دراسة وعزل وتعريف الأحياء الدقيقة في عينات مياه الشرب
(عزل ودراسة وتعريف البكتيريا في المياه)

492 حدق

1437 هـ - 2016 م

علم الأحياء الدقيقة المائي
WATER MICROBIOLOGY

الفحص البكتيري عينات مياه الشرب
Water Bacteriology

يتلوث ماء المطر بالميكروبات العالقه في الجو، وقد تتلوث المياه الجوفيه من خلال التربه من مخلفات المصانع أو مياه المجاري Sewage التي تعتبر أهم الملوثات الميكروبيه.

الطريقة المتبعه عادة للتقدير الكمي البكتيريولوجي لا تعطي سوى الجزء من العدد الكلي للبكتيريا.

أهم مجموعه قد تتواجد في الماء ويتم فحص تلوثه بها هي مجموعة بكتيريا القولون Coliform Bacteria.

* يتم اختبار صلاحية الماء وخلوه من الميكروبات المسببه للأمراض لأغراض الشرب والاستخدام المنزلي والاستخدام في المصانع، معملياً كالتالي:

1- عد البكتيريا الكلي في عينة الماء.

2- اختبار تلوث العينه بمياه الصرف الصحي وبالتالي تلوثها ببكتيريا القولون.

الفحص البكتيري عينات مياه الشرب

1. فحص المحتوى البكتيري الكلي في عينة مياه الشرب Total Bacterial Count (TBC)
2. فحص التلوث ببكتيريا القولون Coliform bacteria:

* إختبارات نوعية Qualitative Tests:
* يتم بفحص تلوث البكتيريا ببكتيريا القولون العادية Total coliformوالبرازية Fecal coliform.
* إختبارات كمية Quantitative Tests: ويشمل عدد خلايا البكتيريا القولون.

1- عد البكتيريا الكلي في عينة الماء
Total Count of Bacteria

1- الحصول على العينه:

يحضر عينات من مياه الشرب المراد فحصها مع كتابة مصدر الماء على العينات ومراعاة ظروف التعقيم، ثم تُفحص العينات مباشرة أو تحفظ في الثلاجه لحين استخدامها.

2- تجرى التجارب التاليه:

الأدوات:

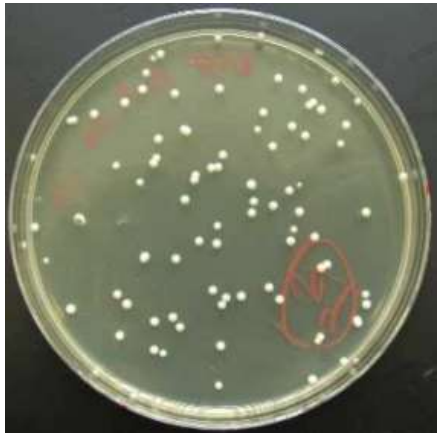
1- الأوساط الغذائية المختلفة.

2- ورق الترشيح المعقم – ورق النيتروسليلوز(0.45 µm) المعقم – مضخه وقمع معقمين بالكحول او الأوتوكلاف.

3- إبر التلقيح – ماصات 1 مل معقمة.

4- أدوات التعقيم

1- العد الكلي على الأطباق
Total Plate Count



* وتسمى طريقة العد القياسية بواسطة الطبق وحدة القياس هى cfu وهى اختصار جملة "colony forming units". أشهر الاوساط الغذائية « *Plate count agar*

* **عملية العد:**

تظهر مستعمرات البكتيريا بيضاء مصفرة

إذا قررنا تأجيل عملية العد يمكن أن نحفظ الطبق بعد إخراجه من الحضانة فى درجة حرارة 5-10 ºم لمدة لاتزيد عن 24 ساعة.

قانون العد:

c.f.u /ml =colonies counted /actual volume of sample :

وبما أنه تم نقل 1 مل من العينة سيكون c.f.u/ml = colonies counted

* إذا كان عدد المستعمرات 30- 300 في الطبق يتم عدها بتقسيم الطبق وعد جزء في صندوق العد ثم يضرب العدد فى عامل القسمة.
* يؤخذ فى الإعتبار معامل التخفيف
* إذا كان العدد كبير جدا بحيث يصعب عده يجب إعادة التجربة بتخفيف أكثر

طريقة الترشيح الغشائي
Membrane Filter Method

* الوسط المستخدم : R2A Agar

قطر الغشاء النيتروسليلوزي لا يزيد عن 0.45 µm

تحت ظروف التعقيم ينقل 1 مل من العينة ونضعه فى كمية ماء مقطر معقمة ثم نصبه على الغشاء حتى يتم توزيع العينة على مساحة الغشاء ثم نرفع الغشاء برفق بواسطة آداة معقمة

نكون قد جهزنا مسبقا طبق وفيه الوسط المغذى (الآجار R2Aالمتصلب)

نقلب الطبق ونضعه فى الحضانة على درجة حرارة 35 ºم لمدة 48 ساعة أو أكثر قليلا أو على درجة حرارة 20-28 ºم لمدة 5-7 ايام.

