

میکروبیولوژی آب (Water Microbiology)

آزمایش های میکروبی آب بطور عمده جهت شناخت وضعیت بهداشت آب صورت می گیرند. روش های متداول در آزمایشگاه تعیین کننده میزان حقیقی میکروارگانیسم های آب نیستند. دلیل عمده این امر اینستکه تمام میکروارگانیسم های موجود در آب قادر به استفاده از محیط کشت های مصرفی بعنوان منبع تولید کننده انرژی نمی باشند. همچنین بعلت تعداد کم میکروارگانیسم ها (در آبهای آشامیدنی) شناسایی و جداساختن آنها از آب بسیار مشکل بوده و از روش های معمولی آزمایشگاهی نمی توان وجود همه آنها را پی گیری نمود.

البته فاضلابها و آبهای آلوده را که باکتریهای مولد بیماری در آنها یافت میشوند میتوان براحتی مورد آزمایش قرار داده و میکروارگانیسم های آنها شناسایی و از آب جدا نمود. به طور عمده سه گروه باکتری در صورت راه یافتن به اندامهای گوارشی انسان و حیوانات (از طریق آب) قادر به فعالیت و ایجاد ناراحتی می باشند:

۱- کلی فرم ها و باکتریهای وابسته

۲- باکتریهای مولد هاگ (اسپور) تخمیر کننده قند لاکتوز

۳- استرپتوکوک های مدفوع

از سه گروه یاد شده در بالا، کلی فرم ها از اهمیت بیشتری نسبت به سایر باکتریها در آب برخوردار بوده و بعنوان شاخص بهداشتی آب بشمار می روند. باین صورت که وجودشان در آب نشانه آلودگی و عدم وجوشان دلیل برپاک و بهداشتی بودن آب می باشد.

علل عمده این امر اینستکه کلی فرم ها ارتباطهای بسیار نزدیکی با باکتریهای بیماریزا گوارشی نظیر باکتریهای مولد مسمومیت های غذایی، اسهال خونی، تیفوئید از نظر هم خانواده بودن با این باکتریها دارند و از طرف دیگر دیده شدن کلی فرم ها در کنار استرپتوکوکهای موجود در مدفوع انسانها و حیوانات نشان دهنده همکاری و ارتباط این باکتریها با استرپتوکوک های مدفوع می باشد. از این نظر اعمالیکه به طور طبیعی و یا مصنوعی در طی ذخیره شدن آب در منابع، رسوب دادن و کلرزدن و سایر کارهائیکه جهت خالص (صاف) کردن و یا بهداشت

آب صورت می گیرد، تا اندازه ای روی کلی فرم ها نیز اثر میگذارد. بهر حال به طور کلی میتوان گفت عدم وجود کلی فرم ها در آب، دلیل بر عدم وجود باکتریهای بیماریزا (پاتوژن) روده ای می باشد.

کلی فرم ها به دو نوع مشخص اشرشیا (*Escher coli*) و اروباکتر (*Aerobacter*) تقسیم می شوند. کلی فرم ها باکتریهای هستند، باسیلی شکل، هوازی و غیر هوازی اختیاری گرم منفی، مزوفیل و بدون هاگ (اسپور) که قادرند لاکتوز را تخمیر نموده و گاز تولید نمایند.

تولید گاز (Gas Production): در آزمایشهای باکتریولوژی که جهت شناخت کلی فرم ها صورت می گیرد. اولین مرحله تولید گاز در محیط لاکتوزبراث است. تولید گاز تنها احتمال وجود کلی فرم را در آب تقویت میکند، زیرا باکتریهای دیگری نظیر باکتریهای هاگ دارهوازی و غیر هوازی نیز قادر به تولید گاز می باشند. حتی ممکنست در محیط لاکتوز براث کلی فرم ها قندلاکتوز را به قند ساده تری مانند گلوکز تجزیه کننده و باکتریهای دیگر با مصرف و تجزیه گلوکز، گاز تولید نمایند.

با دانستن مکانی که نمونه آب از آنجا تهیه شده است میتوان تا حد زیادی باکتریهای آنرا شناسایی کرد. چنانکه در فاضلابها و آبهای آلود وجود کلی فرم ها کاملاً قطعی است و در آبهای مصرفی، آب استخرها و آبهای کلرزده، وجود باکتریهای هاگ دار بعلت مقاومت زیاد آنها در برابر کلر محتمل تر می باشند. تولید گاز توسط باکتری را معمولاً در مدت زمان حداکثر ۴۸ ساعت و در حرارت 37°C مورد آزمایش و بررسی قرار میدهند.

