دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی
و میکروبیولوژی، آزمایشگاه میکروبیولوژی

آزمایشگاه میکروبیولوژی محیط

میکروبیولوژی و کنترل آلودگی آب و پساب

تهیه کننده : سهیلا عباسی

فاضلاب :

- ترکیبات فاضلاب از روزی به روز دیگر و از ساعتی به ساعت دیگر تغییر می کند و بسته به شکل کلی پیدایش فاضلاب ها به سه دسته خانگی، صنعتی و سطحی تقسیم می شوند. کیفیت فاضلاب بستگی به منبع تولید آن دارد. مثلاً فاضلاب های خانگی از نظر آلودگی های میکروبی و انگلی و مواد آلی فساد پذیر بیشتر قابل ملاحظه اند، در حالیکه فاضلاب صنعتی غالباً از نظر وجود مواد شیمیایی مخاطره آمیز در محیط زیست مورد توجه قرار می گیرند.

- در کشور های در حال توسعه عموماً مشکلات ناشی از فاضلاب های خانگی وجود دارد، ولی درکشور های پیشرفته اشکال اصلی مربوط به دفع فاضلاب های صنعتی است.

- به طور کلی سه گروه آزمایش فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی بر روی فاضلاب صورت می گیرد که هر یک نمایانگر فاکتور به خصوصی خواهد بود.

a. آزمایش های فیزیکی : نظیر رنگ، بو، کدورت، درجه حرارت. (درجه حرارت از نظر بازده کار در واحد های عملیاتی نقش موثر دارد.)

b. آزمایش های شیمیایی: آزمایش های شیمیایی مخصوصاً برای فاضلاب های صنعتی دارای اهمیت ویژه است زیرا در تعیین روش تصفیه واحدهای مورد نیاز نقش موثری دارد.

بدیهی است نوع آزمایش های شیمیایی که باید صورت گیرد بستگی به کیفیت فاضلاب و اطلاع از منابع تولید آن دارد، اما انجام آزمایش های زیر به طور معمول جهت پی بردن به خواص شیمیایی عمومیت دارد.

1. اسیدیته و قلیاییی بودن فاضلاب
2. ترکیبات شیمیایی
3. تعیین مقدار مواد جامد معلق

بررسی میکروارگانیسم های موجود در آب :

- **میزان آلودگی :** شدت آلودگی فاضلاب عبارت است از مقدار مواد آلی و معدنی قابل تجزیه و اکسید شدن که در حجم معینی از فاضلاب وجود دارد . (شاخص مواد آلی BOD است .)

- **معیار شدت آلودگی :** برای نشان دادن درجه آلودگی فاضلاب چون عملاً می توان تمام اکسیژن مورد نیاز برای اکسیداسیون مواد اکسید شدنی را اندازه گیری نمود، مقدار اکسیژن مورد نیاز بیوشیمیایی (BOD) پنج روزه را در درجه حرارت ۲۰ درجه سانتیگراد ملاک عمل مقایسه آلودگی فاضلاب قرار می دهند. در این مدت تقریباً ۶۸٪ از اکسیژن مصرفی مورد استفاده قرار می گیرد. پس تعیین BOD در حقیقت تعیین مقدار اکسیژن مورد نیازی است که در خلال ۵ روز باید به فاضلاب داده شود تا باکتریهای هوازی، مواد آلی موجود در فاضاب را اکسیده و به مواد پایدار و نمک های معدنی تبدیل سازند. روش تعیین BOD ، متداول ترین روش تعیین درجه آلودگی بوده و تابعی از درجه حرارت و زمان ماندن فاضلاب در جوار اکسیژن است.

میکرو ارگانیسم های موجود در فاضلاب

- این میکروارگانیسم ها هوازی و غیر هوازی می باشند و بیشتر ساپروفیت و کمولیتوتروف می باشند. بعضی از باکتریهای موجود در مدفوع از آب و بعضی از خاک و روده وارد فاضلاب می شوند. بیشتر باکتریهای موجود در فاضلاب شامل : *انتروباکتریها، استرپتوکوکوس فکالیس، کلستریدیوم، باکتروئید، Cytophaga micrococcus* و *Pesudomonadaceae* ، *اسپیروکت، لاکتوباسیل، کروموباکتریوم، آئروموناس، Comamonas* ، Yeasts ، Molds و غیره می باشند.
- *Sphaerotilus* ، *Beggiatoa* و فیلامنت های *رودوسپریل ها* در اثر رشد خود حالت لزج در ته فاضلاب و در کنار لوله ها و تانک ها ی محتوی فاضلاب به وجود می آورند.

- قارچ ها از میکروارگانیسم های دیگری هستند که در آب فاضلاب وجود دارند، از جمله *Leptomitus sarpolegnia* که در بین آن ها پیدا می شود.

