دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، آزمایشگاه میکروبیولوژی

گزارش کار 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 مربطو 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 ، بود ، 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. اسیدیدته 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 کموارگانیسم می باشند . بعضی از ابکتریهای 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 ، آئرومونـاس ، Comamonas , Yeasts ، Molds و غیره می باشند .
- Sphaerotilus ، Beggiatoa و فیلامنت های رودوسیریل ها در اثر رشد خود حالت لزج در ته فاضلاب و در کنار لوله ها و تانک ها محتوی فاضلاب به وجود می آورند .

- قارچ ها میکوسیت از قارچ 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 H_2 را به CH_4(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 همهم 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 هدراتهای 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 عملایت 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

1.باکتریها

- باکتریها 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 بالینگ 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 کاندیوم 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 باکتریها در لجن فعال هستند . تغذیه پروتوزوئر ها از باکتریها 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 باکلینگ 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 بالینگ 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 ف و گرم متغیر مثل تیب ۰۰۴۱
- باکتریهای رشته ای لغزنده مثل بژیاتوا (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) **اسفروتیلوس (Sphaerotilus)** : غلاف حالت smoothدارد و قطر آن ۵/۲ – ۲/۱ میکرومتر است و گاهی اوقات سلول دما حالت مکعبی دارند که کل غلاف را پر می کنند و غلاف در قسمت هایی که سلول ها وجود ندارند دیده می شود (شکل زیر).

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 شکه 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 .

