



دانشگاه اصفهان

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



آزمایشگاه میکروب پایه

میکروبیولوژی آب



آزمایش میکروبی آب:

- تعداد و تنوع میکروارگانیسم های موجود در آب بسیار متغیر بوده و به عوامل متعددی وابسته است همچون:
 - (الف) نوع آب: آبهای سطحی نسبت به آبهای عمقی آلوده ترند.
 - (ب) مواد آلی: هر قدر مواد آلی آب بیشتر باشد مدت زنده ماندن باکتریها در آب بیشتر است در نتیجه تعداد و تنوع باکتریهای موجود در آب بیشتر است.
 - (پ) درجه حرارت: هر قدر درجه حرارت آب به دمای اپتیمم باکتری ها نزدیک شود فعالیت باکتریها نیز بیشتر می شود در نتیجه دمای بالا می تواند اثر معکوس داشته باشد چرا که باعث افزایش فعالیت باکتریها شده و این خود عامل محدود کننده ای است. شایان ذکر است که باکتریها سرما را بهتر از گرما تحمل می کنند.
 - (ت) غلظت یون هیدروژن: هر قدر آب اسیدی تر شود تعداد کمتری قادر به زنده ماندن هستند و تنها باکتریهای مقاومی همچون تیوباسیلوس ها قادر به رشد خواهند بود.
 - (ث) مقدار اکسیژن : مقدار اکسیژن محلول در آب در فعالیت باکتریهای هوازی و بی هوازی نقش دارد.



- (ج) املاح: برخی از املاح در غلظت‌های بسیار کم هم نقش باکتری کشی دارند. به همین جهت باکتریها در آب دریا سریعتر از بین می روند.
- (چ) نور: هر قدر نور خورشید بیشتر به آب بتابد اثر باکتری کشی بیشتری خواهد داشت اشعه UV).
- (ح) تک سلولیهها: چون عمده تک سلولی ها از باکتریها تغذیه می کنند لذا باعث کاهش تعداد آنها در خاک می شوند.
- (خ) انبار کردن : در اثر انبار کردن آب علاوه بر مواد آلی ، باکتریها نیز رسوب کرده و تعداد آنها کاهش می یابد(ویبریو کلرای موجود در آب پس از یک هفته انبار شدن ۹/۹۹٪ کاهش می یابد).
- (د) صافی طبیعی: هر قدر چاه عمیق تر باشد آلودگی آن کمتر است. چرا که آب با عبور از لایه های خاک ، صاف شده و در عمق ۳-۴ متری بطور تقریبی عاری از میکروب می شود.



نگهداری و ذخیره

- نمونه های آب پس از برداشت باید هر چه زودتر مورد آزمایش قرار گیرند تا از تغییرات غیر قابل پیش بینی جلوگیری شود.
- اگر نمی توانید نمونه ها را تا یکساعت پس از جمع آوری آزمایش کنید، از یخچال برای نگهداری نمونه استفاده کنید یا نمونه ها را درون یخ قرار دهید. بهر حال نمونه های آب نباید بیش از ۱۲ ساعت بین برداشت و آزمایش آن فاصله باشد. (برای نمونه های فاضلاب بین ۱ تا ۶ ساعت).



آزمایش بهداشتی میکروبی آب

• روش آزمایش 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 اینست که 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 می شوند می توان 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 جوشان دلیل برپاک و بهداشتی بودن آب می باشد.
- علل عمده این امر اینست که 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 اعمالی که به طور طبیعی و یا مصنوعی در طی ذخیره شدن آب در منابع، رسوب دادن و کلرزدن و سایر کارهاییکه 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 باکتریهایی 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.



