



دانشگاه اصفهان

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



آزمایش باکتریولوژیکی آب

1

آب آشامیدنی ممکن است آلوده به بعضی باکتری‌های بیماری‌زا از جمله سالمونلا، شیگلاها و باکتری‌های دیگر مانند استرپتوکوک‌ها و کلی‌فرم‌ها باشد که تعداد زیاد آن‌ها آب دلیل بر آلوده بودن آن است.

اغلب آزمایش‌های میکروبیولوژی آب بر روی منابع آب آشامیدنی انجام می‌گیرد. چنانچه آب با مدفوع آلوده گردد، میکروارگانیزم‌هایی در آن یافت خواهد شد که در لوله گوارش انسان و جانوران بسر می‌برند و شامل اشرشیاکلی، استرپتوکوکوس فکالیس و کلستریدیوم پرفرینجنس یا باکتری‌های بیماری‌زایی چون سالمونلا، شیگلا، و ویبریوکلا می‌باشد.

➤ میکروارگانیزم های بیماری زای روده ای اگر در آب موجود باشند در برابر باکتری های فلور طبیعی روده مانند اشرشیاکلی، استرپتوکوکوس فکالیس و کلستریدیوم پرفرینجنس در اقلیت قرار می گیرند.

➤ از این جهت این میکروارگانیزم ها، میکروارگانیزم های معرف یا نشان دهنده ی آلودگی با مدفوع و خطرات احتمالی ناشی از میکروارگانیزم های بیماریزای روده می باشد. از این جهت در بسیاری از موارد شناسایی و جدا کردن کلی فرم های مدفوعی از کلی فرم های غیر مدفوعی برای مشخص کردن منبع آلودگی ضروری است.

نمونه برداری آب :

- ▶ نمونه برداری توسط شیشه در سنباده ای یا در پیچ دار که قبلاً سترون شده و حداقل ۱۲۰ میلی لیتر گنجایش داشته باشد انجام می شود.
- ▶ هنگام نمونه برداری بایستی دقت شود تا از آلودگی آب مورد آزمایش جلوگیری گردد. چنانچه نمونه برداری از شیر آب صورت گیرد سطح بیرونی شیر را بایستی با پنبه الکل و یا شعله استریل نموده و آب را بازنماییم تا مدت ۵ دقیقه آب از آن خارج گردد. سپس در شیشه را باز نموده به طوری که با هیچ چیز تماس پیدا نکند و آن را از آب پر می نمایم.
- ▶ اگر نمونه برداری از آب رودخانه یا قنات باشد بایستی شیشه را به اندازه ۱۰ سانتی متر در آب فرو برده و از آب پر می نمایم. هرگز نباید از سطح آب نمونه برداری نمود.

➤ برای جلوگیری از تماس دست با آب بهتر است از وسایل مکانیکی سترون استفاده کرد. (همچنین برای نگه داشتن شیشه و باز کردن در آن) ولی اگر امکان استفاده از وسایل⁵ مکانیکی وجود ندارد می توان با پوشیدن دستکش سترون از تماس دست با آب جلوگیری نمود.

➤ بر روی نمونه بایستی تاریخ و ساعت نمونه برداری، نام نمونه بردار، محل نمونه برداری، کلریزه بودن یا نبودن آب را یادداشت نمود.

➤ برای ارسال آب از محل نمونه برداری تا آزمایشگاه بایستی نمونه را در مجاورت یخ نگهداری نمود.

➤ در آب هایی که دارای کلر هستند (آب های آشامیدنی اکثر شهر ها) در داخل هر بطری (حجم بطری حدود ۱۲۰ میلی لیتر) باید ۰/۱ میلی لیتر از محلول ۰.۳٪ تیوسولفات سدیم برای خنثی کردن کلر باقی مانده در آب اضافه شود.

نکات زیر در روی شیشه نمونه برداری به دقت ذکر شود :

1. تاریخ و ساعت نمونه برداری
2. مصرف آب مورد آزمایش
3. نام نمونه بردار
4. کلریزه بودن یا نبودن نمونه آب

➔ آزمایش آب از لحاظ آلودگی به کلی فرم

➔ آزمایش آب از لحاظ آلودگی به کلی فرم سه مرحله دارد:

1. آزمایش احتمالی

2. آزمایش تاییدی

3. آزمایش تکمیلی

➤ آزمایش ابتدایی یا احتمالی :

➤ برای شمارش و وجود کلی فرم در آب روش MPN (بیشترین تعداد ممکن) از محیط کشت آبگوشت لاکتوزدار استفاده می نماییم. تعداد لوله های حاوی محیط کشت ۹ عدد است که سه عدد آن بزرگ و ۶ عدد آن کوچک است و حاوی لوله های دورهام می باشند (برای دیدن گاز).

