شرکت مهندسی آب و فاضلاب کشور

معاونت نظارت بر بهره برداری

# دستورعمل

# شمارش جمعیت میکروبی هتروتروف در آب

دفتر نظارت بر بهداشت آب و فاضلاب

ویراست نخست – پاییز ۱۳۸٤

## در تدوین این دستورعمل از منابع زیر استفاده شده است:


۱. American Water Works Association(۱۹۹۹)“Waterborne Pathogens”, AWWA Manual M٤٨

۲. Bartram J. ,Cotruvo J. , EXner M. , Fricker C. & Glasmacher A.(۲۰۰۲) “Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safty”, WHO,NSF,IWA

۳. Bitton G.(۱۹۹۹) “Wastewater Microbiology” Wiley Liss, Second edition
٤. Gleeson C.& Gray N.(۱۹۹۷) “The Coliform Index and Waterborne disease” , E & FNSPON
٥. Moria Csuros & Cfaba Csuros(۱۹۹۹) “Microbiological Examination of Water & Wastewater” , Lewis
٦. Report of an Expert Meeting(۲۰۰۲) “Heterotrophic Plate Conut Measurement in Drinking Water Safty Management” , WHO , Geneva
۷. World Health Organization(۲۰۰٤) “ Guidelines for Drinking Water Quality”, Vol. ۱ ,WHO , Geneva
۸. موسسه استاندارد تحقیقات صنعتی ایران به آب (شمارش به گیروارگانیسم‌های قابل کشت) استاندارد شماره‌ی ۵۲۷۱-۸

## اعضای کمیته‌ی تخصصی بهداشت آب و فاضلاب شهری

**مجید قنادی**
کارشناس‌ارشد مهندسی بهداشت محیط
مدیر دفتر نظارت بر بهداشت آب و فاضلاب کشور
شرکت مهندسی آب و فاضلاب کشور

| | |
|---|---|
| **سید سعید تاج** | کارشناس‌ارشد مهندسی عمران محیط زیست<br>کارشناس دفتر نظارت بر بهداشت آب و فاضلاب<br>شرکت مهندسی آب و فاضلاب کشور |
| **محمد حسن ربیعی راد** | کارشناس‌ارشد میکروبیولوژی<br>مدیر کنترل کیفیت و بهداشت آب و فاضلاب<br>شرکت آب و فاضلاب اهواز |
| **رقیه نیک مرام** | کارشناس شیمی<br>مدیر کنترل کیفیت و بهداشت آب و فاضلاب<br>شرکت آب و فاضلاب آذربایجان شرقی |
| **سیدمحمد سیدخادمی** | کارشناس میکروبیولوژی<br>مدیر کنترل کیفیت و بهداشت آب و فاضلاب<br>شرکت آب و فاضلاب گلستان |
| **سهیل امیری** | کارشناس‌ارشد مهندسی شیمی<br>مدیر کنترل کیفیت و بهداشت آب و فاضلاب<br>شرکت آب و فاضلاب غرب استان تهران |
| **هادی اشرف زاده** | کارشناس بهداشت محیط<br>مدیر کنترل کیفیت و بهداشت آب و فاضلاب<br>شرکت آب و فاضلاب خراسان رضوی |
| **غلامرضا احمری** | کارشناس شیمی<br>مدیر کنترل کیفیت و بهداشت آب و فاضلاب<br>شرکت آب و فاضلاب مرکزی |

# اصطلاحات

**Pour plate :** روشی از کشت میکروبی است که در آن آگار مذاب با نمونه‌ی مایع(نظیر آب)مخلوط و همگن **می‌شود .**

**SPREAD PLATE** : روشی برای کشت میکروبی است که در آن نمونه‌ی مایع بر روی سطح محیط کشت جامد به طور یکنواخت پخش **می‌شود**

**HPC (HETEROTROPHIC PLATE COUNT) :** شمارش کلنی های تشکیل شده حاصل از رشد میکروارگانیسم‌های هتروتروف در یک محیط کشت جامد

**هتروتروف:** گروهی از ارگانیسم‌ها که برای رشد به کربن آلی نیاز دارند و یا از ماده‌ی آلی کربن دار به عنوان منبع غذایی استفاده **می‌کنند**.

**CFU (COLONY FORMING UNIT) :** واحدهای تشکیل دهنده‌ی کلنی و واحد شمارش HPC است که در هر میلی لیتر نمونه وجود دار.د

**TNTC (TOO NOMERATE TO COUNT) :** بیش از حد قابل شمارش

**LA (LABORATORY ACCIDENT) :** خطای آزمایشگاهی

**SPR (SPREADERS) :** کلنی هایی از میکروارگانیسم که به صورت گسترده بر روی سطح آگار ایجاد **می‌شوند**

**AWWA (American Water Works Association ) :** انجمن کارهای آبی ایالت متحده

**AOC (Assemble Organic Carbon)**: کربن آلی قابل جذب

# فهرست مطالب


تعریف و اهمیت **HPC** ---------- ٥
رشد میکروبی در آب ---------- ٦
کاربرد **HPC** در مدیریت آب ---------- ٦
موارد مهم کاربرد **HPC** در مدیریت آب ---------- ٧
شمارش میکروارگانیسم های هتروتروف ---------- ٧
انتخاب روش ---------- ٨
**PourPlate** ---------- ٨
**Spread plate** ---------- ٨
**Membrane filter** ---------- ٨
محل کار ---------- ٩
نمونه برداری ---------- ٩
آماده سازی نمونه ها ---------- ٩
محیط کشت ---------- ٩
**Plate Count Agar** ---------- ٩
**mHPC Agar** ---------- ١٠
**R٢A Agar** ---------- ١٠
**(HPCA) NWRI Agar** ---------- ١٠
انکوباسیون (گرماگذاری) ---------- ١٠
شمارش و ثبت نتایج ---------- ١١
محاسبه و گزارش نتیجه ی آزمایش ---------- ١٣
مراحل انجام آزمایش **HPC** ---------- ١٣
وسایل و مواد ---------- ١٣
تهیه ی محیط کشت ---------- ١٤
آماده سازی آگار ---------- ١٤
آماده سازی رقت ---------- ١٥
آماده سازی پلیت ---------- ١٦
روش کشت سطحی ---------- ١٩
وسایل و مواد ---------- ١٩
آماده سازی پلیت های حاوی محیط کشت آگار ---------- ١٩
روش انجام آزمایش ---------- ١٩

## تعریف و اهمیت HPC

اصطلاح هتروتروف به میکروارگانیسم‌هایی گفته می‌شود که برای رشد نیاز به کربن آلی دارند. این میکروارگانیسم‌ها انواعی از باکتری‌ها، مخمرها وکپک‌ها را شامل می‌شود.

آزمایش‌های مختلفی بر پایه‌ی کشت ساده برای بازیافت این دسته از میکروارگانیسم‌ها از آب در نظر گرفته می‌شود که به مجموع آن‌ها شمارش میکروارگانیسم‌های هتروتروف و یا HPC اطلاق می‌گردد. بنابر این واژه‌های HPC و هتروتروف مترادف نمی‌باشند .

