



وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
پژوهشکده آبی پروری آبهای داخلی

روش های شناسایی باکتریهای گرم منفی (خانواده آنتروباکتریاسه) در اکوسیستم های آبی



تهیه و تدوین : سپیده خطیب حقیقی
پاییز ۱۳۹۸

۳.....	مقدمه.....
۳.....	معرفی انواع فاضلاب.....
۵.....	مشخصات باکتریهای شاخص آلودگی میکروبی در آب.....
۷.....	مشخصات خانواده آنتروباکتریاسه (باکتریهای گرم منفی روده ای).....
۷-۸.....	اشرشیا کلی (<i>Escherichia Coli</i>).....
۸-۱۰.....	گروه کلبسیلا ، آنتروباکتر ، سراشیا.....
۱۰-۱۱.....	گروه آریزونا - ادواردسیلا - سیتروباکتر.....
۱۱.....	پروویدنسیا (<i>Providencia</i>).....
۱۱-۱۲.....	سالمونلا (<i>Salmonella</i>).....
۱۲.....	شیگلا (<i>Shigella</i>).....
۱۲-۱۳.....	پروتئوس (<i>Proteus</i>).....
۱۳.....	مورگانلا (<i>Morganella</i>).....
۱۳.....	روش شناسایی باکتریهای گرم منفی روده ای (آنتروباکتریاسه ها).....
۱۳.....	آزمایش اندول.....
۱۴.....	آزمایش متیل رد.....
۱۴.....	آزمایش و وگس پروسکوئر (VP).....
۱۵.....	آزمایش سیترات.....
۱۵.....	آزمایش اکسیداز.....
۱۵.....	آزمایش با محیط نیمه جامد SIM.....
۱۶.....	آزمایش اوره آز.....
۱۶.....	آزمایش ذوب ژلاتین.....
۱۷.....	تخمیر کربوهیدرات.....
۱۷.....	آزمایش T.S.I.....
۱۷.....	تخمیر سایر قندها.....
۱۷.....	آزمایش تترا تیونات.....
۱۷.....	بیسموت سولفیت آگار.....
۱۸.....	محیط کشت EMB.....
۱۸.....	آزمایش OF.....
۱۹.....	منابع.....

۱- هدف

آشنایی با مشخصات باکتریهای شاخص آلودگی میکروبی (آنتروباکتریاسه) در آب و روش‌های شناسایی و جداسازی آنها

۲- دامنه کاربرد

بهداشت منابع آبی شامل رودخانه، دریا، تالاب و غیره و مصارف شیلاتی (کیفیت اکوسیستم‌های آبی جهت پرورش ماهی)

۳- مسئولیت

کارشناس زیست شناسی تهیه کننده متن

۴- روش کار

به طور واضح در متن توضیح داده شد

۵- مستندات

منابع موجود در دنیا موجود است

مقدمه

آب آشامیدنی مطلوب بایستی فاقد هر گونه میکروارگانیسم بوده و بعلاوه از جهت پارامترهای شیمیایی نیز مناسب باشد. در کشورهای در حال توسعه نیاز به انجام آزمایشات آب جهت نشان دادن وجود باکتریهای پاتوژن مهمتر از کشورهای توسعه یافته است. زیرا اکثر این کشورها دارای سیستم های تصفیه آب با کیفیت بالا هستند. در کشور های کمتر توسعه یافته، فاضلاب اکثرا مستقیما بداخل رودخانه ها و دریاها ریخته می- شود که ممکن است دارای باکتریهای پاتوژن نیز باشد، که می تواند سلامت افراد را به مخاطره بیندازد. خوشبختانه در سالهای اخیر توجه زیادی روی منابع آلودگی آب شده است. بیمارستان ها و کلینیک ها تولید زائادات کلنیک و شهری می کنند. فاضلاب کلنیک به موادی گفته می شود که در طی تحقیق و معالجه افراد بیمار و یا حیوانات آلوده حاصل می شوند و برخی از آنها شامل مایعات بدنی و بافتهای خارج شده از بدن می- باشند و اکثرا حاوی پاتوژن ها هستند. بطور کلی این زائادات بایستی در محل و یا سازمانهای شهری سوزانده و تبدیل به خاکستر شوند ولی متأسفانه تعداد این کوره ها بسیار محدود است و در بعضی از کشورها اصولا وجود ندارد بنابراین بخشی از این فاضلاب به طور قانونی یا غیر قانونی به زمین ها تخلیه و از آنجا به آبها منتهی می شود (۱۰).



معرفی انواع فاضلاب :

فاضلاب ها بسته به شکل پیدایش و خواص آنها به سه گروه تقسیم می گردند :
فاضلاب های خانگی، فاضلاب های صنعتی و سر انجام فاضلاب های سطحی (۱۳و۴).

۱- فاضلاب های خانگی

فاضلاب خانگی خالص تشکیل شده اند از فاضلاب دستگاههای بهداشتی خانه ها مانند : توالت ها، دستشویی ها، حمام ها، ماشین های لباس شویی و ظرفشویی، پساب آشپزخانه ها و یا فاضلاب بدست آمده از شستشوی قسمت های گوناگون منازل. خواص فاضلاب های خانگی در سطح یک کشور تقریبا یکسان و تنها

غلظت آنها بسته به مقدار مصرف سرانه آب در شهر ها تغییر می کند. آنچه در شبکه های جمع آوری فاضلاب شهری، بنام فاضلاب خانگی جریان دارد علاوه بر فاضلاب خانگی خالص دارای مقداری فاضلاب بدست آمده از مغازه ها، فروشگاه ها، تعمیر گاه ها، رستوران ها و مؤسسه هایی مانند آنها نیز می باشد که اجباراً در سطح شهر و به طور پراکنده وارد کانال های جمع آوری فاضلاب می گردند. بوی فاضلاب ناشی از گاز هائی است که در اثر متلاشی شدن مواد آلی بوجود می آید. بوی فاضلاب تازه قابل تحمل تر از فاضلاب کهنه است. بوی فاضلاب کهنه بیشتر از گاز هیدروژن سولفور می باشد که در اثر فعالیت باکتری های بی هوازی و در نتیجه احیای سولفات ها به سولفید ها تولید می گردد. در صورتی که به فاضلاب هوا و اکسیژن کافی برسد باکتری های بی هوازی از فعالیت باز ایستاده و بجای آنها باکتری های هوازی مواد آلی فاضلاب را تجزیه می کنند و گاز کربنیک مهمترین گازی است که از این باکتری ها تولید می شود.