- باکتریهای متانوژنیک هم در فاضلاب وجود دارند که می توانند CO_2 و H2 را به CH4 (متان) تغییر دهند. این گاز می تواند به عنوان منبع انرژی استفاده گردد.

- حداقل حدود ۶۰ نوع ویروس های دستگاه گوارش در فاضلاب ها پیدا شده است که مهم ترین آن ها *Poliovirus*، *کوکساکی ویروس*، *هپاتیت و آدنوویروس* می باشند. البته اگر به فاضلاب ها کلر زیاد بزنند اکثر این ویروس ها از بین می روند.

- میکروارگانیسم ها لجن فعال بسته به کاری که انجام می دهند به چهار دسته تقسیم می شوند.

1. میکروارگانیسم های شکاری
2. میکروارگانیسم های ساپروفیت
3. میکروبهای Floc – Forming
4. میکروارگانیسم های پارازیت

تصفیه بیولوژیکی فاضلاب :

- روش های مختلفی برای تصفیه فاضلاب به طریقه بیولوژیکی وجود دارد، که اصول کار در همه یکسان می باشد. در این روش میکروارگانیسم های هوازی، بی هوازی، بی هوازی اختیاری به طور مداوم محیط را مصرف نموده و سلول ها با میکروارگانیسم های جدیدی بوجود می آورند.

- تا زمانیکه مواد آلی و اکسیژن لازم در محیط به حد کافی در اختیار میکروارگانیسم ها باشد رشد و تکثیر آن ها ادامه می یابد. و سرانجام با کم شدن یکی از مواد حیاتی لازم، رشد آن ها کاهش یافته و یا متوقف می گردد. عمل تصفیه بیولوژیکی ممکن است هوازی ، بی هوازی ، و یا تلفیقی از هر دو باشد.

تصفیه هوازی

- سیستم های هوازی مهمترین و گسترده ترین روش ها برای تصفیه فاضلاب می باشند. اصول کار در سیستم های لجن فعال، صافی های چکنده حوضچه های تثبیت برای فاضلاب و نیز عمل کمپوست کردن برای تصفیه مواد زائد بر اساس تجزیه هوازی می باشد.
- فاکتورهای اصلی و موثر در تصفیه بیولوژیکی نسبت $\frac{F}{M}$ یعنی مواد غذایی موجود در محیط به تعداد میکروارگانیسم ها و نیز مقدار اکسیژن لازم برای اعمال حیاتی آن ها است. هر یک از این فاکتورها علاوه بر آنکه اثر فعال کنندگی سیستم را دارند، می توانند به عنوان فاکتور محدود کننده نیز به حساب آیند.

- به علت محدود بودن بار آلی موجود در محیط فاضلاب در صورتیکه اکسیژن در حد مناسب باشد ابتدا میکروارگانیسم ها به شدت رشد می کنند (فاز اول یا فاز رشد لگاریتمی) و پس از مدتی با کم شدن مواد غذایی رشد آن ها کاهش می یابد.

- فاز دوم کاهش رشدی چون میکروارگانیسم ها در فاز اول به سرعت تکثیر و موجب تجزیه و تثبیت می گردند. لذا زمان لازم برای تجزیه هوازی به مراتب کمتر از تجزیه بی هوازی می باشد. عمل سنتز و تولید انرژی در اکسیداسیون بیولوژیکی مواد آلی توسط میکروارگانیسم ها به شرح زیر است :

- میکروارگانیسم ها جدید $+ \; CO_2, H_2O, NH_3, SO_4, PO_4 \rightarrow$ میکروارگانیسم ها $+$ مواد آلی

- عناصر بالا مواد اولیه موجود در مواد آلی شامل هیدراتهای کربن، پروتئین ها و چربی ها هستند. این ترکیبات ناشی از فرآیندهای حیاتی انرژی و سنتز پروتوپلاسم باکتریایی می باشند.

تصفیه بی هوازی

- واکنش های بی هوازی شامل دو مرحله اند، اول تولید اسید و بعد تولید متان. اکسیژن مورد نیاز غالباً از تجزیه خود ماده آلی یا از آب گرفته می شود. تولید اسید به سبب تجزیه و تخریب مواد هیدروکربنه و پروتئین ها می باشد ولی متابولیسم بی هوازی برای تولید پروتوپلاسم جدید مناسب نیست.
- به این جهت در اثر تجزیه بی هوازی طی دو مکانیسم مختلف ابتدا اسید و بعد متان تولید می گردد.
- اگر عمل تجزیه بی هوازی بخوبی صورت گیرد پساب حاصله دارای مقادیر بسیار کم مواد آلی بوده و در حین عملیات حداقل مقدار لجن تولید می شود، با این وجود طولانی بودن زمان تجزیه و تثبیت و تولید بوهای نامطبوع امروزه بیشتر عملیات روش های تصفیه بیولوژیکی هوازی به کار گرفته می شود.