1. به سه لوله بزرگ محتوی 20 cc آبگوشت لاکتوزدار با غلظت ۲ برابر (قوی) با لوله های دورهام بزرگ به هر یک 10 cc از آب مورد آزمایش اضافه کنید.

2. به سه لوله کوچک محتوی 10 cc آبگوشت لاکتوز دار با غلظت ۱ برابر (ضعیف) با لوله های دورهام کوچک به هر یک 1 cc از آب مورد آزمایش اضافه نمایید.

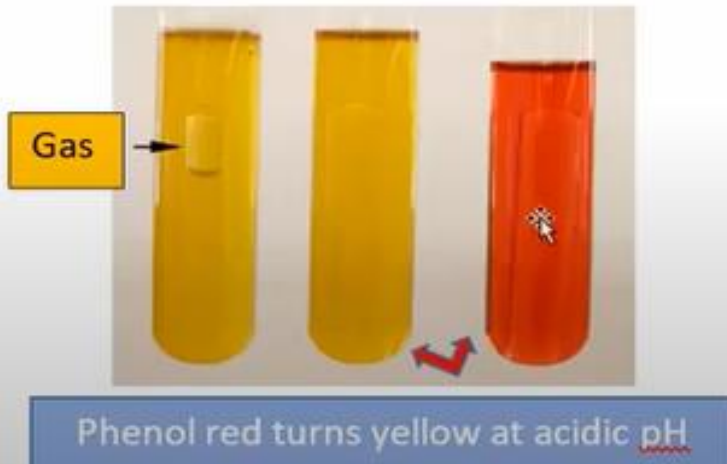
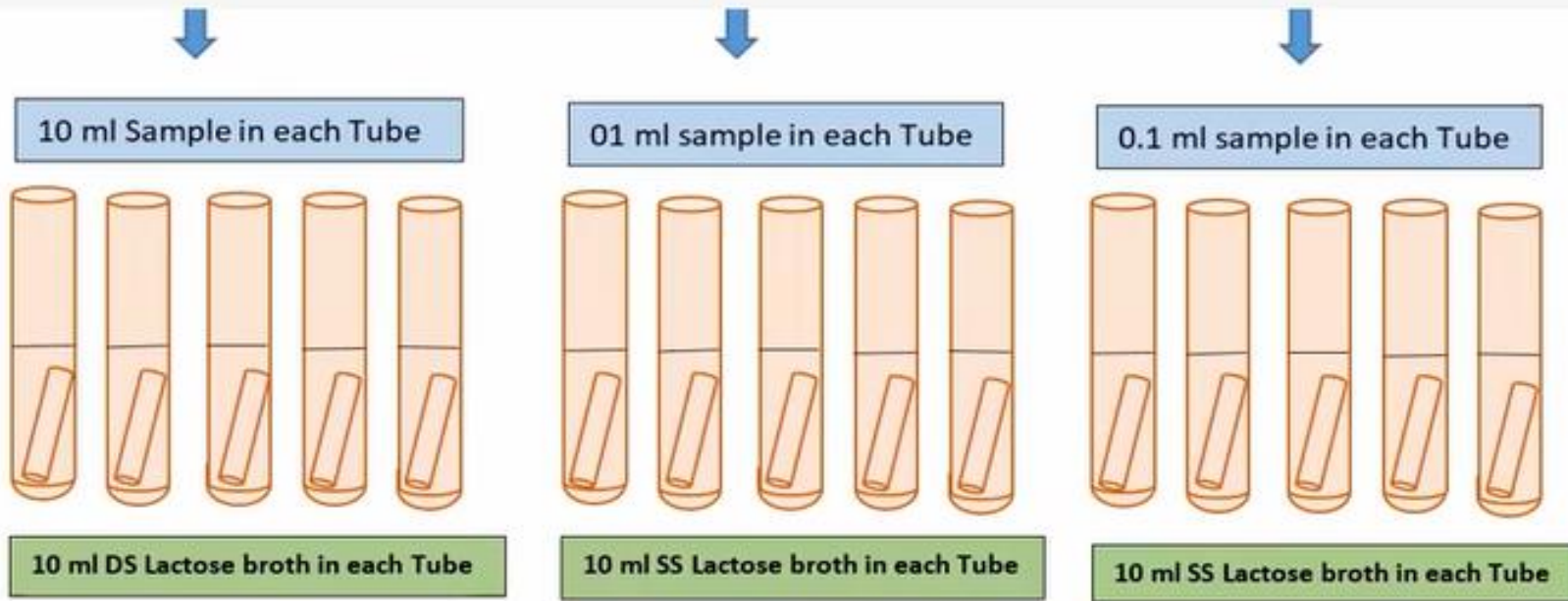
3. به سه لوله کوچک آخری محتوی 10 cc محیط کشت آبگوشت لاکتوزدار (ضعیف) با لوله های دورهام کوچک به هر یک 0.1 cc از نمونه آب اضافه کنید.

