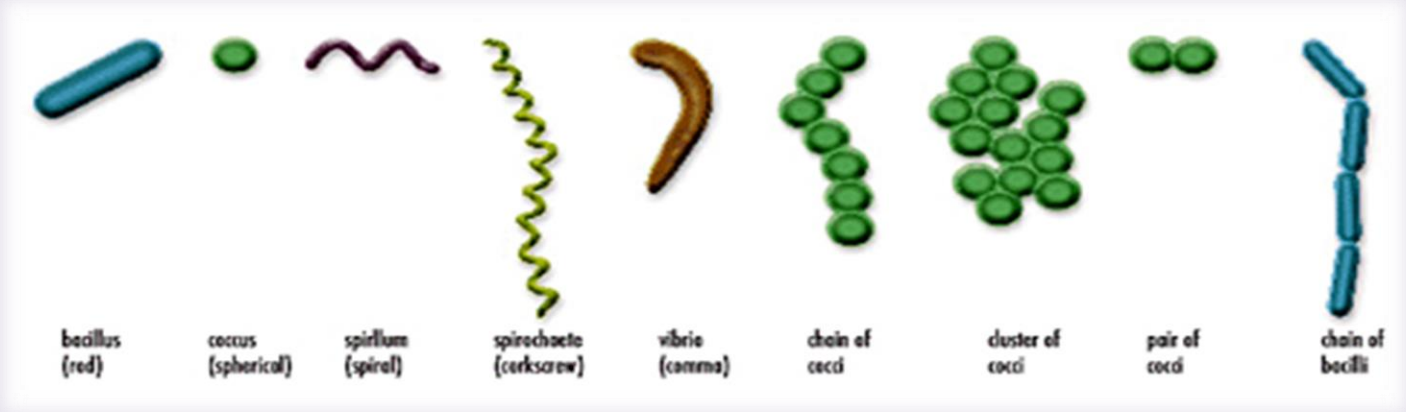
تعریف و اصطلاحات:

- **هتروتروف: مجموعه ای از باکتریهای هوازی یا بیهوازی اختیاری**

تامین کربن و انرژی خود را از ترکیبات آلی کربن دار

از جنسهای میکروکوکوس، باسیلوس، فلاو باکتریوم، پروتئوس، آنترو باکتر، آئروموناس، کلبسیلا، موراکسلا،

آلکالی ژنز، سیتروباکتر، پسودوموناس، سراشیا، اسینتوباکتر، استافیلو کوکوس، مایکو باکتریوم



- HPC (Plate count heterotrophic): **شمارش کلنی های تشکیل شده حاصل از رشد میکرو ارگانیسم های هتروتروفیک در یک محیط کشت**

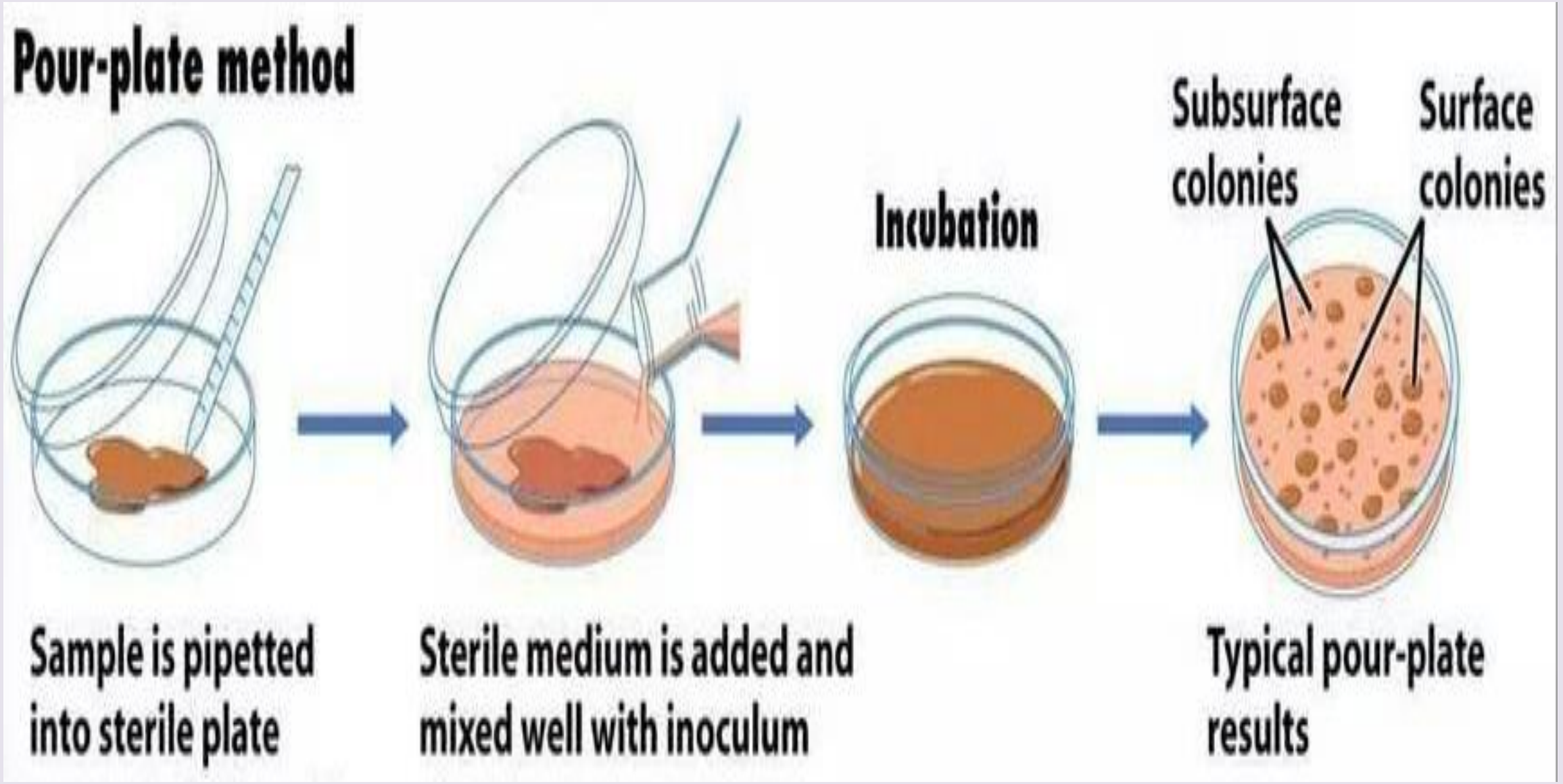
روشی است جهت اندازه گیری تعداد باکتری های هتروتروف زنده آب و قابل بررسی بودن تغییرات کیفی به هنگام تصفیه و توزیع آب و یا کیفیت آب استخر های شنا

- CFU (Colony forming unite): **واحدهای تشکیل دهنده کلنی و واحد شمارش HPC در هر میلی لیتر نمونه**

کلنی ها به صورت دوتایی، زنجیره ای ، خوشه ای یا منفرد

انواع روش کشت:

- **روش پخش بشقابی** (Pour plate method):
  - روشی ساده برای حجم های ۰/۱ تا ۱ میلی لیتر ازنمونه یا رقیق شده آن
  - تشکیل کلنی نسبتا کوچک و متراکم برعکس انواع کشت شده روی سطح و عدم تمایل به نزدیک شدن به یکدیگر
  - رشد کمتر کلنی های غوطه ور و دشوار بودن انتقال آن
  - حفظ دمای محیط کشت در حمام آب در دمای ۴۴–۴۶ درجه سلسیوس
  - احتمال بروز شوک حرارتی آنی و زودگذر برای دسته ای از باکتری ها در حمام آب

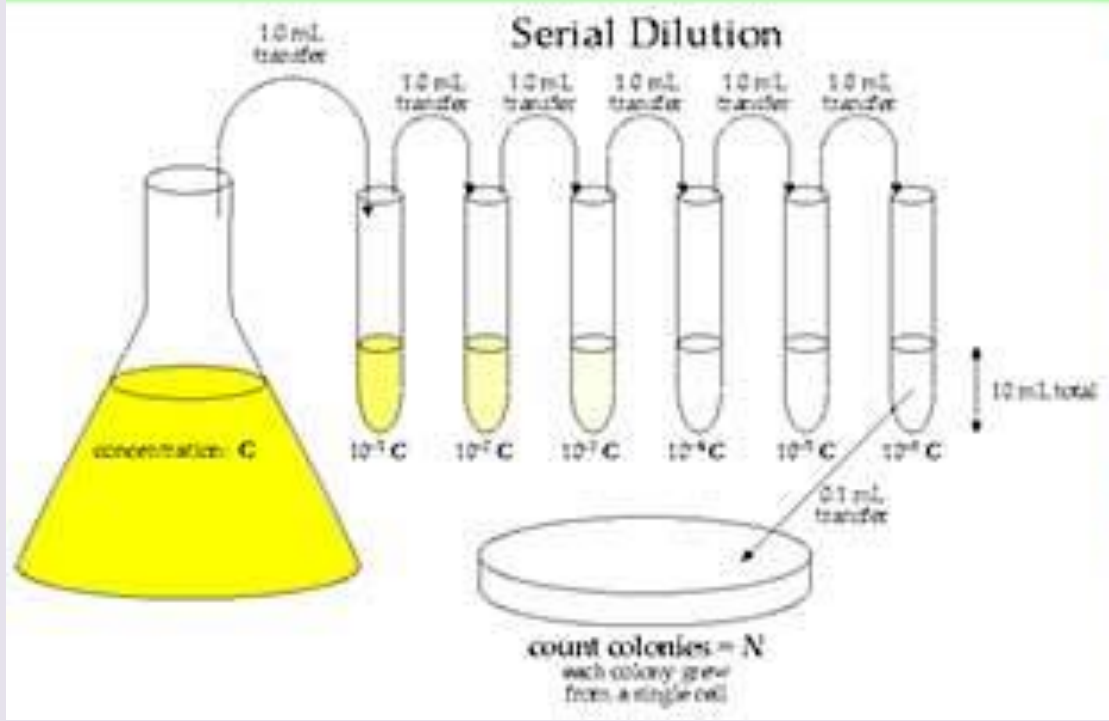

Pour-plate method
Incubation
Subsurface colonies
Surface colonies
Sample is pipetted into sterile plate
Sterile medium is added and mixed well with inoculum
Typical pour-plate results