آزمایش کلی متری

- جهت بررسی بهداشت آب طبق نظر سازمان بهداشت جهانی WHO کلی متری انجام می شود. E.coli باکتری های خانواده انتروباکتریاسه بوده که در مدفوع انسان و حیوانات پستاندار به مقدار زیاد وجود دارد و هم اینکه بعد از مدت ها قبل پذیرفته شده که آلودگی آب به مدفوع انسان و حیوان به طور حد منتج به آلودگی به E.coli نیز می گردد.
- به طور معمول در آزمایشگاه به خاطر اینکه جستجوی تک تک باکتری های بیماری زا روشی بسیار مشکل و سخت است که جهت تعیین آلودگی آب از باکتریهای شاخص آلودگی همچون اشریشیا کلی استرپتوکوکوس فکالیس و کلستریدیوم پرفرنجنس استفاده می کنند.
- تعداد کل کلی فرمها (انتروباکتر ، کلبسیلا، سیتروباکتر، اشریشیا) در یک نمونه آب می تواند بوسیله یک روش تخمین آماری که به آن بیشترین تعداد احتمالی با **most probability number (MPN) test** می گویند انجام شود.
- این تست شامل سریهایی از لوله های تخمیری به همراه لوله دور هام می باشد و به سه مرحله تقسیم می شود: مرحله احتمالی ، تائیدی و تکمیلی. در مرحله تست احتمالی ، رقتهایی از نمونه آب مورد نظر به لوله های تخمیر حاوی **lactose** یا **lauryl tryptose broth** افزوده می شوند.

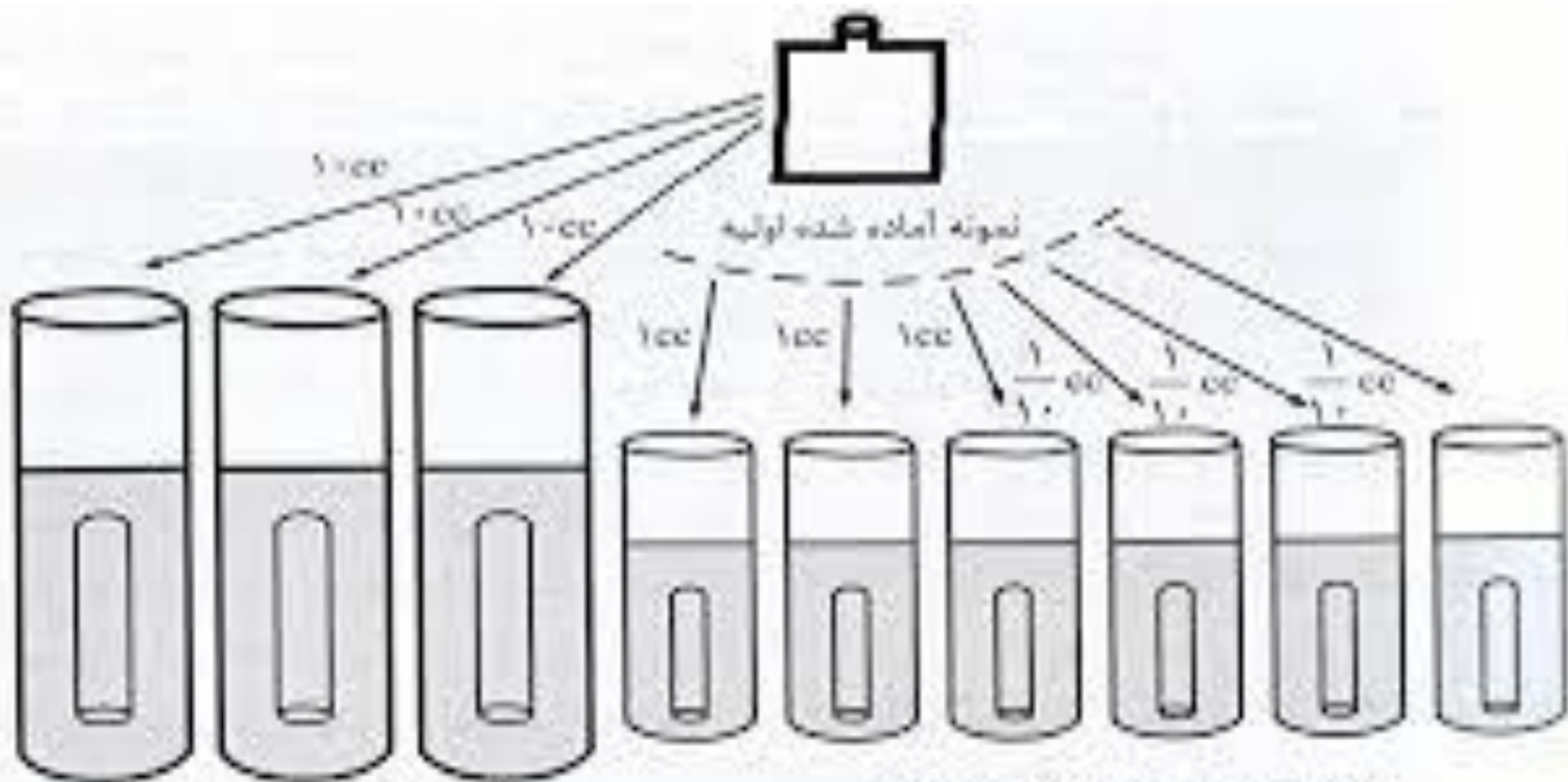


تست فرضی (احتمالی):

