ISIRI

6377

1st – edition

MAY 2003

جمهوری اسلامی ایران

Islamic Republic of Iran

مؤسسه استاندارد وتحقیقات صنعتی ایران

Institute of Standards and Industrial Research of Iran

استانداردملی ایران

۶۳۷۷

چاپ اول

اردیبهشت ۱۳۸۲

آب – شناسایی و جداسازی تک یاخته های آزادزی – روش آزمون

Water - Identification Of Free Living Protozoa - Test Methods

نشانی مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران : کرج - شهر صنعتی، صندوق پستی ۱۶۳-۳۱۵۸۵

دفتر مرکزی: تهران - بالاتراز میدان ولی‌عصر، کوچهٔ شهید شهامتی، پلاک ۱۴

صندوق پستی ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵

تلفن مؤسسه در کرج : ۸-۲۸۰۶۰۳۱ - ۰۲۶۱

تلفن مؤسسه در تهران : ۹-۸۹۰۹۳۰۸

دورنگار : کرج ۲۸۰۸۱۱۴ -۰۲۶۱ تهران ۸۸۰۲۲۷۶ - ۰۲۱

بخش فروش – تلفن : ۲۸۰۷۰۴۵ -۰۲۶۱ دورنگار : ۲۸۰۷۰۴۵ -۰۲۶۱

پیام نگار: ISIRI.INFOC@NEDA.NET

بها : ۳۵۸۴ ریال

Headquarter : *Institute of Standards and Industrial Research of IRAN*

P.O. Box : *31585-163 Karaj - IRAN*

Central office : *NO.14, Shahid Shahamati St., Valiasr Ave. Tehran*

P.O. Box : *14155-6139*

Tel.(Karaj) : *0098 261 2806031-8*

Tel.(Tehran) : *0098 21 8909308-9*

Fax(Karaj) : *0098 261 2808114*

Fax(Tehran) : *0098 21 8802276*

Email : *ISIRI.INFOC@NEDA.NET*

Price : *3584 Ral*

بسمه تعالی

آشنایی با مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب قانون، تنها مرجع رسمی کشور است که عهده‌دار وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) می‌باشد.

تدوین استاندارد در رشته‌های مختلف توسط کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان مؤسسه، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط با موضوع صورت می‌گیرد. سعی بر این است که استانداردهای ملی، در جهت مطلوبیت‌ها و مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فنی و فن‌آوری حاصل از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع شامل: تولیدکنندگان، مصرف کنندگان، بازرگانان، مراکز علمی و تخصصی و نهادها و سازمان‌های دولتی باشد. پیش‌نویس استانداردهای ملی جهت نظرخواهی برای مراجع ذینفع و اعضای کمیسیون‌های فنی مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرات و پیشنهادها در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که توسط مؤسسات و سازمان‌های علاقمند و ذیصلاح و با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌شود نیز پس از طرح و بررسی در کمیته ملی مربوط و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی چاپ و منتشر می‌گردد. بدین ترتیب استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که براساس مفاد مندرج در استاندارد ملی شماره «۵» تدوین و در کمیته ملی مربوط که توسط مؤسسه تشکیل می‌گردد به تصویب رسیده باشد.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد می‌باشد که در تدوین استانداردهای ملی ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی استفاده می‌نماید.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون به منظور حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردها را با تصویب شورای عالی استاندارد اجباری نماید. مؤسسه می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری نماید.

همچنین به منظور اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و گواهی کنندگان سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و کالیبره کنندگان وسایل سنجش، مؤسسه استاندارد اینگونه سازمان‌ها و مؤسسات را براساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران مورد ارزیابی قرار داده و در صورت احراز شرایط لازم، گواهی‌نامه تأیید صلاحیت به آنها اعطا نموده و بر عملکرد آنها نظارت می‌نماید.

ترویج سیستم بین‌المللی یکاها، کالیبراسیون وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی از دیگر وظایف این مؤسسه می‌باشد.

کمیسیون استاندارد « آب – شناسائی وجداسازی تک یاخته‌های آزادزی – روش آزمون »

رئیس	سمت یا نمایندگی
کاظمی- بهرام (دکترای پارازیتولوژی)	استادیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

اعضاء

سرگزی- مریم (لیسانس میکروبیولوژی)	شرکت آب و فاضلاب شهرها و شهرکهای غرب‌تهران
شقاقی- غلامرضا (فوق لیسانس مهندسی محیط زیست)	اداره کل بهداشت محیط و حرفه‌ای-دفتر سلامت و محیط کار
فصیحی- مینا (لیسانس بیولوژی)	شرکت آب و فاضلاب استان تهران
کرمی- منیژه (دکترای فیزیولوژی جانوری)	دانشگاه شاهد
ملکی- فاطمه (دکترای پارازیتولوژی)	دانشگاه علوم پزشکی ایران
نکودری- حمیده (فوق لیسانس محیط زیست)	شرکت آب و فاضلاب استان تهران

دبیر

یاسائی- شکوه (فوق لیسانس انگل‌شناسی پزشکی)	مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

فهرست مندرجات

پیشگفتار ..... الف

مقدمه ..... پ و ت

۱ هدف ۱

۲ دامنه کاربرد ۱

۳ اصطلاحات و تعاریف ۱

٤ روش نمونه‌برداری ۲

۵ مواد لازم ۵

٦ وسایل و دستگاههای مورد نیاز ۵

۷ روش اجرای آزمون ٦

۸ بیان نتایج ۱٦

۹ پیوست الف ۱۸

۱۰ پیوست ب ۲۲

پیشگفتار

استاندارد آب – شناسایی و جداسازی تک‌یاخته‌های آزاد زی در آب که توسط کمیسیون‌های مربوط تهیه و تدوین شده و درسی و سومین جلسه کمیته‌ملی استاندارد میکروبیولوژی و بیولوژی مورخ ۸۱/۵/۱٤ مورد تصویب قرار گرفته، اینک به استناد بند ۱ ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن‌ماه ۱۳۷۱ به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌گردد.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفتهای ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدیدنظر خواهد شد و هرگونه پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها ارائه شود، در هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین برای مراجعه به استانداردهای ملی ایران باید همواره از آخرین تجدیدنظر آنها استفاده کرد.

در تهیه و تدوین این استاندارد سعی شده است که ضمن توجه به شرایط موجود و نیازهای جامعه، در حد امکان بین این استاندارد و استاندارد ملی کشورهای صنعتی و پیشرفته هماهنگی ایجاد شود.

منابع و مآخذی که برای تهیه این استاندارد به کار رفته به شرح زیر است:

1. A.P.H.A \ A.W.W.A \ W.E.F: "Standard Methods for the examination of water and waste water 20thed . 1998
2. Cowling, A.j, Finally, B.j, 'Rogerson , A .Rogerson: A beginner's guide to the collection of freshwater protozoen' 1989.
3. Laybourn parry, J. "A Functional biology of Free- living. Protozoa", 1984.

٤. کرمی، منیژه « جانوران تک یاخته‌ای آبهای شیرین، جداسازی، کشت و تشخیص تألیف فینلی، راجرسون، کولینک، دانشگاه شاهد، معاونت پژوهشی: ۱۳۷۵.

۵. غروی، محمدجواد «مروری بر تک یاخته‌شناسی»، مؤسسه خدمات علمی، آموزشی رزمندگان اسلام : ۱۳۷۵.

مقدمه

تک یاخته‌ها[1] گروهی از موجودات زندهٔ جانوری تک سلولی هستند که تمام اعمال حیاتی‌شان توسط یک سلول انجام می‌گیرد. تاکنون بیش از ۲۰۰۰۰ گونه تک یاخته ، شناسائی شده است که این عده شامل کلیه پروتوزوئرهای آزاد و انگلی می‌باشد. بسیاری از آنها انگل انسان بوده و بیماریهائی نظیر مالاریا و بیماری خواب را ایجاد می‌کنند که این بیماریها هر ساله میلیونها تن را به کام مرگ می‌کشاند. انواع متعددی از آنها در محیطهای آبی طبیعی، به صورت آزادزی زیست می‌کنند.