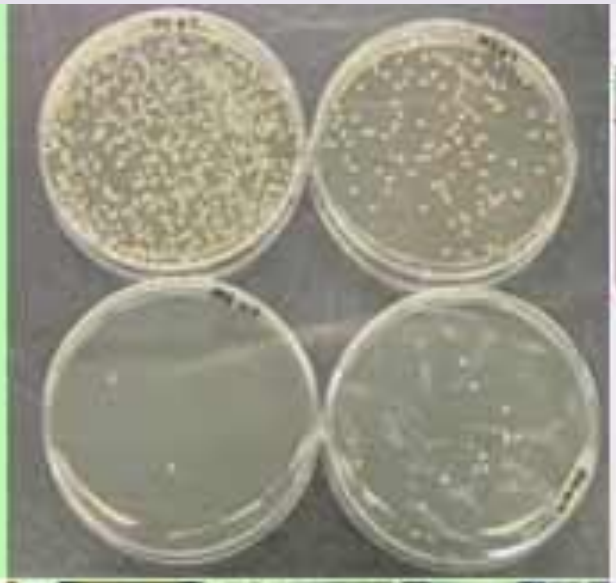
انواع روش کشت:

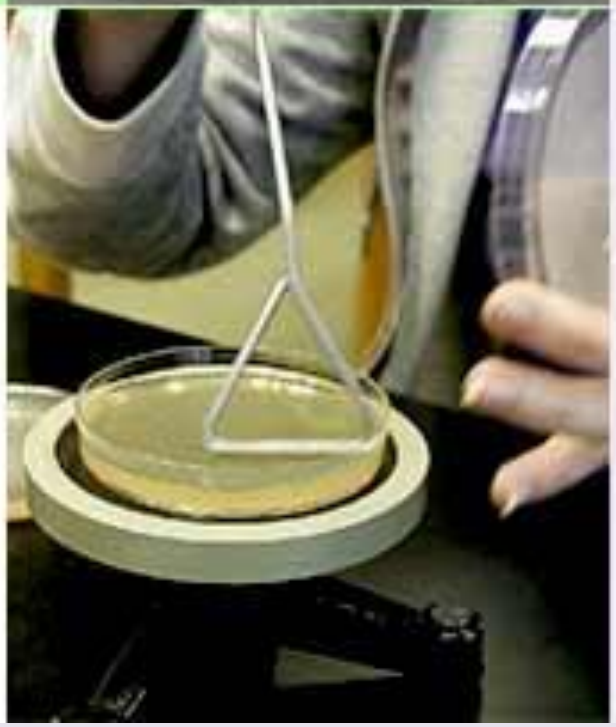
- **روش کشت سطحی**(Spread plate method):
  - روشی برای حجم های ۰/۱ تا ۱ میلی لیتر ازنمونه یا رقیق شده آن
  - متمایز بودن کلنی های روی سطح محیط کشت از دیگر ذرات و حباب ها ی هوا
  - جدا کردن آسان کلنی ها جهت انتقال
  - پلیت های آگار از پیش آماده و به تعداد کافی
  - عدم ایجاد شوک حرارتی برای باکتری ها