فاضلاب خانگی

۲- فاضلاب های صنعتی

- خواص فاضلاب های صنعتی و پس آب کارخانه ها کاملاً بستگی به نوع فرآورده کارخانه دارد. با توجه به این موضوع مهمترین تفاوتی که می تواند فاضلاب کارخانه ها با فاضلاب های خانگی داشته باشد عبارتند از :
- امکان وجود مواد و ترکیبات شیمیایی سمی در فاضلاب کارخانه بیشتر است.
 - خاصیت خوردندگی بیشتری دارد.
 - خاصیت قلیایی و یا اسیدی زیادی دارد.
 - امکان وجود موجودات زنده در آنها کمتر است.



فاضلاب صنعتی

۳- فاضلاب های سطحی

فاضلاب های سطحی ناشی از بارندگی و ذوب یخ ها و برف های نقاط بلند هستند. این فاضلاب ها به علت جریان در سطح زمین و تماس با آشغالها و کثافت های روی زمین و شستن سطح خیابانها و پشت بام ها آلوده شده و مقداری مواد آلی و معدنی در آنها وجود دارد. لذا در شروع بارندگی درجه آلودگی فاضلاب های سطحی زیاد و پس از پاک شدن سطح های بارش، مقدار آلودگی آنها کاسته می شود. بیشترین قسمت مواد خارجی را در این فاضلاب ها مواد معدنی مانند شن و ماسه تشکیل می دهند که در اثر شستشوی خیابانها وارد فاضلاب می شوند. بعلاوه پس مانده ذرات گیاهی و حیوانی و مواد نفتی و دوده، قسمت های دیگری از مواد خارجی موجود در آبهای سطحی را شامل می شوند (۴).

مشخصات باکتریهای شاخص آلودگی میکروبی در آب :

باکتریهای بیماریزا که از طریق خاک به آب راه یافته اند منشاء حیوانی و یا انسانی دارند. آلودگی خاک از طریق فضولات حیوانی و انسانی و گاهی پس از مرگ موجود زنده (که ممکن است از عفونت تلف شده باشد) به طور مستقیم صورت می گیرد. از باکتریهایی که منشاء حیوانی داشته و سپس از طریق خاک موجب آلودگی آب می شوند می توان از باسیل سیاه زخم نام برد که قادر است مدت طولانی در خاک زنده بماند (۶).



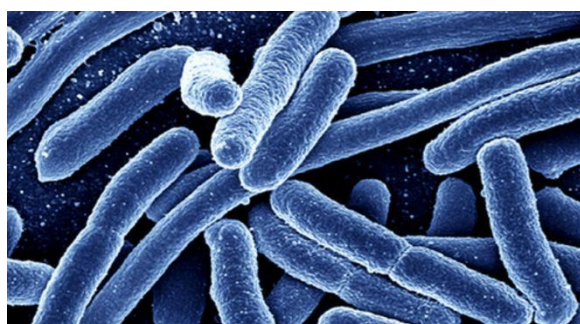
باکتریهای بیماریزای مهمی که توسط آب می توانند منتقل شوند معمولاً از طریق مدفوع به آب راه می یابند مانند سالمونلا تیفی و سالمونلا های دیگر، ویبریو کلرا، شیگلا دیسانتری، اشریشیا و ویروس ها و تعدادی پروتوزوئ نیز به وسیله آب منتقل می شوند. بیماریهایی که به وسیله آب آلوده منتقل می گردند، از چند طریق می توانند ایجاد شوند :

۱ - از طریق آشامیدنی آب

۲ - مصرف آب جهت شستشو

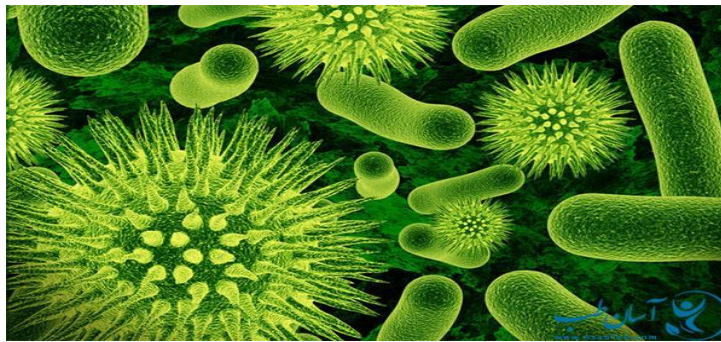
۳ - توسط بی مهرگان موجود در آب

۴ - توسط حشرات وابسته به آب که مهمترین آن، مالاریا می‌باشد و میزان شیوع آن در مناطق گرمسیری بالا می‌باشد. آبها مخازن طبیعی در بردارنده مواد غذایی به مقدار کافی هستند که به زنده ماندن و ازدیاد برخی از باکتری‌ها کمک می‌کنند. وجود باکتری‌های بیماریزا نشانگر آلوده شدن آب از راه خاک و یا آلودگی آن به وسیله فاضلاب و گنداب است. باکتری‌های بیماریزا که به وسیله خاک به آب جاری می‌شوند، منشاء حیوانی و یا انسانی دارند. این باکتریهای بیماریزا که به وسیله آب منتقل می‌شوند معمولاً از راه مدفوع بدن نفوذ می‌کنند. بنابراین دسته وسیعی از میکروارگانیسمها قادرند که آب را آلوده کنند و از آن طریق موجب ایجاد بیماری در انسان یا حیوانات شوند. ولی چون امکان بررسی وجود تمام پاتوژن‌ها وجود ندارند پس لازم است که یک گروه شاخص در نظر گرفته شود که وجود آن در آب معرف آلودگی با مدفوع که منشاء بیشتر آلودگی‌هاست، باشند.