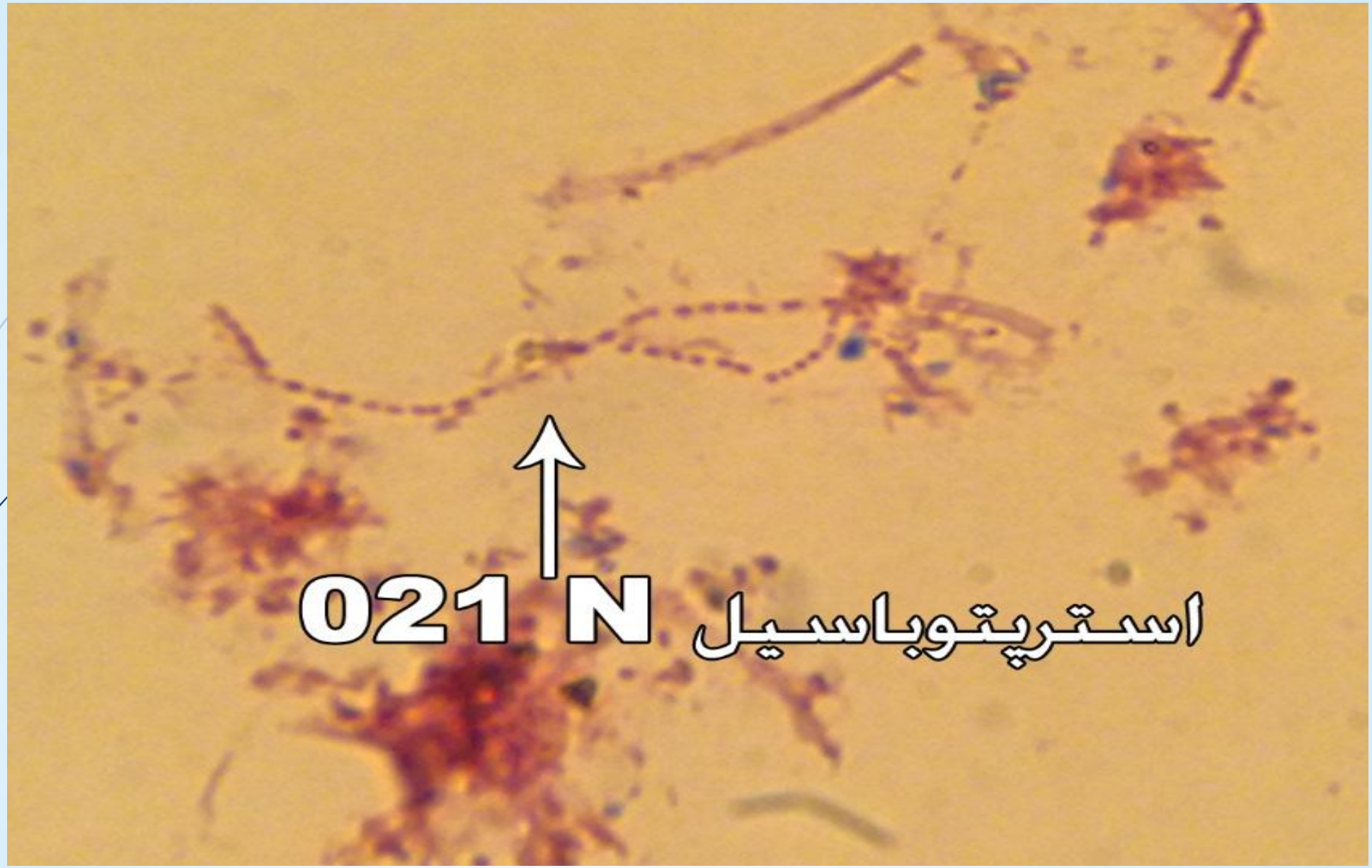
باکتری های رشته ای بدون غلاف

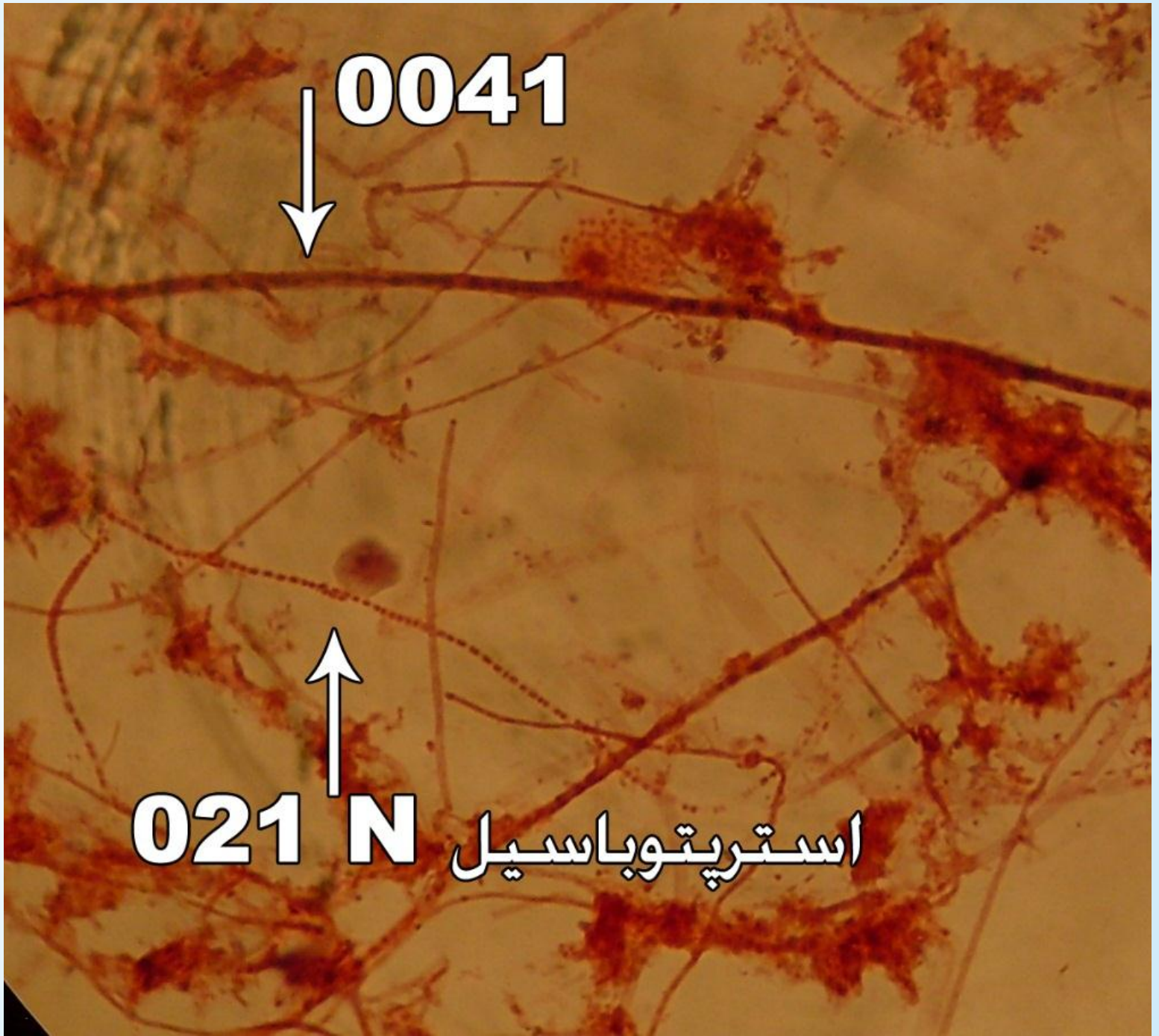
1. **Microthrix :** رشته ای گرم مثبت و بدون septa و حالت کلاف نخ یا اسپاگتی را دارد .
2. **نوستوکوئیدیدا :** رشته ای گرم مثبت و بدون انشعاب دارای سپتا است .
3. **نوکاردیوفرم ها :** از اکتینومیست ها بوده و برخی از آن ها رشته ای گرم مثبت کوتاه که انشعابات اکثراً راست است .