تک یاخته‌های آزادزی به طور مشخص فاگوتروف [2] می‌باشند. هر یک از این جانوران از یک سلول ساخته شده اما اندازه، شکل [3] و ترکیب آن سلول دارای تنوع و سازش پذیری زیادی است. این موجودات ریز تقریباً در همهٔ محیطهای آبی یافت می‌شوند و از تعدد و تنوع گونه‌ای بسیار بالائی برخوردارند.

روش عملی سنتی برای تشخیص و تعیین گونه‌های متعدد این موجودات توسط میکروسکوپ نوری انجام می‌گیرد که هنوز هم معتبر است. اما متخصصان علم رده‌بندی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی بر مشخصات درون سلولی تأکید می‌کنند.

تک یاخته‌ها به طرق مختلفی زندگی بشر را متأثر می‌کنند. یکی از آنها، ایجاد طعم یا بوی نامطبوع در آبهای مصرفی مهار شده می‌باشد. این امر عموماً به تاژکداران سبزینه‌دار منسوب است. در

---

1 - Protozoa

2 – Phagotrophic: جانورانی که از باکتریها، جلبک‌ها و دیگر ذرات کوچک شامل جانوران تک یاخته‌ای دیگر تغذیه می‌کنند.

3 – Form

اینگونه موارد گفته می‌شود که آب طعم ماهی [1] می‌دهد. در واقع روغنهای آروماتیک موجود در بدن تک یاخته‌ها مسئول این امر است و لزوماً ماهی وجود ندارد. مورد دیگر مرگ و میر در ماهیان است که در نتیجه ازدیاد بیش از حد گونه‌های معینی از دینوفلاژله‌ها [2] حادث می‌شود.

آمیبهای بدون غلاف معمولاً در نمونه‌های آبهای سطحی مشاهده نمی‌شوند ولی در رسوبات ذرات و بقایای گیاهان یا سطح برگ‌ها قابل رؤیت می‌باشند.

خصوصیات مرفولوژی و بیولوژی تک یاخته‌ها در پیوست الف و ب آورده شده است.

---

1 - Fishy taste

2 - Dinoflagellates

"آب - شناسائی و جداسازی تک‌یاخته‌های آزادزی – روش آزمون "

۱ هدف

هدف از تدوین این استاندارد تعیین روش آزمون تک یاخته های آزادزی در آب است.

۲ دامنه کاربرد

این روش در تعیین تک‌یاخته‌های آزادزی در انواع آب کاربرد دارد.

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاحات و / یا واژه‌ها با تعاریف زیر بکار می‌رود.

۳-۱ تک یاخته‌های آزادزی

انواع متعددی از تک یاخته‌ها که در محیط‌های آبی طبیعی بصورت شناور و یا کف‌زی زیست می‌کنند و به سه گروه تاژکداران[1] ، مژه‌داران[2] و سارکودینا[3] تقسیم می‌شوند.

۳-۱-۱ تاژکداران

جانورانی که جابجائی و تغذیه آنها بوسیله تاژک انجام می‌شود (تاژکها[4] اندام حرکتی آزاد بوده، تعداد و اندازه آنها متغیر می‌باشد.)

۳-۱-۲ مژه‌داران

جانورانی که جهت حرکت از مژه[5] استفاده می‌کنند (تعداد مژه‌ها معمولاً زیاد بوده ، تمام اطراف ارگانیسم را در بر می‌گیرد.)

---

1 -Flagellates
2 - Ciliates
3 - Sarcodines
4 - Flagella
5 - Cilia

۳-۱-۳ سارکودینه‌ها

تک یاخته‌های آمیبی شکل که با پاهای کاذب [1]حرکت می‌کنند (پاهای کاذب از بیرون زدگی اکتوپلاسم ایجاد می‌شود.)

۴ روش نمونه‌برداری

۴-۱ نمونه‌های مورد آزمایش

نمونه‌های اصلی شامل آب برکه‌ها و دریاچه‌ها، رودخانه‌ها، رسوبات و مردابهای کوچک می‌باشد.

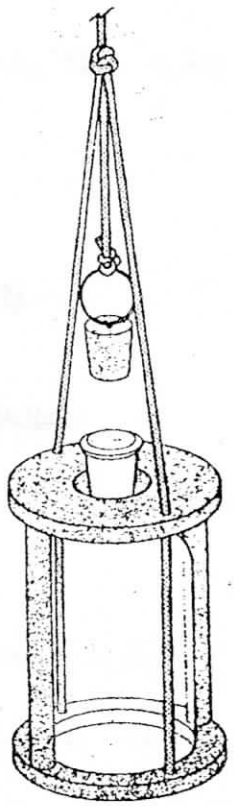
۴-۱-۱ برکه‌ها و دریاچه‌ها

ساده‌ترین روش جمع‌آوری تک یاخته‌ها از دریاچه‌ها و برکه‌ها بدین صورت انجام می‌گیرد که یک بطری با ظرفیت حداقل یک لیتر را در نقاط کم‌عمق به زیر آب فرو برده و دو سوم آنرا پرکرده به آزمایشگاه منتقل می‌کنیم. اگر بطری در شرایط مناسب قرار گیرد بیشتر تک یاخته‌ها ساعت‌ها زنده خواهند ماند. چنانچه بطری ساکن قرار گیرد، اکثر میکروارگانیسم‌ها رسوب خواهند نمود و اگر مدت بیشتری نگهداری شود میکروارگانیسم‌های بیشتری ته‌نشین‌خواهند شد اما بعضی از گونه‌ها از بین رفته و برخی دیگر به رشد خود ادامه خواهند داد.

با استفاده از پیپت ۱۰ میلی‌لیتر پواردار می‌توان رسوب‌حاوی این جانوران را به آسانی جدا نمود. برای نمونه‌برداری از اعماق آب از قایق و دستگاه نمونه‌برداری خاصی استفاده می‌شود. این دستگاه تشکیل شده از یک بطری سنگین که به ریسمانی متصل است و هنگامی که در عمق مناسب فرو برده شود، درب آن با جابجائی ریسمان حامی برداشته و بطری از آب پر می‌شود مطابق شکل (۱).

---

1 - Psuedopodia



شکل ۱- بطری نمونه برداری وزن دار ساده. چوب پنبهٔ متصل به ریسمان را می توان به دقت برداشت

برای جمع‌آوری نمونه‌های بی‌هوازی بستن درب بطری به محض بیرون کشیدن از آب ضروری است.

انواع تجاری بطریهای نمونه‌برداری که در دسترس قرار دارند عبارتند از نیسکین[۱]، روتنر[۲]، وان دورن[۳] و فریدینجر[۴].

برای جمع‌آوری تاژکداران هتروتروف که معمولاً در سطح آب فراوانند نیاز به حجم زیاد آب نبوده و مستقیماً با سرنگ‌های ۱۰ میلی‌لیتر استریل می‌توان نمونه‌برداری نمود.

---

1 - Niskin
2 – Ruttner
3 - Van dorn
4 - Friedinger

۴-۱-۲ رودخانه‌ها

بیشترین تعداد برروی رسوبات یا سطوح غوطه‌ور در آب می‌باشند. در رودخانه‌های با جریان کند تعداد کمی از آنها یافت می‌شوند.. سطح زیرین عدس و لالهٔ آبی، ساقه زنبق، نی و دیگر گیاهان بزرگی که در نقاط نزدیک به حاشیه رودخانه‌ها رشد می‌کنند اغلب منبع غنی‌ای از این موجودات می‌باشند. همچنین در گرهٔ ساقهٔ گیاهان آبی تک یاخته وجود دارد که آب یک گره را می‌توان با پیپت پاستور خارج نمود. (یک میلی‌لیتر از این آب حداقل حاوی ۱۰/۰۰۰ تک یاخته می‌باشد.)