- یک شاخص آلودگی بایستی شرایط زیر را داشته باشد:
 - * باید دارای خصوصیات ارگانیزم روده ای باشد.
 - * در حال طبیعی به مقدار زیاد در آب وجود نداشته باشد.
 - * در زمان شیوع بیماری و در مواقع عادی، در مواد غذایی و آب نباید حساستر یا مقاوم تر از باکتریهای پاتوژن باشد.
 - * به راحتی شمارش شود.
 - * شاخص آلودگی و پاتوژنهای روده ای دارای بقاء یکسانی در شرایط آبی مختلف باشند (۸).
- مطابق آخرین تحقیقات گروه کلیفرم و بخصوص کلیفرم مدفوعی به عنوان شاخص آلودگی در نظر گرفته شده اند، بطور کلی وجود مواد غذایی زیاد می‌توان از روی تعداد زیاد میکروب‌ها حدس زد. آبی که بوسیله فاضلاب یا مواد زائد تجزیه شدنی کارخانجات صنعتی آلوده می‌شود. نیز دارای تعداد زیادی باکتری است میکروارگانیسم‌هایی که بر روی مواد غذایی راکد بسر می‌برند. به سرعت اکسیژن محلول در آب را به مصرف رسانده در نتیجه حیات ماهیان را به خطر می‌اندازد. کلیفرم‌ها باکتری‌هایی هستند گرم منفی، بدون هاگ، میله ای شکل و کوتاه، هوازی و بی‌هوازی اختیاری که در دمای ۳۷-۳۲ درجه سانتی گراد در مدت ۴۸ ساعت رشد کرده و محیط گلوکز دار و لاکتوز دار را تخمیر می‌نماید. کلیفرم‌ها معمولاً منشاء گوارشی و مدفوعی داشته و در طبیعت نیز فراوان می‌باشند. وجود بیش از حد آنها در مواد غذایی و آب خطرناک بوده و باعث مسمومیت و بیماریهای روده‌ای می‌شود. کلیفرم‌ها به دو دسته تقسیم می‌شوند، کلیفرم‌های غیر

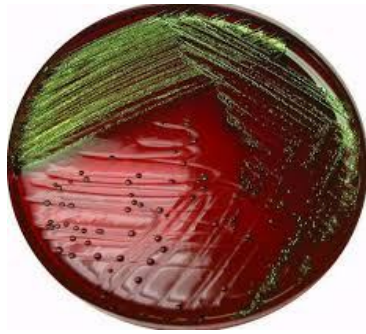
مدفوعی و مدفوعی که مدفوعی صرفاً در روده بسر می برند ولی برخی از کلیفرم‌ها منحصرأ در روده بسربرده بلکه در خاک و در روی گیاهان نیز دیده می‌شوند. اگر نمونه مورد آزمایش در درجه حرارت ۴۲ درجه سانتی گراد قرار گیرد کلیفرم‌های مدفوعی رشد می‌کند. کلیفرم‌های مدفوعی در شرایط خاصی می‌توانند در مthane و مجاری ادراری عفونت ایجاد نمایند. این باکتری‌ها از باکتریهای عادی روده انسان بوده و به تنهایی بی ضرر می‌باشد ولی وجود اشریشیا کلی در یک نمونه آب، دلیل برآلودگی با مدفوع و یا فاضلاب است (۱۳و).



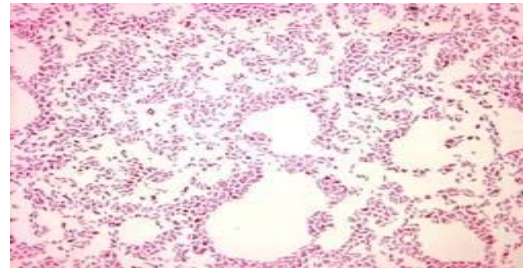
مشخصات خانواده آنتروباکتریاسه (باکتریهای گرم منفی روده ای) :

۱- اشریشیا کلی (*Escherichia Coli*):

این باکتری از خانواده آنتروباکتریاسه هاست، باکتری‌های میله‌ای شکل، گرم منفی، هوازی و بی هوازی اختیاری هستند، این گروه محل طبیعی زندگی آنها روده انسان و حیوان و علاوه برآن در مکانهایی مثل خاک، آب و ... یافت می‌شوند. اشریشیا کلی شاخص آلودگی مدفوعی شناخته شده است این باکتری معرف آلودگی مدفوعی مقبولیت وسیعتری به عنوان شاخص آلودگی مواد غذایی منشاء مدفوعی پیدا کرده است. اشریشیا آنتروپاتوزن یکی از عوامل ایجاد کننده نوعی گاستروآنتریت می‌باشد که ممکن است در انسان بروز کند. باکتری *E.Coli* می‌تواند باعث عفونت‌های مجرای ادراری و مناطق دیگر شود و سروتایپهای ویژه ای از آن باعث بروز بیماریهای روده ای می‌شود. این باکتری‌ها به شکل میله ای، با انتهای گرد و با اندازه (۴ - ۱) × (۱ - ۵/۰) میکرون هستند، آنها معمولاً انفرادی و یا دوتایی هستند، ولی در سوشهای جهش یافته ممکن است زنجیرهایی از باکتری‌ها نیز دیده شود. این باکتری بر روی آگار غذایی پس از ۲۴ ساعت کلونی‌هایی محدب، گرد کمی تار، بیرنگ صاف و به قطر یک تا سه میلیمتر ایجاد می‌کنند. از مهمترین اعضاء گروه باکتری‌های کلیفرمی بوده که در آب و مواد غذایی از لحاظ خاصیت بیماریزائی و ایجاد مسمومیت اهمیت زیادی دارند. اشریشیاکلی منشاء مدفوعی (فکال کلیفرم) داشته و از طریق انسان و حیوان منتشر می‌شود. این باکتری معمولاً در محیط بیرون بسر نمی برد، مگر آنکه در محیط آلودگی با مدفوع انسان و حیوانات رخ داده باشد (۱۴و ۸، ۷، ۳، ۵، ۲). مشخصات انواع کلیفرم موجود در آب موضوع مورد قابل توجه ای می‌باشد. تمام انواع کلیفرم ممکن است در مدفوع یافت نشوند با این وجود *E.coli* در اکثر موارد در آلودگی‌های تازه ناشی از مدفوع حیوانات خونگرم دیده می‌شود. سایر ارگانیزم های کلیفرمی در آلودگی‌های تازه در غیاب *E.coli* وجود دارند.



باکتری اشیریشیا کلی



لام اشیریشیا کلی باسیل گرم منفی

کلیفرم‌های گونه‌های جنس آنتروباکتر، کلبسیلا، سیتروباکتر، اشیریشیا در بیشتر موارد در فاضلاب‌های شهری و آب‌های تصفیه نشده وجود دارند که موارد جدا شدن آنتروباکتر از این منابع بیشتر است. *E. coli* نسبت به سایر ارگانیزم‌های کلیفرمی به وسیله روش‌های معمول آزمایشگاهی بهتر و سریعتر شناخته می‌شوند. برخی از میکروارگانیزم‌های کلیفرمی ساپروفیت هستند. این باکتری‌ها در آب‌های حاصل از صنایع دباغی، صنایع چوب، صنایع نساجی رشد کرده و ایجاد لایه های نازک بر روی سطوح می‌کنند. فاضلاب‌های صنعتی دارای مقادیر زیادی از مواد غذایی هستند و رشد انواع کلیفرم را موجب می‌شوند (۱۱ و ۹). علاوه بر باکتری فوق که از دستگاه گوارش جدا می‌شود میکروارگانیزم‌های زیر که در سه گروه تقسیم شده‌اند جزو کلیفرم‌ها قرار می‌گیرد.