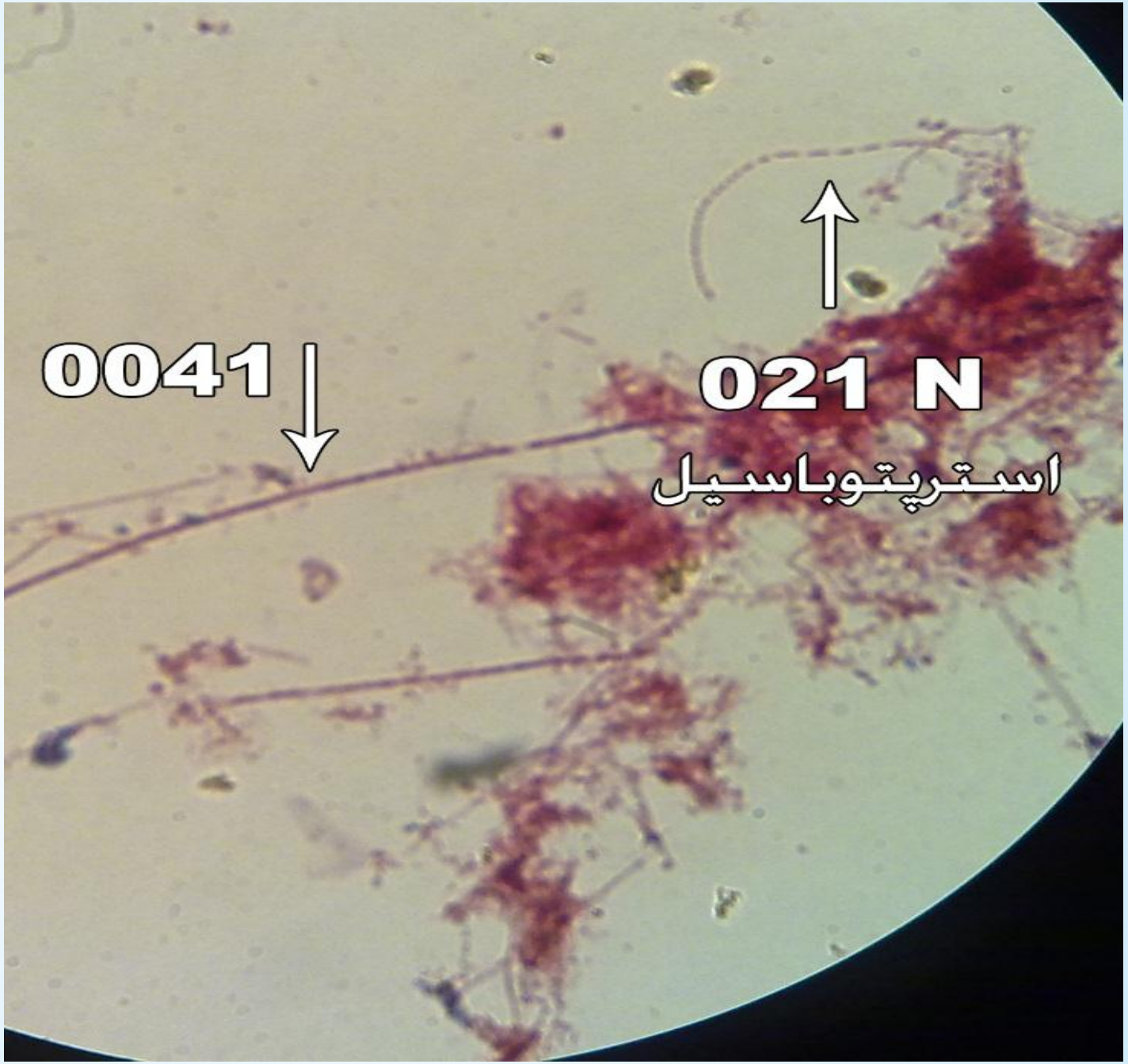
- برخی از این ها هم رشته های طویلی هستند که منقسم به اجسام کوکسی و میله ای می شود .