➤ پس از تکان دادن لوله ها برای مخلوط شدن با محیط کشت، لوله ها را در اتو یا گرمخانه ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار دهید.

➤ پس از انقضای مدت مذکور چنانچه در لوله های دوره‌ام گاز جمع شده و با ضربه (تلنگر) زدن به دیواره لوله حباب گاز متصاعد گردد، نتیجه مثبت است. تعداد لوله های مثبت را یادداشت کنید.

مثال :

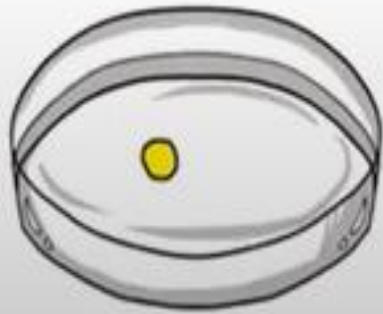
- اگر از سه لوله بزرگ اول ۲ لوله مثبت و از سه لوله کوچک (اول) یک لوله مثبت و از سه لوله کوچک (دوم) ۲ لوله مثبت باشد، بشکل (۲-۱-۲) یادداشت و پس از مراجعه به جدول استاندارد، تعداد احتمالی کلی فرم ها را در 100 cc آب مشخص نمایید.
- ولی تنها با انجام این آزمایش که آزمایش احتمالی است نمی توان گفت که این گاز که در لوله های دورهام دیده شده مربوط به آلودگی کلی فرم است چون امکان دارد میکروارگانیزم های دیگر هم باشند که لاکتوز را تخمیر و ایجاد گاز نموده باشند. لذا جهت تایید کلی فرم لازم است آزمایش ادامه داده شود.



Positive tubes for acid and gas
Production are selected for confirmatory

1. Autoclavation
2. Incubation at 37/44°C for 24 h
3. Observe for acid and gas production
4. Determine MPN from table

12



1 CFU = 1 MPN



No. of tubes giving a positive reaction :			MPN (per 100 ml)
5 of 10 ml	5 of 1 ml	5 of 0.1 ml	
0	0	0	<2
0	1	0	2
0	2	0	4
1	0	0	2
1	0	1	4
1	1	0	4
1	1	1	6
2	0	0	5
2	0	1	7
2	1	0	7
2	1	1	9
2	2	0	9
2	3	0	12
3	0	0	8
3	0	1	11
3	1	0	11
3	1	1	14
3	2	0	14
3	2	1	17
3	3	0	17
4	0	0	13
4	0	1	17
4	1	0	17
4	1	1	21
4	1	2	26

➤ آزمایش تاییدی :

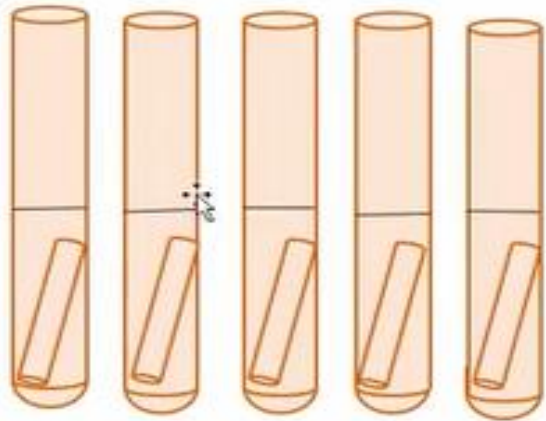
13

➤ برای انجام این آزمایش از محیط کشت آبگوشت سبز درخشان دارای لاکتوز و دو درصد صفرا استفاده می شود. بدین ترتیب که برای هر کدام از لوله های مثبت آبگوشت لاکتوز دار یک لوله سبز درخشان بیفزایید.