تست فرضی را می توان با روش ۱۵ لوله ای، روش ده لوله ای، روش پنج لوله ای و ۹ لوله ای انجام داد. بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت انکوباسیون . در ۳۷ درجه ، باید به دنبال باکتری بگردیم که قادر به تخمیر لاکتوز با تولید گاز باشد که احتمالاً کلی فرم است.

در این مرحله از محیط کشت لاکتوز برات با دو رقت یک غلظتی و دوغلظتی استفاده می کنیم بدین ترتیب که سه لوله لاکتوز برات دوغلظتی و شش لوله لاکتوز برات یک غلظتی را به ترتیب در یک جا لوله قرار می دهیم . در سه لوله اول که لاکتوز برات دوغلظتی است به میزان ۱۰ سی سی از نمونه آب را اضافه می کنیم ، در سه لوله دوم که لاکتوز برات یک غلظتی است به میزان ۱ سی سی و در سه لوله سوم که آن هم لاکتوز برات یک غلظتی است به میزان ۰/۱ سی سی از نمونه آب را اضافه می کنیم . بعد از آن لوله ها را بهم زده در داخل انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴-۴۸ ساعت قرار می دهیم در این مرحله احتمال وجود باکتری ها بررسی می شوند و با واحد MPN در هر ۱۰۰ میلی لیتر گزارش می شود .





سه لوله آزمایش بزرگ هر کدام
محتوی ۲۰ میلی لیتر لاکتوز قوی
(۲ برابر) همراه با لوله تورهام

شش لوله آزمایش معمولی هر کدام
محتوی ۱۰ میلی لیتر لاکتوز یک برابر
(معمولی) همراه با لوله تورهام



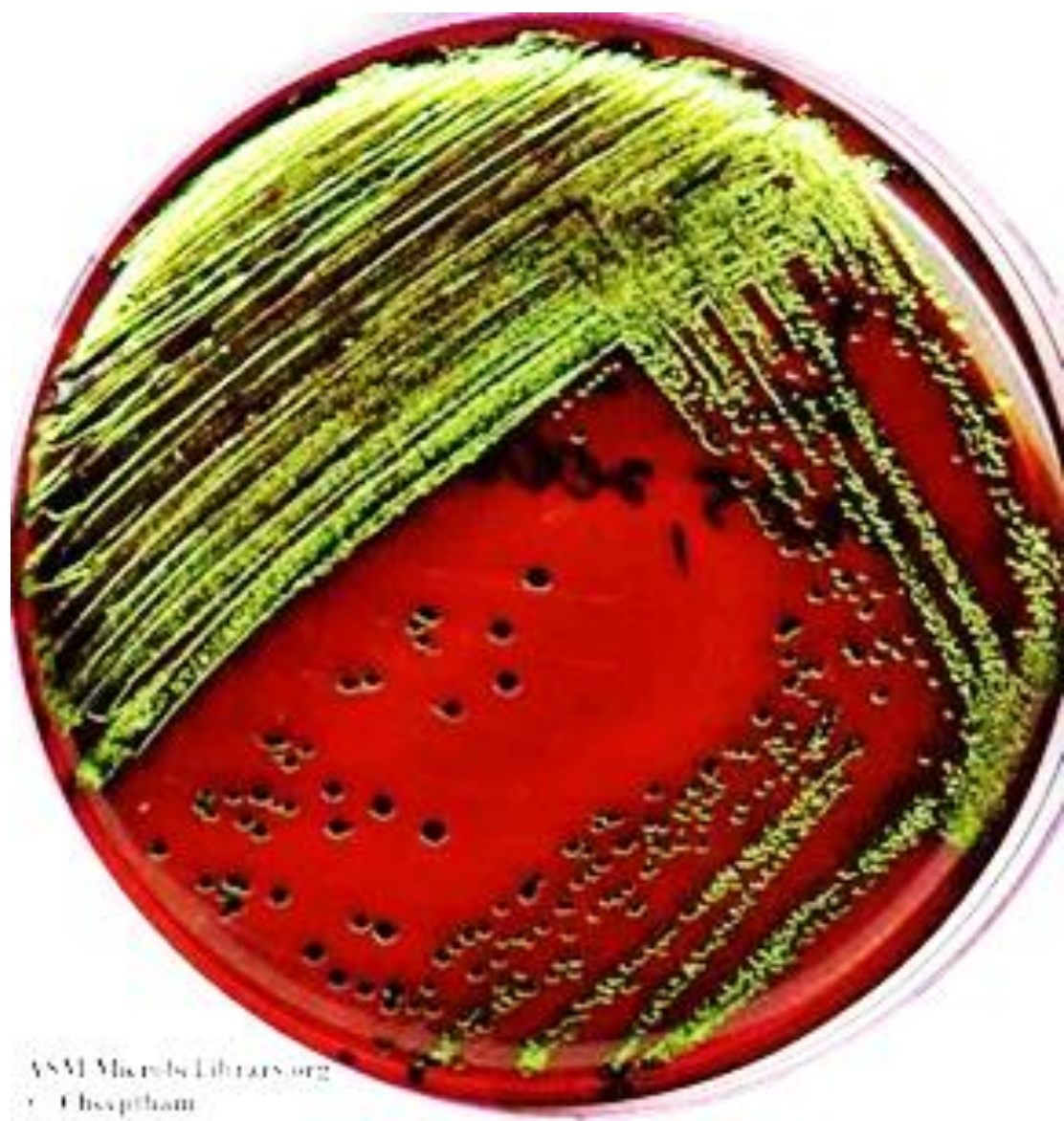
• تست تاییدی:

• در تست تاییدی از بیشترین رقتی از لوله های لاکتوز برائی که رشد داشته و تولید گاز کرده است به داخل محیط brilliant green lactose bile broth یا BGLB یک قطره با لوپ تلقیح می کنیم. همچنین در محیط EMB نیز از روی لوله حاوی محیط لاکتوز براث که در مرحله اول اسید و گاز مثبت بوده است که احتمال دارد کلی فرم در آن باشد) یک قطره برده و به روش استریک پلیت مند کشت می دهیم و پلیت را در اتوو ۳۷ درجه به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت اتوو گذاری می کنند.

• EMB یک محیط کشت افتراقی و انتخابی می باشد که از رشد باکتریهای گرم مثبت ممانعت می کند و کلی فرمها که باکتریهای گرم منفی هستند بصورت کاملا مشخص روی این محیط بصورت کلنی های صورتی رنگ با مرکز تیره با اطراف صورتی یا بنفش و بعضی با جلای سبز متالیک رشد می کنند.

• محیط BGLB نیز یک محیط افتراقی و انتخابی برای کلی فرمها می باشد. پس از سپری شدن زمان مزبور در صورت رشد بر روی EMB و ایجاد کلنی بر روی آن و تولید گاز در محیط BGLB تست تائیدی بر وجود کلی فرم مثبت است ولی علت کافی و کامل برای آلودگی آب به کلی فرمها نیست. بنابراین بایستی مرحله تکمیلی را انجام داد.