باکتری ها

- باکتری ها ترکیب اصلی فلوکه های لجن فعال را تشکیل می دهند. بیش از ۳۰۰ سویه به خوبی در لجن فعال رشد می کنند.
- آن ها مسئول اکسیداسیون مواد آلی و تغییر مواد غذایی هستند و تولید پلی ساکاریدها و سایر مواد پلی مری می کنند که به فلوکه شدن بیوماس میکروبی کمک می کند.

- جنس های اصلی یافت شده در فلوکه ها شامل *زئوگله آ*، *پسودوموناس*، *فلاووباکتریوم*، *آلکالی ژنز*، *باسیلوس*، *اکروموباکتر*، *کورینه یاکتریوم*، *بروی باکتریوم*، *اسینتوباکتر*، و نیز میکرو ارگانیسم های رشته ای هستند.

- برخی نمونه های میکروارگانیسم های رشته ای باکتریهای غلافدار هستند (مثل *اسفروتیلوس*) و برخی بدون غلافند مثل باکتریهای لغزنده (*بژیاتوآ*) که مسئول پدیده بالکینگ لجن هستند. همانطور که سطح اکسیژن در فلوکه ها، انتشار محدود دارد، شمار باکتریهای هوازی فعال با افزایش اندازه فلوکه ها، کاهش می یابد.

- ناحیه داخلی فلوکه ها مملو از باکتریهای بی هوازی مطلق از قبیل متانوژنها است. گمان می رود که وجود متانوژنها می توانند با تشکیل چندین حفره بی هوازی داخل فلوکه ها با توسط متانوژنهای ویژه تحمل کننده اکسیژن توصیف گردد.

جنس یا گروه	درصد کل جداسازی ها
کوماموناس - پسودوموناس	۵۰
آلکا لیژنز	۸/۵
پسودوموناس (گروه فلورسانت)	۹/۱
پاراکوکوس	۵/۱۱
ناشناخته (باسیلهای گرم منفی)	۹/۱
آئروموناس	۹/۱
فلاووباکتریوم – سیتوفاگا	۵/۱۳
باسیلوس	۹/۱
میکروکوکوس	۹/۱
کورینه فرم	۸/۵
آرتروباکتر	۸/۵
آئروباکتریوم – میکروباکتریوم	۹/۱

قارچ ها :

- لجن فعال معمولاً جهت رشد قارچ ها مناسب نیست گرچه برخی قارچ های رشته ای به ندرت در فلوکه های لجن فعال مشاهده می شوند. قارچها ممکن است به طور فراوان تحت شرایط ویژه pH پایین، سمیت پایین و کمبود نیتروژن پساب رشد نمایند. جنس های غالب یافت شده در لجن فعال شامل *ژئوتریکوم، پنی سیلیوم، سفالوسپوریوم، آلترناریا* هستند.

- بالکینگ لجن فعال ممکن است نتیجه رشد قارچ *ژئویکوم کاندیدیوم* باشد که علاقه مند به pH پایین در پساب های اسیدی می باشد.

پروتوزوئرها :

- پروتوزئر ها همانند محیط های آبی طبیعی شکار کننده های قابل توجه باکتری ها در لجن فعال هستند. تغذیه پروتوزوئر ها از باکتری ها می تواند به طور تجربی با اندازه گیری جذب باکتریهای نشاندار شده با مواد فلورسنت انجام شود. تغذیه آن ها می تواند به طور قابل توجهی در حضور مواد سمی کاهش یابد. برای مثال تغذیه پروتوزوئر *آپلیدیسکا کوستاتا* روی باکتریهای لجن فعال در حضور کلسیم کاهش می یابد . پروتوزوئرها شامل انواع زیر هستند :

- ۱. مژکداران
- ۲.تاژکدارن
- ۳. ریسه پایان (آمیب)
- ۴.روتیفر ها

ایجاد بالکینگ در فاضلاب :

- بالکینگ مانع جدا شدن لجن از فاضلاب و مانع رسوب فلوکه ها می شود (در اثر رشد پراکنده یا بالکینگ رشته ای)

علل تشکیل بالکینگ

- شوک حرارتی یا اختلاف دمای ناگهان ، اختلاف هوادهی ، شوک مواد آلی ، شوک مواد پاک کننده و شوک مواد سمی

- میکروارگانیسم های بالکینگ کننده شامل ۲ دسته اند : باکتری های رشته ای و قارچ ها. باکتریهای رشته ای در چند دسته طبقه بندی می شود.