باکتری‌های هتروتروف، مجموعه‌یی از باکتری‌های هوازی- بی‌هوازی اختیاری هستند که به جز دو جنس آن (Microcoucus و Bacillus) بقیه گرم منفی بوده و جنس‌های Aeromonas ، Klebsiella ، Flavobacterium، Proteus ، Enterobacter ، Moraxella ، Alcaligenes ، Citrobacter ، Pseudomonas، Serratia و Acinetobacter را شامل می‌شوند. جنس‌های غالب این مجموعه، باکتری‌های Enterobacter ، Flavobacterium ، Pesudomonas ، Serratia و Acinetobacter هستند. علاوه بر جنس‌های یاد شده، برخی از باکتری‌های مهم در پزشکی نظیر Mycobacterium،Staphylococcus و Serratia نیز در ترکیب باکتری‌های هتروتروف ممکن است حضور داشته باشند.

باکتری‌های هتروتروف ساکن طبیعی بدن انسان و حیوانات هستند و از طریق مدفوع دفع می‌شوند. برگ درختان، خاک، آب، قطره‌های باران و حتی بزاق دهان نیز تعداد معتنابهی از این باکتری‌ها را در خود جای داده‌اند. هر اینچ مربع از پوست سالم انسان، میزبان صدها هزار باکتری‌های هتروتروف است. این باکتری‌ها در بسترهای کربن فعال، رزین‌ها، صافی‌های ماسه‌یی و غشایی، شبکه‌های توزیع و اجزای آن، خنک‌کننده‌ها، مخازن تحت فشار و حتی جدار بطری‌های آب وجود داشته و اثر ناشی از تغییر جمعیت آن‌ها بر کیفیت آب و تأسیسات آب رسانی با ضریب ۱۰ تغییر می‌کند.

روش یکسان شده‌ی جهانی برای شمارش HPC وجود ندارد. روش شمارش HPC شامل انواع وسیعی از حالت‌های مختلف آزمایش است که نتایج متنوع کمی و کیفی را تولید می‌کند. دامنه‌ی دمای آزمایش از۲۰ تا ٤٠ درجه‌ی سیلسوس و زمان انکوباسیون از چند ساعت تا ۷ روز متغیر است .

شرایط تغذیه‌ای نیز از حالت‌های کم تا مقادیر بالای مواد غذایی متفاوت می‌با شند. تنها بخشی از میکروارگانیسم‌های فعال می‌توانند در شرایط خاص تنظیم شده برای آزمایش HPC رشد کرده و تشخیص داده شوند .

به طور کلی تعداد شمارش شده‌ی باکتری‌های هتروتروف به نوع محیط‌کشت، زمان و دمای انکوباسیون و سرانجام روش کشت بستگی داشته و با افزایش دما و زمان انکوباسیون، تعداد شمارش شده‌ی آن‌ها افزایش می‌یابد. تعداد این باکتری‌ها در شبکه‌های توزیع بنابر نظر Bitton(۱۹۹۹) از کمتر از ۱۰ تا بیشتر از $۱۰^{٤}$ کلنی در هر میلی‌لیتر و بر پایه‌ی اعلام انجمن کارهای آبی ایالات متحده (AWWA) تا $۱۰^{٥}$ cfu/mL متغیر است.

## رشد میکروبی در آب

مـیکروارگانیسم‌ها معمولا در آب وسطوح مرتبط با آب در حالت بیوفیلم (لایه ی زیستی) رشد می‌کنند. به رشد میکروارگانیسم‌ها در آب آشامیدنی تصفیه شده "رشد مجدد" گفته می‌شود. به طور کلی مواد غذایی مورد نیاز باکتری‌ها به ویژه کربن آلی قابل جذب(AOC)، عامل محدود کننده‌ی رشد میکروبی در شبکه‌های آب شهری محسوب شده و رشد اغلب باکتری‌ها در غلظت های کمتر از ۱۵-۱۰ میکروگرم بر لیتر کربن آلی قابل جذب متوقف می‌شود و این در حالی است که باکتری‌های گروه کلیفرم به ویژه باکتری‌های E.coli ، E.cloacaea و K.pnenumonac و E.aerogenes در غلظت‌های بسیار کمتر AOC نیز قادر به رشد هستند.

رشد میکروارگانیسم‌ها معمولا با مقادیر بالای HPC در نمونه‌های آب مشخص می‌گردد. مقادیر بالای HPC در لوله‌هایی که جریان آب کم است، مجاری داخلی منازل ، آب‌های بطری شده، مجاری دستگاه‌هایی مانند سختی‌گیر و صافی دستگاه‌های خودکار که با پرداخت پول، آب تحویل می‌دهند، روی می‌دهد. دما ، در دسترس بودن مواد غذایی، کاهش ماده‌ی گندزدای باقی‌مانده سه عامل اصلی رشد مجدد در شبکه‌های آب‌رسانی هستند. مواد مغذی ممکن است از خود آب و یا مواد در تماس با آب در اختیار مـیکروارگانیسم‌ها قرار گیرد. AWWA شرایط مناسب برای رشد باکتری‌های هتروتروف را چنین اعلام کرده است:

- AOC بیشتر از ۵۰ میکروگرم بر لیتر
- دما بیشتر از ۱۰ درجه‌ی سیلسیوس
- کلر باقی‌مانده‌ی آزاد کمتر از ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر

## کاربرد HPC در مدیریت آب

در سال ۱۸۸۳، در یازدهمین کنفرانس پزشکان آلمان در برلین، رابرت کخ برای نخستین بار چگونگی شمارش میکروارگانیسم‌های هتروتروف در آب، خاک و هوا را توضیح داد. پس از آن به تدریج شمارش HPC به عنوان شاخص عملکرد فرآیندهای تصفیه‌ی آب ، به ویژه صاف‌سازی مورد استفاده قرار گرفت. در قرن بیستم با رواج تعیین مقدار باکتری E.Coli به عنوان شاخص آلودگی مدفوعی آب، استفاده از HPC در تعیین سلامت میکروبی آب کاهش یافت. با این حال اندازه‌گیری HPC به عنوان شاخص مکمل در بسیاری از کشورها همچنان ادامه یافت. تغییرات جمعیت این باکتری‌ها در شبکه‌ی توزیع از سه نظر حایز اهمیت است:

- زیبایی‌شناختی: ایجاد طعم و بو، تغییر رنگ، ایجاد و رشد لایه‌های لزج چسبنده (Slime)
- اقتصادی: نظیر خوردگی، رسوب‌گذاری و کاهش آبدهی

- بیماری‌زایی: باکتری‌های هتروترف شاخص سلامت میکروبی از نظر بیماری‌زایی نیستند. ولی برخی از آن‌ها نظیر E.coli O۱۵۷:H۷ بیماری‌زا و گروهی دیگر از آن ها(سودوموناس عامل عفونت‌های پوستی و ریوی و آئروموناس عامل گاستروآنتریت) فرصت‌طلب هستند و از این رو فراوانی این باکتری‌ها در آب آشامیدنی می‌تواند سلامت افرادی که دچار سوختگی‌های شدید شده‌اند و یا تحت درمان با کورتیکوستروئیدها قرار دارند، افراد مبتلا به بیماری سندرم نقص اکتسابی سامانه‌ی ایمنی (ایدز)، نوزادان، سالخوردگان و زنان باردار که همگی در زمره‌ی افراد آسیب‌پذیر محسوب می‌شوند را به مخاطره اندازد.