۴-۱-۳ رسوبات

اکثر تک یاخته‌های کف‌زی در ارتفاع یک سانتی‌متری از سطح رسوبات وجود دارند، لذا بررسی قسمت‌های عمیق‌تر ضرورتی ندارد (جز در مورد رسوبات اقیانوسی و نواحی که بعلت وجود جزر و مدهای شدید دوره‌ای، تک یاخته‌ها و سایر ارگانیسم‌های بینابینی [1] در نواحی عمیق‌تر یافت می‌شوند). رسوبات سطحی مملو از مواد آلی نیمه تجزیه شده غنی از تک یاخته‌ها می‌باشند. چنانچه آب عمیق نباشد، این رسوبات را می‌توان به کمک یک قاشق چایخوری یا وسیلهٔ مشابه دیگر و یا با یک پیپت ۱۰ میلی‌لیتری که نوک آن شکسته شده و مجهز به پوار می‌باشد جمع‌آوری نمود. با کمک پوتر [2] که معمولاً برای جمع‌آوری حشرات بکار می‌رود می‌توان حجم بیشتری از رسوبات را جمع‌آوری نمود.

برای مطالعهٔ کمی تک یاخته‌های کف‌زی باید نمونه‌برداری از مراکز دست نخورده به کمک لوله‌های پلاستیکی در طرحهای مختلف و قطر داخلی ٦-٤ سانتی‌متر انجام گیرد.

در دریاچه‌های بزرگ‌تر، باد اغلب باعث حرکت و حمل ذرات و خرده‌های ناشی از تخریب و تجزیهٔ گونه‌های گیاهی و جانوری می‌شود که این ذرات در حالت مرطوب حاوی تک یاخته‌های

---

1 – interstitial fauna

2 - Pooter

بسیاری هستند. این وضعیت در مورد جلبک‌های تشکیل دهنده بلوم [1] (معمولاً جلبک‌های سبز-آبی) که گاهی اوقات به یک سوی دریاچه برده می‌شوند نیز صدق می‌کند.

۴-۱-۴ مرداب‌های کوچک

تک یاخته‌ها در مردابهای کوچک پوشیده از خزه فراوان هستند. آمیبهای غلاف‌دار و فاقد غلاف و بعضی از تاژکداران بزرگ‌تر به طور ویژه در این مکانها یافت می‌شوند. جمع‌آوری آنها نسبتاً ساده است و تنها به یک جفت چکمهٔ لاستیکی و یک ظرف دهان گشاد نیاز است؛ برای این منظور در مرداب ایستاده و اجازه دهید آب در اطراف چکمه‌ها جریان داشته باشد و متناوباً مقداری از خزه خیس را جمع‌آوری کنید و آنها را داخل ظروف دهان گشاد فشار دهید.

۵ مواد لازم

۵-۱ سولفات نیکل ۲٪

۵-۲ فرمالین ٤٪

۵-۳ متیل سلولز ۱۰ ٪

۶ وسایل لازم

۶-۱ اسپلیترفولسوم [2]

۶-۲ میکروسکوپ دوچشمی

۶-۳ لام و لامل مخصوص شمارش تک‌یاخته [3]

---

1 - Bloom

2 - Splitter Folsom

3 - Sedgewick - Rafter

۶-۴ پیپت

۶-۵ ظروف مخروطی ایمهوف[1]

۶-۶ ذره‌بین دستی با بزرگنمائی ۸ تا ۱۰ برابر

۶-۷ پیپت پاستور

۶-۸ لام و لامل ساده

۶-۹ بشر

۶-۱۰ لوله پلاستیکی اکریلی شفاف

۶-۱۱ الک نایلونی

۶-۱۲ کاغذ صافی

۶-۱۳ پیپت ۱۰ میلی‌لیتر پواردار

۶-۱۴ سرنگ ۱۰ میلی‌لیتر

۶-۱۵ لوله‌های پلاستیکی در طرحهای مختلف و با قطر داخلی ٦-٤ سانتی‌متر

۷ روش اجرای آزمون

۷-۱ تغلیظ نمونه

۷-۱-۱ سانتریفوژ[2]

سرعت و زمان مورد نیاز به اندازه و وزن تک یاخته‌ها بستگی دارد. معمولاً سرعت پائین‌و

---

1 - Imhoff cone

2 - Centrifugation

۲۰۰-۱۰۰ دور در دقیقه و مدت زمان نیم دقیقه کافی است. تک یاخته‌های بزرگ تحت این شرایط به راحتی رسوب می‌کنند، در صورتیکه برخی از گونه‌های حساس ممکنست از بین بروند و احتمالاً تاژک‌داران کوچک، معلق باقی می‌مانند.

برای بررسی وجود یا عدم وجود رسوب در ته لوله می‌توان از یک ذره‌بین دستی با بزرگنمائی ۸ تا ۱۰ برابر استفاده کرد که در این صورت می‌توان بیشتر مژه‌داران را مشاهده نمود.

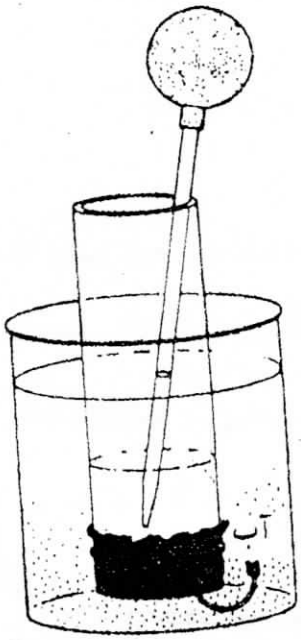
۲-۱-۷ غربال کردن[1]

بسیاری از مژه‌داران را می‌توان به سادگی با عبور نمونه آب از میان یک الک نایلونی با منافذ ۵-۳۰ میکرون و با استفاده از یک پیپت مجهز به پوار جدا نمود. در یک روش دقیق‌تر که در شکل ۲ نمایش داده شده است، آبی را که از الک عبور می‌کند با استفاده از یک پیپت خارج نموده و تک یاخته‌ها بصورت تغلیظ شده در ته ظرف بزرگتر باقی می‌مانند. تک یاخته‌های کوچک‌تر، بویژه تاژکداران را بسته به اندازه‌های آنها می‌توان به کمک صافی‌هائی با منافذ مختلف جدا نمود. برای تغلیظ بیشتر تاژک‌داران و بسیاری از آمیب‌های مقاوم‌تر و همچنین مژه‌داران، یک نمونه با حجم ۲۰۰-۵۰۰ میلی‌لیتر کافی می‌باشد. در این روش می‌توان از صافی‌های غشائی با منافذ کمتر از ۰/۸ میکرون و بدون استفاده از یک خلاء با قدرت بالا استفاده کرد و زمانیکه چند میلی‌لیتر از آب روی صافی باقی است عمل صاف کردن را متوقف نموده، نمونه تغلیظ شده را با پیپت خارج کرد. در روش کرودر[2] از یک کاغذ صافی استفاده می‌شود. این صافی جلوی مواد را می‌گیرد و بعضی از تک یاخته‌ها را تغلیظ می‌نماید.

---

1 - Sieving

2 - ruder method



جانوران تک‌یاخته‌ای متراکم شده

شکل ۲- وسیله‌ای برای متراکم نمودن تک یاخته‌ها

یادآوری *آب عبور داده شده از الک از استوانهٔ داخلی خارج می‌گردد و تک یاخته‌ها در استوانهٔ بیرونی باقی می‌مانند.*