رشد هوازی (Aerobic growth): باکتریهای کلی فرم قادرند در روی محیط کشت های جامد به طور هوازی رشد نمایند. محیط کشت هایی که در این مورد از آنها استفاده می شود عبارتند از: اتوزین متیلن بلو آگار (*Eosin Methylene Blue Agar*) و همچنین اندوآگار (*Endo Agar*). چون خصوصیات پرگنه های مربوط به کلی فرم ها در این محیط کشت ها مشخص می باشد. چنانچه نحوه کشت به طور صحیح صورت می گیرد.

در صورت وجود کلی فرم در نمونه آب میتوان وجود آنرا کاملاً شناسایی کرد. همچنین در محیط های یاد شده از رشد باکتریهای هاگ دار غیر هوازی جلوگیری می شود. وجود معرف های رنگی از قبیل ائوزین Y (زرد) و متیلن بلو محیط کشت را جهت رشد سایر باکتریهای که مورد نظر نیستند نامناسب میسازد. چگونگی نمونه برداری از انواع آب ها: در نمونه برداری از آب های مختلف چند اصل مهم را باید رعایت نمود. این اصول را میتوان بقرار زیر شرح داد.

- ۱- ظروف مورد استفاده جهت نمونه برداری حتی الامکان درب دار و استریل باشند.
- ۲- نمونه برداری در روز انجام آزمایش ها و حداکثر بفاصله چند ساعت تا انجام آزمایش میکروبی صورت گیرد.
- ۳- سعی شود، نمونه به طور صحیح و کامل با آزمایشگاه تحویل گردد.
- ۴- در هنگام نمونه برداری از آبهای جاری (رودخانه) و ساکن (دریاچه) دقت شود که دهانه ظرف نمونه برداری در زیر سطح آب قرار گیرد تا از نفوذ عوامل سطحی آب جلوگیری شود.
- ۵- در نمونه برداری از آب لوله کشی، ابتدا قدری شیر آب را باز نموده تا آب ساکن داخل شیر جریان یابد و سپس بعد از پاک نمودن آلودگی سطحی شیر توسط شعله چراغ (چراغ الکلی) با باز نمودن دوباره شیر و درب ظرف نمونه برداری موجب پر شدن ظرف از آب مورد نظر گردید.

آزمایش های میکروبی آب از نظر وجود باکتری

مواد و لوازم مورد نیاز:

- محیط کشت تریپتون سویا آگار (Trypton Soya Agar) در لوله
- محیط کشت فنل رد لاکتوز برات (Phenol Red Lactose Broth)
- پتری دیش استریل
- نمونه های مختلف آب در ظرف / شیشه (استریل)
- محلول سیلین در لوله و شیشه (Saline Solution)
- محیط کشت ائوزین متیلن بلو آگار (E.M.B)
- محیط کشت تریپتون سویا برات (Trypton Soya Broth)
- محیط کشت آم.آر.وی.پی (M.R.V.P Medium)
- محیط کشت سیمون سیترات آگار (Simon Citrate Agar) در لوله
-

چگونگی انجام آزمایش های میکروبی آب:

قسمت اول: وضعیت کلی آب مورد آزمایش جهت تعیین تعداد کلی میکروارگانیسم ها در یک میلی لیتر نمونه آب مورد آزمایش، براساس روش استاندارد پلیت کانت (Standard Plate Count) به طریق زیر عمل میشود. ابتدا با استفاده از پی پت استریل یک میلی لیتر از نمونه آب را به لوله دارای ۹ میلی لیتر محلول سیلین اضافه نموده و کاملاً آمیخته نمائید. بعد از آنکه نمونه آب و محلول سیلین آمیخته شدند یک میلی لیتر از آنرا به محیط کشت تریپتون سویا آگار (T.S.A) استریل شده و نگهداری گردیده در حرارت 45°C افزوده و بخوبی مخلوط نمائید و بعد از آن مخلوط فوق را در داخل پتری دیش استریل، خالی نمائید. میتوان به همین طریق

نمونه آب را با کمک محلول سیلین تا چند درجه رقیق نموده و در پتری دیش های جداگانه کشت داد. پلیت های کشت داده شده از نمونه ای مختلف آب را برای مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت در اینکوباتور 37°C قرار دهید.