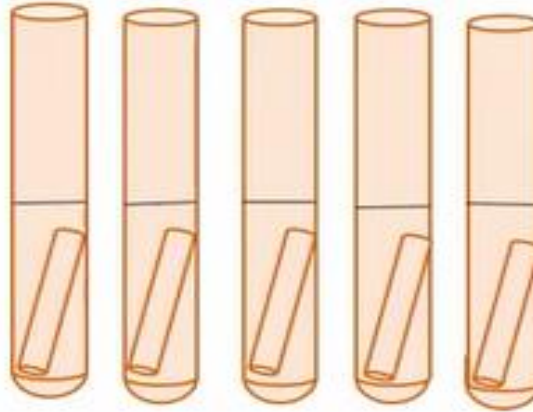
➤ سپس لوله ها را به مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید. پس از این مدت لوله ها را بررسی نمایید،

➤ چنانچه در لوله های محتوی محیط آبگوشت سبز درخشان گاز مشاهده شود، وجود کلی فرم تایید می گردد. چنانچه تشخیص اشرشیا کلی لازم باشد باید آزمایش تکمیلی زیر انجام گیرد.

Confirmatory Phase



Positive Lactose broth Tubes of Set 1, 2 and 3 from Presumptive test



Brilliant green lactose bile broth

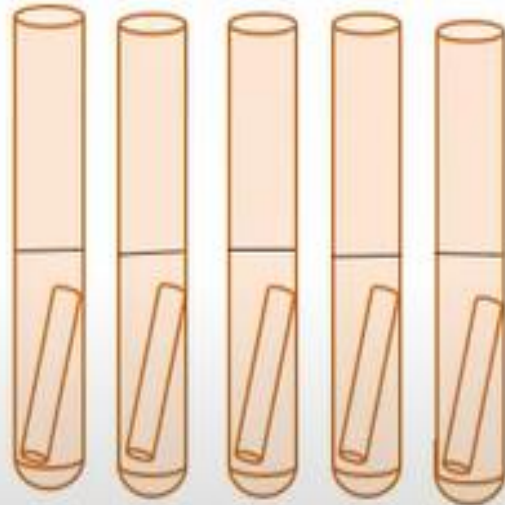
1. A loop full from positive lactose broth Tubes is inoculated in BGLB Broth
2. Incubation at 37°C for 24 h
3. Observe for Turbidity and gas production

➤ آزمایش تکمیلی :

15

- آزمایش تکمیل جهت وجود اشرشیا کلی (آزمایش ایک من) برای هر یک، از لوله های دارای محیط آبگوشت سبز درخشان و دیگری دارای آب پپتونه در نظر بگیرید.
- توسط پی پت سترون دو قطره از لوله های مثبت (گاز دار) محتوی آبگوشت سبز درخشان برداشت کرده و هر یک از دو لوله یاد شده یک قطره بیفزایید و پس از مخلوط کردن برای ۲۴ ساعت در حمام ماری (بن ماری) ۴۴ درجه سانتی گراد قرار دهید.
- سپس به لوله محتوی آب پپتونه چند قطره معرف کواکس بیفزایید. چنانچه پس از این مدت در قسمت بالای لوله حلقه قرمز رنگ تشکیل شود آزمایش از نظر اشرشیاکلی مثبت است.