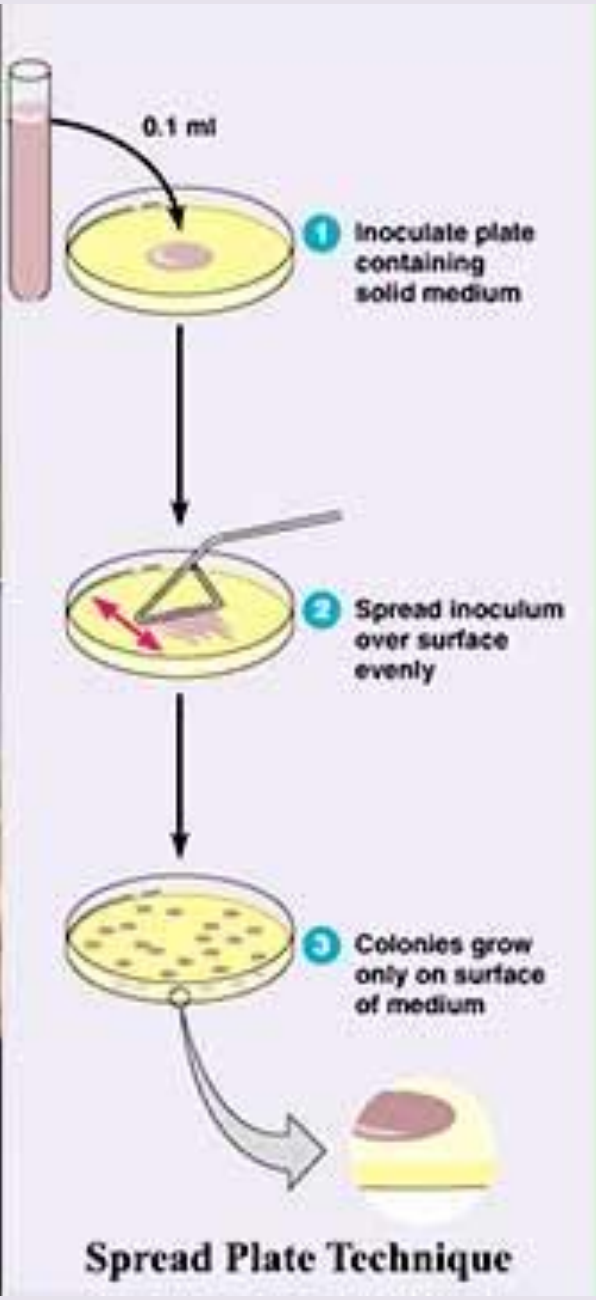
Spread Plate Technique

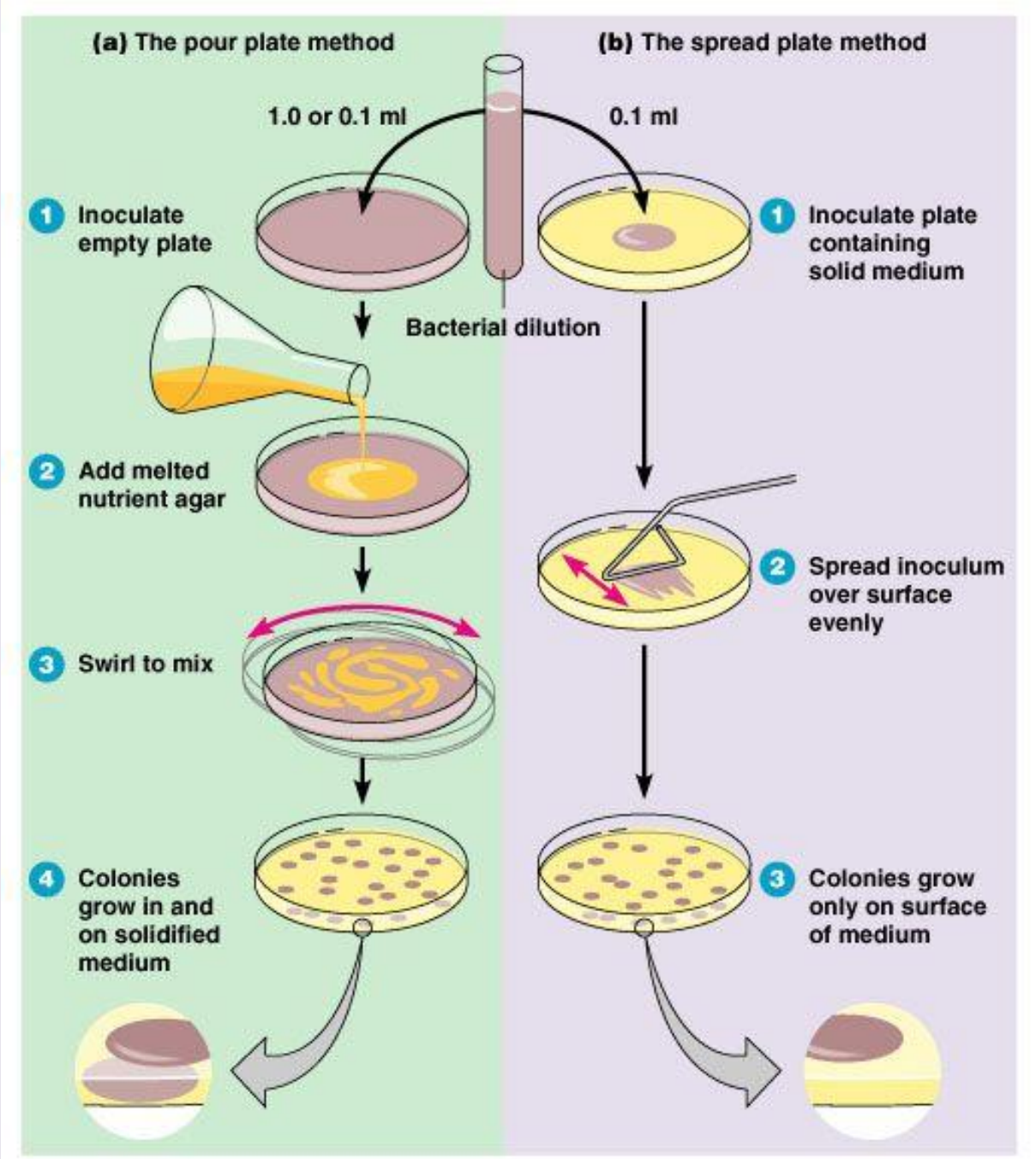
Principle, Procedure and Uses





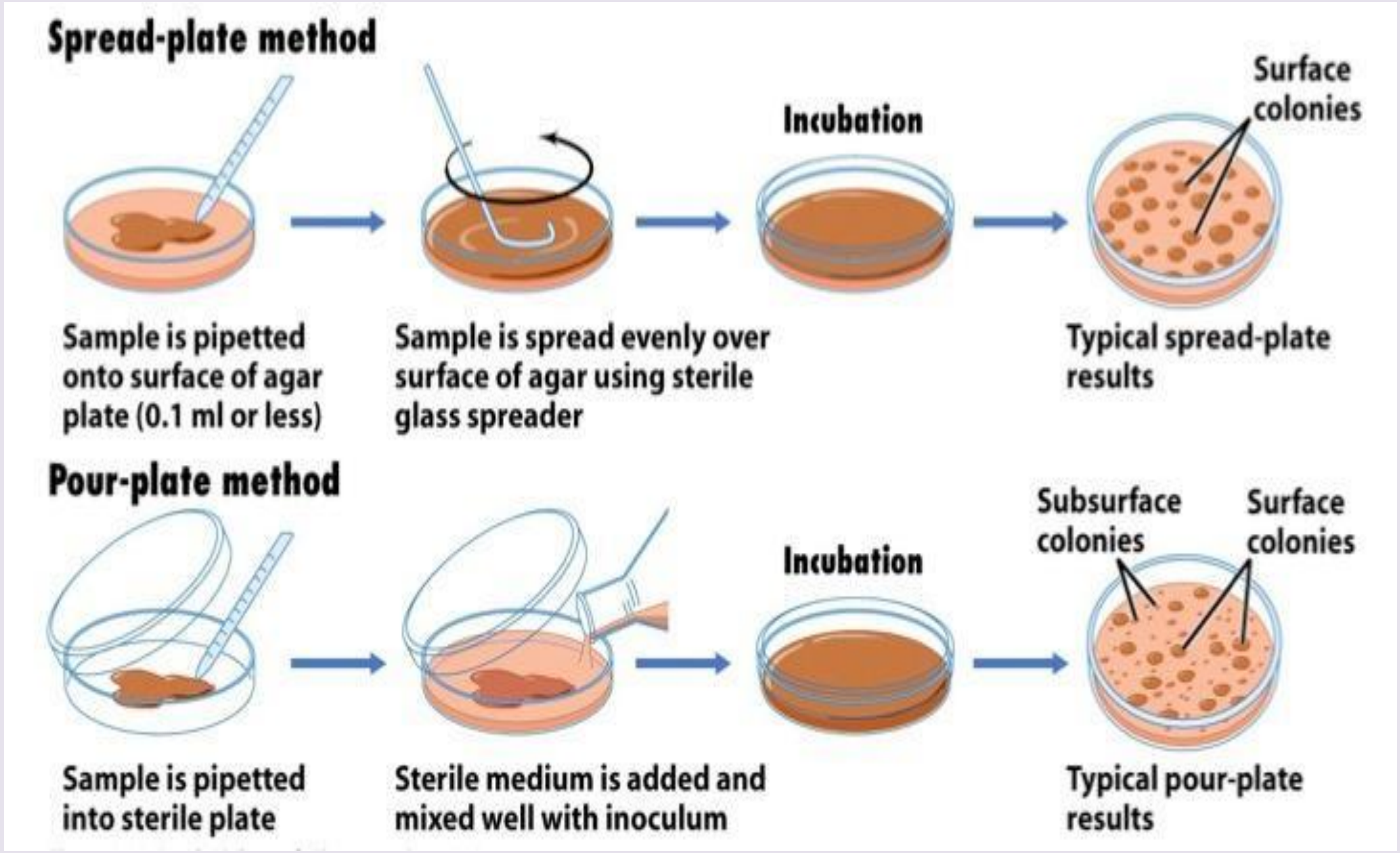






مقایسه روش کشت سطحی و عمقی

در باکترهای هترتروف


Spread-plate method
Incubation
Surface colonies
Sample is pipetted onto surface of agar plate (0.1 ml or less)
Sample is spread evenly over surface of agar using sterile glass spreader
Typical spread-plate results
Pour-plate method
Incubation
Subsurface colonies
Surface colonies
Sample is pipetted into sterile plate
Sterile medium is added and mixed well with inoculum
Typical pour-plate results

انواع روش کشت:

- **روش صافی غشایی**(Membrane Filter method):
  - **برای نمونه هایی با حجم زیاد و کدورت کم و آبهایی با احتمال شمارش کلنی کم**
  - **روش پر هزینه**
  - **عدم شوک حرارتی**
- **روش آنزیم سوبسترا**(Enzyme substrate):
  - **دامنه گسترده ای از تعداد باکتری ها در این روش**
  - **استفاده از یک محیط کشت با پایه سوبسترای آنزیمی**
  - **عدم شوک حرارتی**

شرایط محیط کار:

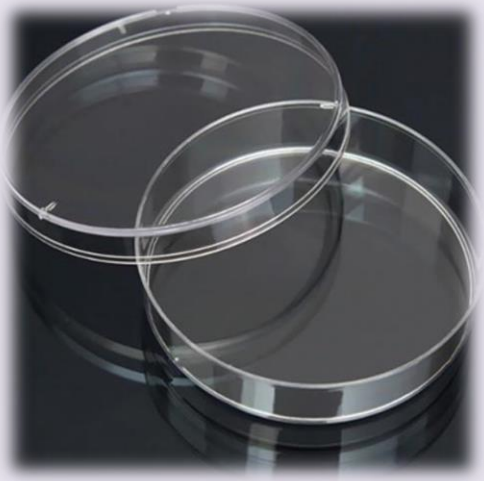
- اتاقی تمیز و عاری از ذرات و با نور مناسب
- میز یا سکو با سطح کافی و کاملا صاف و بدون منافذ ریز
- گندزدایی مناسب میز کار پیش از آغاز به کار جهت آزمایش

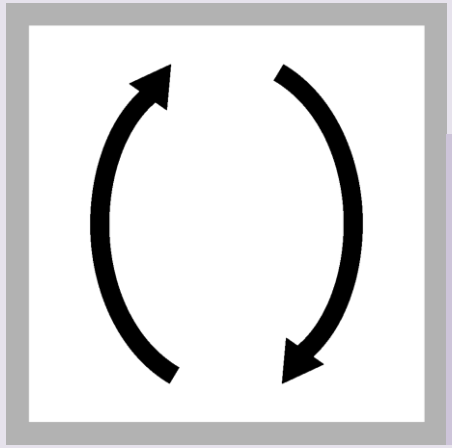
نمونه ها:

- انجام آزمایش در کمترین زمان پس از نمونه برداری و پیش از بروز تغییرات هرچند جزیی در جمعیت میکروبی
- مدت زمان مجاز بین نمونه برداری و انجام آزمایش **حداکثر ۸ ساعت** (انتقال به آزمایشگاه حداکثر۶ ساعت و ۲ ساعت جهت آماده سازی در آزمایشگاه)
- در صورت عدم انجام آزمایش ظرف مدت ۸ ساعت نگهداری نمونه ها در دمای زیر ۴ درجه سانتی گراد بدون یخ زدگی
- در هر صورت فاصل زمانی نمونه برداری تا انجام آزمایش **بیش از ۲۴ ساعت** نشود.

آماده سازی نمونه:

- ثبت شماره نمونه، میزان رقیق سازی نمونه ، تاریخ و هرگونه اطلاعات مورد نیاز
- آماده سازی حداقل دو پلیت برای هر حجم نمونه یا حجم رقیق شده
- استفاده از پلیت های شیشه ای (سطح ۶۵ سانتی متر مربع) یا پلیت یکبار مصرف (با سطح ۵۷ سانتی متر مربع)
- مخلوط نمودن ظرف محتوی نمونه ها یا حجم های رقیق سازی شده با تکان و حرکت های ممتد و سریع حدودا ۲۵ بار (از بالا به پایین و یا جلو به عقب)





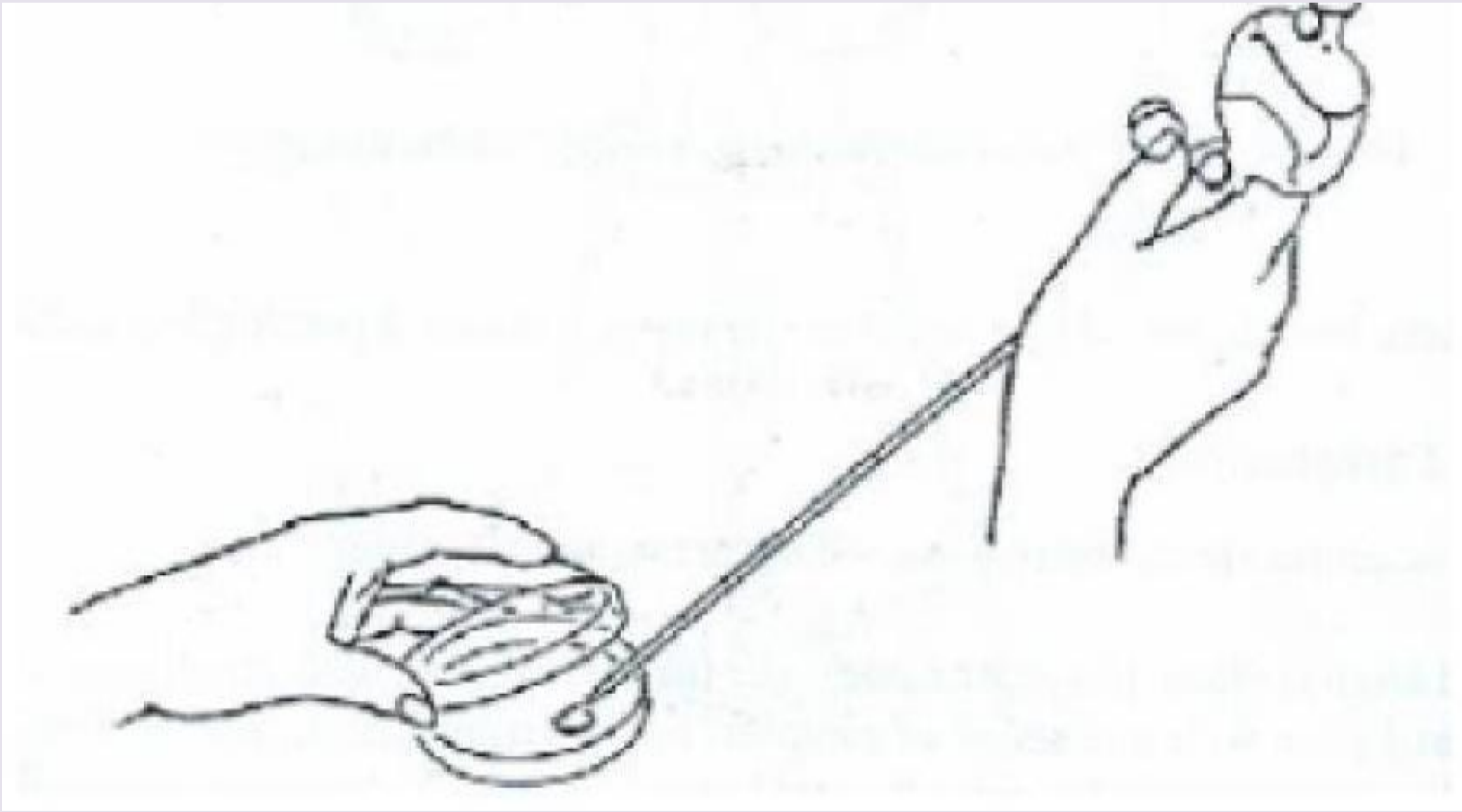
Invert the sample or the diluted sample for 30 seconds (25 times) to make sure that the sample is mixed well.