بررسی وجود کلی فرم ها در نمونه آب (Coliforms in water)

- جهت بررسی وجود کلی فرم ها در آب و تائید دقیق و حتمی آنها می بایست از حداقل سه مرحله آزمایش و محیط کشت های مناسب آنها استفاده نمود. این مراحل بقرار زیر می باشند:

۱- آزمایش مرحله احتمالی (Presumptive Test)

۲- آزمایش مرحله تائیدی (Confirmative Test)

۳- آزمایش مرحله تکمیلی (Completed Test)

در اولین مرحله آزمایش جهت پیگیری وجود کلی فرم ها از محیط کشت فیل ردلاکتوزبراث استفاده میشود. جهت انجام آزمایش ۳ لوله دارای محیط (P.R.L.B) یک میلی لیتر از نمونه آب افزوده شده و برای مدت ۴۸ ساعت در اینکوباتور 37°C قرار داده میشود.

قسمت دوم: در جلسه بعدی، ابتدا محیط های کشت (T.S.A) مورد بررسی قرار می گیرند. پرگنه (کلنی)های رشد یافته در آنها را توسط دستگاه کلنی کانتر شمارش نموده و سپس با در نظر گرفتن درجه رقت، تعداد کل میکروارگانیسم ها در یک میلی لیتر نمونه آب محاسبه میگردد.

- سپس سعی میشود از پرگنه های مختلف موجود در محیط لازم تهیه نموده و با استفاده از رنگ آمیزی گرم، آنها را رنگ آمیزی نموده و سپس مورد مشاهده میکروسکوپی قرار دهند.

- در مورد کلی فرم ها، محیط کشت (P.R.L.B) را بررسی نمائید. وجود گا از طریق لوله دورهام موجود در محیط بررسی میشود. همچنین چنانچه محیط اسیدی شود رنگ محیط زرد و در صورت قلیائی بودن رنگ آن

قرمز می گردد. لوله هائی که رنگ محیط زرد و در لوله دورهام گاز تجمع یافته باشند، احتمال وجود کلی فرم ها را تقویت نموده و می بایست جهت تائید آنها، از محیط فوق به میزان ۰/۱ تا ۰/۵ میلی لیتر در محیط کشت E.M.B کشت داده و در اینکوباتور ۳۷^oC قرار داد.

قسمت سوم: در محیط کشت ائوزین متیلن بلو آگار خصوصیات پرگنه کلی فرم ها به صورتی است که میتوان تا حدودی زیادی وجود آنها را از دیگر باکتریها مشخص نمود.

این خصوصیات را میتوان در جدول زیر خلاصه نمود.

نام باکتری	اندازه پرگنه (کلنی)	رنگ پرگنه	وضعیت ظاهری پرگنه	خصوصیات کلی پرگنه	وضعیت هر پرگنه نسبت به پرگنه های مجاور
اشرشیاکلی	۲-۳ میلی لیتر	سیاه رنگ (در مرکز) دارای چای سبز رنگ	مسطح یا فرو رفته	خشک (دارای رطوبت کم)	پرگنه ها دور از یکدیگر قرار دارند.
اروباکتراروجنز	۴-۶ میلی لیتر	قهوه ای رنگ (در مرکز) دارای حاشیه بنفش مایل به آبی	برجسته	لج و لجنی شکل	پرگنه ها کاملاً در کنار یکدیگر می باشند
سالمونلا وشیگلا	این دو نوع باکتری بعلت اینکه قادر به تخمیر قند و لاکتوز نمی باشند، در صورت وجود پرگنه هایشان بی رنگ می باشد				
باکتریهای گرم مثبت	بعلت وجود معرف ائوزین (Y) در محیط E.MB این باکتریها معمولاً قادر به رشد نیستند و در صورت رشد پرگنه هایشان بسیار کوچک خواهد بود				

- با در نظر گرفتن خصوصیات ذکر شده در بالا چنانچه وجود حداقل یکنوع کلی فرم در محیط مشخص گردید. با تهیه لام از پرگنه آن و انجام رنگ آمیزی گرم و مشاهده میکروسکوپی بررسی خود را کامل تر نموده و پس از مشاهده شکل باکتری از پرگنه ای که لام تهیه نموده اید جهت انجام آزمایش تکمیلی و پی گیری نتیجه آنها از طریق تست های ایم و یک (IMvic's Tests) به قراری که در قسمت های زیر (صفحات بعد) شرح داده میشود در محیط کشت های مورد نظر کشت داده و نتایج آنها را بررسی نمایید.