## موارد مهم کاربرد HPC در مدیریت آب

هر چند باکتری‌های هتروتروف به عنوان شاخص سلامت میکروبی کمتر مورد توجه‌اند، اما شمارش و تعیین مقدار این باکتری‌ها، مشخص‌کننده‌ی چگونگی عملکرد و شاخص کنترل فرآیندهای تصفیه‌ی آب و تأسیسات شبکه‌ی توزیع محسوب می‌شود و در موارد زیر کاربرد دارد:

- ارزیابی کارآمدی فرآیندهای تصفیه‌ی آب(انعقاد، گندزدایی)
- کنترل کیفیت میکروبی آب تصفیه شده در مخازن و شبکه
- تعیین نیاز و یا عدم نیاز به شست و شوی شبکه و مخزن
- تعیین کارآمدی شست و شوی شبکه و مخزن
- تعیین وقوع و میزان رشد میکروبی در تأسیسات
- تعیین احتمال وقوع رشد مجدد در شبکه‌ی توزیع
- تعیین کیفیت آب‌های بطری شده

# شمارش میکروارگانیسم هتروتروف

شمارش میکروارگانیسم‌های هتروتروف (HPC) که پیش از این تحت عنوان شمارش پلیت استاندارد شناخته می‌شد، روشی است که توسط آن تعداد باکتری‌های هتروتروف زنده در آب اندازه‌گیری شده و جزء تغییرات کیفی به هنگام تصفیه و توزیع آب و یا کیفیت آب استخرهای شنا بررسی می‌گردد. کلنی‌های مورد مطالعه با این روش می‌توانند به صورت دوتایی، زنجیره‌ای، خوشه‌ای و یا منفرد تشکیل شوند که همه‌ی انواع آن تحت عنوان واحدهای تشکیل دهنده‌ی کلنی(CFU) نامیده می‌شوند. شمارش نهایی به مقدار موثر انتشار کلنی بستگی دارد، از این رو روش کار و محیط کشت به گونه‌ای باید انتخاب شود که به تواند بیشترین تعداد کلنی را در مدت معینی از گرماگذاری تولید کند. در این دستورعمل سه روش و چهار نوع محیط کشت مناسب شرح داده می‌شود.

## انتخاب روش

### ❖ Pour plate

شیوه‌ی ساده‌ای است که می‌تواند برای حجم‌هایی از نمونه یا حجم‌های رقیق شده‌ای از آن که در حدود ۲- ۰/۱ میلی‌لیتر باشند به کار رود. کلنی‌های تشکیل شده در این روش به نسبت کوچک و فشرده‌اند و به عکس انواع کشت شده روی سطح، تمایل چندانی به نزدیک شدن به یکدیگر ندارند. از سوی دیگر کلنی‌های غوطه‌ور در محیط کشت اغلب دارای رشد کندتری بوده، برداشتن وانتقال آن‌ها مشکل است. در این روش برای حفظ دمای محیط‌کشت، نیاز به حمام آب با دمای کنترل شده می‌باشد. در هر حال احتمال بروز شوک حرارتی آنی و زودگذر برای باکتری‌های موجود در نمونه‌هایی که با آگار ذوب شده با دمای ٤٦- ٤٥ درجه‌ی سلسیوس مخلوط می‌گردند، وجود دارد .

### ❖ کشت سطحی (Spread plate)

این روش موجب شوک گرمایی نشده و تمام کلنی‌هایی که روی سطح محیط کشت رشد می‌کنند می‌توانند به سادگی از ذرات دیگر و یا حباب‌های هوا متمایز گردند. در صورت نیاز برای بررسی‌های تکمیلی، کلنی‌ها را می‌توان به سرعت جدا کرد و انتقال داد و به آسانی شناسایی نمود. مشکل اصلی این روش کم بودن حجم نمونه یا نمونه ی رقیق شده نسبت به آگار مصرفی است. در این روش حجم باید ۰/۵-۰/۱ میلی‌لیتر باشد. میزان دقیق نمونه، بستگی به نحوه‌ی آماده کردن پلیت‌ها دارد. به هنگام کار با این روش به اندازه‌ی کافی پلیت حاوی آگار از پیش باید آماده شده باشد.

### ❖ صافی غشایی (Membrane filter)

این روش در مورد نمونه‌های آب با حجم زیاد و کدورت کم و معمولا برای آب‌هایی با احتمال شمارش کم کلنی(کمتر از Cfu/mL ۱۰-۱) به کار می‌رود. این روش شوک گرمایی ایجاد نمی‌کند و هزینه‌ی آن برای تهیه‌ی صافی‌های غشایی بیشتر از دو روش برشمرده است. از دیگر مشکلات این روش کوچک بودن سطح محیط کشت، استفاده از نور برگشتی در مقابل زمینه‌ی سفید برای بررسی کلنی‌ها (در صورتی که از صافی‌های رنگی یا رنگ‌آمیزی مناسب استفاده نشود) و احتمال تغییر در کیفیت صافی‌های غشایی است.

## محل کار

یک میز یا سکوی مسطح با فضای کافی و اتاقی با نور مناسب ، فضای آزاد و تمیز یا هود لامینیار تهیه کنید. قبل از انجام آزمایش، میز یا سکوی با سطح بدون خلل و منفذ را گندزدایی کنید.

## نمونه‌برداری

شروع آزمایش باید در کوتاه‌ترین زمان پس از نمونه‌برداری و پیش از بروز تغییرات هر چند جزیی در جمعیت میکروبی انجام شود. بیشترین مدت زمان مجاز بین نمونه‌برداری و آزمون ۸ ساعت (حداکثر ٦ ساعت برای انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه و ۲ ساعت برای انجام آزمایش در آزمایشگاه) می‌باشد. چنانچه امکان انجام آزمایش در این مدت وجود نداشته باشد ، نمونه‌ها را باید در دمای کمتر از ٤ درجه‌ی سیلسیوس در یخچال بدون این که یخ بزنند، نگهداری کرد. در هر صورت حداکثر فاصله‌ی زمانی بین نمونه‌برداری وآزمایش نباید بیشتر از ٢٤ ساعت شود.

## آماده‌سازی نمونه‌ها

پلیت‌ها را براساس تعداد نمونه‌ها، رقت‌ها و هرگونه مفروض‌های لازم قبل از آزمایش، آماده کنید. برای حجمی ازنمونه یا رقت مورد آزمایش می‌توان دو نوع پلیت تهیه کرد.

برای روش پورپلیت یا کشت سطحی باید از ظروف شیشه‌ای سترون (با سطح مقطع ٦٥ سانتی‌متر مربع) و یا از ظروف پلاستیکی با سترون‌سازی بالا (با سطح مقطع **٥٧** سانتی‌متر مربع) استفاده کرد.

همه‌ی نمونه‌ها یا حجم‌های رقیق شده‌ی آن‌ها را با ۲۵ بار تکان دادن به صورت بالا و پایین (یا جلو و عقب) کاملا مخلوط کنید. از دستگاه شیکر برای تکان دادن نمونه‌ها یا رقت‌ها به مدت ۱۵ ثانیه نیز می‌توان استفاده کرد.