- برخی نمونه های میکروارگانیسم های رشته ای باکتریهای غلافدار (مثل *اسفروتیلوس*) و باکتریهای لغزنده (مثل *بژیاتوآ*) هستند که مسئول پدیده بالکینگ لجن هستند .
- میکروارگانیسم های بالکینگ کننده شامل ۲ دسته اند : باکتری های رشته ای و قارچ ها
- باکتری های رشته ای در چند دسته طبقه بندی می شود .
- باکتریهای رشته ای غلاف دار (Sheathed bacteria) : یک گروه آن گرم منفی و یک عده گرم مثبت هستند . گرم منفی مثل *اسفروتیلوس* ، *لپتوتریکس* ، *هالیس کامنوباکتر* گرم متغیر مثل تیپ ۰۰۴۱
- باکتریهای رشته ای لغزنده مثل *بژیاتوآ* (گوگردی و بدون غلاف) ، *توکسوتریکس* (غلافدار شبیه *هالیس کامنوباکتر* ولی U شکل) ، و *تیوتریکس* (روزت شکل)
- باکتریهای رشته ای بدون غلاف مثل *میکروتریکس* (گرم مثبت) و تیپ ۰۴۱۱ (*استرپتوباسیل* گرم منفی)

بررسی خصوصیات برخی از باکتریهای رشته ای :

1) ***اسفروتیولوس (Sphaerotilus)*** : غلاف حالت smoothدارد و قطر آن ۵/۲ – ۲/۱ میکرومتر است و گاهی اوقات سلول ها حالت مکعبی دارند که کل غلاف را پر می کنند و غلاف در قسمت هایی که سلول ها وجود ندارند دیده می شود.

2) ***لپتوتریکس*** : Leptothrix حالت Rough دارد و چون رسوب منگنز روی آن وجود دارد قطر آن هم ، ۴/۱ – ۶/۰ است . قطر اسفروتیلوس ۲ برابر لپتوتریکس است .

3) ***هالیس کامنوباکتر*** : Haliscamenobacter میله ای گرم منفی بوده و غلاف بسیار ظریفی دارد و دارای انشعابات حقیقی Branch هستند .

- هالیس کامنوباکتر و اسفروتیلوس به خاطر ترکیب پلی ساکاریدی غلافشان ، باکتریهای دیگر را به سطح خود جذب می کنند .

1) **تیپ ۰۰۴۱ :** میله ای گرم مثبت یا گرم متغیر با غلاف که آن هم می تواند گرم متغیر باشد و فاصله کاملاً مشخص (septa) بین سلول های تشکیل دهنده وجود دارد .

2) ***فراگموتریکس* :** سلول های دیسکی شکل و گرم مثبت مثل سکه هایی که روی هم قرار گرفته باشد .

3) ***کالوتریکس* :** مثل *فراگموتریکس* دیسکی شکل است با این تفاوت که کالوتریکس ابتدا و انتهای رشته یک اندازه نیستند .

باکتری های رشته ای بدون غلاف

1. ***Microthrix*** : رشته ای گرم مثبت و بدون septa و حالت کلاف نخ یا اسپاگتی را دارد.

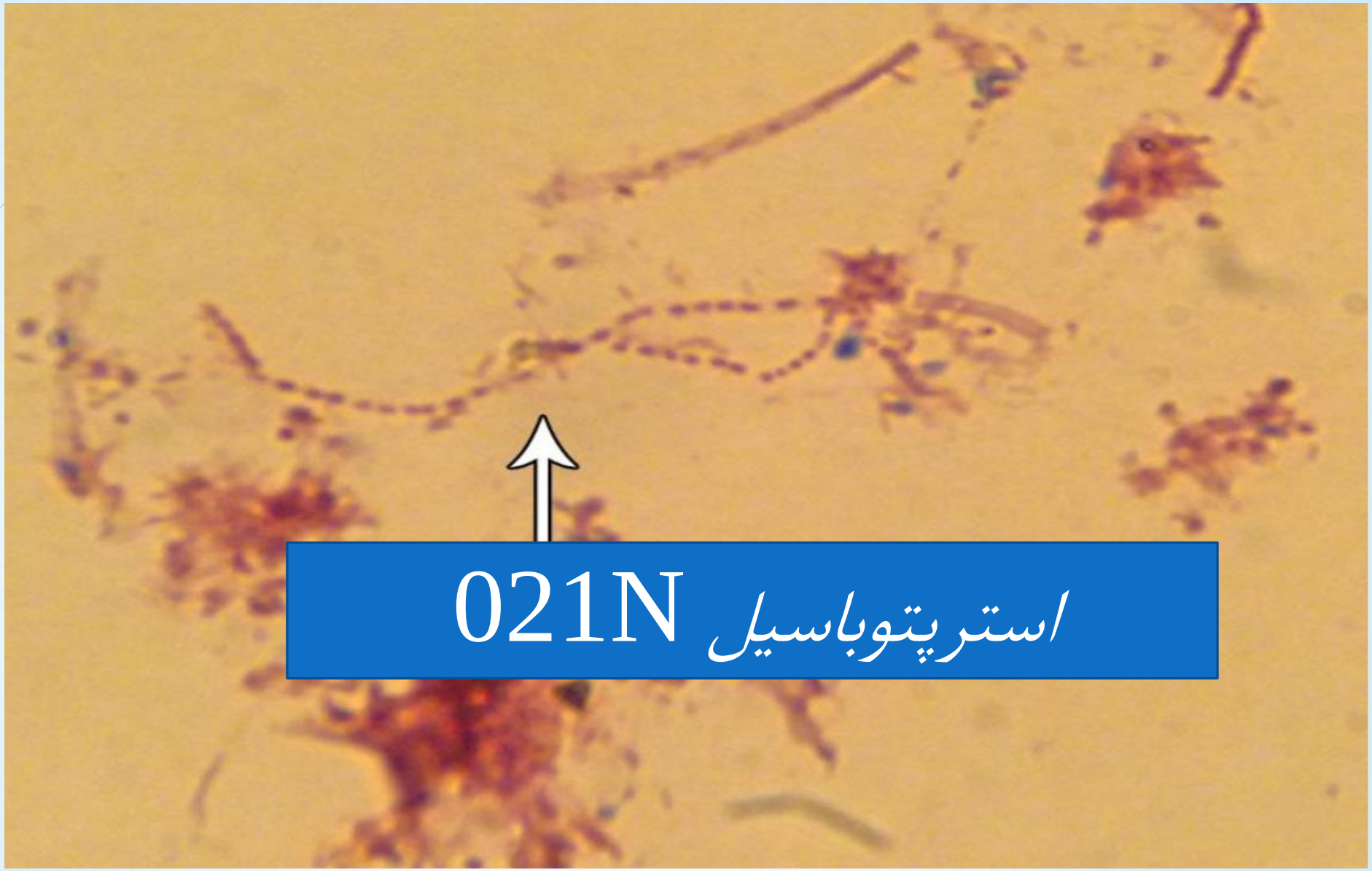
2. ***نوستوکوئیدیدا*** : رشته ای گرم مثبت و بدون انشعاب دارای سپتا است.