۲- گروه کلبسیلا، آنتروباکتر، سراشیا :

۲-۱- کلبسیلا (*Klebsiella*) :

این باکتری دارای باسیل‌های گرم منفی و از آنتروباکتریاسه ها است. کلنی‌های مخاطی و کپسول بزرگ پلی ساکارییدی داشته و تست تولید لیزین دکربوکسیلاز و سیترات مثبت است. اکثر نژادهای کلبسیلا ساپروفیت بوده و در محیط اطراف بخصوص در آب‌های طبیعی یافت می‌شوند. انواعی از آن مانند کلبسیلا پنومونیه و کلبسیلا ازنه و کلبسیلا رینو اسکروماتیس، که کلبسیلا پنومونیه قدرت تولید هیستامین را دارند و نیز موجب عفونت‌های بیمارستانی می‌شود. کلبسیلاها جزء فلور نرمال روده هستند کلبسیلا در غالب محیط‌های کشت آزمایشگاهی مانند محیط آگار خوندار، آگار مک کانکی و آگار EMB و تریپتی کیز سوی آگار پرورش می‌یابد.



محیط کشت MacConkey Agar

باکتری *Klebsiella*

و کلنی‌های برجسته و موکوئیدی تولید می‌نماید که هنگام برداشتن با آنس مانند عسل کش می‌آیند و نیز دارای کپسول حجیم غیر متحرک می‌باشد. در مجاری تنفسی و مدفوع حدود ۵٪ از افراد عادی وجود دارند و عامل حدود ۳ درصد از موارد پنومونی باکتریایی می‌باشد. کلبسیلا، آنتر و باکتر، هافنیا و سراسیا و ... بطور کلی باکتری‌های VP مثبت از اسید پیروویک $\text{CH}_3\text{-CO-COOH}$ ، استیل متیل کاربنیول oine Acet ایجاد می‌نمایند. این باکتری‌ها از لحاظ تعداد، دومین رقم آنتر و باکتری‌ها را در فلور معمولی مدفوع انسان تشکیل می‌دهند. این باکتری در عفونت‌های بیمارستانی معمولاً در سرویس‌های جراحی و غیره دیده می‌شود. غالباً عقیده دارند که مصرف آنتی بیوتیک‌ها با طیف وسیع نزد بیماران به پیدایش این عفونت‌ها کمک می‌نماید (۱۲).

۲-۲ - آنتر و باکتر (*Enterobacter*):

این باکتری جزء خانواده آنتر و باکتریاسه‌ها می‌باشد و برخلاف کلبسیلا متحرک هستند. آنتر و باکتر بطور معمول ساپروفیت می‌باشد ولی فرصت طلب نیز هستند. در طبیعت وجود دارد بخصوص از آب و مواد آرایشی و غیره توانسته‌اند آنرا جدا نمایند. بطور طبیعی در روده انسان و حیوانات مانند گاو و گوسفند، اسب، جوندگان حتی پرندگان و نیز در مواد غذایی مانند شیر، گوشت‌های موجود در قصابی، تخم مرغ، سوسیس و کالباس و در آب و خاک و سبزیجات وجود دارد. بیماری‌زایی آنها در انسان معمولاً ثانویه است. اکثر انواع آن باسیل‌های گرام منفی و از نظر حرکت، تولید سیترات و اورنیتین دکربوکسیلاز مثبت بوده و از گلوکز گاز تولید می‌کنند.



محیط کشت Tryptic Soy Broth

باکتری *Enterobacter*

آنتر و باکتر آئروژنز کپسول کوچکی دارد و بطور آزاد در روده یافت شده و موجب عفونت مجرای ادراری و سپتی سمی می‌شود و یکی از باکتری‌ها تولید کننده هیستامین هستند، انتشار وسیعی دارند. جزء فلور نرمال روده اند و از زخم‌ها، لوله تنفسی، ادرار و خون جدا می‌شوند.

۲-۳ - سراسیا (*Serratia*):

اعضاء جنس سراسیا باسیل‌های گرام منفی هستند که به خوبی در محیط‌های آزمایشگاهی پرورش می‌یابند. بعضی از آنها در محیط آگار خوندار تولید همولیز کامل می‌نمایند. این باکتری در طبیعت در آب و خاک خیلی فراوان دیده می‌شود. اخیراً این باکتری‌ها را از حشرات نیز جدا کرده‌اند. بصورت ساپروفیت در روده، دهان، رینوفارنکس انسان و حیوانات دیده می‌شوند. معمولاً متحرک بوده ولی تحرک در این باکتری‌ها زیاد

نیست و حتی نمونه‌های بدون تحرک وجود دارد. امروزه به عنوان پاتوژن فرصت طلب محسوب می‌شود. عامل عفونت‌های بیمارستانی بخصوص عفونت‌های ادراری است. سراشیا مارسنس معمولاً به طور غیر پاتوژن و آزاد زندگی می‌کند و فراوانترین سراتیا در طبیعت می‌باشد. در انسان در فلور روده، دهان و حلق، واژن وجود دارد. انواع بدون پیگمان باکتری در سپتی سمی‌ها دیده می‌شود. تخمیر لاکتوز توسط سراشیا به کندی صورت می‌گیرد.



محیط کشت XLD Agar

باکتری *Serratia*

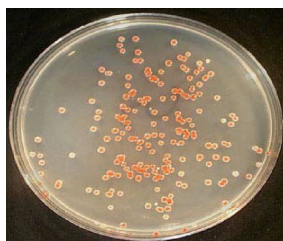
۳- گروه آریزونا - ادواردسیلا - سیتروباکتر :

۳-۱- آریزونا (*Arizona*):

این باکتری‌ها باسیل‌هایی هستند گرام منفی، کوتاه و متحرک که روی محیط‌های کشت افتراقی کلنی‌هایی شبیه سالمونلا ایجاد می‌کنند. اعضای این گروه اگر قادر به تخمیر لاکتوز باشند، آن را بکندی بسیار تخمیر می‌کنند و از نظر بسیاری از خصوصیات بیوشیمیایی مشابه سالمونلا‌ها بوده و گاهی در انسان بیماری‌های مشابه عفونت‌های سالمونلایی ایجاد می‌کنند که مهمترین آنها آنتریت و سپتی سمی است.