آماده سازی محیط کشت:

- محیط کشت R2A (آرتوآگار) برای هر سه روش کشت سطحی،بشقابی و غشایی
- تعداد کلنی بیشترنسبت به آگار های حاوی مواد مغذی (با وجود اینکه مواد مغذی کمتری دارد)
- حرارت دهی و استریل سازی آگار به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد (اتوکلاو)
- محیط کشت های آماده نیازی به تنظیم PH بعد از استریل سازی ندارد (۷/۲± ۰/۲)

نحوه برداشت نمونه برای کشت:

- استفاده از پیپت های استریل برای انتقال نمونه از ظرف نمونه برداری به پلیت ها (تعویض پیپت در صورت آلوده شده در حین کار و استفاده از پیپت مجزا برای برداشتن نمونه های با رقت متفاوت)
- دقت در آلوده نشدن نوک پیپت و عدم تماس با سطوح خارجی یا ظرف نمونه برداری در هنگام خارج کردن از ظروف
- به هنگام برداشت نمونه از ظرف پیپت بیشتر از ۲–۳ سانتی مترdر زیر سطح نمونه یا نمونه رقیق شده فرو نرود
- نگه داشتن پیپت با زاویه ۴۵ درجه نسبت به کف پلیت یا داخل گردن لوله های مخصوص رقیق سازی
- هنگام قرار دادن پیپت درب پلیت را به اندازه کافی بالا بگیرید.
- تخلیه پیپت حدود ۲ تا ۴ ثانیه تا مایع داخل پیپت از علامت ۱ میلی لیتر تا انتهای پیپت برسد



روش صحیح دردست گردن پیپت و برداشتن درب پلیت

نحوه برداشت نمونه برای کشت:

- چنانچه بخواهید ۰/۱ میلی لیتر ازنمونه رابرداشت کنید از پیپت های ۰/۱ میلی لیتر مدرج استفاده کنید در غیر اینصورت به شکل زیر رقیق سازی مرحله ای نمایید.

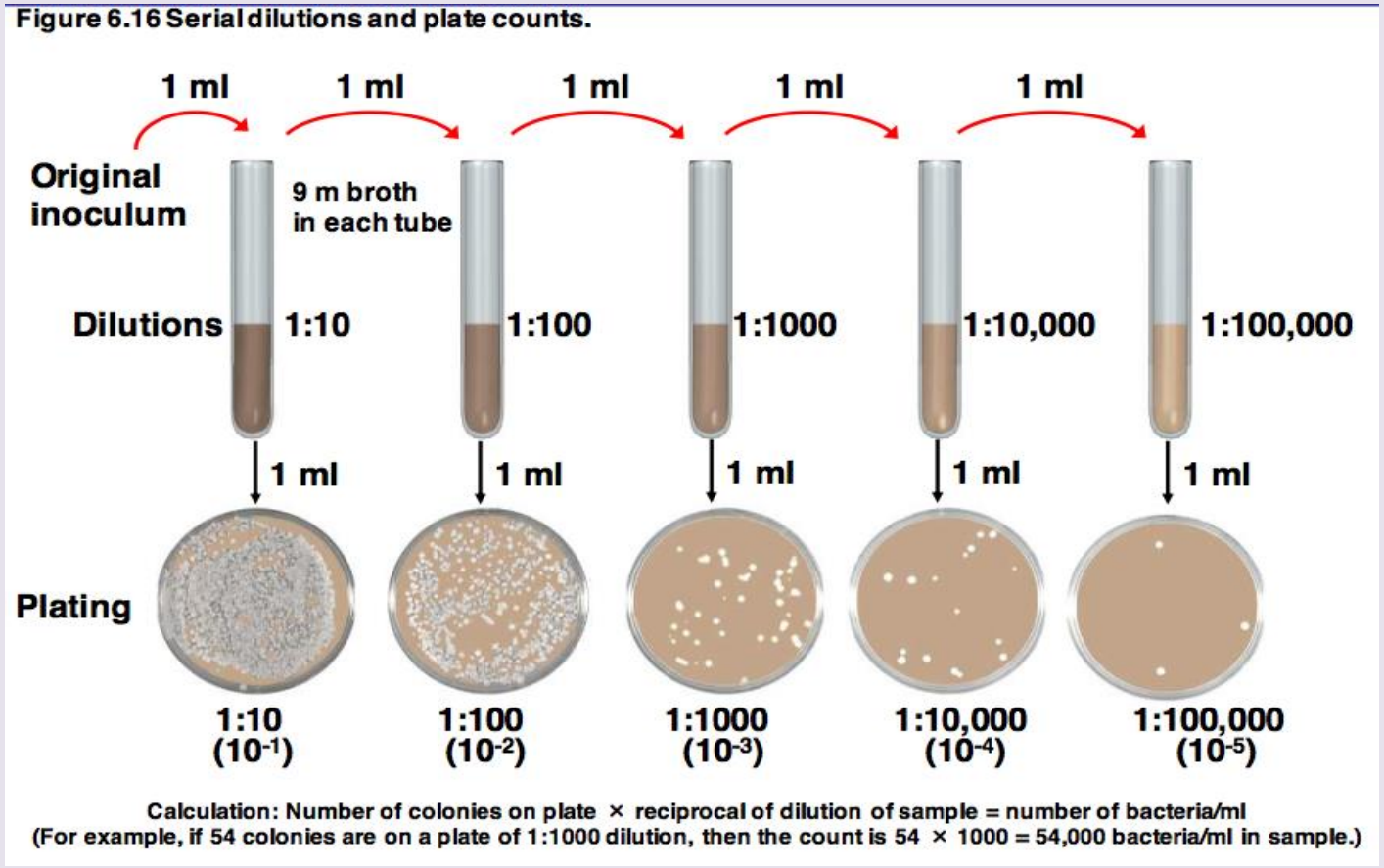


Figure 6.16 Serial dilutions and plate counts.

Calculation: Number of colonies on plate × reciprocal of dilution of sample = number of bacteria/ml
(For example, if 54 colonies are on a plate of 1:1000 dilution, then the count is 54 × 1000 = 54,000 bacteria/ml in sample.)

روش کشت بشقابی

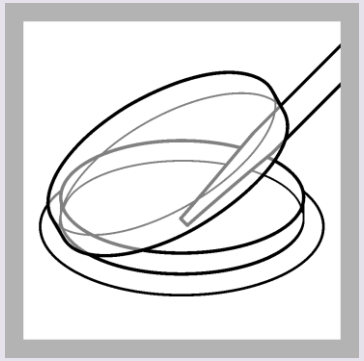
ذوب محیط کشت و پلیت گذاری

- ذوب کردن ظرف حاوی محیط کشت آگارجامد استریل را در حمام آب جوش یا به کمک بخار آب
- نگهداری محیط کشت ذوب شده در حمام آب گرم در دمای بین ۴۴–۴۶ درجه سانتی گراد تا آغاز عمل کشت و ترجیحا کمتر از ۳ ساعت

- کنترل دما به کمک دماسنج و عدم سنجیدن دمای محیط کشت هنگام ریختن با حس دست
- محیط کشت حین ذوب یا پس از آن بیش از اندازه متحمل گرما نگردد
- محیط کشت ساخته شده بیش از یکبار استریل نشود
- استفاده از محیط های کشت به همان ترتیبی که ذوب و آماده شده اند (به شرطی که آگار داخل ظرف کاملا به شکل مایع باشد)
- دور ریختن آگارهای مذاب که بخشی از آن بسته (راسب) شده است
- اجازه ندهید فاصله زمانی بین ریختن نمونه و افزودن محیط کشت در روش کشت بشقابی از ۲۰ دقیقه بیشتر شود.

پخش آگار درپلیت

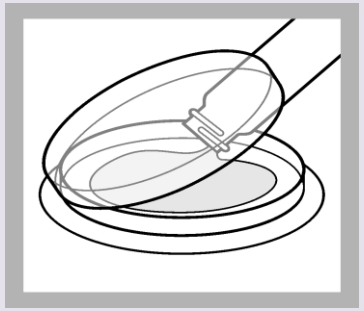
- آماده کردن پلیت های لازم به تعداد لازم برای کشت
- انجام فرآیند پخش آگار در پلیت ترجیحا کمتر از ۱۰ دقیقه
- برداشتن درب پلیت تا حدی که امکان ریختن محیط ذوب شده باشد
- ریختن حداقل ۱۰–۱۲ میلی لیتر محیط کشت مایع با دمای ۴۴–۴۶ درجه سانتی گراد
- مراقب باشید هنگام ریختن محیط کشت به لبه یا درب طرف نریزد
- خشک کردن سطح بیرونی ظرف یا لوله هایی که در حمام بخار هستندبه کمک یه کاغذ خشک کن یا توسط شعله ملایم



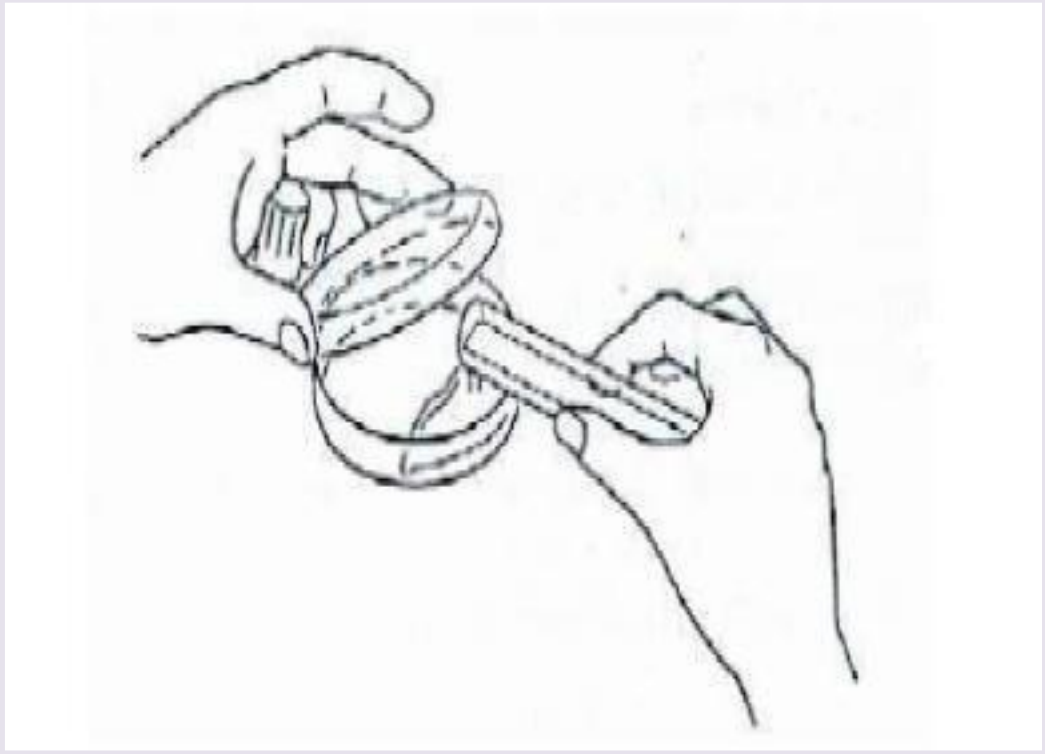
Use a pipet to add the sample (or dilution) to a sterile petri dish. Touch the pipet tip to the bottom of the petri dish and hold at a 45° angle as the pipet drains. Wait 2–4 seconds for the pipet to drain.