ASAP Microbiology.org
© Chocpitham

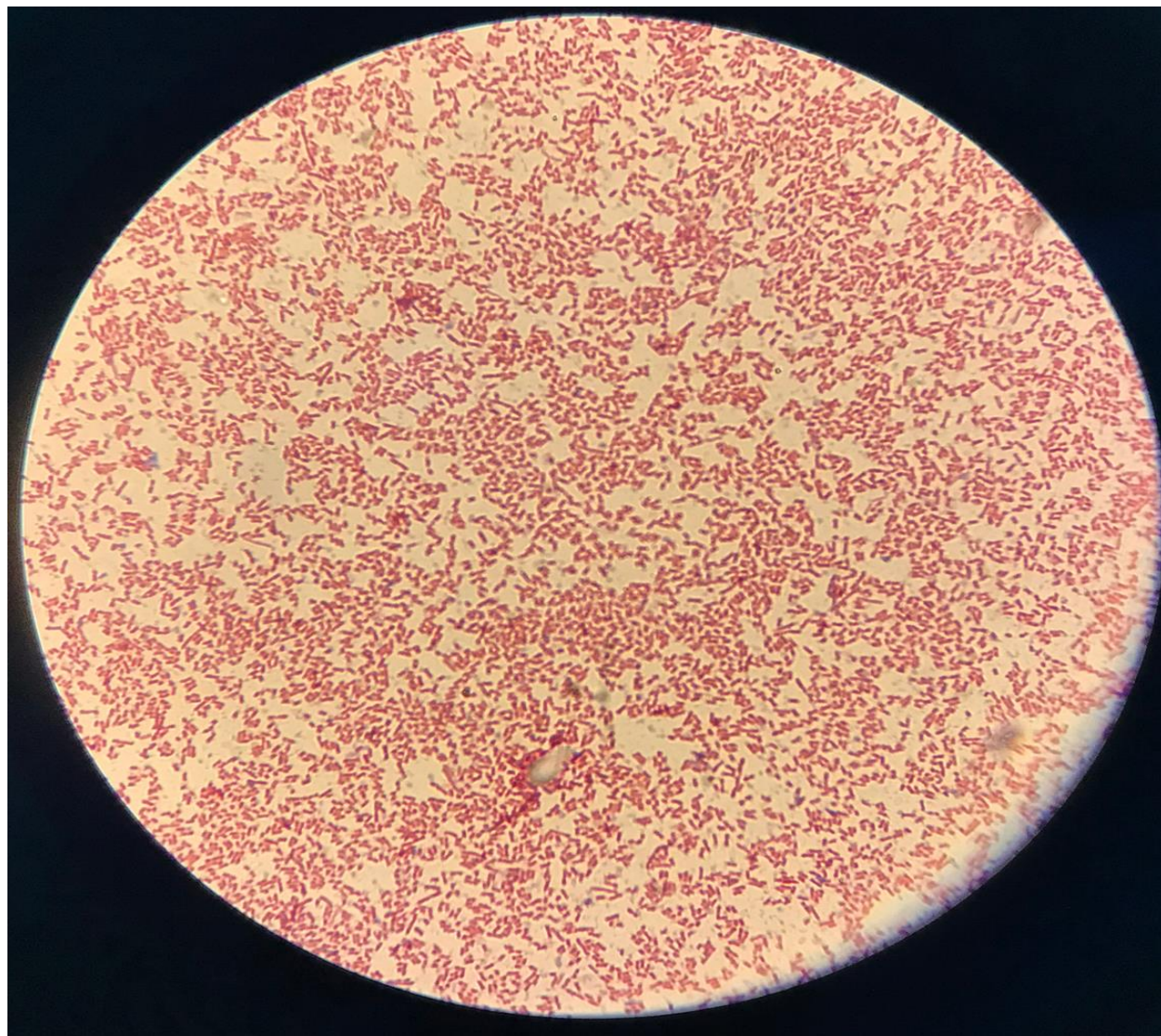




در تست تکمیلی، از یک کلنی خالص و مجزا بوسیله لوپ استریل برداشته (یا از لوله های مثبت بر می داریم) و روی آگار اسلنت و لاکتوز براث حاوی لوله دور هام تلقیح می کنیم . هر دو را ۲۴ تا ۴۸ ساعت در اتوو ۳۷ درجه نگهداری می کنیم.

پس از ۲۴ ساعت از آگار اسلنت یک فروتی تهیه کرده و آنرا به روش گرم رنگ آمیزی می کنیم. اگر در لام تهیه شده باکتریهای میله ای کوتاه (کوکوباسیل) گرم منفی و بدون اسپور مشاهده کردید و در لوله لاکتوز براث هم اسید و گاز تولید شود نتیجه تست تکمیلی هم مثبت است





تولید گاز

- 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 ممکن است در محیط لاکتوز براث کلی فرم ها قند لاکتوز 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. می توان 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 ۳۷ درجه سانتیگراد مورد آزمایش و بررسی قرار می دهند.



رشد هوازی:

- 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: ائوزین 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 گیرد در صورت وجود کلی فرم در نمونه آب می توان وجود آنها کاملا 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 و متیلن بلو محیط کشت را جهت رشد سایر باکتریهایی که مورد نظر نیستند نامناسب می سازد.