۳-۲- ادواردسیلا (*Edwardsiella*):

در این جنس ادواردسیلا تاردا (*Tarda*) است این باکتری به صورت باسیل‌های گرام منفی و متحرک است که به خوبی در محیط‌های کشت مانند مک کانکی آگار و SS پرورش می‌یابد. این باکتری از آب و مدفوع انسان سالم جدا شده است، هم چنین آن را از حیوانات خونسرد و خونگرم به دست آورده اند به جهت تولید اندول و عدم تخمیر مانیتول از سالمونلا، سیتروباکتر و آریزونا مشخص می‌گردد. این باکتری به ندرت موجب بیماری می‌شود.



محیط کشت BHI Agar

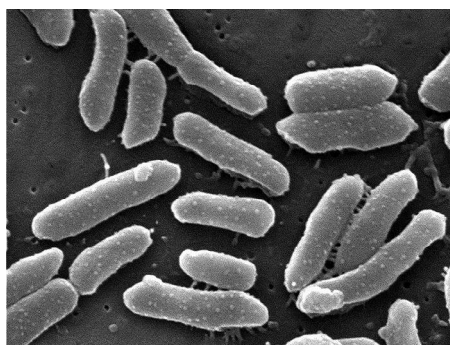
باکتری *Edwardsiella*

۳-۳ - سیتروباکتر (*Citrobacter*):

باکتری جنس سیتروباکتر نیز باسیلی شکل، گرام منفی و متحرک هستند که می‌توانند لاکتوز را تخمیر کنند. این باکتری اصولاً پاتوژن نبوده بلکه فرصت طلب است و از تعدادی از عفونت‌های مانند عفونت‌های ادراری، باکتری‌می و غیره جدا شده است. جنس سیتروباکتر شامل گونه‌های *C. Aalonaticus* و *C. Freundii* و سایر گونه‌ها می‌باشد. از عفونت‌های زخم در انسان و از ادرار جدا می‌شوند. جزء فلور نرمال روده‌اند و از محیط نیز جدا می‌شوند، به طور طبیعی در خاک وجود دارد و معرف خوبی برای آلودگی آب می‌باشند. این باکتری سیترات مثبت بوده و چون دکربوکسیلاز لیزین تولید نمی‌کنند با سالمونلا تفاوت دارند. سیتروباکتر لاکتوز را خیلی آهسته تخمیر کرده یا هرگز آن را تخمیر نمی‌کند.

۴- پروویدنسیا (*Providencia*):

باکتری پروویدنسیا باسیل‌های گرام منفی متحرکی بوده که از دیدگاه بیولوژی این باکتری‌ها مشابه پروتئوس-ها می‌باشند. این باسیل حرکت سوآرمینگ نداشته و لاکتوز را تخمیر نمی‌کند. انواع پروویدنسیا فلور طبیعی روده بوده و اغلب به داروهای ضد باکتری مقاوم هستند، هم به صورت آزاد و هم به صورت پاتوژن در عفونت-های دستگاه ادراری و سپتی سمی‌ها دیده می‌شوند و در مدفوع اشخاص سالم وجود دارند.



باکتری *Providencia*

۵- سالمونلا (*Salmonella*):

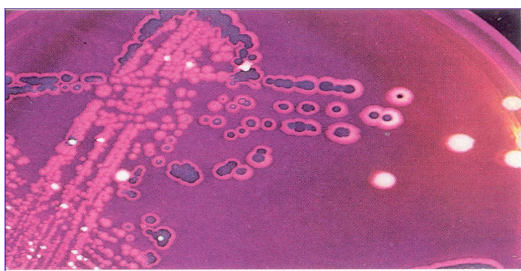
یک گروه از خانواده آنتروباکتری‌ها هستند. اکثریت برای انسان و حیوانات و یا هر دو بیماریزا هستند. گاهی در حیوانات خونسرد مانند خزندگان نیز این باکتری‌ها بصورت کم‌نسل وجود دارند. سالمونلا باسیل‌های بلند گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری و متحرکند. این باکتری‌ها گلوکز و مانوز را تخمیر می‌کنند، اما از تخمیر لاکتوز و سوکروز عاجز می‌باشند. بطور معمول در آب و خاک و هوا سالمونلا‌های بیماریزا برای انسان دیده نمی‌شوند. چنانچه این محیط‌ها به مدفوع انسانی آلوده شوند باکتری مدتها در آنها باقی می‌ماند ولی تکثیر نمی‌یابند. نداشتن سیستم بهداشتی جمع‌آوری مدفوع، نبودن سیستم صحیح فاضلاب، امکان وجود آلودگی‌های آب جاری و آشامیدنی، خرابی و کار نکردن صحیح دستگاه کلرزنی به آب نکات مهمی هستند که باید به آن توجه نمود. اکثر سالمونلا‌ها، هیدروژن سولفور تولید کرده و برای انسان و حیوانات مختلف بیماریزا هستند. آریزونا در گروه سالمونلا قرار دارد. بطور کلی سالمونلا در انسان سه نوع بیماری ایجاد می‌کند عبارتند از :

* تب روده (تب تیفوئید)

* باکتری می یا سیتی سمی همراه با ضایعات موضعی

* انتروکولیت

سالمونلاها از طریق خوردن غذای آلوده یا آشامیدن آب آلوده وارد بدن می‌شوند. از منابع عفونت سالمونلایی آب و آلودگی آن با مدفوع بیمار سالمونلایی و خوردن صدفی که در آب آلوده با مدفوع بوده است را می‌توان نام برد.

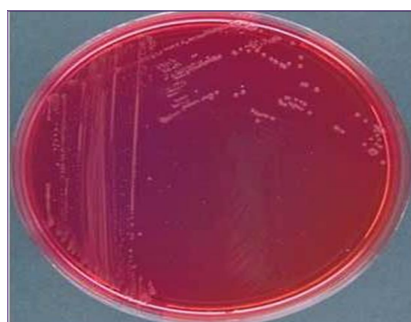


محیط کشت MacConkey Agar

باکتری *Salmonella*

۶- شیگلا (*Shigella*):

این باکتری دارای باسیل‌های گرام منفی باریکی بوده که در کشت جوان گاهی به صورت کوکو باسیل دیده می‌شود. این باکتری بدون حرکت، بدون اسپور و کپسول است. شیگلا بی‌هوازی اختیاری بوده اما در شرایط هوازی بهتر رشد می‌کند و کلنی‌های محدب و مدوری که نور را از خود عبور می‌دهند، به وجود می‌آورند. فاقد حرکت بوده و لاکتوز را تخمیر نمی‌کند، اما قندهای دیگری را تخمیر کرده که اسید بدون گاز تولید می‌کند و هیدروژن سولفور تولید نمی‌کند. زیستگاه طبیعی شیگلا، روده بزرگ انسان و پستانداران است که در آن مکان، این باسیل تکثیر یافته و اسهال باسیلی را بوجود می‌آورد.