اختلاط داخل پلیت ها

- محیط کشت را ابتدا در یک جهت و سپس در جهت مخالف بچرخانید یا اینکه این کار را با گردش یا کج نمودن پلیت ها انجام دهید
- قرار دادن ظروف به مدت ۱۰ دقیقه در روی سطح صاف تا محیط کشت جامد شود

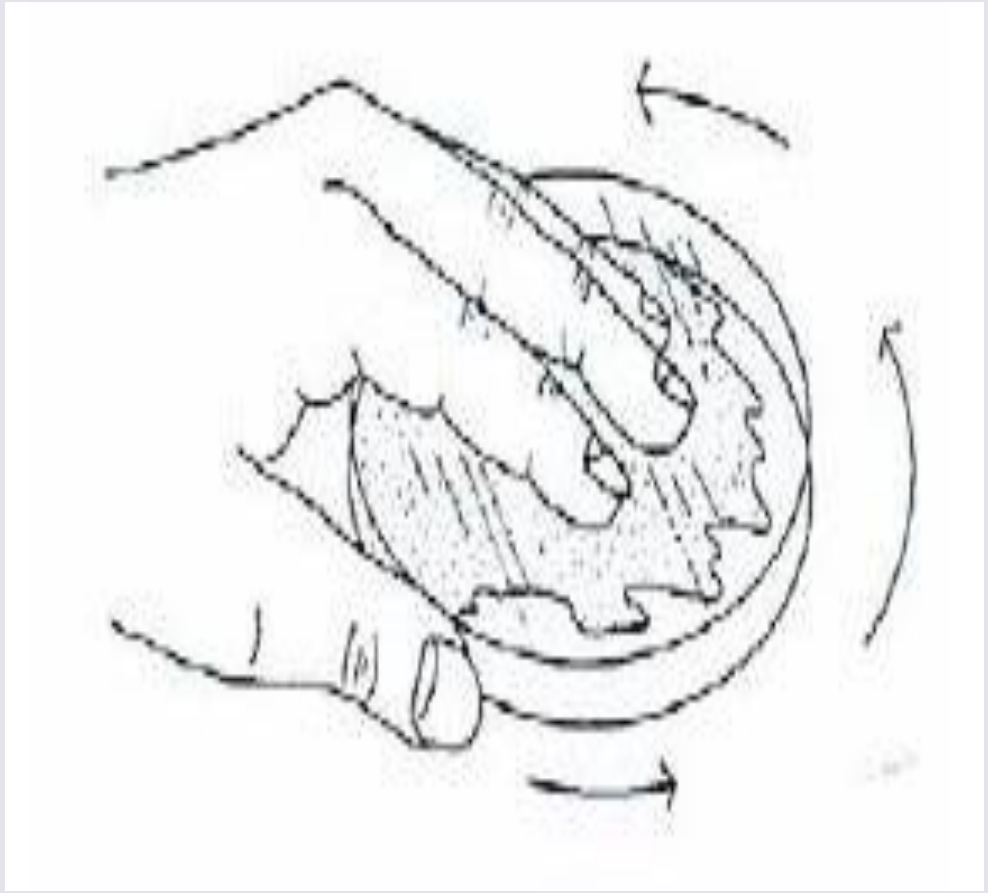


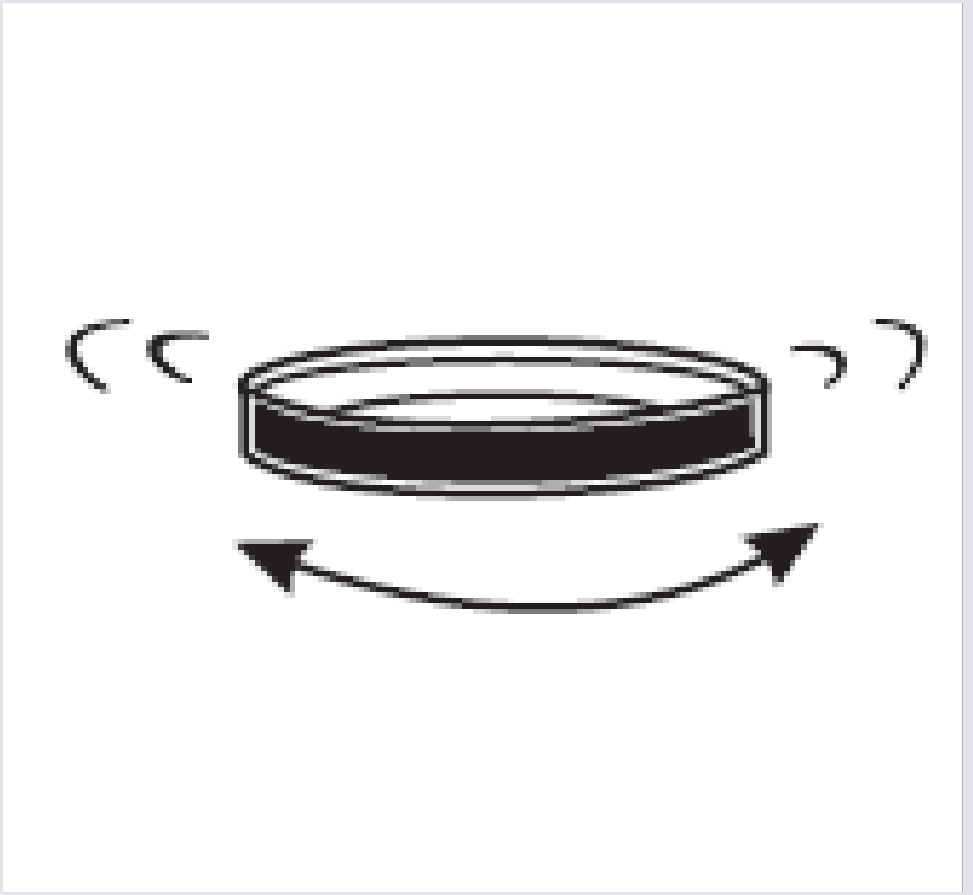
Pour half (10 to 12 mL) of the melted agar from one tube into the petri dish. Do not spill the agar. Close the lid.



روش صحیح اضافه نمودن

آگار مذاب به نمونه



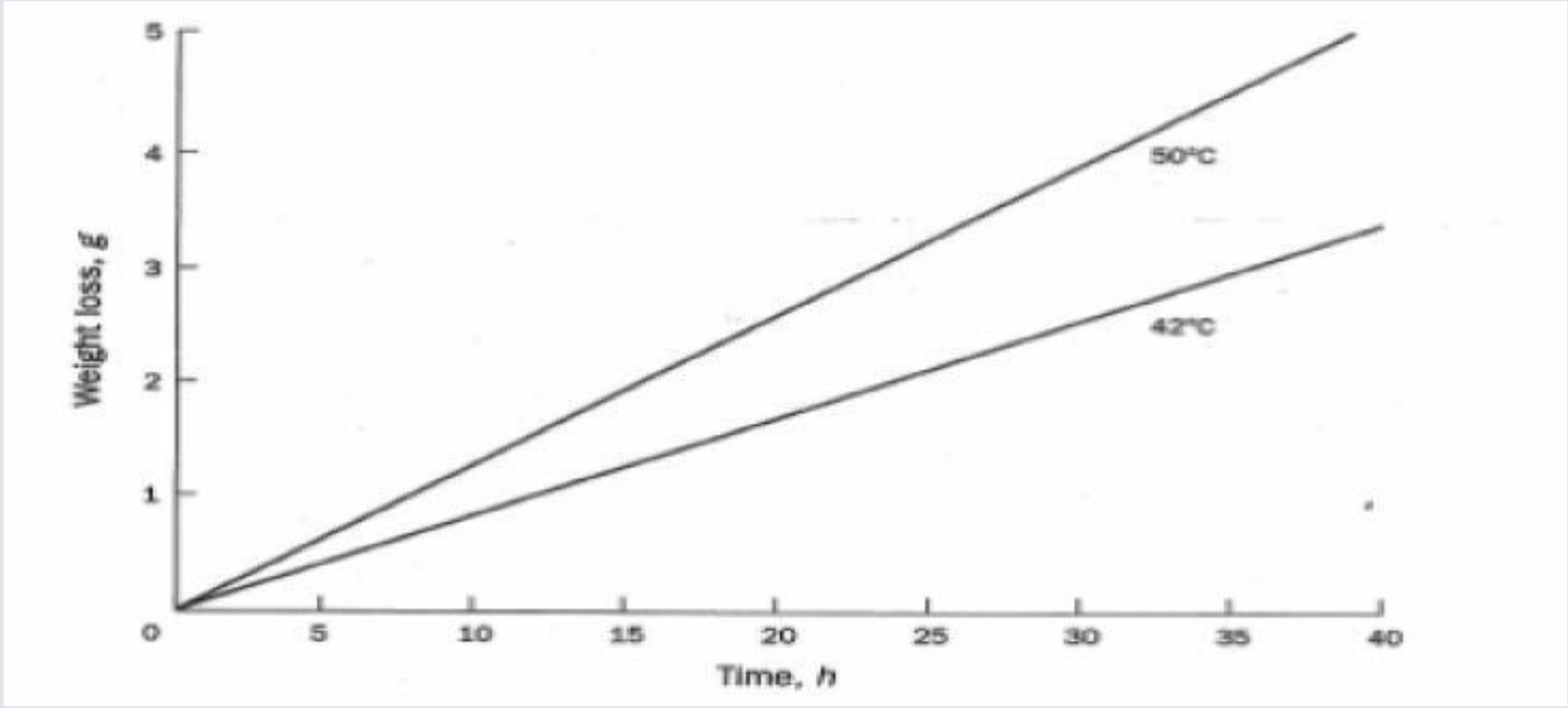


چرخش صحیح جهت اختلاط

روش کشت سطحی

آماده سازی پلیت ها

- ریختن ۱۵ میلی لیتر از محیط کشت به داخل پلیت های استریل
- اجازه دادن جهت بسته شدن کامل آگار و قرار دادن به صورت وارونه جهت خشک شدن
- استفاده بلافاصله پلیت های خشک شده یا نگهداری درکیسه های پلاستیکی در دمای ۴ درجه سانتیگراد حداکثر به مدت ۲ هفته
- **با گذشت یک شب ۲–۳ گرم آب از پلیت ها از دست میرود.**