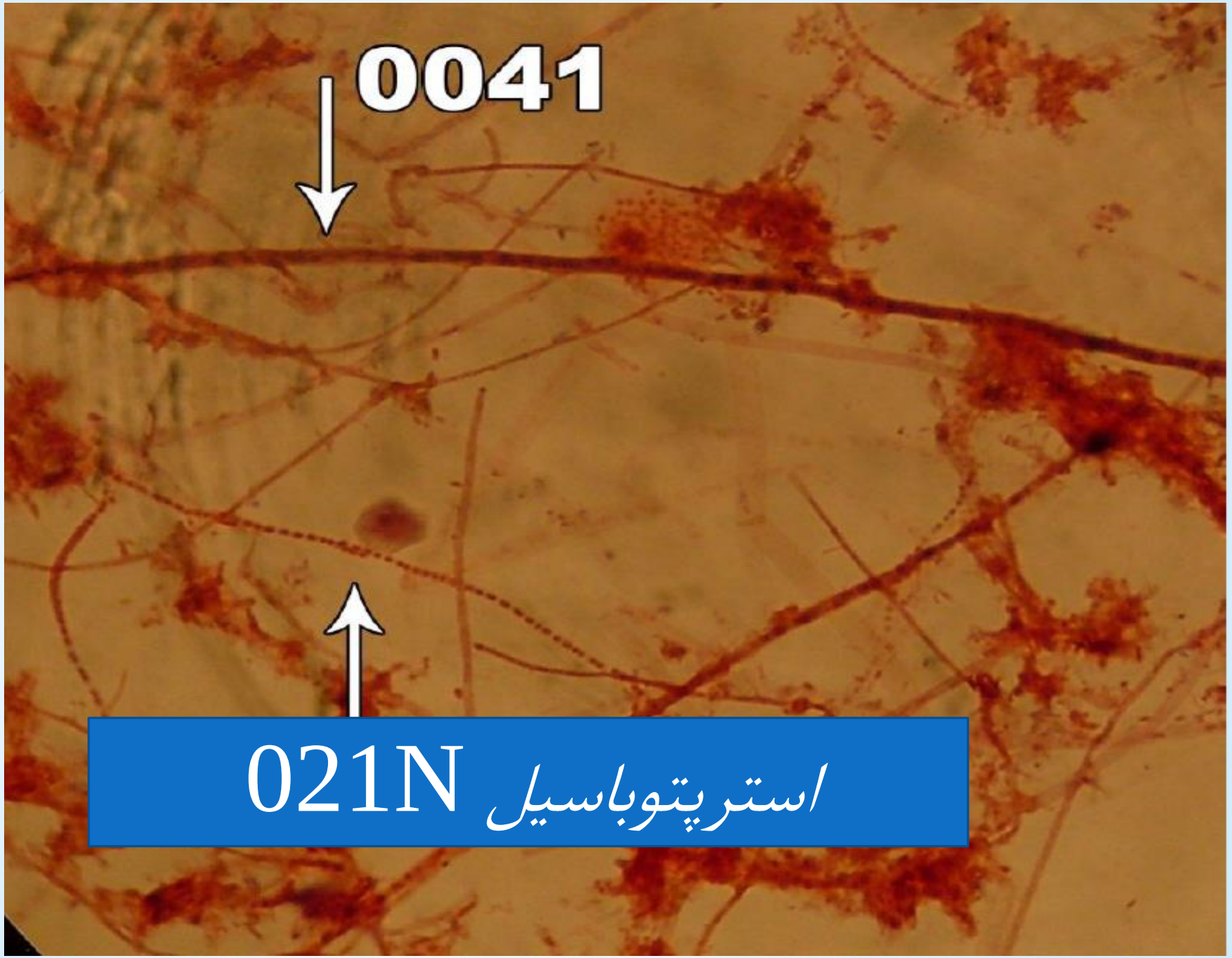
3. ***نوکاردیوفرم ها*** : از *اکتینومیست ها* بوده و برخی از آن ها رشته ای گرم مثبت کوتاه که انشعابات اکثراً راست است.