* طريقة العد مثل طريقة pour plate.

طريقة العد الكلي للبكتريا القولونية باستخدام الترشيح الغشائي Total coliform (membrane filter method)

الوسط المستخدم: M-Endo Agar

توضع ورقة ترشيح (معقمة) في المكان المخصص في وحدة الترشيح.

ينقل 100 مل من العينة إلى الوعاء الخاص بوحدة الترشيح ونقوم بالترشيح.

بواسطة ملقط معقم تنقل ورقة الترشيح وتوضع علي سطح الأجار المتصلب (M-) Endo agar المحضر مسبقا (5 -7 مل في الطبق الصغير) بدون اى فراغات.

يترك الطبق لفترة قصيرة حتي تلتصق الورقة جيدا بالوسط الغذائي ويظهر ذلك بتلون ورقة الترشيح من الخلف باللون الاحمر.

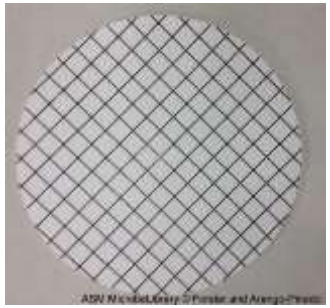
يحضن الطبق مقلوباً عند 35.5 ºم ولمدة 24 ساعة وتسجل النتيجة النهائية بعد 48 ساعة.