## محیط کشت

- **( Tryptone glucose yeast agar) plate count agar**

این محیط کشت برای روش pour plate و Spread Plate استفاده می‌شود. در این محیط کشت غنی شده که در گذشته بیشتر مورد استفاده قرار می‌گرفت، کلنی‌های کمتری نسبت به محیط کشت R۲A و یا NWRI آگار شمارش می‌شوند. پس از اتوکلاو کردن محیط کشت در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه، pH آن باید حدود ۰/۲ ± ۷ باشد.

### ❖ mHPC Agar

این محیط کشت که حاوی مواد مغذی بیشتری است فقط در صافی غشایی مورد استفاده قرار می گیرد.

پودر محیط کشت را با آب مقطر مخلوط کنید. در صورت نیاز pH را با NaOH ۱ نرمال در ۷/۱ تنظیم کنید و در حرارت ملایم بجوشانید تا کاملاً حل شود. سپس گلیسرول اضافه کنید و در ۱۲۱ دمای درجه‌ی سیلسیوس به مدت ۵ دقیقه اتوکلاو کنید.

### ❖ R۲A Agar

این محیط کشت برای روش pour plate و Spread Plate استفاده می‌شود. این محیط کشت با مواد مغذی کم، شمارش کلنی بیشتری را نسبت به محیط کشت با مواد مغذی زیاد نشان می‌دهد.

pH را با محلول K۲HPO٤ یا KH۲PO٤ جامد قبل از اضافه کردن آگار در حد ۷/۲ تنظیم کنید. برای حل شدن آگار، محیط کشت را حرارت دهید و در ۱۲۱ درجه‌ی سلسیوس، به مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید.

### ❖ NWRI Agar (HPCA)

از این محیط کشت برای روش های pour plate ، spread plate و membrane filter استفاده می‌شود . این محیط کشت با مواد مغذی کم، شمارش کلنی بیشتری را نسبت به محیط کشت با مواد مغذی زیاد نشان می‌دهد و به شکل آماده و بدون آب موجود نمی‌باشد و باید از مواد اولیه تهیه شود. به این دلیل کارکنان آزمایشگاه‌ها اغلب تمایل کمتری به استفاده از آن دارند. قبل از اتوکلاو کردن به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سیلسیوس، pH محیط را حدود ۷/۲ تنظیم کنید.

## انکوباسیون (گرماگذاری)

برای مطابقت با اهداف پایش، تحت عنوان قانون EPA برای تصفیه‌ی آب‌های سطحی مربوط به باکتری‌های هتروتروف، پلیت‌ها را در دمای ۳۵ درجه‌ی سلسیوس گرماگذاری کنید. در غیر این صورت از بین زمان‌ها و دماهای پیشنهاد شده در پایش تغییرات کیفی آب ، استفاده کنید، به طوری که دوره‌ی گرماگذاری نمونه‌های کشت شده از ۷-۵ روز در دمای ۲۸-۲۰ درجه‌ی سیلسیوس خواهد بود.(به جهت یکنواخت سازی روش گرماگذاری و همچنین امکان مقایسه نتایج به دست آمده در سطح کشور و با توجه به تجربه‌ی شرکت‌های آب و فاضلاب در اندازه‌گیری HPC شبکه‌های آب آشامیدنی توصیه می‌شود گرماگذاری مطابق روش درج شده در صفحه‌ی ۱۸ بند شماره‌ی ۸ انجام شود.

در طول مدت گرماگذاری، رطوبت داخل دستگاه انکوباتور را به طوری که پلیت‌ها کاهش وزنی رطوبت بیشتر از ۱۵ درصد نداشته باشد، نگهداری کنید. این موضوع به ویژه برای زمانی که از گرماگذاری طولانی

مدت استفاده می‌شود، خیلی اهمیت دارد. قرار دادن یک ظرف آب در عمق انکوباتور ممکن است برای این کار کافی باشد.توجه کنید که از زنگ‌زدن یا اکسیدشدن دیواره‌های داخلی جلوگیری شود. دیواره‌ها باید از استیل ضدزنگ با درجه‌ی بالا یا آلومینیوم آندی شده باشند. برای انکوباتورهای بدون رطوبت، پلیت‌ها را در کیسه‌های پلاستیکی بسته بندی کنید.

## شمارش و ثبت نتایج

بلافاصله پس از اتمام مدت زمان گرماگذاری، شمارش کلنی‌ها را انجام دهید. چنانچه این کار امکان‌پذیر نباشد می‌توانید پلیت‌ها را حداکثر تا ٢٤ ساعت در دمای ١٠–٥ درجه‌ی سیلسیوس دریخچال نگهداری کنید. توصیه می‌شود تا حد ممکن از انجام این عمل اجتناب کنید.

هنگام گزارش نتیجه حتی برای تعداد کم نمونه‌ها باید نتیجه‌ی شاهد هم ثبت شود(وجود شاهد ضروری است). برای ثبت شمارش می‌توانید از دستگاه کلنی شمار به جای شمارش دستی کمک بگیرید.

توجه داشته باشید که به هنگام آماده‌سازی پلیت‌ها، حجم برداشت شده توسط پیپت را طوری انتخاب کنید که برای شمارش نهایی، حدود ٣٠ تا ٣٠٠ کلنی در هر پلیت تشکیل شده باشد. هدف این است که حداقل در یک پلیت حاوی نمونه‌ی رقیق شده، به توان تعداد کلنی‌ها در دامنه‌ی یاد شده را شمارش کرد.

به طور معمول بهتر است بیشتر از ٢ میلی‌لیتر نمونه را کشت ندهید، مگر این که کلنی‌های حاصل از ٢ میلی‌لیتر نمونه کمتر از ٣٠ عدد باشد که در این صورت بدون توجه به توصیه‌ی بالا، تمام کلنی‌ها را بشمارید. به جز موارد استثنا، در سایر موارد تنها پلیت‌های حاوی ٣٠٠–٣٠ کلنی را به حساب آورید. پس از شمارش کل کلنی‌ها در هر پلیت نتیجه را به صورت تعداد باکتری‌ها در میلی‌لیتر نمونه درج کنید.

برای محاسبه باید تعداد کلنی در هر پلیت را تعیین کرده و باتوجه به ضریب رقیق‌سازی نمونه در آن پلیت نتیجه بر حسب Cfu/mL گزارش شود .

- چنانچه در میان پلیت‌ها ، هیچ کدام شمارشی بین ٣٠ تا ٣٠٠ کلنی نداشت و تعدادی از آن‌ها حاوی بیش از ٣٠٠ کلنی بود از نتیجه‌ی شمارش پلیت‌هایی با نزدیک‌ترین عدد به ٣٠٠ در محاسبه استفاده کنید.
- اگر در هیچ یک از پلیت‌ها با ضرایب رقت گوناگون، رشد کلنی مشاهده نشد، نتیجه‌ی آزمایش را به صورت کمتر از یک کلنی در نمونه‌ای با کمترین ضریب رقت محاسب کنید به عنوان مثال چنان چه در پلیت حاوی نمونه‌ی رقیق شده به نسبت ٠/٠١ هیچ کلنی شمارش نشد، نتیجه به صورت کمتر از ١٠٠ در میلی‌لیتر (Cfu/mL ١٠٠ >) گزارش می‌شود.
- اگر در مواردی شمارش کلنی در هر پلیت به مراتب بیشتر از ٣٠٠ است، نتیجه را به شکل بسیار بیشتر از حد قابل شمارش (TNTC) گزارش نکنید.