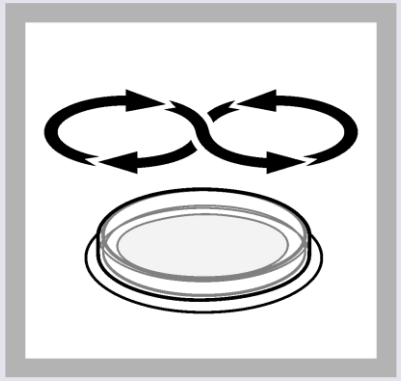


تغییرات وزنی ناشی از خشک شدن پلیت های درپوش دار و بر عکس شده واجد ۱۵ میلیلیتر اگار برحسب زمان در دماهای ۴۲ و ۵۰ درجه سلسیوس

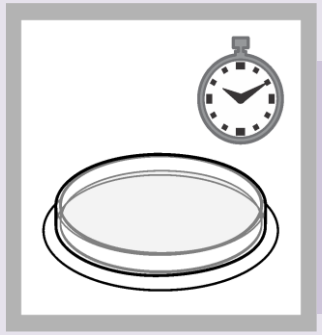
روش کشت سطحی

نحوه انجام آزمون

- حجم دلخواهی ازنمونه (۱ یا ۰/۱ میلی لیتر) به کمک پیپت مناسب کشیده و بر روی سطح آگار آماده شده در حالیکه پلیت توسط دست شما به جلو و عقب حرکت میکند بریزید.
- توسط میله شیشه ای ته خمیده استریل نمونه تلقیحی را در تمام سطح محیط کشت از طریق به چرخش در آوردن پلیت ها با دست پخش کنید و بعد از آن به هشت انگلیسی پلیت را حرکت دهید.
- اجازه دهید نمونه تلقیحی قبل از برعکس شدن پلیت ها و گرماگذاری به طور کامل جذب محیط کشت شود.



Move the petri dish in a figure-eight motion on a flat surface to mix the melted agar with the sample. Do not invert the petri dish.



Put the petri dish on a level surface. Wait approximately 10 minutes

کنترل استریل بودن محیط کشت

- جهت اطمینان از استریل بودن محیط کشت مورد استفاده و آب رقیق سازی نمونه هایی از آنها را در پلیت ریخته و به همراه سایر نمونه هادر انکوباتور قرار دهید.

انکوباسیون(گرما گذاری):

- قراردهی پلیت های در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور بعد ازکشت به صورت برعکس (توصیه میشود)
- قرار دهی پلیت ها در دمای ۲۰–۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۵ –۷ روز در انکوباتور بعد ازکشت به صورت برعکس

Invert the petri dish.

- نکات قابل توجه:

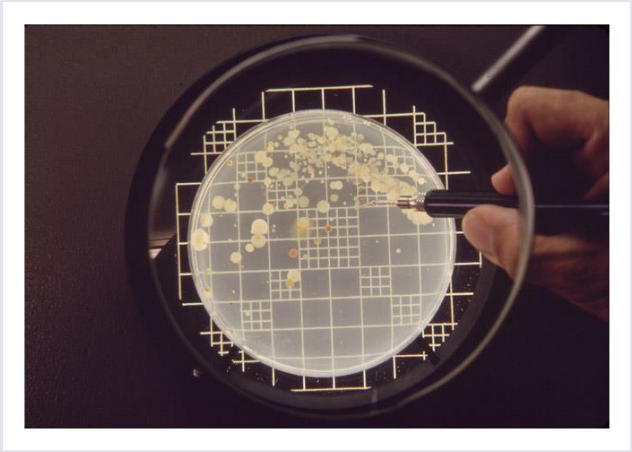
- تامین رطوبت داخل دستگاه انکوباتوردر طول مدت گرما گذاری جهت جلوگیری از خشک شدن و کاهش وزن پلیت ها به اندازه بیش از ۱۵ درصد وزن آنها
- قرار دادن ظرف آب داخل انکوباتور(به شرط آنکه صفحات فلزی و دیواره دستگاه از جنس استیل با درجه کیفیت بالا)

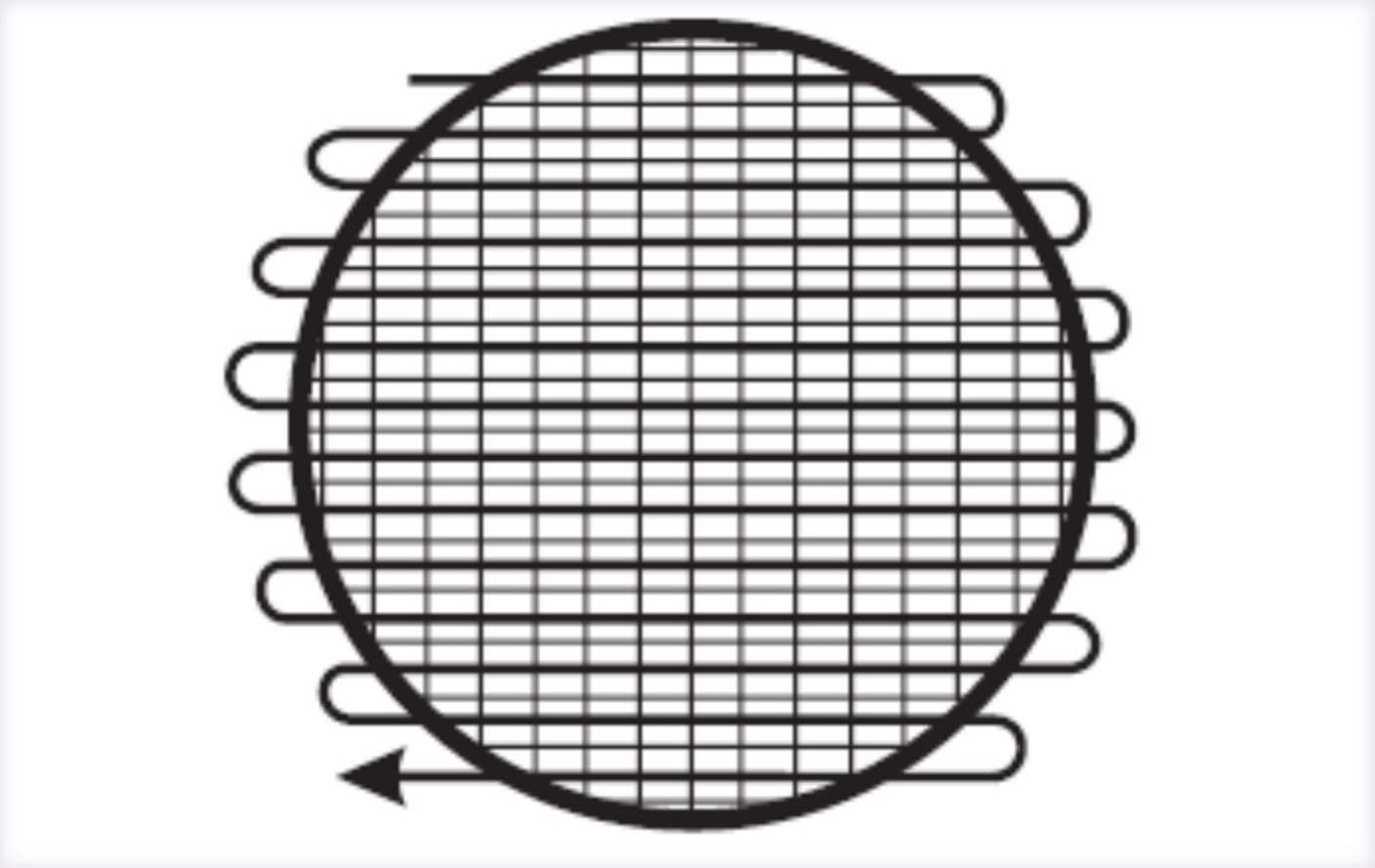
Invert the plates, place them in a plastic bag, and seal the bag. Place the bag in an incubator that has been prewarmed to 35 °C.

- بسته بندی پلیت ها در کیسه پلاستیکی در انکوباتورهای بدون رطوبت در دوره گرما گذاری طولانی

ثبت و شمارش نتایج

- قراردادن حداقل دو پلیت برای رقت های مختلف به طور مثال (۱ و ۰/۱ و ۰/۰۱ و ...)
- شمارش کلنی ها بلافاصله بعد از مدت زمان گرما گذاری (درصورت امکان پذیر نبودن نگهداری پلیت ها در دمای ۵–۱۰ درجه سانتیگراد حداکثر ۲۴ ساعت)
- شمارش نمونه های قابل قبول با استفاده از یک کلنی کانتر به صورت دستی
- دقت درانتخاب حجم برداشت شده توسط پیپت که حاصل آن تشکیل ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی باشد



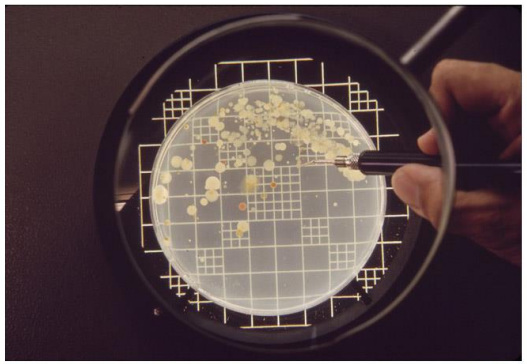


Report all counts as colony-forming units (CFU)/mL. Include in the report the method used, the incubation temperature and time, and the medium.
For example: 75 CFU/mL, pour plate method, 35 °C/48 hours, plate count agar.