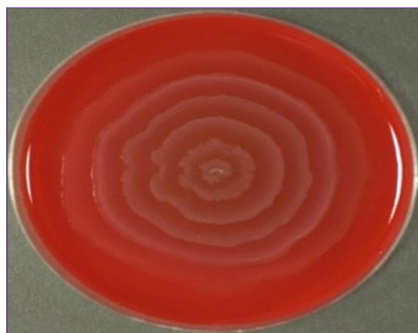
محیط کشت XLD Agar

باکتری *Shigella*

۷- پروتئوس (*Proteus*):

این باکتری در طبیعت، فاضلاب، آب، خاک، مواد گندیده، حیوانات و شیر پراکنده بوده و جزء فلور طبیعی روده انسان می‌باشد و به علت داشتن تازک پری‌تریش، حرکت سوآرمینگ دارد. بدون کپسول است و اعضاء

جنس پروتئوس باسیلهایی هستند متحرک و گرام منفی که مهمترین خاصیت آنها عدم تخمیر لاکتوز و ئیدرولیز نمودن اوره است. عفونت این باکتری در انسان به صورت عفونتهای ادراری سپتی سمی می باشد.



محیط کشت Blood Agar

باکتری *Proteus*

۸ – مورگانلا (*Morganella*) :

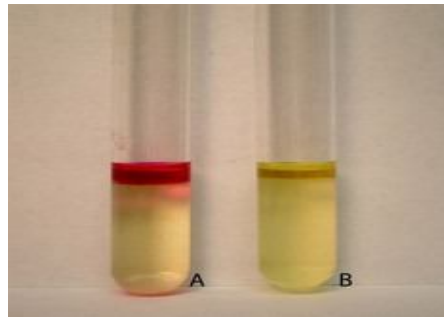
این جنس را سابقا به نام پروتئوس مورگانی می نامیدند و امروزه به نام مورگانلا نام می برند. وجه افتراق آن از پروتئوس ها به صورت عدم تولید SH_2 ، حل نکردن ژلاتین در حرارت ۲۲ درجه و تست D-Mannose مثبت است. از عفونت های ادراری و سایر نقاط بدن جداسازی شده است (۸ و ۷، ۵، ۳، ۲).

روش شناسایی باکتریهای گرم منفی روده ای (آنتروباکتریاسه ها) :

جهت شناخت خانواده آنتروباکتریاسه ابتدا از نمونه ها رقت تهیه می گردد، سپس برروی محیط کشت پایه TSA کشت سطحی داده می شود و به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری می شود. کلنی های بررسی شده سپس خالص سازی (ایزوله) شده و آنگاه جهت شناخت باکتری، از محیط های کشت افتراقی، اختصاصی و بیوشیمیایی و قند ها استفاده می شود. محیط های کشت و آزمایش های بیوشیمیایی که در این روش استفاده می شوند به شرح زیر می باشد :

۱ – آزمایش اندول:

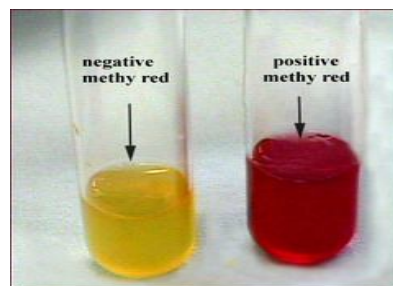
توانایی ارگانیزم برای تجزیه اسید آمینه تریپتوفان با آزمایش اندول مشخص می گردد. از آبگوشت تریپتوفان که در لوله های آزمایش به مقدار ۵ میلی لیتر تهیه و استریل شده است استفاده می گردد. برای تلقیح از کلنی تک برداشته و در ۵ میلی لیتر محیط، باکتری را اضافه نموده و در 35 ± 0.5 به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری می شود. پس از پایان مدت ۰/۲ تا ۰/۳ میلی لیتر از محلول کوآکس (۵ gr پارادی متیل آمینو بنزالدئید در ۷۵ ml آمیل الکل و ۲۵ ml HCL) اضافه کرده و بعد از ۱۰ دقیقه نتیجه خوانده می شود. رنگ قرمز در آمیل الکل در قسمت سطحی، نشان دهنده جواب مثبت است و اگر تغییر رنگی دیده نشود جواب منفی است.



آزمایش اندول: A مثبت - B منفی

۲ - آزمایش متیل رد (MR):

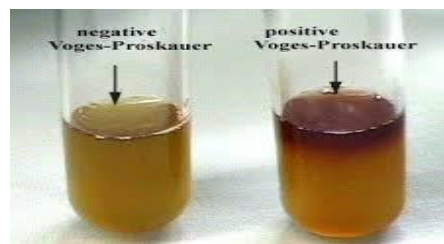
ارگانیزم‌هایی که از گلوکز استفاده می‌کنند ممکن است تولید محصولات نهایی آنها مانند فورمات و استات از متابولیسم پیرووات باشد. بعلاوه آنها ترکیبات کربنه را متابولیزه کرده و تولید استوئین و بوتاندیول که PH آن خنثی است. تستهای MR و VP حضور ماده نهایی این دو واکنش‌های متابولیکی را نشان می‌دهد. از آبگوشت گلوکز بافره برای آزمایش MR استفاده می‌گردد. ۱۰ ml از محیط باکشت خالص تلقیح و در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت (چنانچه نتیجه منفی بود، بمدت حداکثر ۵ روز) گرمخانه گذاری می‌شود. به ۵ ml از محیط ۵ قطره اندیکاتور متیل رد اضافه می‌گردد. رنگ قرمز تیره، جواب مثبت و رنگ زرد به عنوان جواب منفی تلقی می‌گردد.



آزمایش متیل رد

۳ - آزمایش و وگس پروسکوئر (VP) :

از باقیمانده محیط افتراقی متیل رد استفاده می‌گردد، به ۵ ml از محیط معرف‌های مخصوص آزمایش VP اضافه می‌شود (۳ میلی لیتر محلول آلفا نفتول و ۱ میلی لیتر محلول KOH) گسترش رنگ از صورتی به قرمز لاکی در طی ۱۵ دقیقه تا یک ساعت نشان دهنده جواب مثبت است.



آزمایش VP

۴- آزمایش سیترات :

سیترات به عنوان تنها منبع کربن بشمار می‌رود، باکتری‌هایی که آنزیم برای بکارگیری سیترات دارند در این محیط رشد می‌کنند. محیط اندکی بازی می‌شود، بازی شدن محیط به آبی رنگ شدن معرف برموتیمول بلو منجر می‌شود. افزون بر سیترات، نمک‌های آمونیوم نیز در این محیط وجود دارد.