- اگر تعداد کلنی‌ها در واحد سطح کمتر از ۱۰ کلنی بر سانتی‌متر مربع بود، کلنی‌های رشد کرده در ۱۳ مربع ( دستگاه شمارش کلنی) که توزیع یکنواختی از کلنی‌ها را داشته باشد بشمارید. بهتر است در صورت امکان ۷ مربع متوالی در جهت افقی و ٦ مربع متوالی در جهت عمودی انتخاب کنید و کلنی‌ها را شمارش کنید. توجه داشته باشید که یک مربع را دو بار شمارش نکنید. سپس مجموع کلنی‌های شمارش شده در ۱۳ مربع یک سانتی‌متر مربعی را در عدد ۵ ضرب کنید تا کل کلنی‌ها در سطح ٦۵ سانتی‌متر مربع پلیت محاسبه شود.
- اگر تعداد کلنی‌ها در واحد سطح بیشتر از ۱۰ کلنی بر سانتی‌متر مربع بود، فقط چهار مربع را انتخاب و شمارش کرده و میانگین کلنی‌ها را در واحد سطح (یک سانتی‌متر مربع ) محاسبه کنید. این عدد را در ضریب مناسبی (۵۷ برای پلیت‌های یک بار مصرف و ٦۵ برای انواع شیشه‌ای) ضرب کنید تا کل کلنی‌ها در سطح پلیت به دست آید.
- هنگامی که شمارش از ۱۰۰ کلنی در ساتنی‌متر مربع بیشتر باشد، نتیجه را به صورت ٦۵۰۰< (برای پلیت‌های شیشه‌ای) و ۵۷۰۰ < (برای پلیت‌های یک بار مصرف) بر حسب Cfu/mL گزارش کنید.
- اگر هنگام بررسی پلیت‌ها با کلنی‌های گسترش یابنده (SPREADERS) مواجه شدید، زمانی این کلنی‌ها را شمارش کنید که کلنی‌های تشکیل شده کاملا مشخص و یکنواخت توزیع شده باشند و سطح پوشیده شده از کلنی‌های گسترش یابنده، بیش از نیمی از کل پلیت را اشغال نکرده باشد. در صورت شمارش کلنی‌های گسترش یابنده، هر یک از انواع زیر به عنوان یک واحد کلنی در نظر گرفته می‌شود .

۱. کلنی که به صورت یک لایه‌ی نازک (Film) بین آگار و کف پلیت رشد کرده باشد.
۲. زنجیره‌ای از کلنی‌ها که به نظر رسد در نتیجه‌ی تجزیه‌ی یک توده‌ی باکتری به هنگام مخلوط کردن آگار و نمونه به وجود آمده باشد .
۳. کلنی که به صورت یک لایه‌ی نازک از آب در لبه‌ی آگار یا روی سطح آگار رشد کرده باشد .

موارد ۱ و ۲ گاهی بر اثر تجمع رطوبت از نقطه‌ای که کلنی گسترش یابنده در آن تشکیل شده است به وجود می‌آیند. این گونه کلنی‌ها اغلب بیش از نیمی ازسطح پلیت را پوشانده و کار شمارش قابل اطمینان و صحیح پلیت را مشکل می‌کنند.

- برای شمارش کلنی‌ها به ترجیح کلنی‌های مستقل و مشابه نزدیک به هم و نه به هم چسبیده، که فاصله‌ی بین آن‌ها حداقل برابر قطر کوچک‌ترین کلنی باشد را انتخاب کنید.
- کلنی‌های به هم چسبیده‌ای که از نظر شکل ظاهری و یا رنگ متفاوت هستند، به صورت مستقل شمارش می‌شوند. اگر پلیت‌ها دارای کلنی‌های گسترش یابنده‌ی بیشتری باشند، آن‌ها را به صورت SPR (Spreaders) گزارش کنید.

- چنانچه پلیت‌ها به دلایلی نظیر عدم آگاهی از میزان رقت، یا ریختن اتفاقی و آلودگی غیرقابل شمارش بوده و یا محیط کشت کنترل (شاهد) علائمی از آلودگی نشان داد، نتیجه را تحت عنوان: حادثه‌ی آزمایشگاهی (Laboratory Accident) و یا خطای آزمایشگاهی گزارش کنید.

.

## محاسبه و گزارش نتیجه‌ی آزمایش

واژه‌ی واحدهای تشکیل دهنده‌ی کلنی (CFU) در همه‌ی روش‌های آزمایش HPC استفاده می‌شود. از این رو در هنگام تکمیل فرم‌ها باید به روش مورد استفاده، دما و زمان گرماگذاری و نوع محیط کشت مورد استفاده در قسمت توضیح، اشاره کرد. برای مثال Cfu/mL ، روش پورپلیت ، دمای ۳۵ درجه‌ی سیلسیوس، ٤٨ ساعت و آگار شمارش پلیت. برای محاسبه‌ی شمارش پلیت، کل کلنی‌های شمارش شده و یا میانگین آن‌ها (در مورد پلیت‌های دوتایی از یک ضریب رقت یکسان)در هر پلیت در عکس ضریب رقت ضرب می شود.

وقتی کلنی‌های در پلیت‌های دو تایی یا در پلیت‌های با ضرایب رقیق‌سازی متوالی شمارش می‌شوند، بهتر است نتایج ابتدا تا دو رقم معنی‌دار (دو رقم سمت چپ) گرد شده سپس به صورت Cfu/mL گزارش شود. برای مثال عدد ١٤٢ به صورت ١٤٠ و عدد ١٥٥ به صورت ١٦٠ و عدد ۳۵ به همان شکل ۳۵ گزارش شود.

## مراحل انجام آزمایش HPC

مقداری از نمونه یا نمونه‌ی رقیق شده که به وسیله‌ی پیپت به پلیت سترون اضافه شده و سپس محیط کشت آگار مذاب اضافه شده و پس از مخلوط شدن باید سرد و منجمد گردد سپس گرماگذاری شده و شمارش شود.

### وسایل و مواد

فهرست وسایل و مواد مورد نیاز در زیر توضیح داده شده است

- اتوکلاو
- انکوباتور با دمای ثابت ۰/۵± ۳۵ درجه‌ی سیلسیوس. دما به وسیله‌ی دماسنج NBC دقیق به طور مرتب کنترل و گزارش شود .