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

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

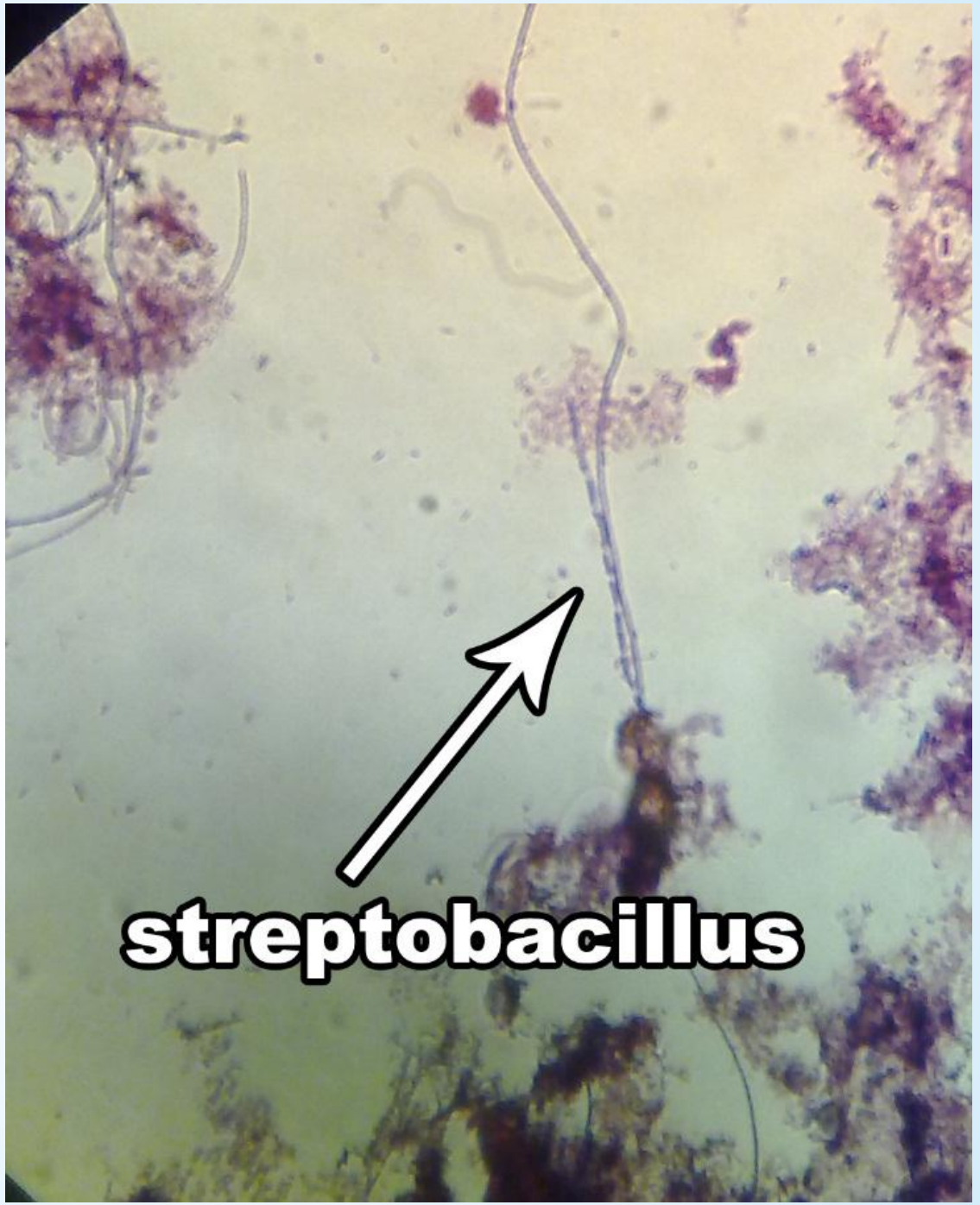

استرپتوباسیل 021 N