ثبت و شمارش نتایج

- شمارش پلیت هایی که حاوی ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی می باشد
- شمارش باکتری در هر میلی لیتراز طریق فرمول زیر محاسبه میگردد:

$$\text{CFU/ML} = \frac{colonies\ counted}{actual\ volume\ of\ sample\ plated.\ ml}$$



ثبت و شمارش نتایج

- چنانچه جهت شمارش پلیت ها با کلنی های منتشر شونده مواجه شدید، فقط موقعی شمارش را انجام دهید که در منطقه شمارش، کلنی های منتشر شونده وجود نداشته باشند و کلنی هایی که قرار است شمارش شوند دارای توزیع خوبی باشند و هم چنین فضایی که کلنی های منتشر شونده اشغال کردند کمتر از نصف مساحت پلیت باشد.
- در صورتی که کلنی های منتشر شونده باید مورد شمارش قرار گیرد هریک از انواع زیر را به عنوان یک کلنی واحد درنظر بگیرید:

۱)زنجیره ای از کلنی ها که به نظر میرسد در نتیجه جدا شدن یک توده باکتری در هنگام مخلوط کردن آگار و نمونه است

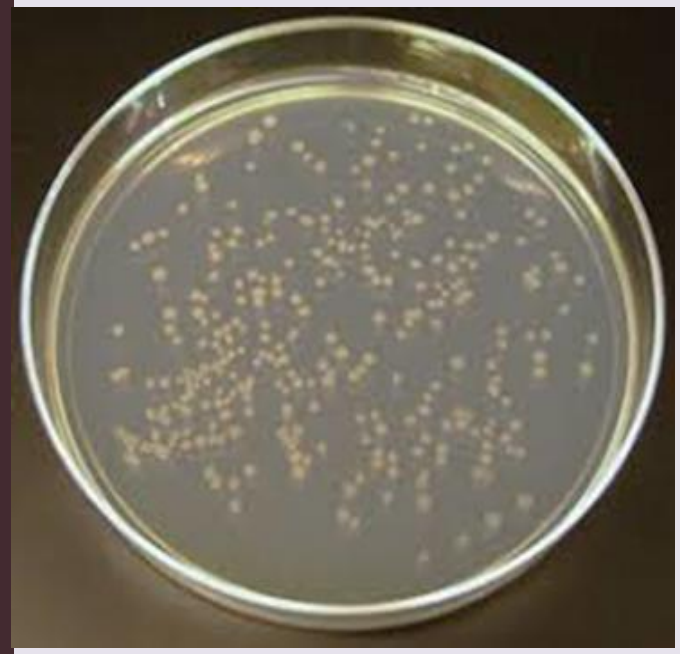
۲)کلنی هایی منتشر شونده که به شکل یک لایه نازک گسترش یافته یا در حد فاصل میان آگار و کف پلیت رشد نموده است

۳)کلنی هایی که در یک لایه نازک از آب در سطح یا کناره آگارتشکیل میشود

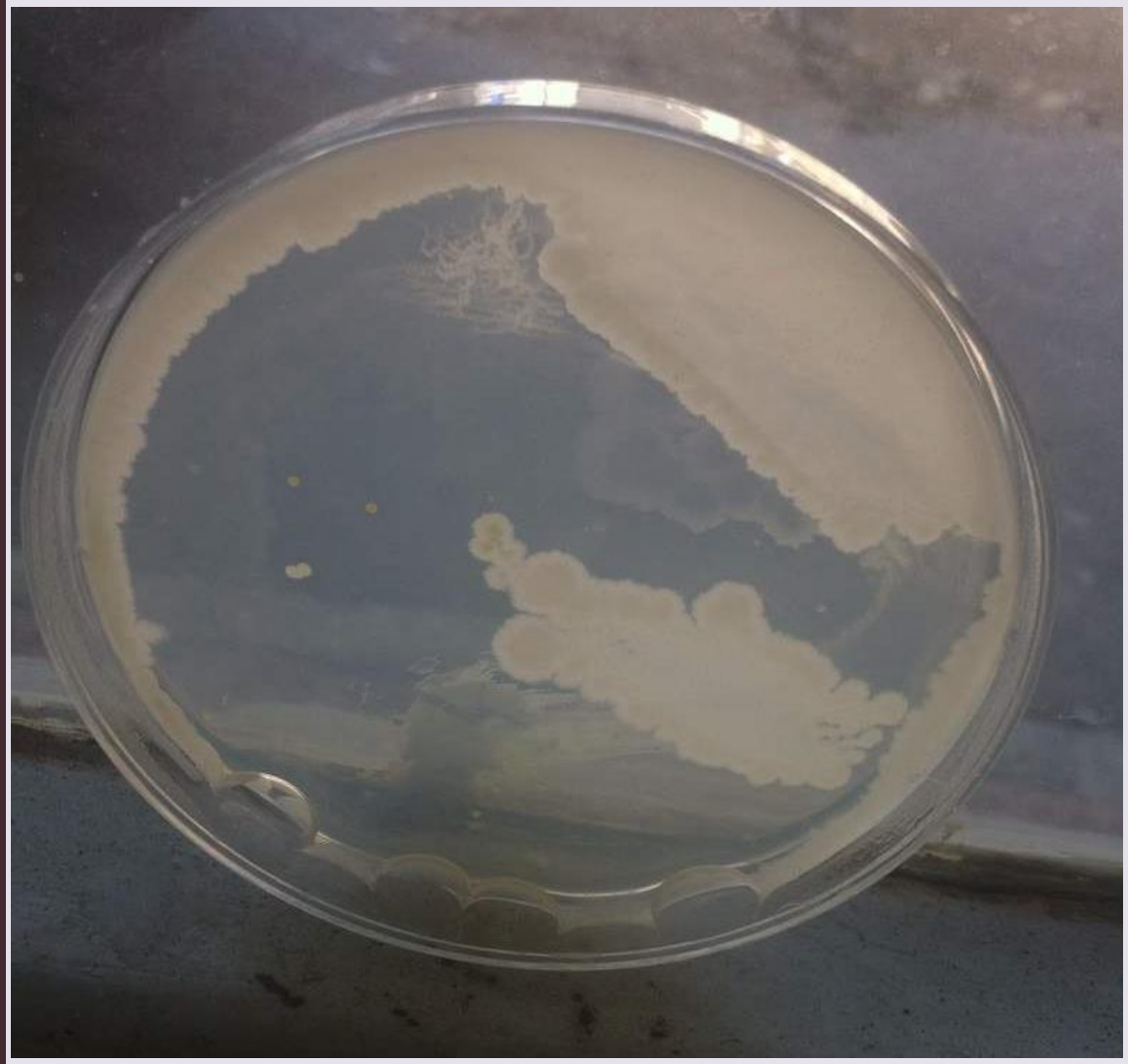
تجمع رطوبت در نقطه ای که انواع منتشر شونده از آن نقطه نشات میگیرد منجر به گسترش زیاد کلنی های ذکر شده اخیر میگردد. که اینگونه کلنی ها اغلب بیش از نیمی از پلیت را می پوشاند و عمل شمارش را دچار مشکل می سازد