- برخی از این ها هم رشته های طویلی هستند که منقسم به اجسام کوکسی و میله ای می شود.

٤. ***استرپتومیستها*** : متعلق به *اکتینومیست ها* بوده و رشته ای گرم مثبت، شدیداً منشعب که تشکیل کونیدی می دهند (به شکل زنجیره ای یا مارپیچی).

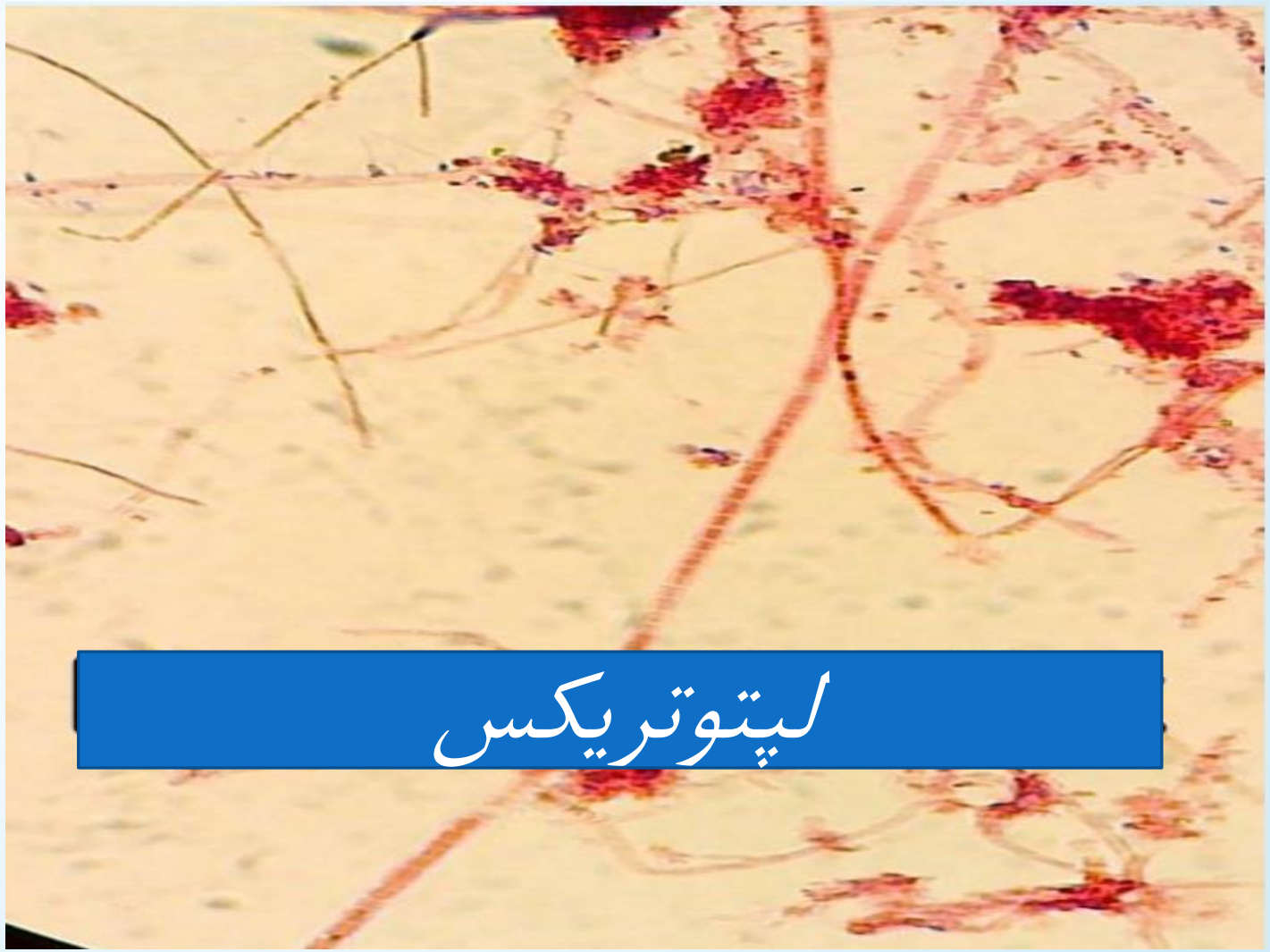
٥. ***بژیاتوآ گرم منفی و رشته ای*** : تجمعی از باسیل هایی است که پشت سر هم و بدون septa قرار گرفته اند و دارای ذخیره گوگردی اند.