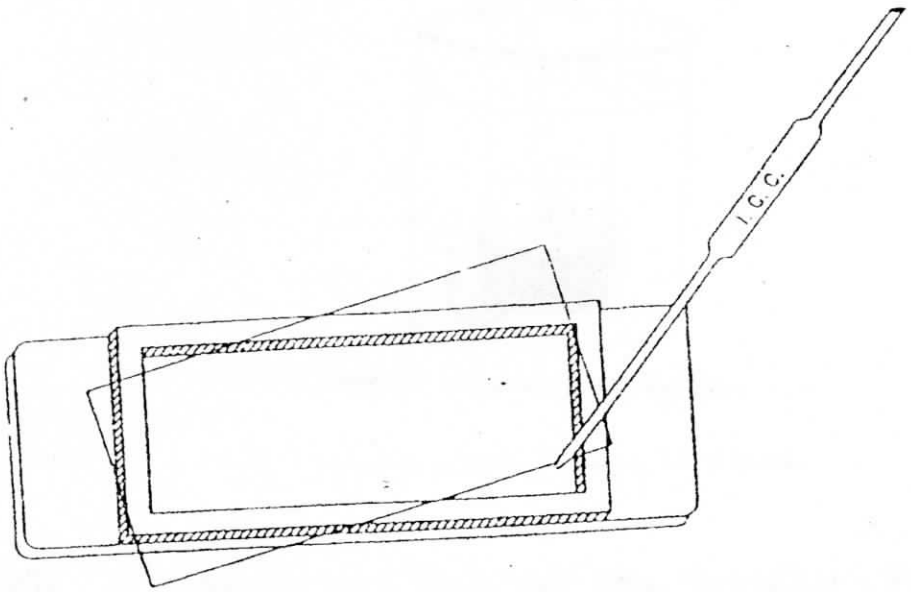
۲-۷ مشاهدهٔ نمونه‌های آب شیرین

تک یاخته‌های بزرگ‌تر با چشم غیرمسلح قابل مشاهده‌اند اما تشخیص ساختمان داخلی آنها بدون استفاده از میکروسکوپ امکان‌پذیر نمی‌باشد. چندین روش استاندارد جهت بررسی تک‌یاخته‌های موجود در نمونه‌های آب و رسوبات وجود دارد. حرکت تک یاخته‌ها در فضای لام و لامل که سیل[1] شده باشد، مشاهده آنها را آسان می‌نماید. لام حجمی تجاری قابل دسترس لام سدویک رافتر[2] می‌باشد (شکل ۳) که گنجایش آن ۱ میلی‌لیتر و عمق آن ۱ میلی‌متر است. این لام مجهز به یک پوشش شیشه‌ای ضخیم می‌باشد که می‌توان آنرا با یک شیشه ظریفتر جایگزین نمود تا مشاهده اشیاء با بزرگنمائی (۱۶×) را نیز امکان‌پذیر سازد.

---

1 -Seal

2 – Sedjewick - rafter



شکل ۳- لام سدویک رافتر

برای مشاهده ابتدا با عدسی پائین (٤×) یا دارای قدرت کم، بررسی را آغاز نموده و انواع مختلف یاخته‌ها را با حرکات متفاوت مشاهده می‌کنیم. مژه‌داران سریع‌تر از دیگر تک یاخته‌ها حرکت می‌کنند و تاژک‌داران عمدتاً کندتر حرکت می‌کنند و رفتارهای شاخصی همچون خزیدن، چرخیدن، لرزیدن و یا به آرامی از این سو به آن سو جنبیدن را از خود نشان می‌دهند. آمیبها کندترین تک یاخته‌ها هستند که با پای کاذب حرکت می‌کنند. اغلب ممکنست موجودات معلق کروی شکل و خارداری را مشاهده نمود که احتمالاً جزء خورشیدی ها [1] هستند. گاهی اوقات ممکنست که ما ارگانیسم‌های دیگری را شبیه به همین موجودات ولی با اندازه کوچکتر و به تعداد زیادتری مشاهده کنیم که تاژکداران خاردار[2] نامیده می‌شوند و احتمالاً نمی‌توان آنها را با

---

1 – Heliozoeae

2 – Spine – bearing Chrysomonad flagelates

عدسی‌های شیئی با بزرگنمائی کمتر از ۱۰ مشاهده نمود. بیشتر تک یاخته‌ها را می‌توان در فضای لام سدویک رافتر تا ۳۰ دقیقه زنده نگهداشت. مسلماً تک یاخته‌ها تنها میکروارگانیسم‌های شناگر در آبها نیستند. احتمالاً زیر میکروسکوپ بعضی از دینوفلاژله‌ها و جلبکهای سبز که شناگر آزاد می‌باشند و دارای پیگمان هستند همچنین بی‌مهرگان پلانکتونی کوچکی بنام متازوئرها[1] وجود دارند که در سطح بدن آنها اندامی شبیه به مژه دیده می‌شود. روتیفرها[2] و گاستروتریکها[3] که در ستونهای آبی هستند و نماتودها[4] وتوربلارینها[5] و تاردیگریدها[6] در رسوبات و خاشاک مشاهده می‌شوند.

رسوبات بایستی با کمی از آب قسمت بالائی رسوب (حدود ۰/۰۵ میلی‌لیتر) رقیق شده مستقیماً روی لام قرار گیرند. برای جابجا کردن ذرات به اطراف و شکستن قطعات بزرگتر مواد آلی، از یک سوزن یا سنجاق ته‌گرد استفاده می‌کنیم و این کار بهتر است همزمان با مشاهده میکروسکوپی انجام گیرد. مشاهده میکروسکوپی با میکروسکوپ زمینه روشن و عدسی‌های شیئی با بزرگنمائی ٤× یا ۱۰× انجام می‌گیرد. یقیناً مژه‌داران کوچکی در حال جهش (اسکوتیکوسیلیاته‌ها[7]) یا در حال خزیدن برروی رسوبات (آسپیدیکاها[8]) دیده خواهند شد. احتمال مشاهده مژه‌داران بزرگتر

---

1 - Metazoans

2 – Rotifera

3 – Gastrotricha

4 – Nematoda

5 – Turbellaria

6 - Tardigrades

7 - Scuitocociliates

8 – Aspidisca

(لوکسودوس [1] و اسپیروستوموم[2] و استنتور[3]) و آمیبهای فاقد غلاف (پلومیکسا[4]) نیز وجود دارد. با کمک یک میکروسکوپ زمینه تاریک با قدرت کم می‌توان به فراوانی تک یاخته‌ها در رسوبات پی برد. تاژکداران شناگر و بعضی از این تک‌یاخته‌ها و همچنین سه گروه از آمیبها با این روش قابل مشاهده و شناسائی هستند: ۱) آمیبهای پوشش‌دار (دیفلوجیا[5] و سنتروپیکسس[6]) دارای پوشش تیرهٔ موجدار هستند که به دانه‌های ماسه و ذرات رسوبی شباهت بسیار دارند. ۲) آمیبهای دارای پوشش شفاف (نبتا [7] و اوگلیفا [8]) ۳) آمیبهای دارای پوشش منظم و احتمالاً خاردار مجهز به دریچه‌ای که پاهای کاذب از آن خارج می‌شود و گاهی اوقات نیز سبب جابجائی همه غلاف می‌گردد

مرحلهٔ بعدی افزایش بزرگنمائی میکروسکوپ است. با عدسی شیئی با بزرگنمائی بیشتر فاصله دید کوتاهتر و عمق میدان کوچکتر می‌شود و به همین جهت است که استفاده از لامل ضرورت می‌یابد. با لاک بیرنگ چهار طرف لامل را محدود کرده و سپس می‌توان آنرا با عدسی‌های با قدرت ۲۵–۲۰× مشاهده نمود. اگر نیاز به عدسی ٤۰× باشد، لامل را کمی فشار دهید. با این روش آمیبها و مژه‌داران بزرگ از لام خارج شده و احتمالاً از بین خواهند رفت ولی به تک یاخته‌های کوچکتر آسیبی نخواهد رسید. اگرچه امکان مشاهده دقیق بیشتر مژه‌داران، به علت شنای سریع آنها کماکان فراهم نیست ولی بسیاری از تاژکداران و آمیبهای کوچک را نیز می‌توان دید.

کار با مژه‌داران، بعلت شنای سریع بسیار دشوار است. راه‌حل ساده‌ای برای کار با همهٔ گونه‌ها

---

1 _ Loxodos

2 _ Spirostomum

3 - Stentor

4 _ Pelomyxa

5 – Difflugia

6 – Centropyxis

7 – Nebta

8 - Euglypha

وجود ندارد. بیشتر مژه‌داران به طور دوره‌ای (برای چند ثانیه) دست از شنا برمی‌دارند و استراحت می‌کنند و بنابراین می‌توان به مطالعه آنها پرداخت.