Completed Phase

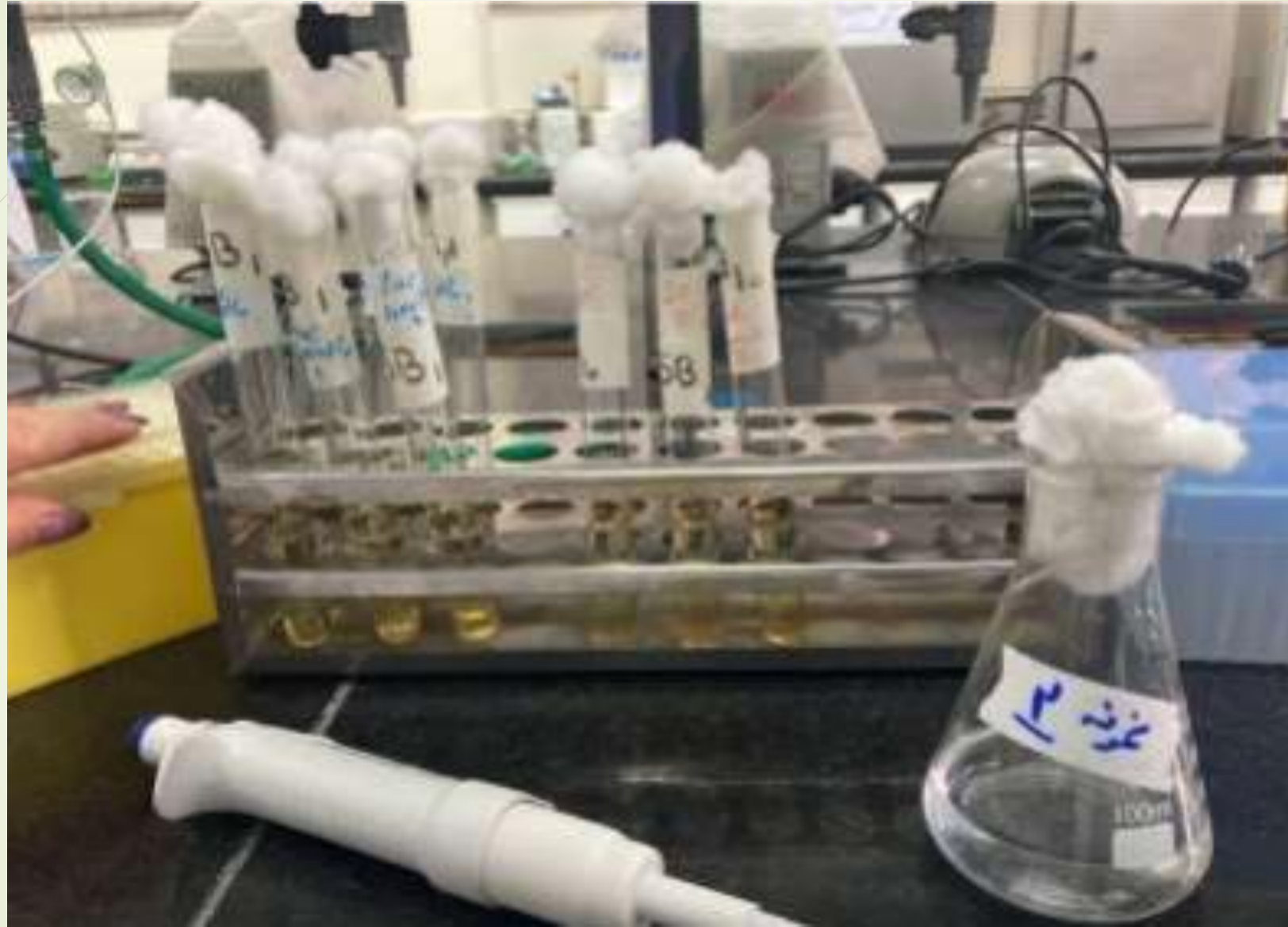


Positive Tubes of Brilliant
green lactose bile broth

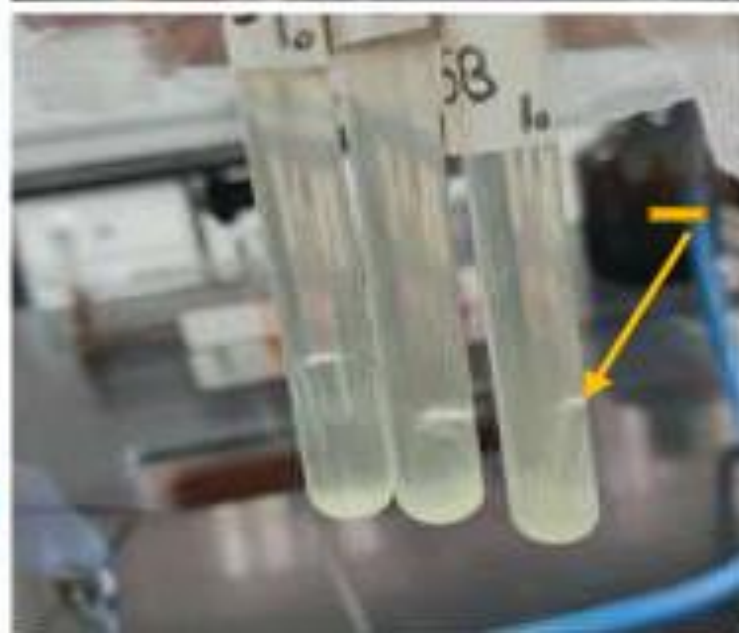
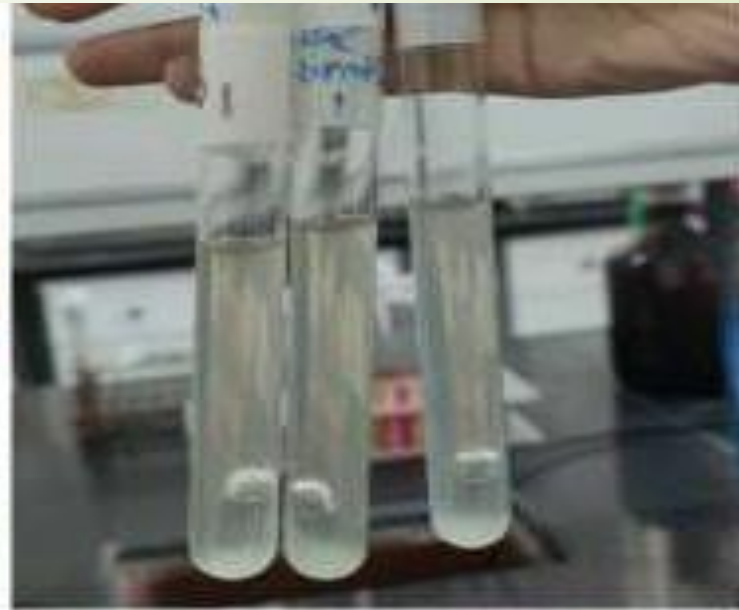
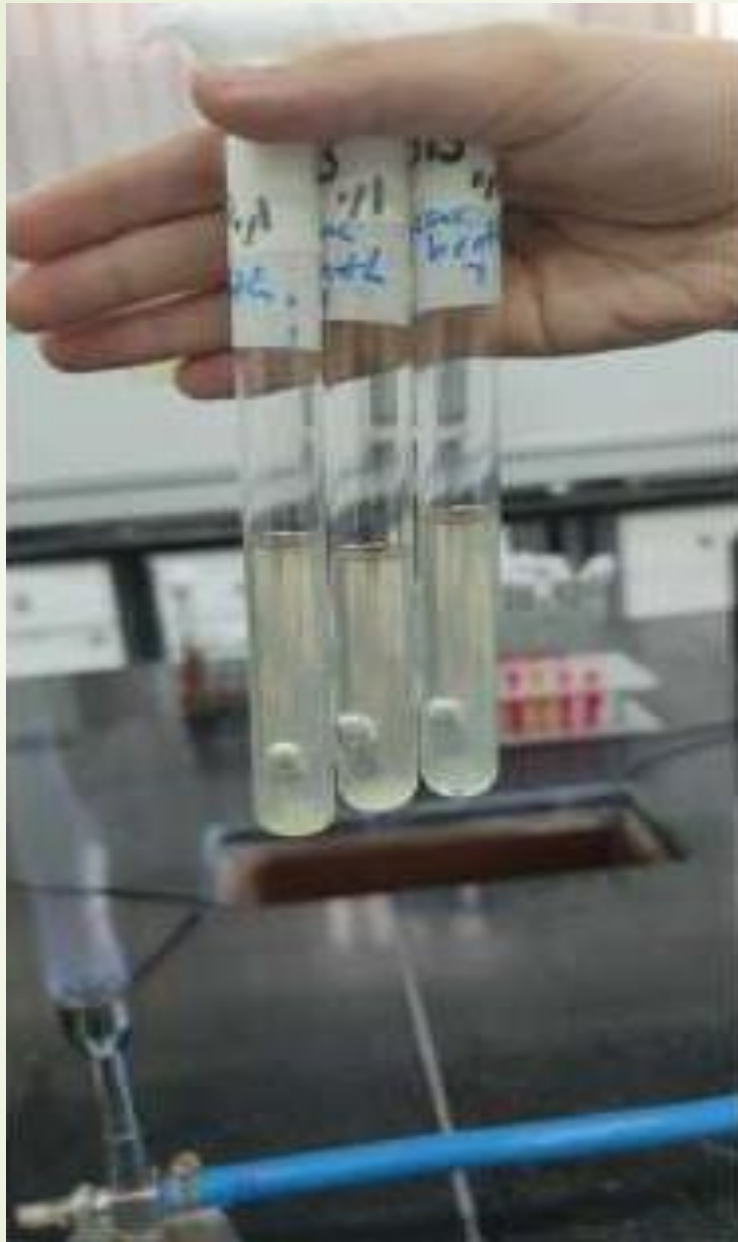
Eosin Methylene Blue Agar



1. A loop full from positive BGLB broth Tubes is streaked on Eosin methylene blue agar
2. Incubation at 37°C for 24 h
3. Observe for pink colonies having green metallic sheen