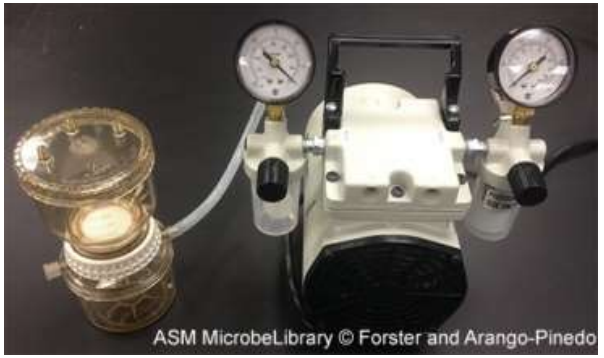
قلنون العد

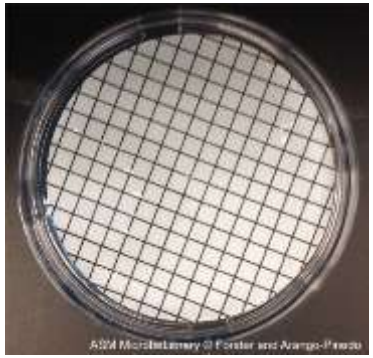
(Total) Coliform colonies/100mL = *

(coliform colonies counted x 100) / (mL sample filtered *

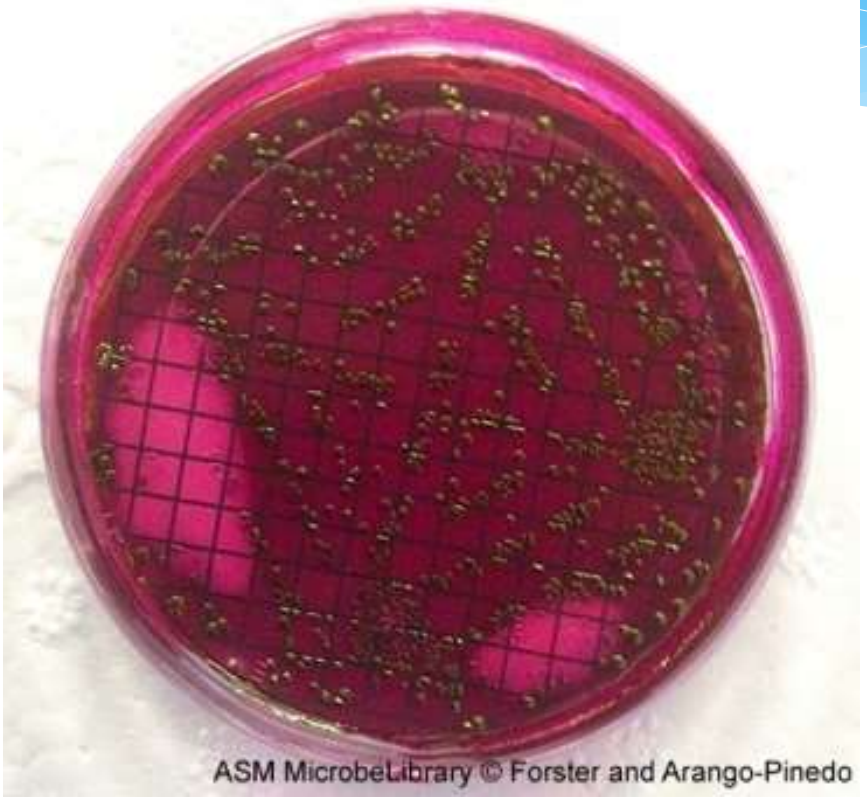
ورق النيتروسليلوز والمضخه







النتيجة الموجبة ويجب مقارنتها مع كونترول موجب وسالب



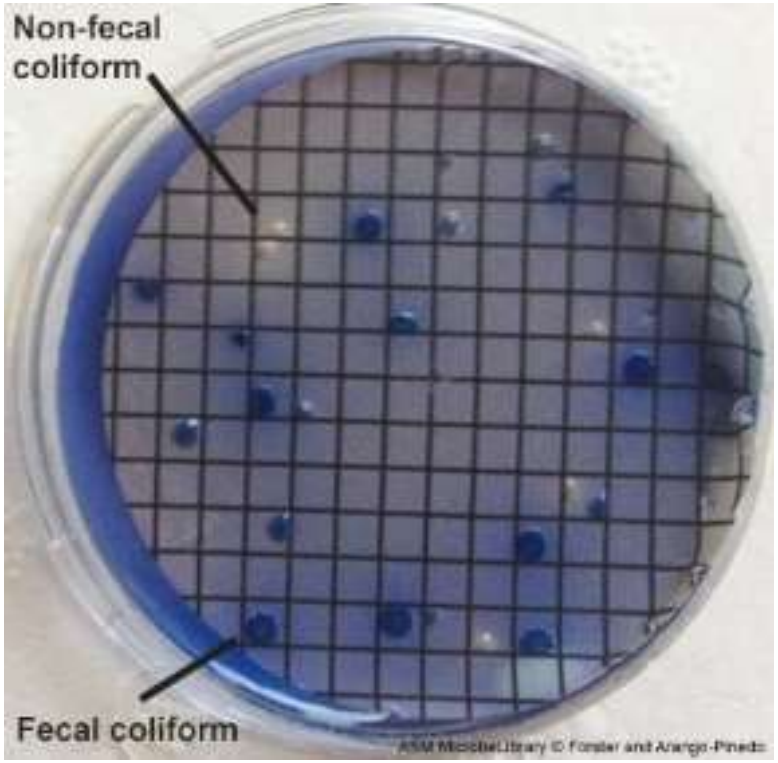
طريقة عد البكتريا القولونية البرازية بطريقة الترشيح الغشائيFecal coliform

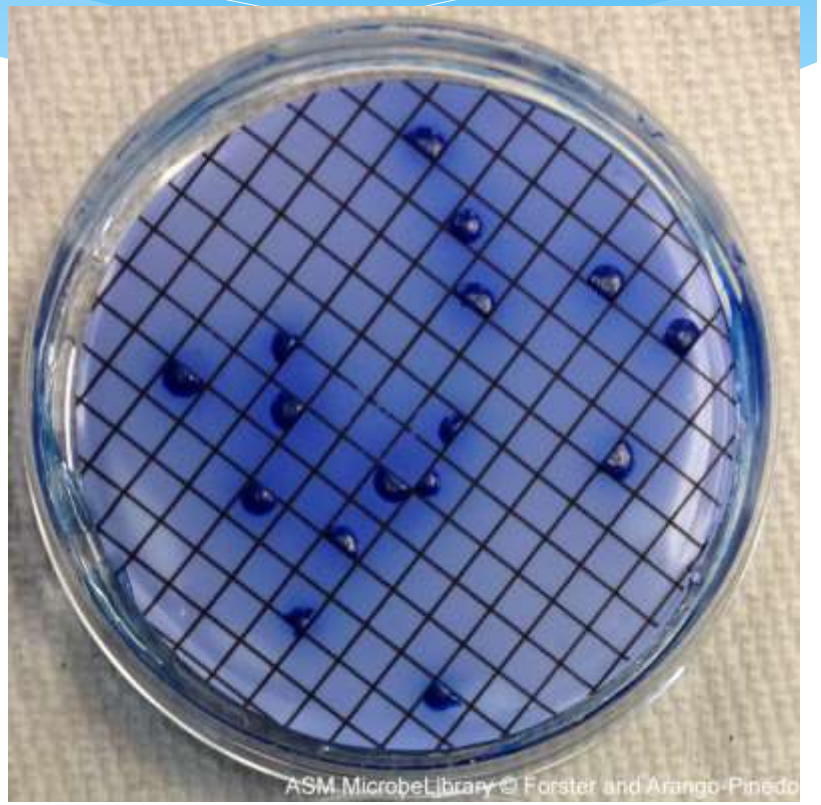
* نفس الخطوات السابقة وقانون العد فيما عدا