تست احتمالی

بعد از کشت لاکتوز برات به مدت ۳ ± ۴۸ ساعت در انکوباتور ۱۵ ± ۲۵ درجه سانتیگراد قرار می دهیم.

تست تأییدی

برای لوله هایی که در مرحله احتمالی مثبت شده اند به طریق ذیل عمل می کنیم.

از هر لوله مثبت CC ۱۱ در محیط برلیانت گرین (۴۰ گرم در لیتر) کشت داده و به مدت ۳ ± ۴۸ ساعت در انوکلاو ۱۵ ± ۲۵ درجه سانتیگراد قرار می دهیم.

عدم تولید گاز بیانگر
عدم وجود کلی فرم

تولید گاز بیانگر
وجود کلی فرم

از هر لوله مثبت CC ۱۱ در محیط اثرشیاکالی (۳۷ گرم در لیتر) کشت داده و به مدت ۲ ± ۴۴ ساعت در بن ماری $۲ \pm ۴۴/۱۵$ درجه سانتی گراد قرار می دهیم.

عدم تولید گاز نشانگر
عدم وجود
لترشیاکالی

وجود گاز
نشانگر وجود
لترشیاکالی

- تعداد اثرشیاکالی همیشه کمتر یا مساوی کلیفرم به دست می آید.

- محیط کشت شامل لوله های حاوی لوله دورهام و ۱۰ سی سی محیط کشت لاکتوز برات ، EC و برلیانت گرین کنترل شده می باشد.

- محیط کشت لاکتوز برات شامل قوی (۲۶ گرم در لیتر) و ضعیف (۱۲ گرم در لیتر) می باشد.