- بن ماری تنظیم شده در دمای ٤٦-٤٤ درجه‌ی سیلسیوس برای گرم نگه‌داشتن آگار. پتری‌دیش(پلیت)های سترون با قطر داخلی ۱۵×۱۰۰ میلی‌متر ساخته شده ازجنس شیشه یا پلاستیک .
- پیپت‌های سترون TD یا موهر مخصوص کشت باکتریولوژیکی از جنس شیشه یا پلاستیک با حجم مشخص .
- بطری‌های درپیچ‌دار علامت‌گذاری شده تا حجم ۹۹ میلی‌لیتر، با خطوط خط‌کشی برجسته.
- چراغ گازی (Bunsen)
- بافر رقیق‌سازی سترون (محلول بافر فسفات)

## تهیه‌ی محیط کشت

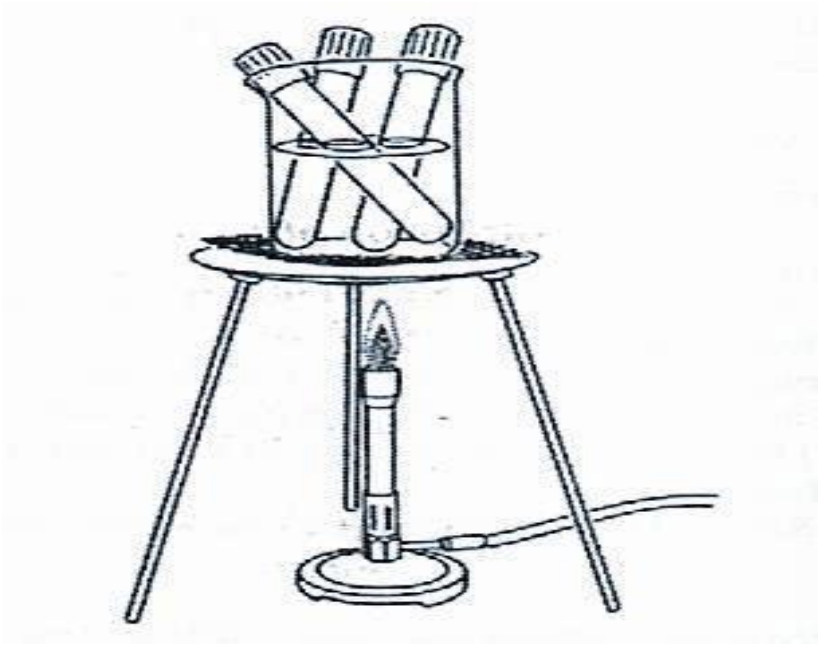
مراحل زیر درتهیه‌ی محیط کشت باید مورد استفاده قرار گیرد:

۱. استفاده از پودر خشک plate count agar یا R۲A ، محیط کشت را بر اساس دستورعمل کارخانه‌ی سازنده بر روی قوطی آن تهیه کنید .
۲. مقدار توصیه شده از محیط کشت خشک(پودری) را وزن کنید.
۳. آب مقطر به مقدار لازم به آن اضافه کنید.
٤. محیط کشت‌ها را در حال هم زدن حرارت دهید تا کاملا حل شود.
٥. محیط کشت‌ها را در لوله‌ها (۱۵ تا ۲۰ میلی‌لیتر در هر لوله متناسب با حجم پلیت مورد استفاده) یا به مقدار زیاد در فلاسک‌های درب پیچ‌دار توزیع کنید .
٦. محیط‌های کشت توزیع شده در لوله‌ها در اتومکلا و سترون شود.
۷. محیط‌ها را سرد کرده و در یخچال نگهداری کنید.
۸. با ذکر نام و تاریخ تهیه برچسب بزنید.

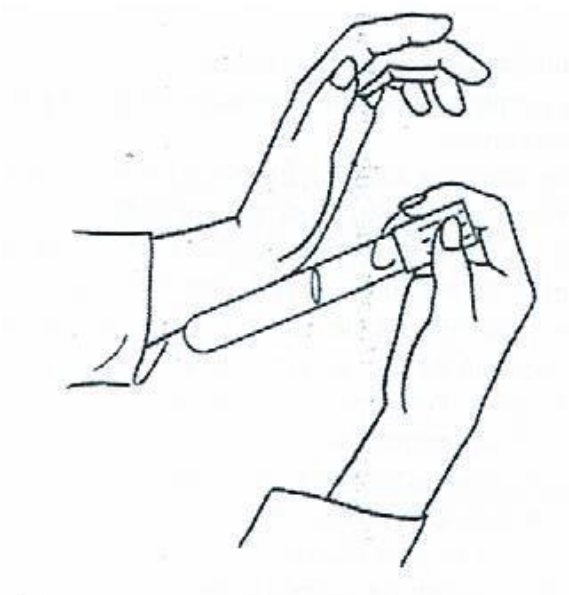
## آماده‌سازی آگار

مراحل زیر برای تهیه‌ی آگار باید انجام شود:

۱. محیط کشت حاوی آگار را به وسیله‌ی گرمای حاصل از جوشیدن آب ، ذوب کنید(شکل شماره‌ی ۱). محیط کشت‌ها نباید بیشتر از زمان لازم در دمای ذوب بمانند. توجه شود که محیط کشت آگار تهیه شده فقط یک مرتبه باید ذوب شود.
۲. محیط کشت آگار مذاب را داخل آب با حداقل دمای حدود ٤٦-٤٤ درجه‌ی سیلسیوس نگهداری کنید(شکل شماره‌ی ۲). نباید محیط کشت آگار نواب بیش از ۳ ساعت در این دما نگه داشته شود.



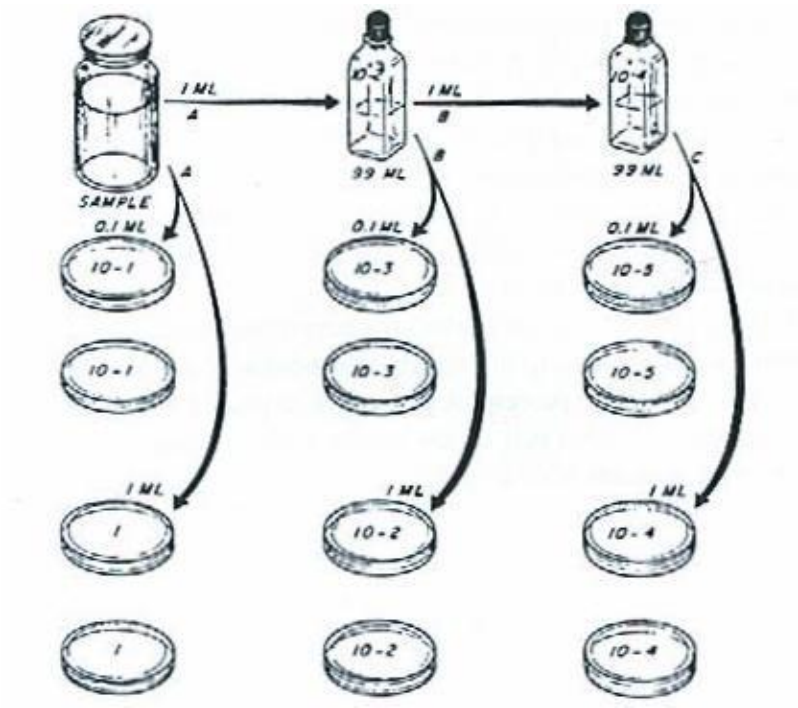
**شکل شماره‌ی ۱: تصویر تجسمی  نحوه‌ی ذوب شدن محیط کشت آگار در لوله‌ها**



**شکل شماره‌ی ۲: تصویر تجسمی چگونگی کنترل دما ، به وسیله‌ی دست**

## آماده‌سازی رقت

رقت صحیح را براساس منبع برداشت نمونه و نتایج قبلی آن انتخاب کنید . بـرای نمونـه‌هـای آب در شبکه‌ی توزیع مقدار ۱ –۰/۱ میلی‌لیتر بدون رقت و برای نمونه‌های برداشت شده از آب خام و یا جریـان آب در فرایند تصفیه مقدار ۱–۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های صد بار رقیق شده استفاده شود(شکل شماره‌ی ۳).