با استفاده از محیط کشت های مشخص در آزمایش تکمیلی (completed Test) نوع کلی فرم ها از نظر جنس و تا حد ویژه ای از نظر گونه در آب مورد آزمایش بطرز نسبتا واضحی مشخص و نمایان می گردد.

تست آزمایش های فیزیولوژیکی ایم و یک جهت شناخت باکتریهای کلی فرم

(IMVIC's physiological Test Used for Identification Coliforms bacteria)

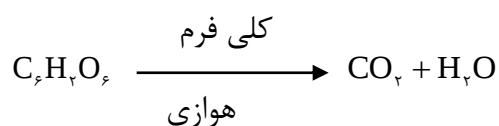
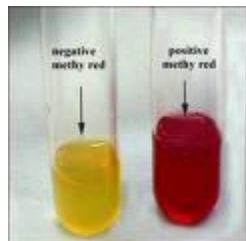
۱- ایندول تست (Indole Test): به طور کلی باکتریهای غیر هوازی مانند اشرشیاکلی (E.coli) قدرت متابولیسم و تغییر و تبدیل مواد بیشتری نسبت به باکتریهای هوازی دارند. از این خاصیت میتوان جهت جدا نمودن و شناخت آنها از یکدیگر استفاده نمود. اشرشیاکلی قادرست در محیط دارای اسید آمینه تریپتوفان (Tryptophan) با اثر گذاری و شکست باند آمینه آن ترکیب و رنگ ایندولی بوجود آورد. باکتریها بویژه کلی فرم های هوازی فاقد چنین خاصیت و قدرتی می باشند.

محیط کشتی که در این مورد بکار می رود تریپتون سوپاراث می باشد، در این محیط کشت مقدار قابل توجهی آسیدآمینه تریپتوفان وجود دارد. از پرگنه یا نمونه مشکوک به اشرشیاکلی در این محیط کشت، کشت داده و برای مدت ۴۸ ساعت در اینکوباتور 37°C قرار دهید. پس از گذشته مدت فوق (در جلسه بعد) چند قطره معرف کوواکس (Kovac's reagent) به محیط مزبور اضافه کنید. ظاهر شدن حلقه قرمز رنگ نامحلول در محیط نشان دهنده وجود ترکیب ایندولی و اشرشیاکلی می باشد.

این آزمایش برای کلی فرم های غیرهوازی (اشرشیا) مثبت و برای هوازیها منفی می باشد.



۲- متیل رد تست (Methyle Red Test): کلی فرم های غیر هوازی مانند اشرشیاقندها را تخمیر نموده و در نتیجه آن را در مدت نسبتاً کوتاهی اسیدلاکتیک، اسید استیلک، الکل ایتلیک، هیدروژن و گاز کربنیک بوجود می آورند.



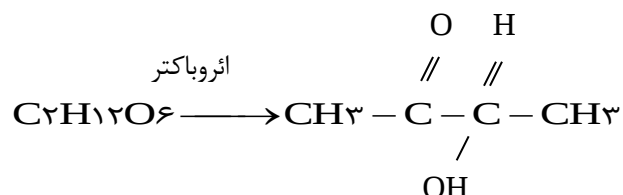
محیط کشتی که جهت انجام متیل رد تست مورد مصرف قرار می گیرد. ام. آر. وی. پی می باشد. در این محیط کشت قند مورد نظر دکستروز (گلوکز خالص) می باشد که مطابق آنچه در بالا شرح داده شده است در غیبت اکسیژن دارای تولیدات زیاد و در حضور اکسیژن تنها شامل آب و گاز کربنیک می باشد.

جهت انجام آزمایش به محیط کشت ام. آر. وی. پی پرگنه مشکوک به اشرشیا را انتقال داده و برای مدت ۳ روز در اینکوباتور 37°C قرار دهید. پس از گذشته مدت فوق چند قطره معرف متیل رد به آن اضافه کنید، چنانچه اشرشیا در محیط باشد چون در اثر فعالیت آن محیط اسیدی می شود، پس از افزودن معرف رنگ محیط قرمز میگردد. زرد و یا نارنجی شدن محیط پس از افزایش معرف دلیل بر عدم وجود اشرشیا و منفی بودن آزمایش می باشد.