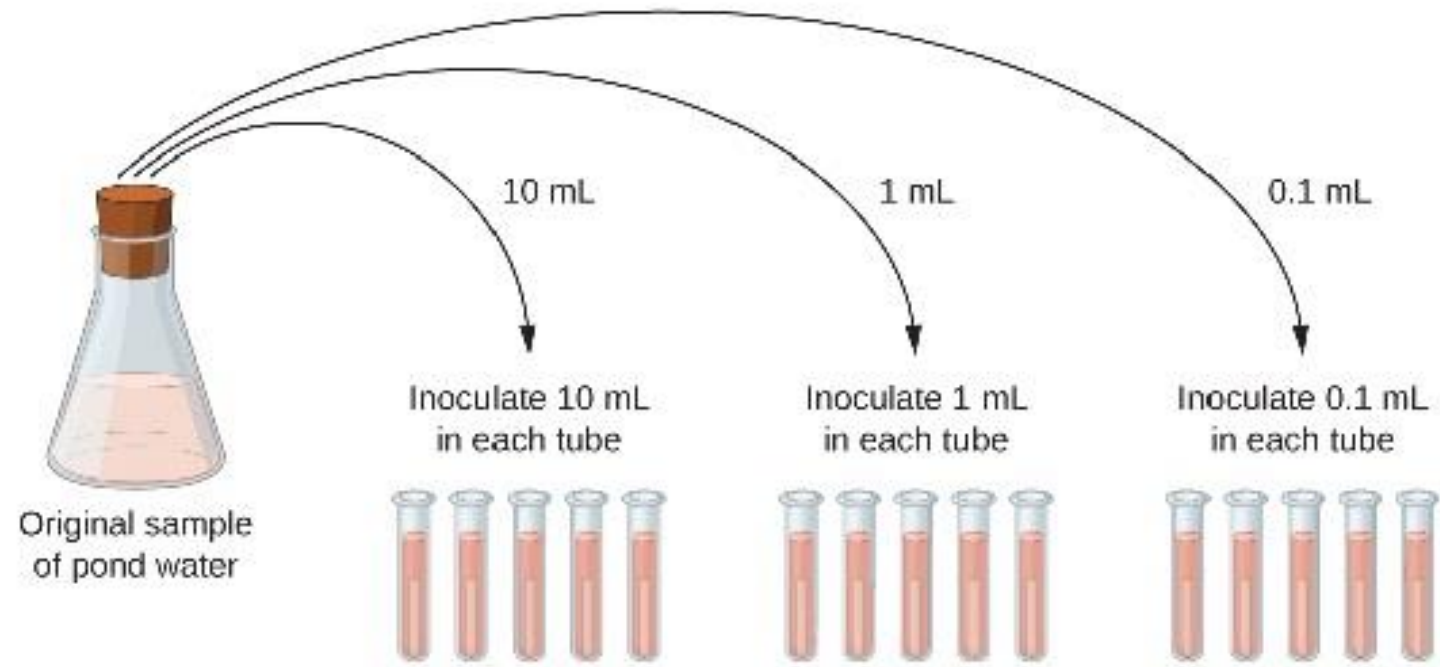


• از باکتریهای کلی فرم می توان اشرشیا کلی (از منبع مدفوعی) و انتروباکتر ائروژنز (معمولا از منبع غیر مدفوعی) را نام برد. البته کلبسیلا و سراشیا هم جزء کلی فرمها می باشند.

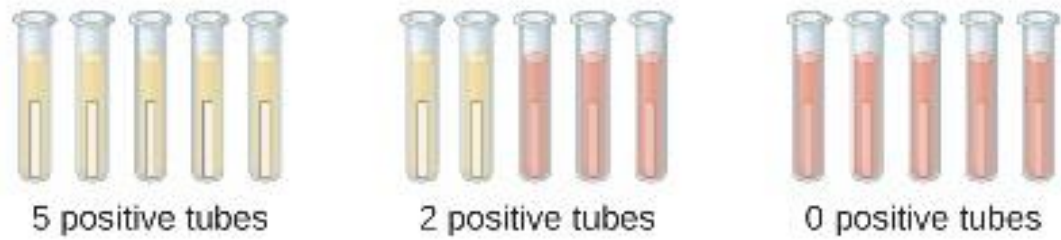
• تذکر: در تست فرضی می توان با استفاده از روش لوله ای MPN را نیز محاسبه کرد: بیشترین تعداد احتمالی باکتریها در ۱۰۰ میلی لیتر آب:

• MPN را هم از روی جدول استاندارد و هم از روی فرمول MPN میتوان محاسبه نمود. برای اینکار نیاز به ۳ لوله لاکتوز براث دو غلظتی و ۶ لوله لاکتوز براث یک غلظتی می باشد که به سه لوله اول ۱۰ میلی لیتر و به ۳ لوله یک غلظتی ۱ میلی لیتر و به ۳ تای دیگر هر کدام ۰/۱ میلی لیتر آب تلقیح می شود.