تهیه کننده : سهیلا عباسی



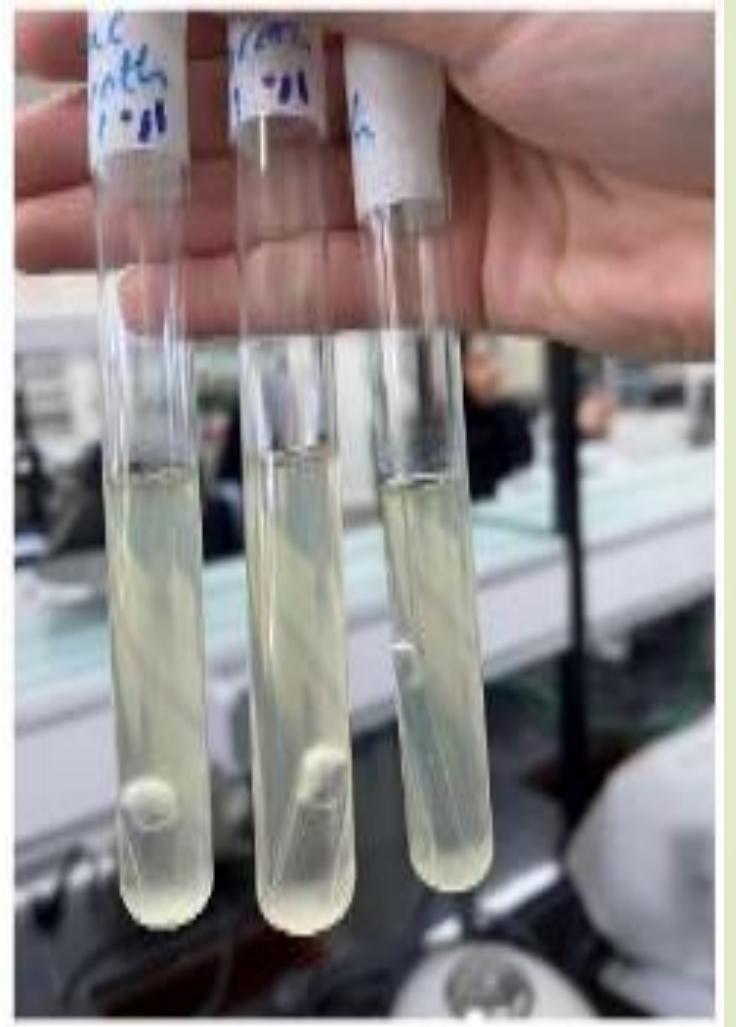
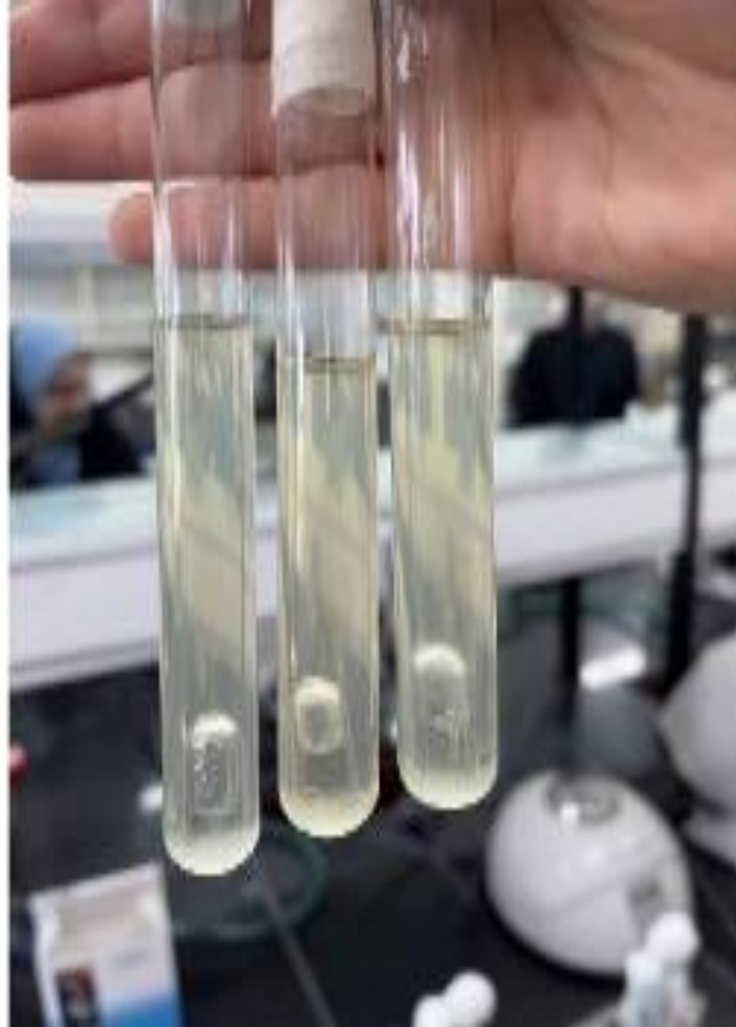
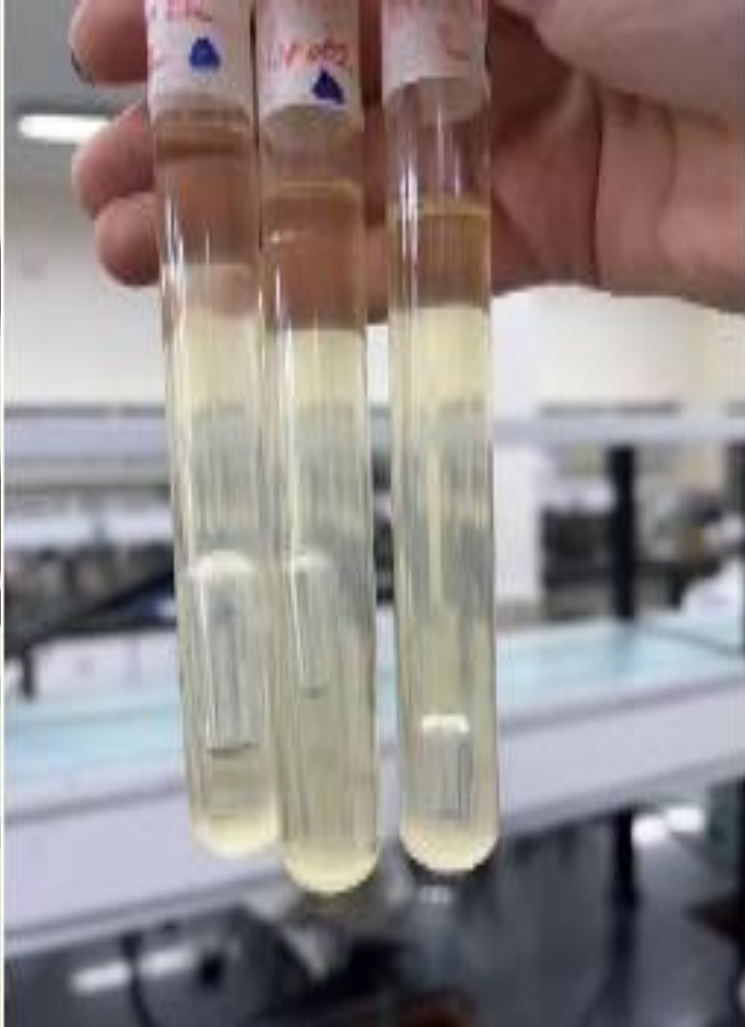
تهیه کننده : سهیلا عباسی