استرپتوباسیل 021N


0041
021N استرپتوباسیل

0041
021 N
استرپتوباسیل

لپتوتریکس : Leptothrix حالت Rough دارد و چون رسوب منگنز روی آن وجود دارد قطر آن هم ، ۴/۱ – ۶/۰ است . قطر اسفروتیلوس ۲ برابر لپتوتریکس است .



نوکاردیا

استرپتوباسیل

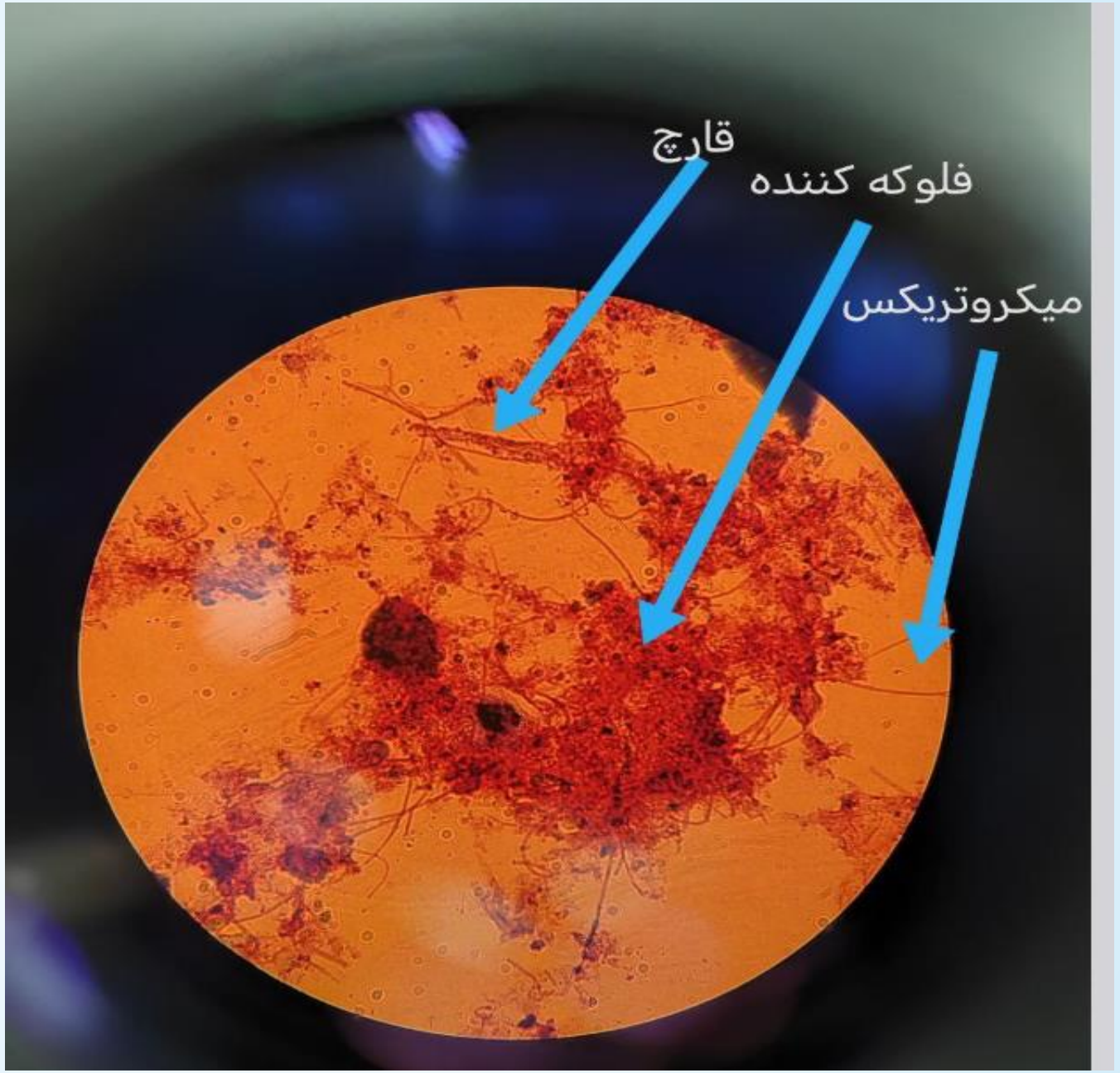
فراگموتریکس : سلول های دیسکی شکل و گرم مثبت مثل شکه هایی که روی هم قرار گرفته باشد .