Incubate at 37 °C for 24 hours



جدول انتشار ویتامین

انتشار ویتامین			تعداد افراد مبتلا	انتشار ویتامین			تعداد افراد مبتلا
بزرگسالان	کودکان	مجموع		بزرگسالان	کودکان	مجموع	
1	2	3	4	5	6	7	
8	9	10	11	12	13	14	
15	16	17	18	19	20	21	
22	23	24	25	26	27	28	
29	30	31	32	33	34	35	
36	37	38	39	40	41	42	
43	44	45	46	47	48	49	
50	51	52	53	54	55	56	
57	58	59	60	61	62	63	
64	65	66	67	68	69	70	
71	72	73	74	75	76	77	
78	79	80	81	82	83	84	
85	86	87	88	89	90	91	
92	93	94	95	96	97	98	
99	100	101	102	103	104	105	
106	107	108	109	110	111	112	
113	114	115	116	117	118	119	
120	121	122	123	124	125	126	
127	128	129	130	131	132	133	
134	135	136	137	138	139	140	
141	142	143	144	145	146	147	
148	149	150	151	152	153	154	
155	156	157	158	159	160	161	
162	163	164	165	166	167	168	
169	170	171	172	173	174	175	
176	177	178	179	180	181	182	
183	184	185	186	187	188	189	
190	191	192	193	194	195	196	
197	198	199	200	201	202	203	
204	205	206	207	208	209	210	
211	212	213	214	215	216	217	
218	219	220	221	222	223	224	
225	226	227	228	229	230	231	
232	233	234	235	236	237	238	
239	240	241	242	243	244	245	
246	247	248	249	250	251	252	
253	254	255	256	257	258	259	
260	261	262	263	264	265	266	
267	268	269	270	271	272	273	
274	275	276	277	278	279	280	
281	282	283	284	285	286	287	
288	289	290	291	292	293	294	
295	296	297	298	299	300	301	
302	303	304	305	306	307	308	
309	310	311	312	313	314	315	
316	317	318	319	320	321	322	
323	324	325	326	327	328	329	
330	331	332	333	334	335	336	
337	338	339	340	341	342	343	
344	345	346	347	348	349	350	
351	352	353	354	355	356	357	
358	359	360	361	362	363	364	
365	366	367	368	369	370	371	
372	373	374	375	376	377	378	
379	380	381	382	383	384	385	
386	387	388	389	390	391	392	
393	394	395	396	397	398	399	
400	401	402	403	404	405	406	
407	408	409	410	411	412	413	
414	415	416	417	418	419	420	
421	422	423	424	425	426	427	
428	429	430	431	432	433	434	
435	436	437	438	439	440	441	
442	443	444	445	446	447	448	
449	450	451	452	453	454	455	
456	457	458	459	460	461	462	
463	464	465	466	467	468	469	
470	471	472	473	474	475	476	
477	478	479	480	481	482	483	
484	485	486	487	488	489	490	
491	492	493	494	495	496	497	
498	499	500	501	502	503	504	
505	506	507	508	509	510	511	
512	513	514	515	516	517	518	
519	520	521	522	523	524	525	
526	527	528	529	530	531	532	
533	534	535	536	537	538	539	
540	541	542	543	544	545	546	
547	548	549	550	551	552	553	
554	555	556	557	558	559	560	
561	562	563	564	565	566	567	
568	569	570	571	572	573	574	
575	576	577	578	579	580	581	
582	583	584	585	586	587	588	
589	590	591	592	593	594	595	
596	597	598	599	600	601	602	
603	604	605	606	607	608	609	
610	611	612	613	614	615	616	
617	618	619	620	621	622	623	
624	625	626	627	628	629	630	
631	632	633	634	635	636	637	
638	639	640	641	642	643	644	
645	646	647	648	649	650	651	
652	653	654	655	656	657	658	
659	660	661	662	663	664	665	
666	667	668	669	670	671	672	
673	674	675	676	677	678	679	
680	681	682	683	684	685	686	
687	688	689	690	691	692	693	
694	695	696	697	698	699	700	
701	702	703	704	705	706	707	
708	709	710	711	712	713	714	
715	716	717	718	719	720	721	
722	723	724	725	726	727	728	
729	730	731	732	733	734	735	
736	737	738	739	740	741	742	
743	744	745	746	747	748	749	
750	751	752	753	754	755	756	
757	758	759	760	761	762	763	
764	765	766	767	768	769	770	
771	772	773	774	775	776	777	
778	779	780	781	782	783	784	
785	786	787	788	789	790	791	
792	793	794	795	796	797	798	
799	800	801	802	803	804	805	
806	807	808	809	810	811	812	
813	814	815	816	817	818	819	
820	821	822	823	824	825	826	
827	828	829	830	831	832	833	
834	835	836	837	838	839	840	
841	842	843	844	845	846	847	
848	849	850	851	852	853	854	
855	856	857	858	859	860	861	
862	863	864	865	866	867	868	
869	870	871	872	873	874	875	
876	877	878	879	880	881	882	
883	884	885	886	887	888	889	
890	891	892	893	894	895	896	
897	898	899	900	901	902	903	
904	905	906	907	908	909	910	
911	912	913	914	915	916	917	
918	919	920	921	922	923	924	
925	926	927	928	929	930	931	
932	933	934	935	936	937	938	
939	940	941	942	943	944	945	
946	947	948	949	950	951	952	
953	954	955	956	957	958	959	
960	961	962	963	964	965	966	
967	968	969	970	971	972	973	
974	975	976	977	978	979	980	
981	982	983	984	985	986	987	
988	989	990	991	992	993	994	
995	996	997	998	999	1000	1001	

جدول انتشار ویتامین در استان تهران - ۱۳۹۵



$$\text{MPN} / 100 \text{ ml} = \frac{100 \times \text{تعداد لوله های مثبت}}{\sqrt{\text{حجم نمونه (ml) در تمام لوله ها} \times \text{حجم نمونه (ml) در لوله های منفی}}}$$

جدول فرمول های رایج برای محاسبه MPN در آزمایش کلیرم





با سیاسی فراوان از توجه شما

تهیه کننده : سهیلا عباسی