علاوه بر این بر اثر تبخیر آب زیر لامل، مژه‌داران به تدریج از بین می‌روند. اگرچه شکلشان پهن و متورم می‌گردد. ولی جزئیات داخلی با عدسی روغنی راحت‌ترقابل بررسی و مطالعه می‌گردد. در این لحظات فعالیت واکوئلهای انقباضی [1] کاهش یافته و بر حجم آنها افزوده می‌گردد. بعلت فشرده شدن واکوئل‌های غذائی محتویات داخلی آنها را بهتر می‌توان بررسی نمود. برای کاهش سرعت حرکت می‌توان از محلولهای ویسکوز، مانند متیل سلولز ۱۰٪ [2] استفاده کرد. زیرا تک یاخته‌ها به چسبندگی مایع اطراف حساس هستند و این روش سرعت حرکت آنها را محدود خواهد کرد. همچنین می‌توان از مواد کاهندهٔ حرکت و چسبندهٔ دیگری نیز مانند سولفات نیکل ۲ ٪[3] و فرمالین ٤٪[4] به کمک یک سوزن می‌توان قدری از این مواد را به داخل نمونه مورد مطالعه وارد کرد.

همچنین الیاف پنبه، باکتریهای رشته‌ای و خاشاک نیز جهت کاهش حرکت می‌توان استفاده نمود.

۳-۷ شناسائی

اغلب شناسایی تک یاخته‌ها از روی گونه مشکل و وقت‌گیر است، اما اگر آنها را در یک طبقه‌بندی بالاتر قرار دهیم، شناسائی آنها راحت‌تر خواهد بود. اما این به این معنا نیست که شناسائی سریع و راحتی از تک یاخته‌ها را از نظر گونه‌ای بتواند تسهیل کند. با این روش حداقل سه طبقه وسیع از تک یاخته‌ها در حد جنس شناسائی خواهند شد.

---

1 - Contactile vacoule

2 - Methyl cellulose

3 - Nickel Sulphate

4 – Formalin

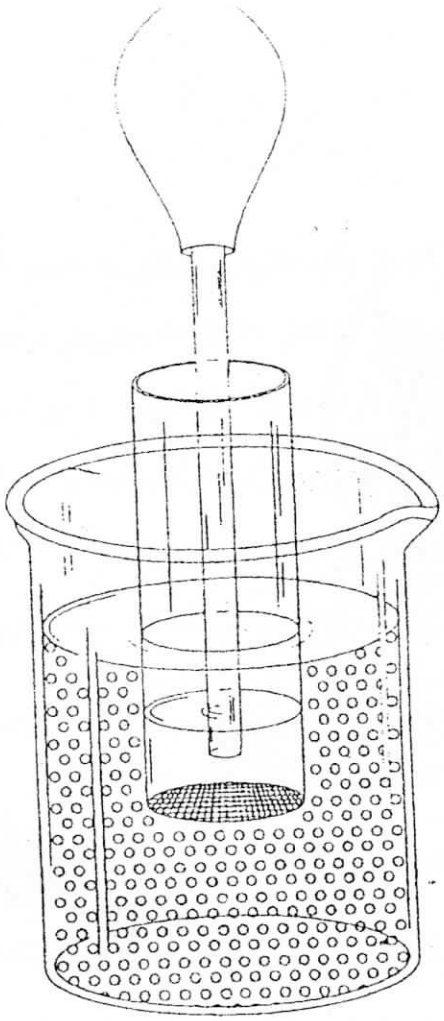
شکل ظاهری تک یاخته‌ها به گونه‌ای است که در هنگام شناسائی آنها، بایستی روشهای متعددی را بکار گرفت. مژه‌داران از نظر شکل و اندازه تنوع فوق‌العاده زیادی را نشان می‌دهند و شناسائی بعضی از جنسها با مشاهده اتفاقی(فرم فعال) آنها با میکروسکوپ نوری نیز امکان‌پذیر است. به هر حال تاژکداران و آمیبها به بررسی بیشتری نیاز دارند، برای مثال اگرچه آمیبها در زیر لازم زنده باقی می‌مانند ولی بایستی بطور اختصاصی سیل شوند و معمولاً لامل وسیله حرکتی آنها را مختل می‌کند و نحوه حرکت آنها نیز در تشخیص‌شان حائز اهمیت است. نمونه را بایستی در یک پلیت نیمه مرطوب قرار داد تا بتوان حرکت آنها را بررسی کرد و یا اینکه آنرا سیل نموده و با میکروسکوپ نوری با قدرت بالا مشاهده نمود. آمیبها با این روش چندین روز فعال باقی می‌مانند.

۴-۷ شمارش

جهت شمارش می‌توان از دو روش زیر استفاده نمود:

۱-۴-۷ روش پیپتی

در این روش، حجم مناسبی از نمونه را به یک سیلندر مدرج یا ظروف مخروطی ایمهوف انتقال دهید. تک یاخته‌ها را با استفاده از پیپت پوآردار و لوله پلاستیکی اکریلی شفاف که توری به آن متصل است تغلیظ کنید (مطابق شکل ٤)



شکل ٤- یک ابزار ساده و کارا برای تغلیظ تک یاخته به روش پیپتی

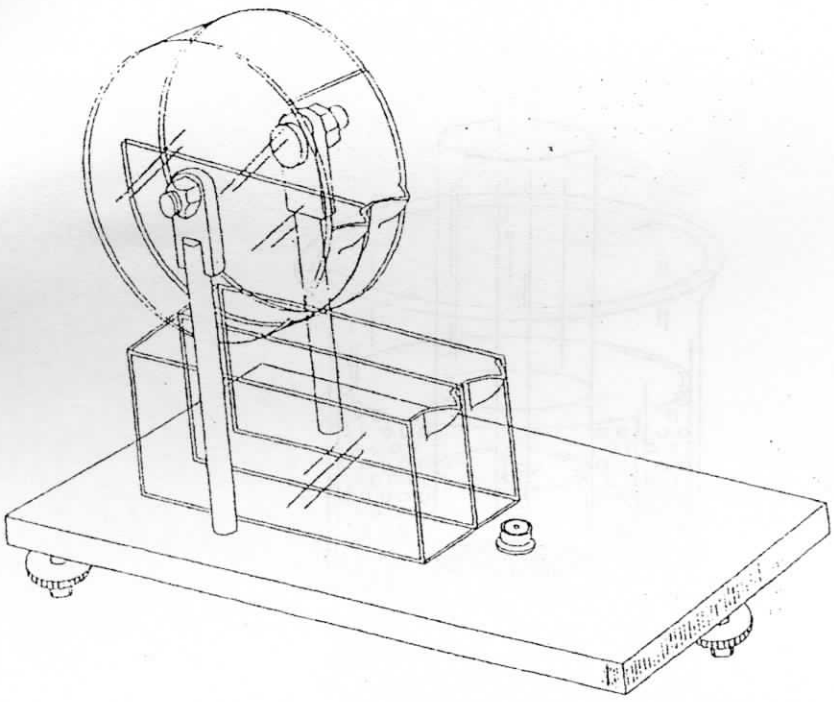
یادآوری ***لوله در پائین بشر حاوی نمونه قرار می‌گیرد، آب فیلتر شده به داخل لوله با پوار پلاستیکی خارج می‌گردد. فیلتر از جنس نایلون است که به انتهای لوله متصل گردیده است. اندازه منافذ فیلتر باید به گونه‌ای باشد که از عبور تک یاخته‌ها جلوگیری نماید و فقط آب از آن عبور کند.***

۲-۴-۷ روش تغلیظ

نمونه را به یک ظرف دهان گشاد منتقل کرده، به آرامی آنرا تکان دهید و به صورت تصادفی با پیپت، ۱ تا ۵ میلی‌لیتر از آنرا برداشته، داخل حفره شمارشی قرار دهید. تهیه نمونه اختصاصی به روش اسپلیتینگ [1] با هر نوع وسیله‌ای انجام می‌گیرد ولی اسپلیتر فولسوم بهترین وسیله شناخته شده است (مطابق شکل ۵)

---

1 - Splitting



شکل ۵- اسپلیترفولسوم[1]

قبل از استفاده اسپلیتر را در یک سطحی تراز کنید و آنرا به چندین قسمت تقسیم کرده و سپس آنرا در داخل نمونه خوب شستشو دهید تا نمونه اختصاصی تهیه شود، با ادامه این کار تکه‌ها و اجزای مناسبی ایجاد کنید. حتی زمانیکه از اسپلیتر فولسوم استفاده می‌کنید نمونه‌های اختصاصی حقیقتاً نمی‌توانند پذیرفته شوند، بنابراین موجودات را در چندین نمونه اختصاصی که از یک نمونه تهیه شده‌اند شمارش کنید تا احتمال اشتباه کاهش یابد.