**شکل شماره‌ی ۳ : سری رقت‌های رایج در آزمایش HPC**

## آماده سازی پلیت

برای آماده کردن پلیت‌ها مراحل زیر به ترتیب باید انجام شود :

۱. ابتدا در یک محل مناسب پلیت‌ها را چیده وعلامت گذاری کنید.

برای یک سری نمونه، یک پلیت شاهد، دو پلیت با شرایط یکسان برای تلقیح یک نمونه و یک پلیت کنترل مثبت تهیه کنید.

برای کنترل کردن شرایط سترون، یک میلی‌لیتر از آب رقیق‌سازی سترون را به پلیت حاوی محیط کشت آگار ذوب شده اضافه و کاملا مخلوط کنید.

پلیت کنترل(شاهد) سترون بودن پیپت ، محیط کشت آگار وآب رقیق‌سازی را نشان خواهد داد.

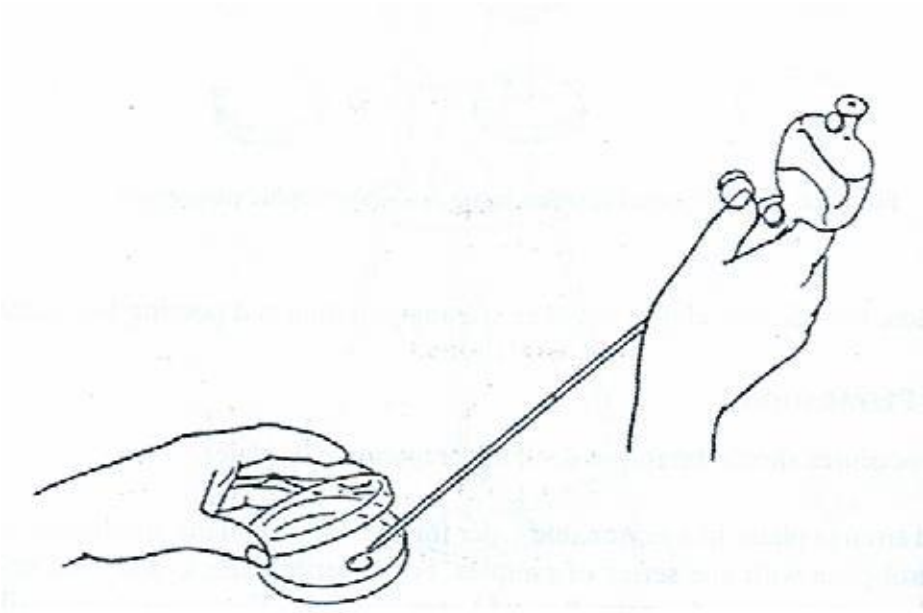
۲. پلیت‌ها را بر اساس نمونه‌ها و رقت‌ها مرتب کنید.

۳. هریک از نمونه‌ها و رقت‌ها را قبل از برداشتن حجم معینی از آن‌ها و افزون آن‌ها به پلیت‌های خالی سترون، به شدت تکان دهید.

٤. از پیپت‌های مدرج برای برداشتن نمونه یا رقت استفاده کنید.

هنگام تخلیه‌ی نمونه، پیپت‌ها را با زاویه ی ٤٥ درجه در کف پلیت یا در قسمت داخلی گردن بطری‌های مخصوص رقیق‌سازی نگهدارید. هنگام قرار دادن پیپت، درب پلیت را به اندازه‌ی کافی بالا بگیرید. حدود ۲تا ٤ ثانیه زمان برای تخلیه‌ی یک میلی‌لیتر نمونه به صورت قطره‌ای در کف پلیت لازم است(شکل شماره‌ی ٤).

برای هر یک از نمونه‌ها از پیپت‌های سترون مجزا استفاده کنید. برای هر یک از نمونه‌ها و رقت‌ها دو پلیت با شرایط یکسان تهیه کنید

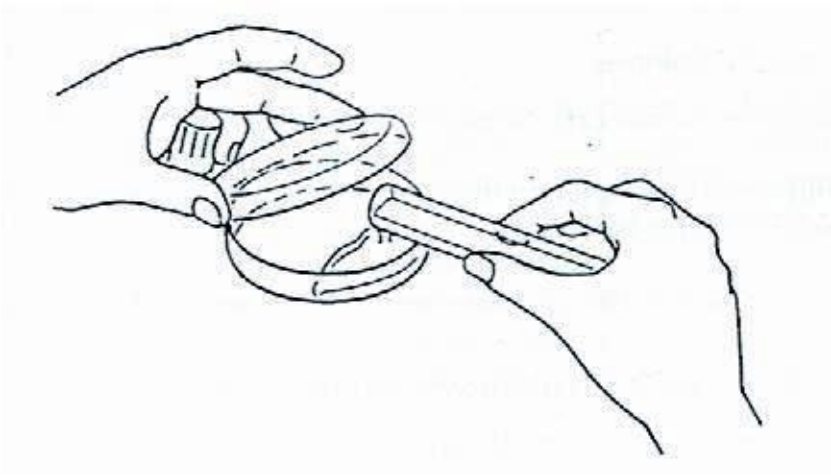


**شکل شماره‌ی ٤: تصویر تجسمی روش صحیح گرفتن پیپت در دست و برداشتن درپوش پلیت**

٥. با استفاده از دماسنج دمای محیط کشت را قبل از این که با نمونه مخلوط شود کنترل کنید.

٦. بعد از اضافه کردن نمونه‌ها در هر سری از پلیت‌ها محیط کشت مذاب را درون پلیت‌ها ریخته و با دقت مخلوط کنید (شکل شماره‌ی ٥). تعداد نمونه‌ها را طوری انتخاب کنید که زمان تهیه‌ی اولین رقت تا اضافه نمودن به آخرین پلیت بیشتر از ٢٠ دقیقه (به ترجیح ١٠ دقیقه) نباشد. برای جلوگیری از آلودگی، احتیاط‌های مربوطه (شرایط آسپتیک) لازم است. زمانی که لوله‌های محتوی محیط کشت حاوی آگار مذاب را از داخل ظرف آب برداشتید باید لوله‌ها به وسیله‌ی حوله‌ی پارچه‌ای یا کاغذی خشک شوند. زیرا ممکن است آب اطراف لوله‌ها به داخل پلیت راه یافته و ایجاد آلودگی کنند. هنگامی که می‌خواهید محیط کشت آگار مذاب را به پلیت اضافه کنید، درپوش لوله‌های محتوی آگار را برداشته ولبه‌ی خارجی لوله بر روی شعله قرار داده تا میکروارگانیسم های آن ازبین بروند.