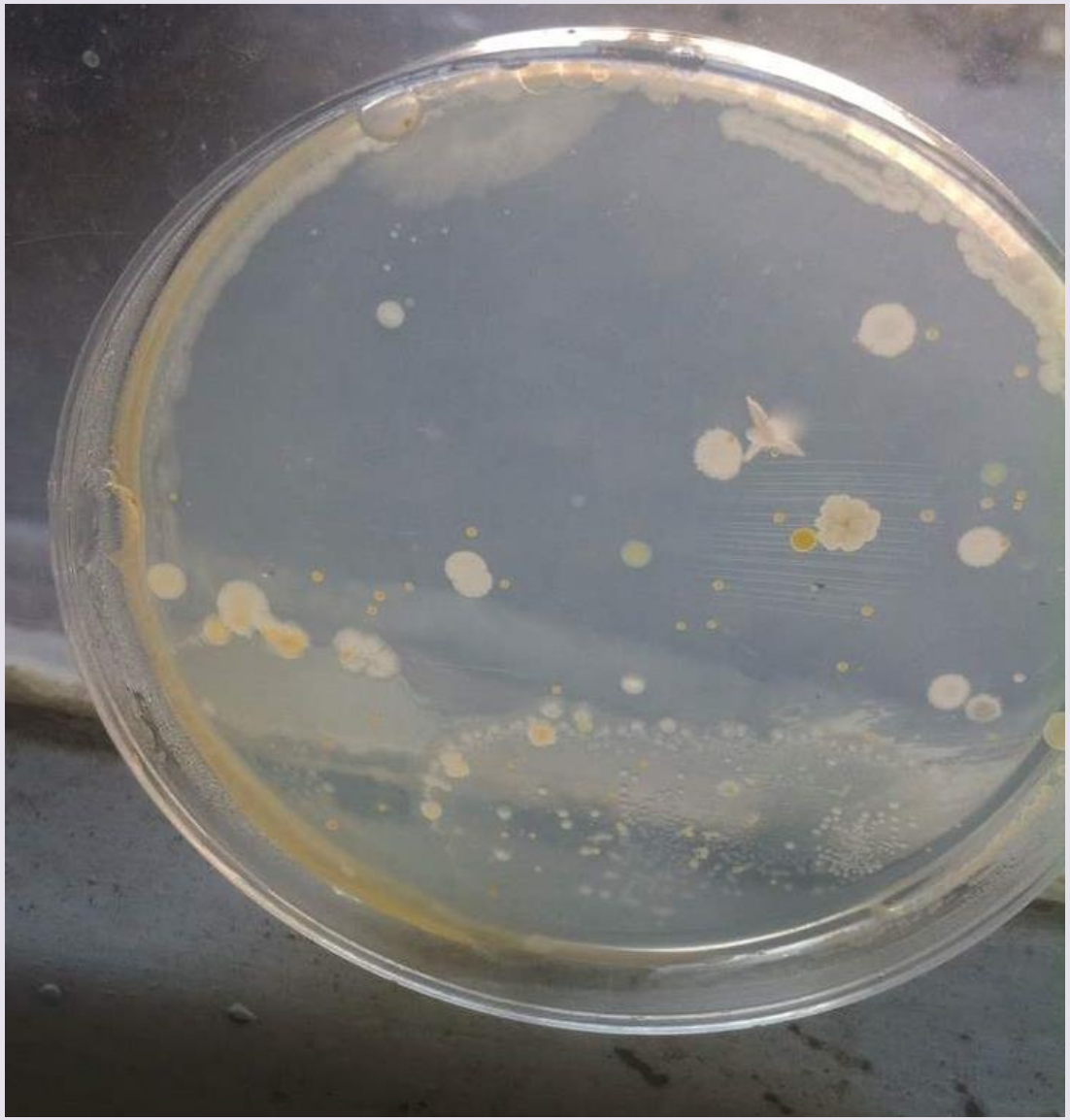
ثبت و شمارش نتایج

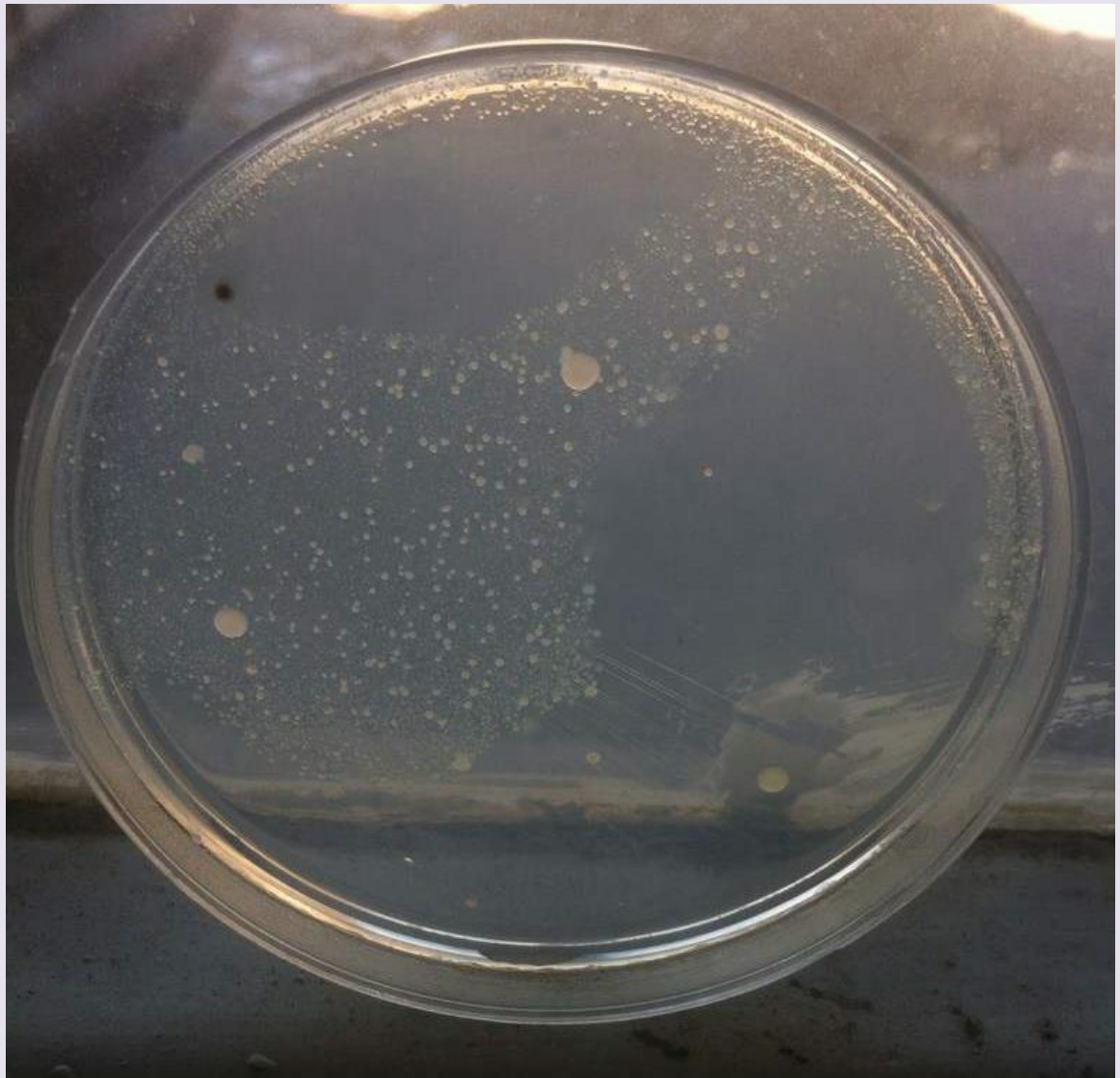
- برای شمارش کلنی ها ترجیحا کلنی های مستقل و مشابه و نزدیک به هم اما نه بهم چسبیده که فاصله بین آنها حداقل برابرقطر کوچکترین کلنی باشد را انتخاب کنید.
- کلنی های به هم چسبیده که از نظر شکل ظاهری و یا رنگ با هم متفاوت هستند به صورت کلنی مستقل شمارش میشوند.
- اگر پلیت ها دارای کلنی های منتشر شونده خیلی زیادی باشد نتیجه شمارش را به صورت spr (spreaders)گزارش کنید.
- چنانچه پلیت ها به دلایلی نظیر عدم آگاهی از میزان رقت یا ریختن غیر اصولی نمونه و یا به دلیل آلودگی غیر قابل شمارش باشند و یا محیط کشت شاهد علائمی از آلودگی نشان داد نتیجه را تحت عنوان L.A (Laboratory accident) یا خطای آزمایشگاهی گزارش نمایید.

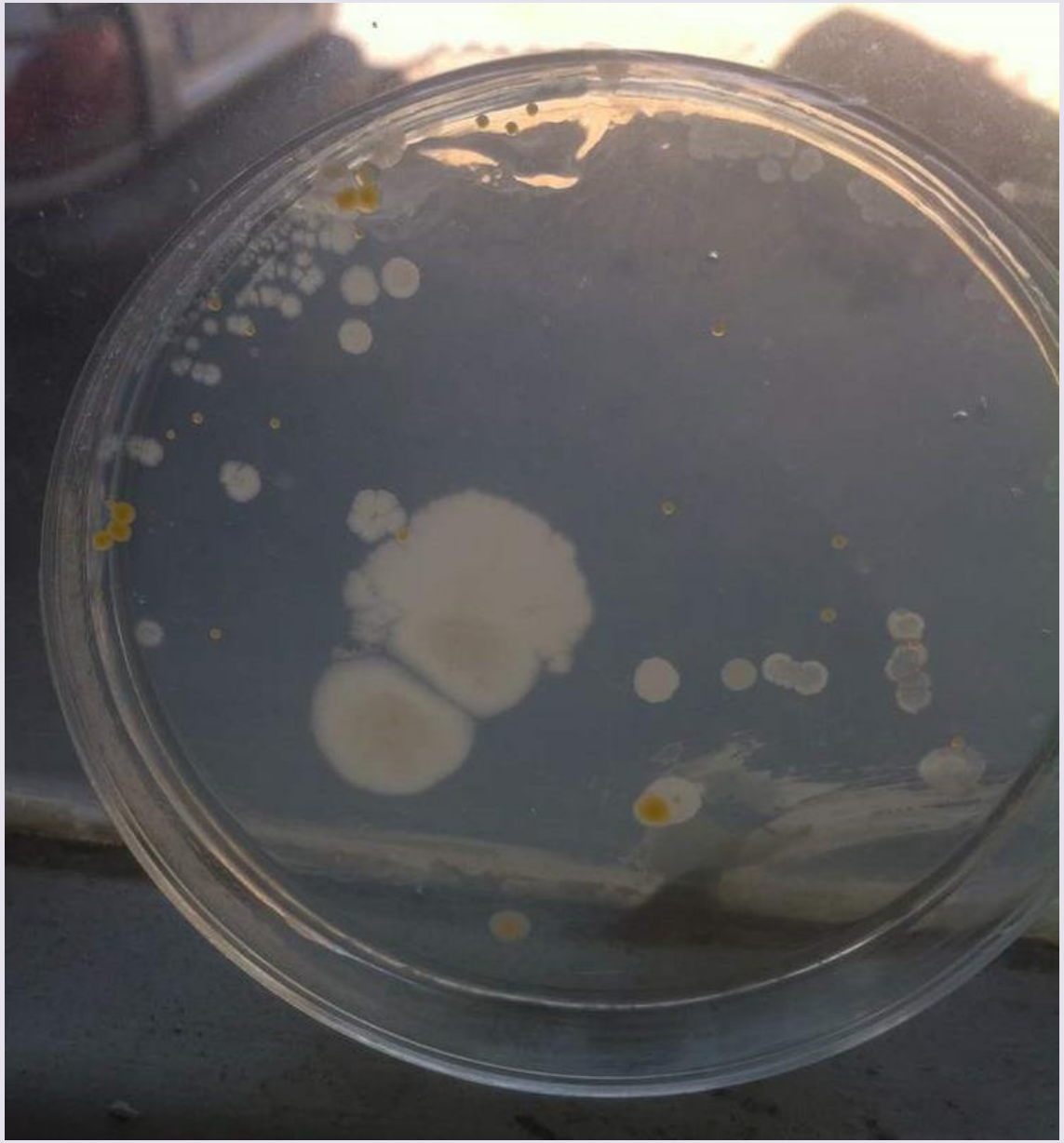


3
7
8
6
5
4
4
4
3
3
1
9
3
3
4
1
2
3
4
3





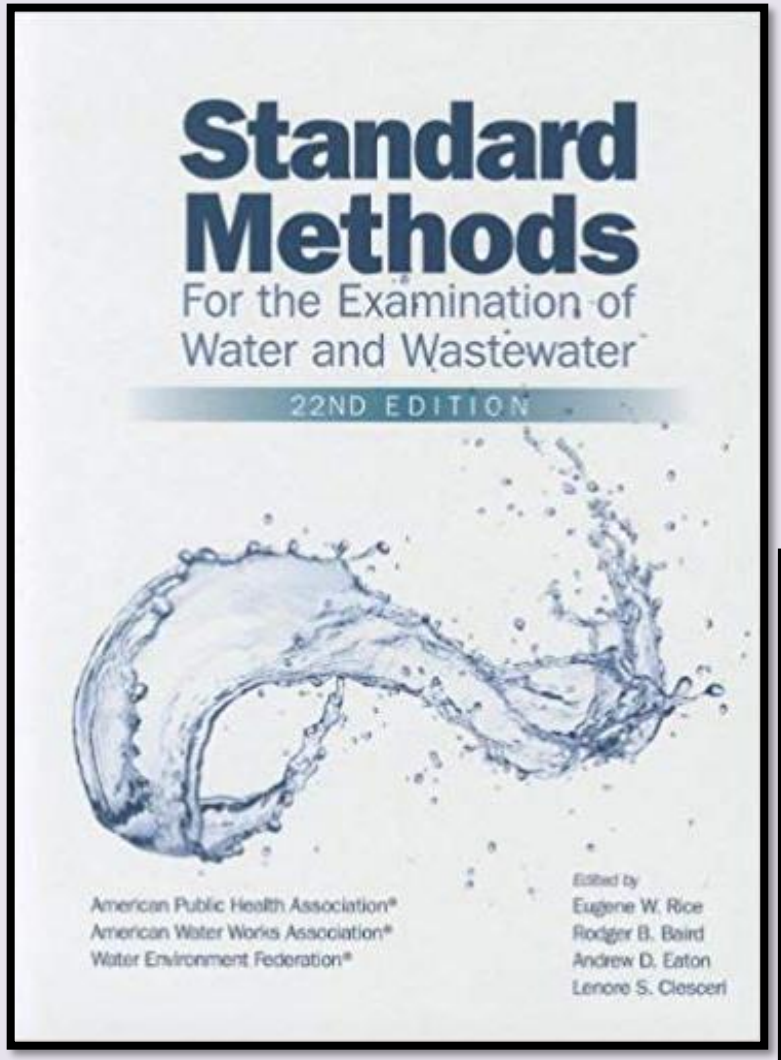




منبع:

- استاندارد متد ۲۰۱۲
- دستورالعمل شمارش باکتری های هتروتروف

(شرکت مهندسی آب و فاضلاب کل کشور)



سپاس از
توجه و همراهی شما