تهیه کننده : سهیلا عباسی

Table II: For 3 tubes each at 0.1, 0.01, and 0.001 g inocula, the MPNs per gram and 95 percent confidence intervals.

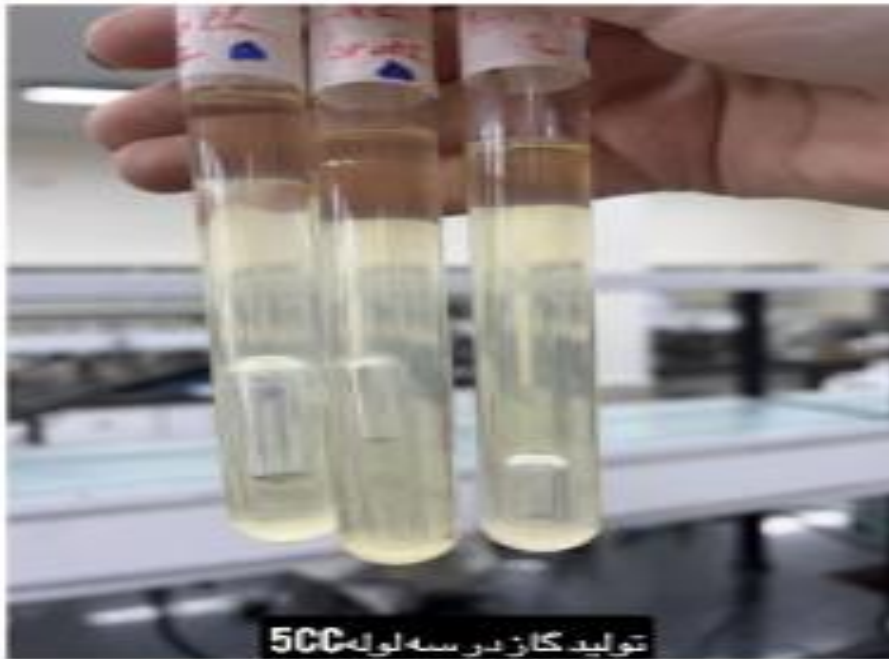
Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.		Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.	
0.10	0.01	0.00		Low	High	0.10	0.01	0.00		Low	High
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,00
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,00
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,00
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,10
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--



زهیه کننده : سهیلا عباسی



تهیه کننده : سهیلا عباسی



تهیه کننده : سهیلا عباسی

با سیاسی فراوان از توجه شما