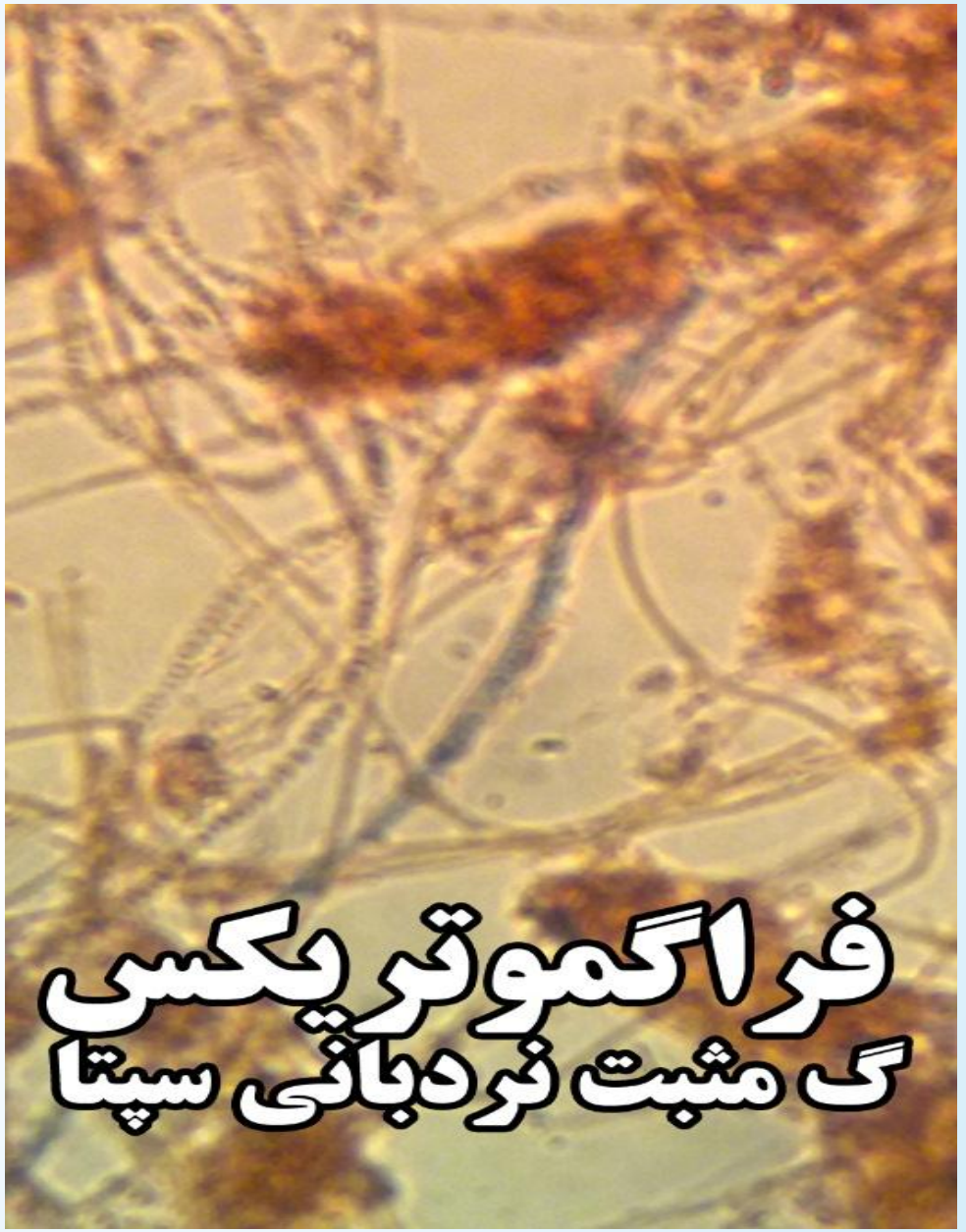

0041
021 N
استرپتوباسیل


0041
021 N
استرپتوباسیل

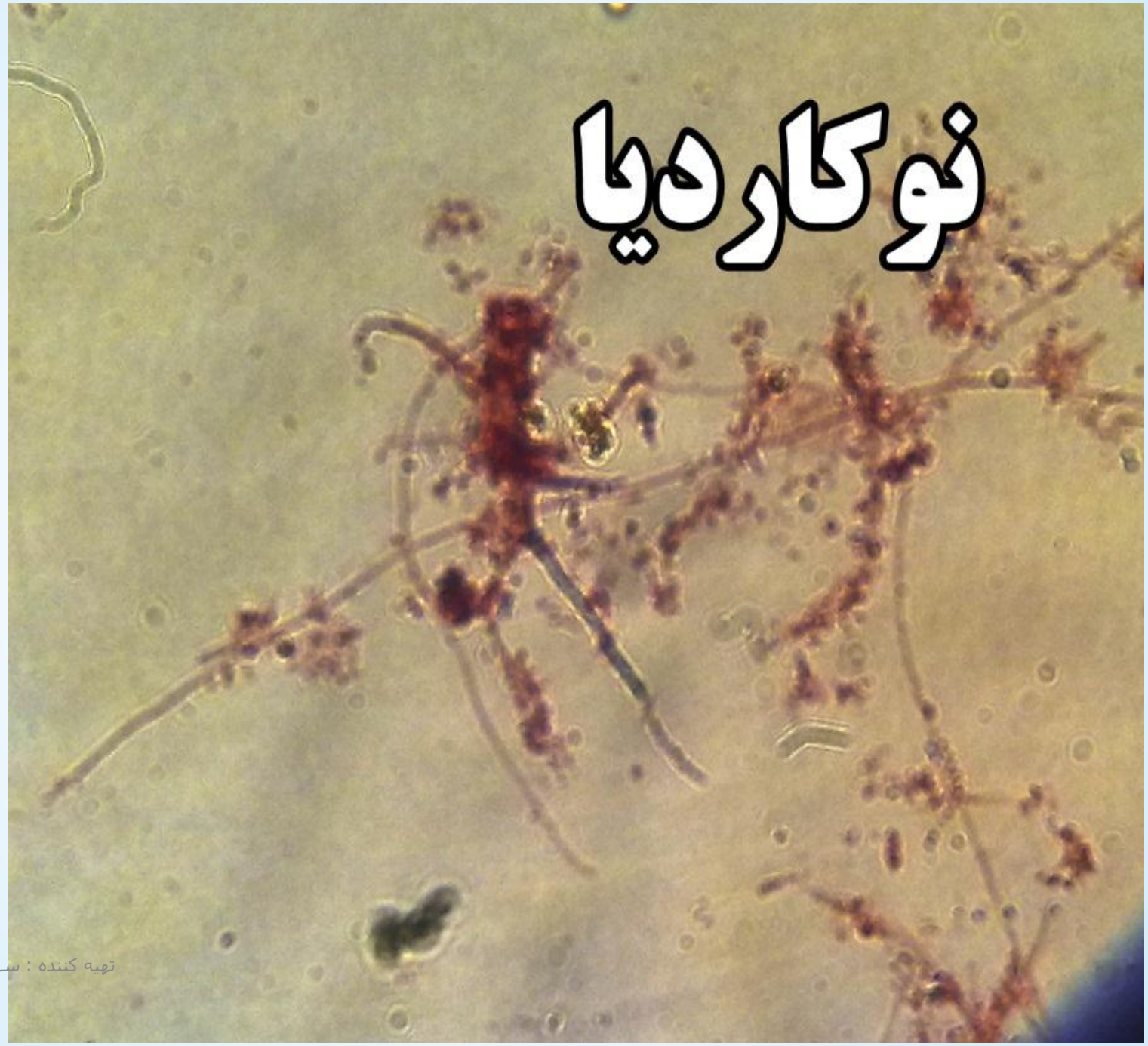
leptothrix