آزمایش سیترات

۵- آزمایش اکسیداز :

از یک محیط فاقد کربوهیدرات مثل نوترینت آگار برای این آزمایش استفاده می‌شود. معرف این آزمایش محلول آبی ۱٪ تترا متیل پارا فنیل دی آمین دی هیدروکلراید است. قسمتی از کلنی رشد یافته روی محیط را روی نوار کاغذی آغشته به معرف گسترانیده و گسترش رنگ قرمز و یا بنفش در طی ۱۰ ثانیه به عنوان وجود اکسیداز تلقی شد. کلنی‌هایی که در این روش استفاده می‌شوند نباید در محیط رنگی کشت یافته و در ضمن از لوپ غیر فلزی استفاده گردد. روش دیگر استفاده از دیسک‌های آماده در بازار می‌باشد.



آزمایش اکسیداز

۶- آزمایش با محیط نیمه جامد SIM :

وجود سه پارامتر تولید SH_2 ، اندول و حرکت را در این محیط می‌توان بررسی کرد. میکرو ارگانیزم (باکتری) را به صورت یک خط مستقیم در عمق ۱۰ میلی لیتری محیط کشت داده و بعد از ۲۴ ساعت حرکت به صورت رشد محو، که در همان راستای کشت داده شده، رشد می‌کنند، تولید اندول را از روی اضافه کردن محلول کواکس روی این محیط و نیز جداگانه روی آبگوشت تریپتوفان می‌توان بررسی نمود. تولید SH_2 به صورت رسوب در ته لوله دیده می‌شود.



آزمایش SIM

۷- آزمایش اوره آز :

توانایی ارگانیزم برای هیدرولیز اوره به آمونیاک و CO_2 می‌تواند مبنای تشخیص باشد. برای این منظور از محیط Urea Broth استفاده می‌گردد. تغییر رنگ محیط از قرمز به بنفش نشان دهنده جواب مثبت است.



آزمایش اوره آز

۸- آزمایش ذوب ژلاتین :

توانایی عده ای از میکروارگانیسم ها در هیدرولیز یا ذوب ژلاتین در شناسایی جنس و گونه هایی بسیاری از جمله آئروموناس بسیار مفید است. ژلاتین توسط آنزیم ژلاتیناز باکتری هیدرولیز می‌شود. خاصیت ژله ای خود را از دست داده و حتی در دمای یخچال نیز بسته نمی‌شود. بنابراین آزمایش ذوب ژلاتین براساس تبدیل ژلاتین ژله ای به ژلاتین مایع استوار است. از آنجائیکه بیشتر باکترهایی که دارای ژلاتیناز هستند حداکثر فعالیت آنزیمی خود را در دماهای پایین تر از 37°C درجه سانتی گراد دارا هستند. آنزیم‌های تجزیه کننده پروتئین ها، غالباً از عوامل ویروالانس باکتری هستند که بوسیله تعداد کمی از محیط آبگوشت ژلاتین در سری‌های دو تایی استفاده می‌شود و بعد از تلقیح باکتری در لوله ها، آنها را در 37°C درجه سانتی گراد و سری دیگر در حرارت اتاق گرمخانه گذاری شوند. بعد از رشد کافی، لوله ها ۳۰ دقیقه در یخچال گذاشته می‌شوند. اگر میکرو ارگانیزم مورد آزمایش دارای آنزیم ژلاتیناز باشد هر دو لوله به صورت مایع باقی می‌مانند که نشان دهنده شکسته شدن ژلاتین موجود در محیط می باشد و جواب مثبت است.



Fig. Nutrient Gelatin Stabs.
A. Positive: *Aeromonas hydrophila*
B. Negative: *Escherichia coli*

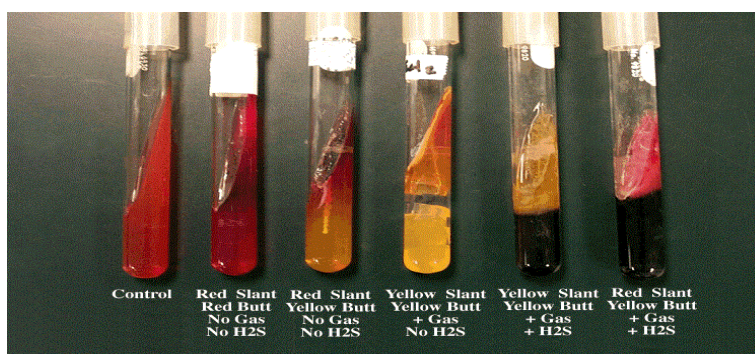
آزمایش ذوب ژلاتین

۹- تخمیر کربوهیدرات :

هر لوله قندی، یک لوله کوچک دورهام وارونه و معرف فنل رد دارد، عمل تخمیر باتولید اسید و گاز و یا فقط اسید پایان می‌یابد. کاهش PH نشانه تولید اسید است و جمع شدن حباب در لوله کوچک دورهام دلیل تولید گاز است.

۱۰- آزمایش T.S.I :

با استفاده از این محیط تخمیر سه قند گلوکز، لاکتوز و سوکروز و بعلاوه تولید SH_2 نیز با ایجاد رسوب سیاه مشخص می‌گردد. تولید اسید در ته لوله و یا در سطح و یا در هر دو می‌تواند مبنای تشخیص باشد. برای استفاده از این محیط باکتری به صورت streaking & stab کشت داده می‌شود و بعد از ۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری می‌گردد.



آزمایش T.S.I

۱۱- تخمیر سایر قندها :

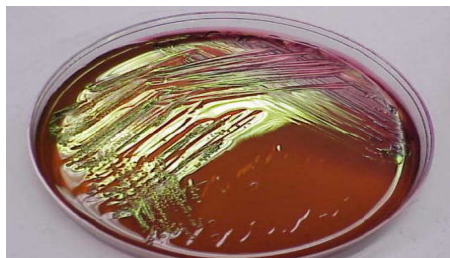
از محیط‌های قندی مختلف استفاده می‌گردد. بعد از استریل نمودن محیط، باکتری تلقیح و در ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری می‌شود.