مراحل شمارش معمول ارگانیسم‌های محاسبه شده براساس فراوانی آنها در یک نمونه است. بنابراین در یک نمونه با یک ارگانیسم معین و مشخص، ۵۰٪ تعداد کل خطا کاهش می‌یابد. در هر صورت با استفاده از میکروسکوپ با بزرگنمائی ۱۰۰× می‌توان تک یاخته‌های کوچک را در ۱ تا ۵ میلی‌لیتر شمارش نمود.

---

1 - Splitter Folsom

برای شمارش تک یاخته‌های بزرگتر از یک حفره شمارشی با حجم ۵ تا ۱۰ میلی‌لیتر استفاده می‌کنند یک ظرف شمارشی دهان گشاد به قطر ۵۰ تا ۸۰ میلی‌متر و عمق ۲ میلی‌متر مورد نیاز است. یادآوری می‌شود که جابجا کردن ظرف دهان گشاد مشکل‌آفرین است.

افزودن یک محلول پاک کننده قبل از شمارش، حرکت ارگانیسم‌ها را کاهش می‌دهد.

تک یاخته‌های بزرگتر با میکروسکوپ دو چشمی و درشت‌نمائی ۲۰× تا ٤٠× قابل شمارش می‌باشند اگر تشخیص مشکل شد، ارگانیسم‌ها را با بزرگنمائی بیشتر بررسی و شمارش نمائید.

یادآوری ***روش تهیه نمونه اختصاصی***

نمونه‌هائی که تعداد تک یاخته‌های آنها کمتر از ۲۰۰ عدد می‌باشد نیازی به تهیه نمونه اختصاصی جهت شمارش ندارند . بنابراین اکثر نمونه‌ها دارای ارگانیسم‌های زیادتری نسبت به آنچه که شمرده می‌شوند می‌باشند. بدین‌ترتیب برای برای شمارش کامل باید نمونه اختصاصی تهیه گردد.

؛ قبل از تهیه نمونه اختصاصی، ابتدا همه ارگانیسم‌های غیر متعارف و نامعمول بزرگ (مانند لارو ماهی‌های آب شیرین و مرجانیان [1]، دکاپودای [2] آب شور) را شمارش نمائید.

۸ بیان نتایج

برای شمارش تک یاخته‌ها از فرمول زیر استفاده نمائید.

$\frac{N_o}{m^3} = \frac{C \times V'}{V'' \times V'''}$ (برای تک یاخته‌های کوچکتر $\frac{N_o}{L}$)

---

1 - decapods

2 - decapods

که در آن:

C= تعداد ارگانیسم‌های شمرده شده.

V'= حجم نمونه تغلیظ شده برحسب میلی‌لیتر

V''= حجم شمارش شده برحسب میلی‌لیتر

V'''= حجم نمونه اولیه، برحسب متر مکعب

تک یاخته‌های کوچکتر را به صورت تعداد در لیتر و تک یاخته‌های بزرگتر را بصورت تعداد در مترمکعب گزارش نمائید.

پیوست الف

خصوصیات تک یاخته (بیولوژی و مورفولوژی)

(اطلاعاتی)

در علم تک یاخته‌شناسی [1] از آن دسته از موجوداتی صحبت می‌شود که دارای یک سلول واحد هستند: به عبارتی در تعریف تک یاخته [2] می‌گوئیم «تک یاخته موجودی است با ساختمان واحد که در آن تمام اعمال حیاتی به تنهائی توسط یک سلول انجام می‌گیرد».

تک یاختگان دارای اشکال مختلف و اندازه‌های گوناگون می‌باشند بعضی از آنها با چشم غیرمسلح دیده می‌شوند ولی کوچکترین آنها باید هزاران بار بزرگتر شود تا قابل مشاهده گردد از نظر شکل و حدود آنها عده‌ای کروی، بعضی بیضوی، عده‌ای دیگر دارای تقارن شعاعی یا جانبی هستند گاهی اوقات تک یاختگان به صورت کمانی یا قوسی و زمانی همراه با پیچش یا بالاخره فاقد هرگونه شکل هندسی منظم می‌باشند.

ساختمان تک یاخته (Structure)

ساختمان تک یاخته شامل قسمتهای زیر می‌باشد:

۱- هسته [3]: تک یاخته‌ها برخلاف باکتریها از نظر ساختمان هسته واجد یک هسته مستقل و منفک از سیتوپلاسم هستند. مهمترین وظیفه هسته انتقال صفات تک یاخته و شرکت در تولید مثل است.

۲- آندوپلاسم[4]: شامل پروتوپلاسم نسبتاً غلیظی است که دور هسته را احاطه می‌کند و حاوی گرانولهای فراوانی است این لایه قسمت اعظم سلول را در بر گرفته و عموماً سنتز مواد غذائی در این قسمت انجام می‌شود. در درون آن انواع واکوئلها از جملهٔ آنها گلیکوژن[5]، واکوئلهای دفعی یا

---

1 - Protozoology

2 - Protozoa

3 - Nucleus

4 - Endoplasm

5 - Glycogen

ترشحی[1] به منظور دفع ذرات و مواد غذائی غیرقابل مصرف و سایر ترشحات غیرضروری وجود دارد.

۳- اکتوپلاسم[2]: این قسمت سلول یکنواخت‌تر و شفاف‌تر است و دور اندوپلاسم را احاطه می‌کند و در تغذیه، تنفس، دفع ضایعات متابولیکی و بالاخره محافظت ارگانیسم دخالت دارد.

٤- غشاء[3]: غشاء یا پرده سیتوپلاسمیک یک دیواره محدود کننده ارگانیسم است که ورود و خروج مواد غذائی را کنترل می‌کند.

اعمال حیاتی تک یاخته

تک یاختگان دارای توانائی حرکت، تغذیه، تنفس، تکثیر و نوعی قدرت پاسخگوئی به محرکهای اطراف خود می‌باشند.

رده‌بندی این موجودات با تقسیم آنها به طبقات وسیعی که در بردارنده انواع مشابه است صورت می‌گیرد. گونه‌های آزادزی معمولاً به سه گروه بزرگ تقسیم می‌شوند: سارکودینه‌ها، تاژکداران و مژه‌داران، بسیاری از تاژکداران مانند اوگلنا[4] اتوتروف[5] هستند و برخی از آنها هتروتروف[6] و بعضی به صورت میکسوتروف[7] می‌باشند.

---

1 - excretory
2 - Ectoplasm
3 - Membrane
4 - Euglena

5- *Autotrophic*: موجوداتی هستند که دارای سبزینه یا کاروفیل بوده و گازکربنیک را به ترکیبات کربندار آلی تبدیل می‌کنند

6- Heterotrophic: این موجودات باکتریها و دیگر ذرات کوچک را بلعیده و از آنها به عنوان کربن استفاده می‌کنند.

7 - *Mixotrophic*:به موجودات زنده‌ای که می‌توانند اتوتروف یا هتروتروف باشند میکسوتروف می‌گویند

بسیاری از تک یاخته‌ها تحت تأثیر شرایط ویژه‌ای بخصوص در محیطهای کشت آزمایشگاهی و در زیستگاههائی که متأثر از آلودگی زیاد مواد آلی هستند بصورت اسموتروف [1] عمل می‌کنند.

تک یاخته‌ها در محیطهای مختلفی زندگی می‌کنند. گذشته از آبهای شور و نیمه‌شور و خاکهای مرطوب، گونه‌های آزاد تک یاخته‌ها در محیطهائی چون دریاچه‌های آب شیرین، رودخانه‌ها، برکه‌ها[2] و حتی استخرها [3] یافت می‌شوند.