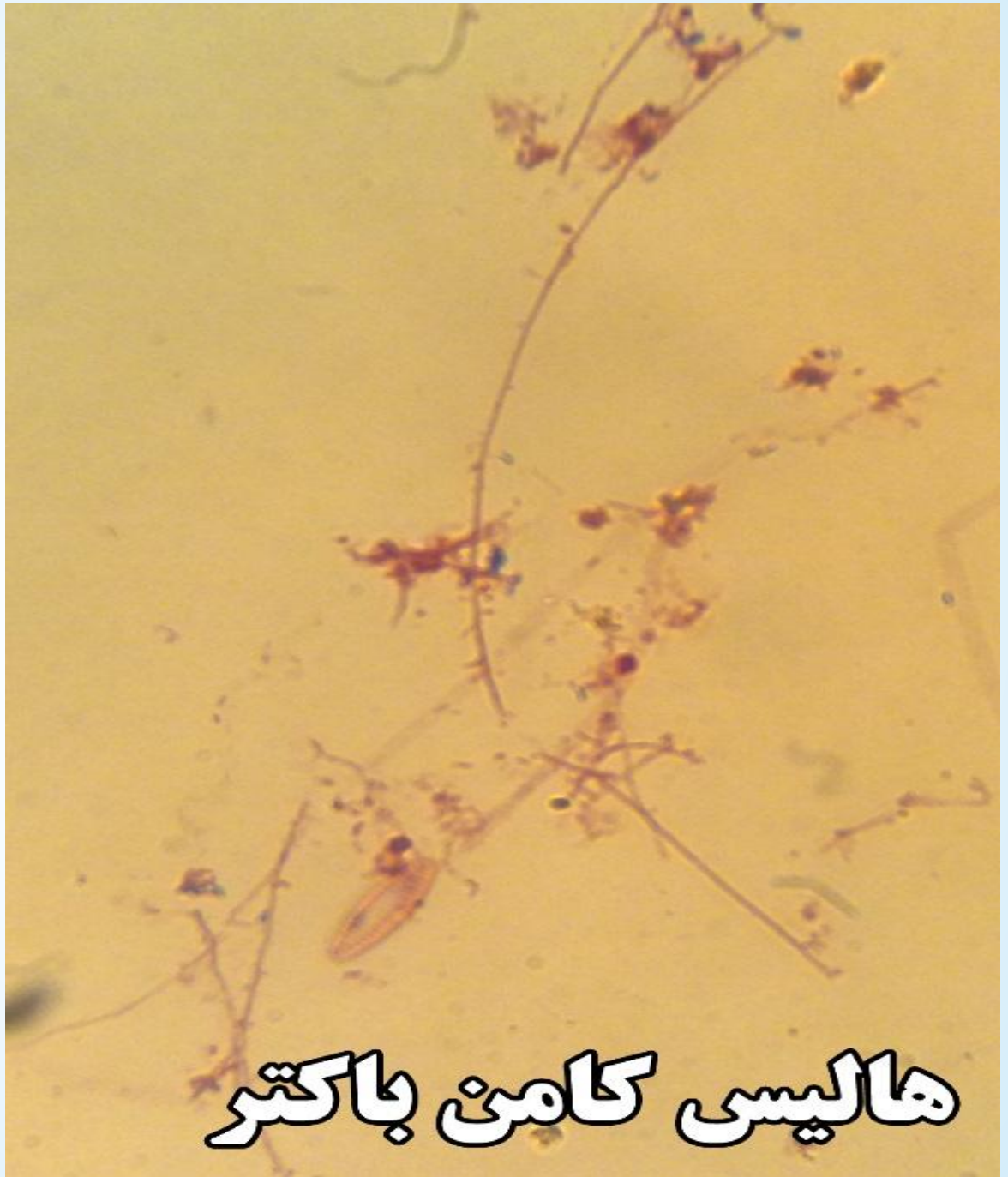
نوکاردیا


streptobacillus


فراگموتریکس
گ مثبت نردبانی سپتا

میکروتریکس
گرم مثبت


نوکاردیا


هالیسی کامن باکتر

با سپاس فراوان از توجه شما