۳- وی. پی (وگس - پروسکوئر) تست (Voges-Proskauer's Test)

این آزمایش جهت بررسی وجود کلی فرم هوازی، ائروباکتراروجنز صورت می گیرد و اساس آزمایش براین مبنا می باشد، که باکتری فوق قادرست در محیط دارای قند دکستروز فعالیت نموده و ایجاد ترکیبی بنام استیل

متیل کاربینول (استوین) بنماید.



محیط کشت مورد استفاده جهت انجام وی. پی تست، ام. آر. وی. پی است. جهت انجام آزمایش پرگنه مشکوک به ائروباکتراروجنز را در محیط فوق، کشت داده و برای مدت ۲ الی ۳ روز اینکوباتور 37°C قرار دهید.

- در جلسه بعد پس از تکان دادن لوله دارای محیط کشت داده شده فوق مقدار ۱ میلی لیتر از آنرا بداخل یک لوله استریل خالی انتقال داده و روی آن ابتدا ۰/۶ میلی لیتر (۱۲ قطره) محلول آلفانفتل (۴ درصد در الکل اتیلیک) و بعد ۰/۲ میلی لیتر (۴ قطره پتاس) ۴۰٪ افزوده و بعد از تکان دادن و مخلوط نمودن کامل آنها با یکدیگر لوله محتوی ترکیبات فوق برای مدت حداقل ۱۰ دقیقه بگذارید در جای ثابت باقی بماند. ظاهر شدن رنگ صورتی تا قرمز تیره نشان دهنده مثبت بودن آزمایش و تولید استیل متیل کاریتول توسط ائروباکتراروجنز می باشد.

۴- سیترات تست (Citrate Test)

این آزمایش با استفاده از محیط کشت سیمون سیترات آگار که به صورت شیبدار (Slant) در لوله تهیه شده است انجام می گیرد. تنها منبع کربن دار (ترکیب آلی) محیط کشت فوق سیترات سدیم می باشند. بنابراین تنها باکتری‌هایی می توانند در این محیط فعالیت مناسب داشته باشند که قادر به مصرف سیترات باشند. از ترکیبات دیگر آن معرف برم تیمول بلو است که در محیط اسیدی سبز مایل به زرد در محیط خنثی سبز و در محیط قلیائی آبی می باشد. میکروارگانیسم هائی که در محیط مزبور کشت داده میشوند چنانچه قادر به مصرف سیترات باشند، سیترات سدیم را مورد استفاده قرار داده، سیترات آنرا مصرف و سدیم آنرا آزادمینمایند. باقیمانده های سدیم چنانچه با OH حاصل از متابولیسم سلولی همراه شوند ایجاد سود گردیده و در حضور معرف برم تیمول بلو که در محیط قلیائی آبی رنگ است، رنگ محیط کشت از سبز به آبی تبدیل می شود. جهت انجام آزمایش از پرگنه مشکوک به ائروباکتر مقداری برداشت نموده و از انتهای قسمتی که شیب محیط کشت شروع میشود به سمت بالا به صورت زیگزاک کشت داده و سپس برای مدت ۴۸ ساعت در اینکوباتور 37°C قرار دهید. پس از گذشت مدت فوق محیط های کشت داده شده را بررسی نمائید. چنانچه مطابق آنچه گذشت رنگ محیط کشت آبی گردیده بود، آزمایش مثبت بوده و احتمال وجود ائروباکتر در محیط تقویت می گردد. از پرگنه های ایجاد شده در محیط لام تهیه نموده و با روش گرم رنگ آمیزی نمائید. پس از مشاهده میکروسکوپی شکل باکتریهای مشاهده شده را رسم نمائید.

نتایج بدست آمده را مطابق جدول زیر در گزارش کار خود مشخص نمائید.

آزمایش	کلی فرم های هوازی	کلی فرم های بی هوازی	Test
ایندول تست	منفی (-)	حلقه قرمز ایندولی (+)	1-Indole Test
متیل رد تست	منفی (-)	قرمز (اسیدی) (+)	2-Methyle Red Test
وی. پی تست	صورتی (قرمز) (+)	منفی (-)	3-Voges-proskour's Test
سیترات تست	آبی (قلیائی) (+)	منفی (-)	4-Citrate Test