بیشتر تک یاخته‌ها مجهز به دهان یا اندامکهای ویژهٔ تغذیه هستند و قابلیت بیگانه‌خواری، آنها را از دیگر تک‌یاخته‌های هم اندازه متمایز می‌کند. مرز بین تک یاخته و جلبکها بخوبی مشخص نشده است این جانوران در عین فاگوتروف بودن دارای ارگانلهای جلبکها مانند کلروپلاست [4]، لکه چشمی [5] و رنگدانه‌ها[6] می‌باشند که بطور غیرفعال یا رشد نیافته در آنها دیده می‌شود.

تک یاخته‌ها می‌توانند به طریقه غیرجنسی، جنسی و یا هر دو روش تولید مثل کنند. روش تولید مثل جنسی به طریقه کونژوگاسیون [7] و روش تولید مثل غیرجنسی به طریقه تقسیم دوتائی [8] است.

این موجودات در محیطهای غنی از فرآورده‌های بیولوژیکی به میزان فراوانی یافت می‌شوند. رسوبات کف دریاچه‌ها ممکنست حاوی چندین هزار از مژه‌دار و تاژکدار، باشند که قادرند

1- *Osmotrophic* موجوداتی هستند که حداقل مقداری از کربن مورد نیاز خود را از آب محیطی به طریق انتشار به داخل خود به دست می‌آورند.

2 - *Ponds*

3 – *Pools*

4 – *Chloroplast*

5 -*Eye spot*

6 - *Pigments*

7-*Conjugation*: اتصال موقت یاخته‌ها به یکدیگر و تبادل مواد ژنتیک را می‌گویند.

8 – *Binary Fission*

بصورت بی‌هوازی به حیات خود ادامه دهند. بسیاری از این جانوران کف‌زی[1] حاوی باکتریهای همزیست [2] تولید کنندهٔ گاز متان (CH_4) می‌باشند(این باکتریها در سیتوپلاسم این جانوران کف‌زی زندگی می‌کنند).

---

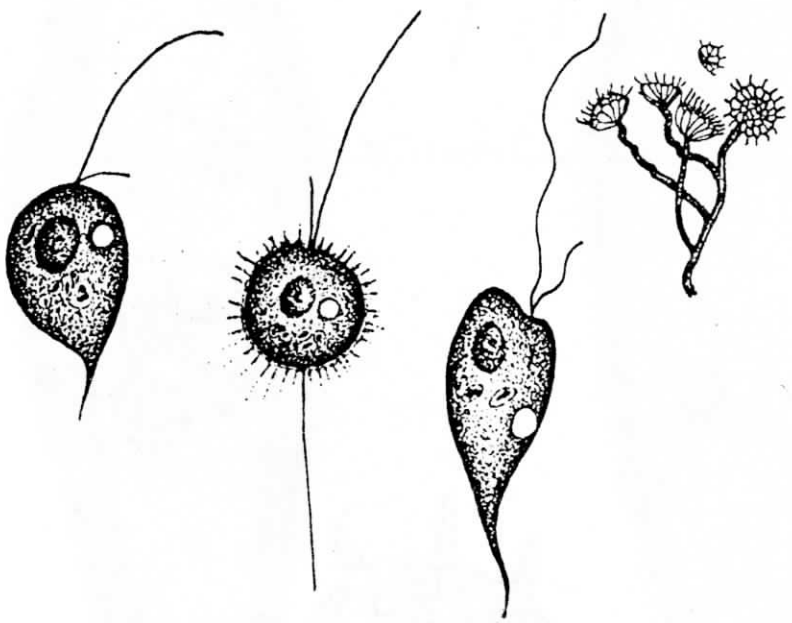
1 – Benthic

2 – Symbiotic Bacteria

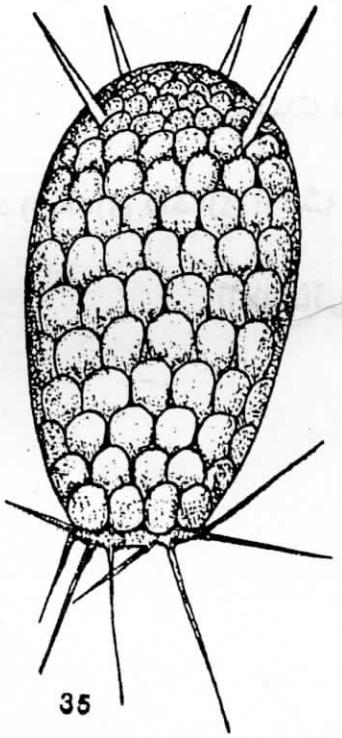
پیوست ب

مرفولوژی شماری از تک یاخته‌های آزادزی

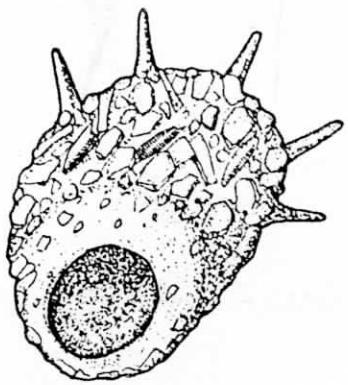
(اطلاعاتی)