۱۲- آزمایش تتراتیونات :

این محیط برای تغذیه انتخابی سالمونلا از مواد گوناگون است. تتراتیونات و تیوسولفات اضافی میکروارگانیسم‌های کلیفرمی و سایر باکتری‌های همراه را متوقف می‌سازد. در حالیکه تمام باکتری‌های احیاء کننده تتراتیونات مثل سالمونلا و پروتئوس می‌توانند کم و بیش روی این محیط بطور نرمال تکثیر شوند از تجزیه تتراتیونات اسیدهای فرآورده‌هایی تشکیل می‌شود که توسط کربنات کلسیم خنثی می‌شوند. نمک‌های صفاوی تا حد زیادی تمام میکروارگانیسم‌هایی را که بطور طبیعی در روده زندگی نمی‌کنند مهار می‌کنند.

۱۳- بیسموت سولفیت آگار :

بریلیانت گرین و بیسموت موجود در محیط کشت فلور باکتریایی همراه را مهار می‌کنند. کلنی های SH₂ مثبت سالمونلا بعلت تشکیل سولفید آهن سیاه‌رنگ می‌شوند. احیای یون‌های بیسموت یک درخشش جلای فلزی در اطراف کلنی‌ها ایجاد می‌نماید (۶).



محیط کشت EMB



بیسموت سولفیت آگار

۱۴ - محیط کشت EMB :

لاکتوز و ساکاروز موجود در این محیط موجب می‌گردد لاکتوز و ساکاروز منفی از میکروارگانیسم‌های لاکتوز و ساکاروز مثبت متمایز شوند. ائوزین متیلن بلو آگار حاوی پپتون، لاکتوز، ساکارز و رنگ ائوزین و متیلن بلو است. رنگ‌های موجود در این محیط کشت باکتریایی مانع از رشد باکتری‌های گرام مثبت شده همچنین به عنوان شاخص‌های افتراقی برای محصولات تخمیری استفاده می‌شود و در شرایط اسیدی رنگ سبز متالیک را ایجاد می‌کند. این جلای سبز فلزی به عنوان شاخص تخمیر ساکارز و لاکتوز توسط کلیفرم‌های مدفوعی می‌باشد. رشد کلنی‌های صورتی بر روی این محیط کشت به دلیل تخمیر لاکتوز موجود در محیط توسط ارگانیسم مورد نظر می‌باشد در حالی که رشد کلنی‌های بی رنگ نشان دهنده عدم تخمیر لاکتوز می‌باشد.

۱۵ - آزمایش OF :

این آزمایش برای تشخیص باکتری‌های اکسیداتیو از باکتری‌های فرمانتاتیو صورت می‌گیرد. باکتری‌هایی که قادرند گلوکز را در شرایط بی‌هوازی تخمیر کنند فرمانتاتیو هستند. محیط پایه OF به صورت تجاری ساخته شده و در دسترس است. برای انجام آزمایش و برای هر باکتری دو لوله استفاده می‌شود. روی یکی از لوله‌ها، پارافین استریل ریخته می‌شود تغییر رنگ معرف از سبز به زرد در اثر اسیدی شدن محیط بعد از ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد نشانه تبدیل گلوکز به اسید است. چنانچه فقط لوله بدون پارافین زرد شود باکتری اکسیداتیو است و اگر هر دو لوله زرد شوند توانایی باکتری دارای قدرت تخمیر قند هم در شرایط بی‌هوازی و هم در شرایط هوازی است. همچنین از محیط‌های کشت مختلف از قبیل، مک کانکی آگار، محیط سالمونلا - شیگلا آگار، سلنیت F، دزوکسی کلات آگار و غیره نیز جهت تشخیص باکتری‌ها استفاده می‌گردد. (۲، ۳، ۵، ۷، ۸ و ۱۰).



محیط کشت OF based on glucose

منابع :

- ۱ - امتیازی، گیتی، ۱۳۷۹. میکروبیولوژی و کنترل آب و پساب. انتشارات مانی. ۲۱ - ۴ ص.
- ۲ - جاوید، ای، ۱۳۷۰. میکروبیولوژی پزشکی. ترجمه دکتر کامبیز حاذقی. انتشارات جهاد دانشگاهی تهران. ۹۰۴ ص.
- ۳ - ملک زاده، ف، شهامت، م، ۱۳۷۹. میکروبیولوژی عمومی. انتشارات عقیق. ۱۶۰ - ۱۵۰ ص.
- ۴ - منزوی، م.ت، ۱۳۷۸. تصفیه فاضلاب (جلد دوم). انتشارات دانشگاه تهران. ۲۶۶ ص.
- ۵ - نادری نسب، م، راشد، ط، ناظم، م، ۱۳۸۲. باکتری شناسی آزمایشگاهی. انتشارات دانشگاه امام رضا مشهد. ۴۴۵ ص.
- ۶ - ندافی، ک، یزدان بخش، ا، ۱۳۶۹. کنترل کیفی آب آشامیدنی در اجتماعات کوچک. انتشارات جهاد دانشگاهی امام رضا مشهد. ۱۶۸ ص.
- ۷ - نوروزی، ج، ۱۳۷۱. باکتریولوژی پزشکی. دانشگاه علوم پزشکی ایران. مرکز نشر اشارت تهران. ۳۸۹ ص.
- ۸ - همتی، ی، ۱۳۷۰. باکتریهای بیماریزا در انسان. انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه شهید بهشتی. ۵۰۲ ص.
- ۹ - American Public Health Association (APHA), ۲۰۰۵. Washington, D.C. Standard methods for the examination of water and waste water. ۱۷th edition. New York. USA. pp. ۸۷۵-۱۰۰۳.
- ۱۰ - Baron, E.J and Fingold, S. M., ۱۹۹۰. Diagnostic Microbiology. The C.V. Mosbyco, St. Louis. pp. ۷۲۸-۷۴۸.
- ۱۱ - Bitton, G., ۱۹۹۹. Waste water microbiology. INC Publication. Second edition. New York, USA. Vol. ۵۷۸, pp. ۲۰۵-۵۰۰.
- ۱۲ - Domek, M.j., LeChevallier, M.W., Cameron, S.C. and Mcfeters, G.A., ۱۹۸۴. Evidence for the role of copper in the injury process of coliform bacteria in drinking water. Applied and Environmental Microbiology. Vol. ۴۸ NO: ۲ pp: ۲۸۹-۲۹۳.
- ۱۳ - Fujioka, S., Harlan, R., Hashimoto, H. and Edward, B., ۱۹۹۱. Effect of sunlight on survival of indicator bacteria in sea water. Applied and Environmental Microbiology. Vol. ۴۱, No. ۳, pp. ۶۹۰-۶۹۵.
- ۱۴ - Macfaddin, J.F., ۲۰۰۰. Biochemical tests for Identification of Medical Bacterial. ۳^{ed}, Lippincott Williams & Wilkins. ۳۷۴ P.