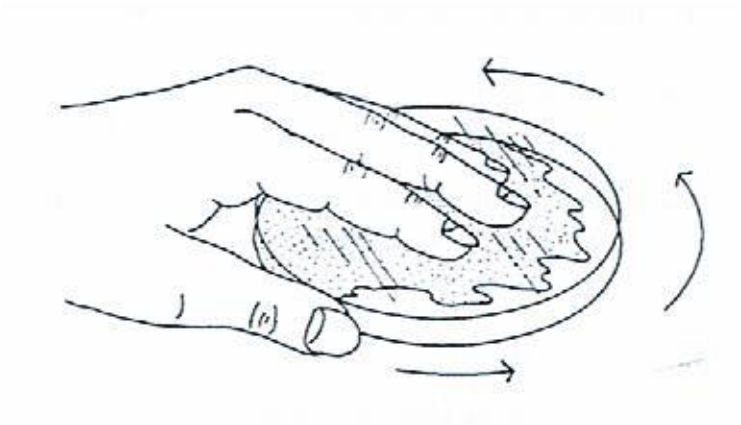
هنگام اضافه کردن آگار مذاب موجود در لوله ها به پلیت‌ها، درپوش پلیت‌ها را فقط در یک جهت و به مقدار کافی به نحوی بردارید که دهانه‌ی لوله به آسانی وارد پلیت شود. حدود ١٢تا ١٥ میلی لیتر محیط کشت حاوی آگار مذاب را به هر یک از پلیت‌ها که دارای مقدار مشخصی نمونه هستند، اضافه کنید.



**شکل شماره ی ۵: تصویر تجسمی روش صحیح اضافه کردن آگار مذاب به نمونه در پلیت‌ها با رعایت شرایط سترون**

۷. محیط کشت تلقیح شده را به نحوی مخلوط کنید که از آن بیرون ریختن نشود. برای این کار توصیه می شود ۵ بار پلیت را در جهت چپ و ۵ بار در جهت راست بچرخانید و ۵ بار در جهت جلو و عقب حرکت دهید (شکل شماره‌ی ٦).

۸. حدود ۱۰ دقیقه صبر کنید تا محیط کشت مخلوط شده با نمونه جامد شود. سپس پلیت‌ها را وارونه کرده و در حرارت ۳۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت ٤٨ ساعت گرماگذاری کنید. در طول مدت گرماگذاری رطوبت درون گرم خانه را طوری تنظیم کنید تا پلیت‌ها بیش از ۱۵ درصد رطوبت از دست ندهند. برای این منظور قرار دادن یک طرف آب در ته گرم‌خانه کافی است. برای جلوگیری از زنگ زدن دیواره‌های داخلی و طبقه‌های گرم‌خانه، آن‌ها باید از استیل ضد زنگ مرغوب یا آلومینیوم ساخته شده باشند.



**شکل شماره‌ی ٦: تصویر تجسمی نحوه‌ی چرخاندن پلیت‌ها**

## روش کشت سطحی (Spread plate)

۰/۱ یا ۰/۵ میلی‌لیتر از نمونه یا ۰/۱ یا ۰/۵ میلی‌لیتر از رقت مناسب نمونه به محیط کشت حاوی آگار جامد شده موجود در پلیت اضافه کنید. نمونه‌ی تلقیح شده بر روی سطح محیط کشت را با یک میله‌ی شیشه‌ای سترون به صورت یکنواخت پخش کنید. در این روش همه‌ی کلنی‌ها بر روی سطح محیط کشت به وجود آمده و مانع از نفوذ کلنی‌ها به داخل آگار مذاب می‌شود. پس از گرماگذاری در دما و زمان مناسب، کلنی‌های باکتری‌ها را بر روی سطح آگار شمارش کنید .

در روش پور پلیت، کلنی‌ها بین محیط کشت و همچنین برروی سطح محیط کشت حاوی آگار موجود در پلیت رشد می‌کنند.

## وسایل و مواد

وسایل و مواد مورد نیاز در روش کشت سطحی مشابه‌ی روش پورپلیت است. فقط یک میله شیشه ای سترون به آن اضافه می‌شود.

مراحل آماده‌سازی محیط کشت حاوی آگار، نمونه‌های رقیق شده همانند روش پورپلیت است.

## آماده سازی پلیت‌های حاوی محیط کشت آگار

برای آماده سازی پلیت‌های حاوی محیط کشت مراحل زیر باید انجام شود:

۱. برای جلوگیری از آلودگی برخی احتیاط‌ها لازم هستند.
۲. ۱۵تا ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت آگار مذاب را درون پلیت‌ها بریزید.
۳. پتری دیش را طوری بچرخانید تا محیط ریخته شده در آن کف پلیت را به پوشاند(شکل شماره ی ٦).
٤. قبل از جامد شدن محیط کشت پلیت را حرکت ندهید.
٥. درب پلیت‌ها را بپوشانید. برای خروج رطوبت اضافی به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه اندکی باز بگذارید.
٦. وقتی که سطح محیط کشت حاوی آگار خشک شد درب ظرف را ببندید.

## روش انجام آزمایش

برای آماده سازی پلیت‌ها مراحل زیر باید انجام شود:

۱. پلیت ها را به ترتیب چیده و علامت گذاری کنید . پلیت شاهد، دوسری پلیت برای هر نمونه مورد آزمایش ونمونه کنترل مثبت برای یک سری از نمونه‌ها تهیه کنید. برای کنترل شرایط سترون از ۰/۱ میلی لیتر آب رقیق سازی سترون استفاده کنید. این کار برای اطمینان از سترون بودن پیپت، آگار و آب رقیق سازی انجام می‌شود.

۲. نمونه‌ها را رقیق سازی کنید.
۳. براساس نمونه‌ها ورقت‌ها پلیت‌ها را مرتب کنید.
٤. نمونه‌ها ورقت‌ها را قبل از این که با استفاده از پیپت به داخل پلیت منتقل کنید به شدت تکان دهید.
٥. در حالی که پلیت را می‌چرخانید، نمونه یا حجم رقیق شده (۰/۱ یا ۰/۵ میلی لیتر) را با استفاده از پیپت روی سطح محیط آگار جامد بریزید.
٦. نمونه‌ی تلقیح شده را بر روی سطح محیط کشت با استفاده از میله‌ی شیشه‌ای سترون به طور یکنواخت پخش کنید. این کار با ثابت نگه داشتن میله‌ی شیشه‌ای بر روی سطح آگار و حرکت دادن پلیت و یا با حرکت دادن میله‌ی شیشه‌ای بر روی سطح محیط کشت انجام می‌شود. در این روش همه‌ی کلنی‌ها بر روی سطح محیط کشت شکل می‌گیرند.
۷. قبل از گرماگذاری اجازه دهید تا نمونه‌ی تلقیح شده به طور کامل در محیط کشت جذب شود.
۸. وقتی سطح محیط کشت آگار خشک شد درب پلیت‌ها را ببندید، آن‌ها را به صورت وارونه برای انجام آزمایش‌های اختصاصی به مدت لازم گرماگذاری کنید. پس از گرماگذاری در دما و مدت زمان مناسب، کلنی‌های مجزا بر روی سطح محیط کشت پدیدار می‌شوند.
۹. گرماگذاری همانند روش پورپلیت می‌باشد.