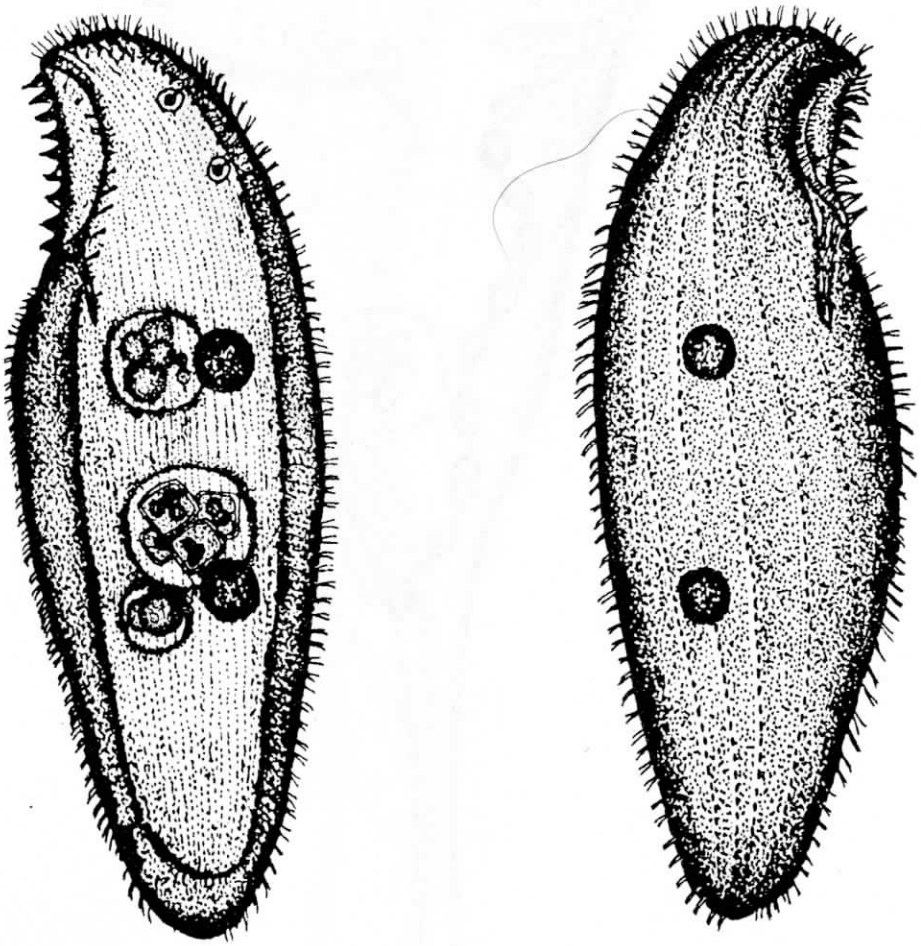
شکل ۱۰-۱- تاژکداران کریزوموناد خاردار



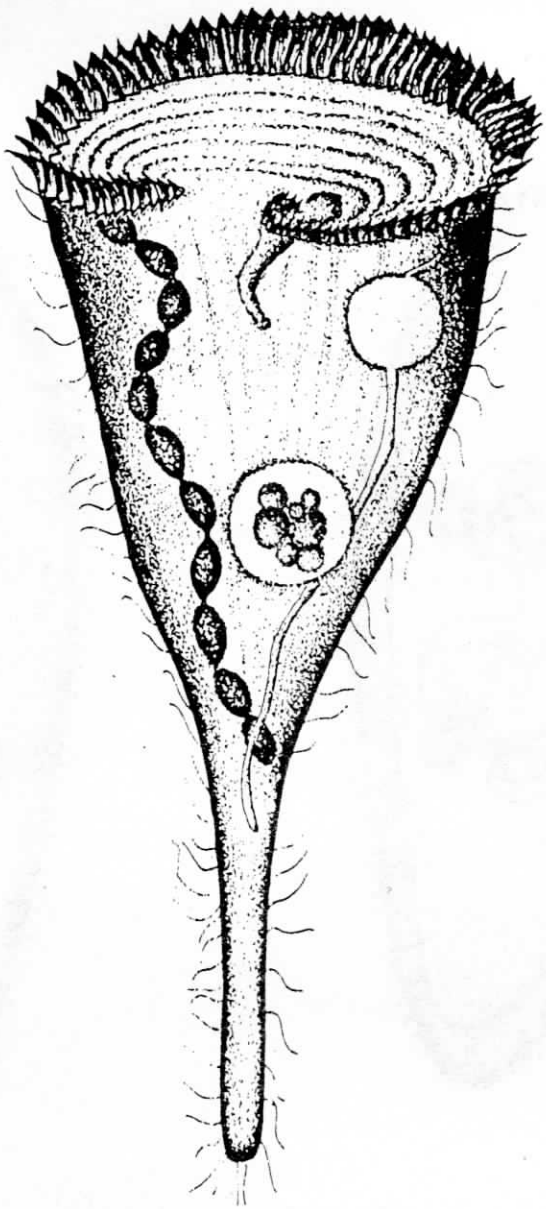
شکل ۱۰-۲۰- آمیب اوگلیفا



شکل ۱۰-۳- سنترو پیکسیس(آمیب غلافدار با پاهای کاذب انگشتی)

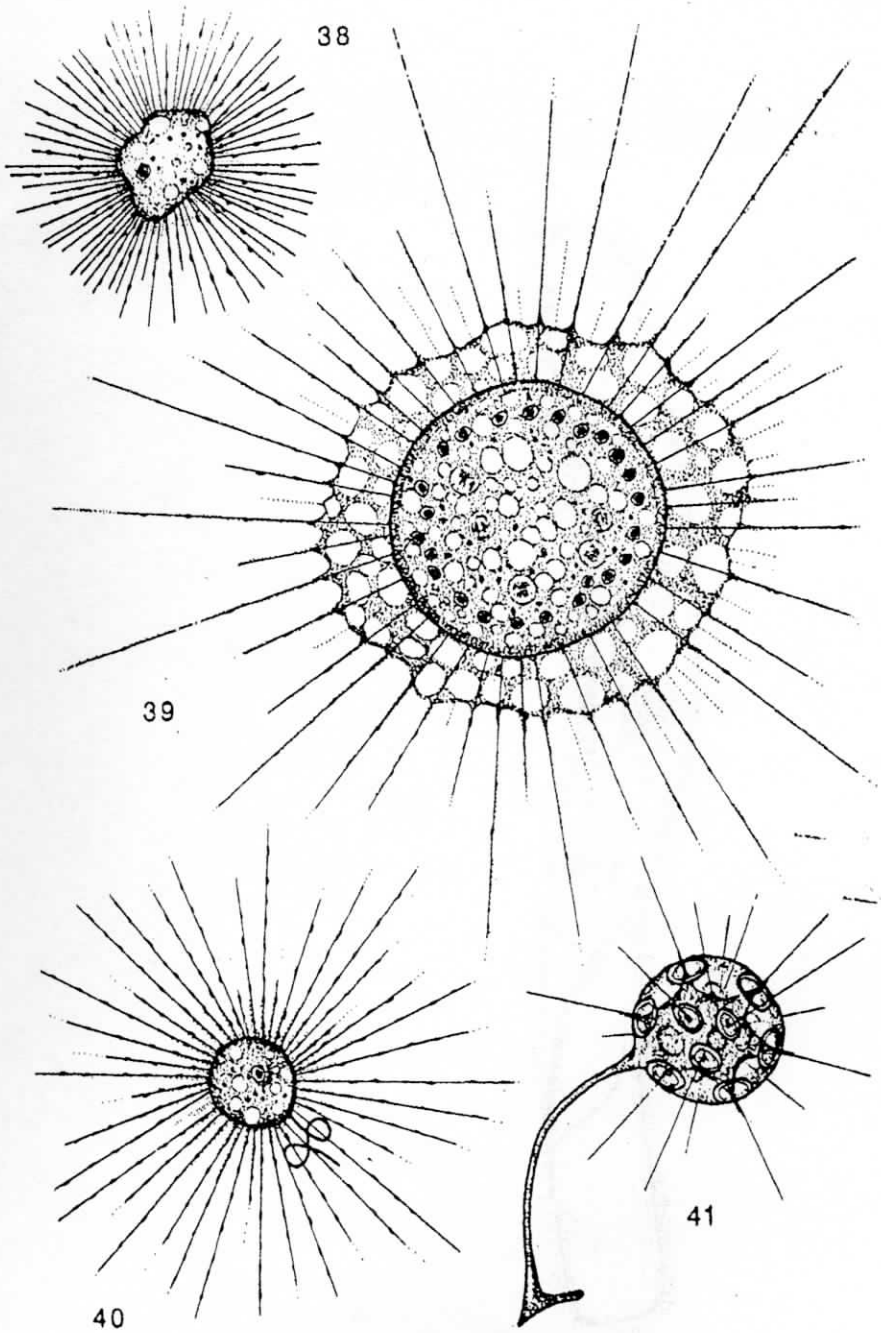


شکل ۱۰-٤- مژه‌دار لوکسودوس (سطح پشتی و شکمی)

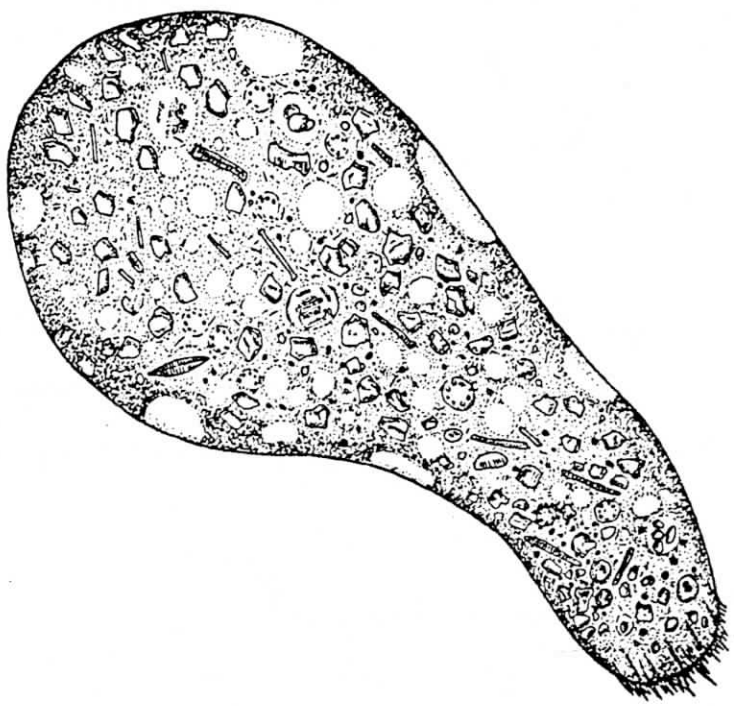


شکل ۱۰-۵- مژه دار استنتور

۱۰-٦- مژه‌دار اسپیروستوموم



شکل ۱۰-۷- خورشیدیها



شکل ۱۰-۸- پلومیکسا (آمیب بدون غلاف با پاهای کاذب لوله‌ای)