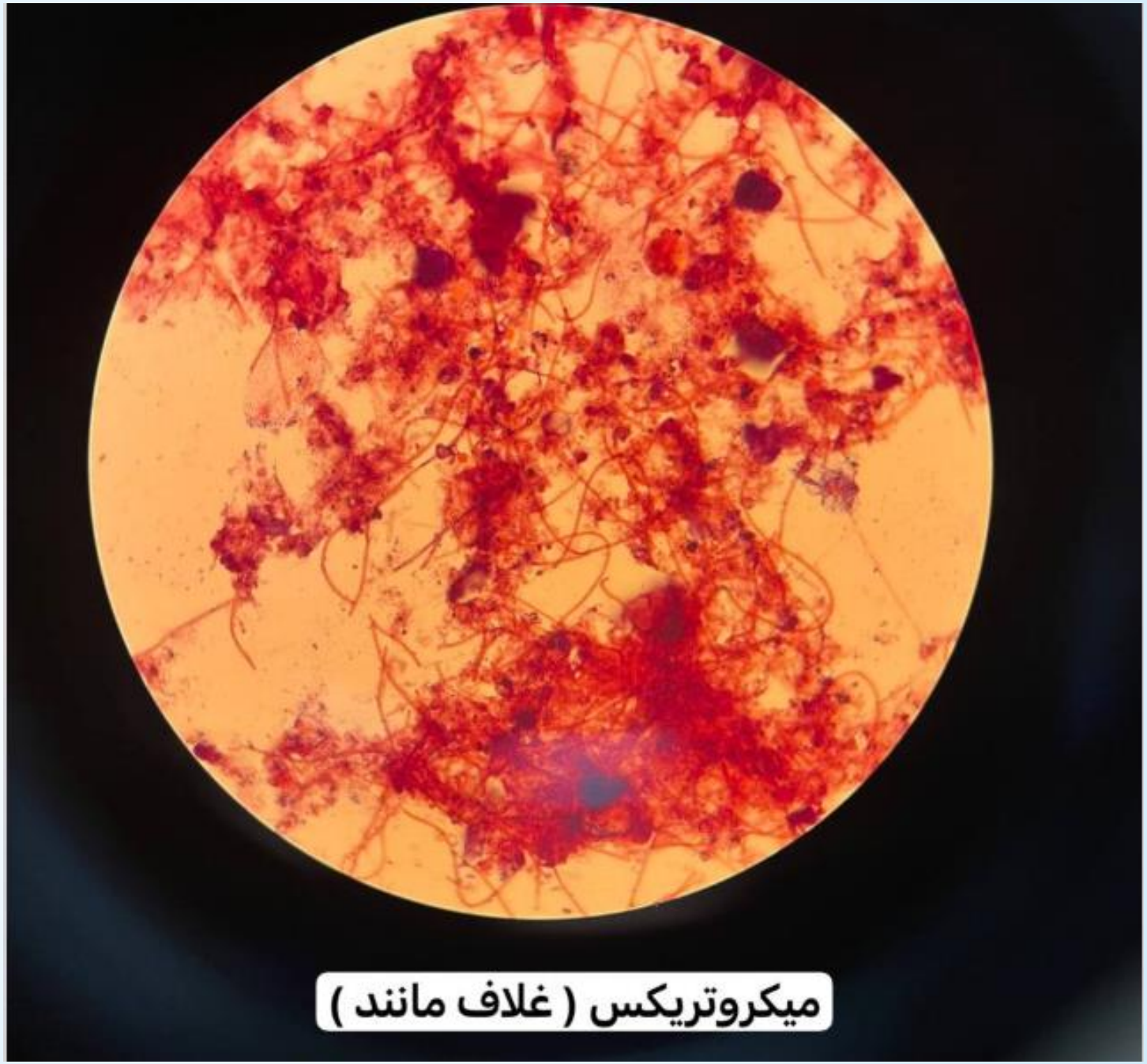
میکروتریکس (گرم مثبت)

نوکاردیا

هالیس کامنوباکتر : *Haliscamenobacter* میله ای گرم منفی بوده و غلاف بسیار ظریفی دارد و دارای انشعابات حقیقی Branch هستند .

هالیس کامنوباکتر و اسفروتیلوس به خاطر ترکیب پلی ساکاریدی غلافشان ، باکتریهای دیگر را به سطح خود جذب می کنند.


قارچ
فلوکه کننده
میکروتریکس


میکروتریکس (غلاف مانند)

با سپاس فراوان از توجه شما