1- يستخدم وسط غذائي حاص يسمى FC agar

2- التحضين عند 44.5 ºم لمدة 24 ساعة.

النتيجة الموجبة ويجب مقارنتها مع كونترول موجب وسالب





2- اختبارات نوعية تلوث عينة مياه الشرب ببتكيريا القولون

Examination of Coliform Bacteria

1- الاختبار الاحتمالي Presumptive Test

2- الاختبار التأكيدي Confirmatory Test

3- الاختبار التكميلي Complementary Test

الكشف عن البكتيريا القولونية (التخمر)

الكشف عن المجموعة القولونية:

Escherichia, Enterobacter, Klebsiella, Citrobacter and *Serratia*.

* تستخدم هذه الطريقة للكشف عن كل أنواع البكتيريا التى تستطيع تخمير اللا كتوز في ظروف التحضين عند 35 ° م لمدة 48 ساعة.
* فى هذه الطريقة سيظهر أثر وجود البكتيريا في صورة غاز(CO_2)
* او تغير في درجة الأس الهيدروجيني pH فتزيد الحامضية فيمكن استخدام 0.01 جم من bromocresol purple كدليل.
* تسمى العينة التى يثبت وجود اى بكتيريا بها بأنها عينة موجبة + ve
* العينة السالبة - ve هى التى لا يتواجد بها اى أثار البكتيريا من الغاز او الحامضية
* الوسط المستخدم Lactose broth و EMB Agar أو Endo Agar.

اختبار تلوث عينة الماء بمياه المجاري
Examination of Water for Sewage Pollution

* يعتبر الماء صالحاً للشرب إذا كان خالياً من ميكروبات القولون بشرط أن يكون خالياً من المواد السامه.
* مجموعة القولون : Coliform Bacteriaبكتيريا عصويه قصيره سالبة لصبغة جرام غير مكونة للجراثيم متحركة بالأسواط هوائية اختياريا وتخمر سكر اللاكتوز منتجة غاز وحمض كنواتج للتخمر.

سكر اللاكتوز
Lactose
$C_{12} H_{22} O_{11}$

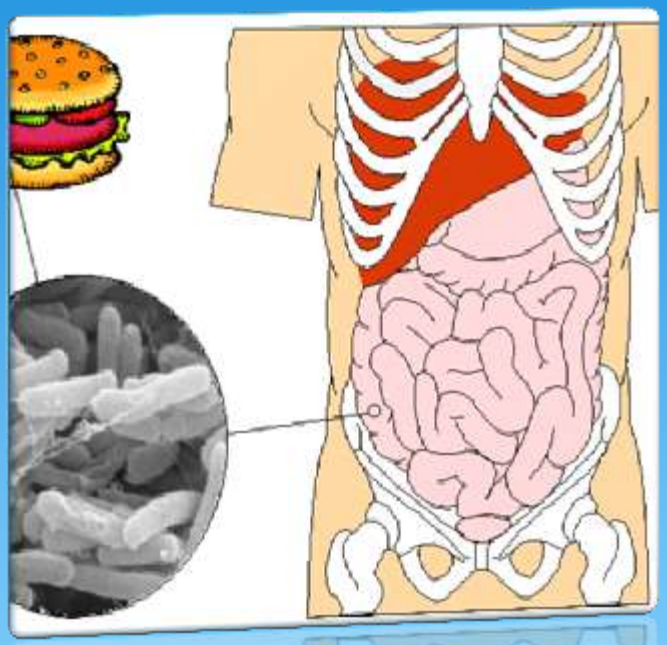
عملية التخمر
coliform bacteria

حمض اللاكتيك
تغير لون الكاشف
إلى الأصفر

+

غاز CO_2و الهيدروجين
في صورة فقاعة داخل
أنبوبة درهام
Durham tube

كيف يمكن أن تصل بكتيريا مجموعة القولون إلى مصادر المياه؟



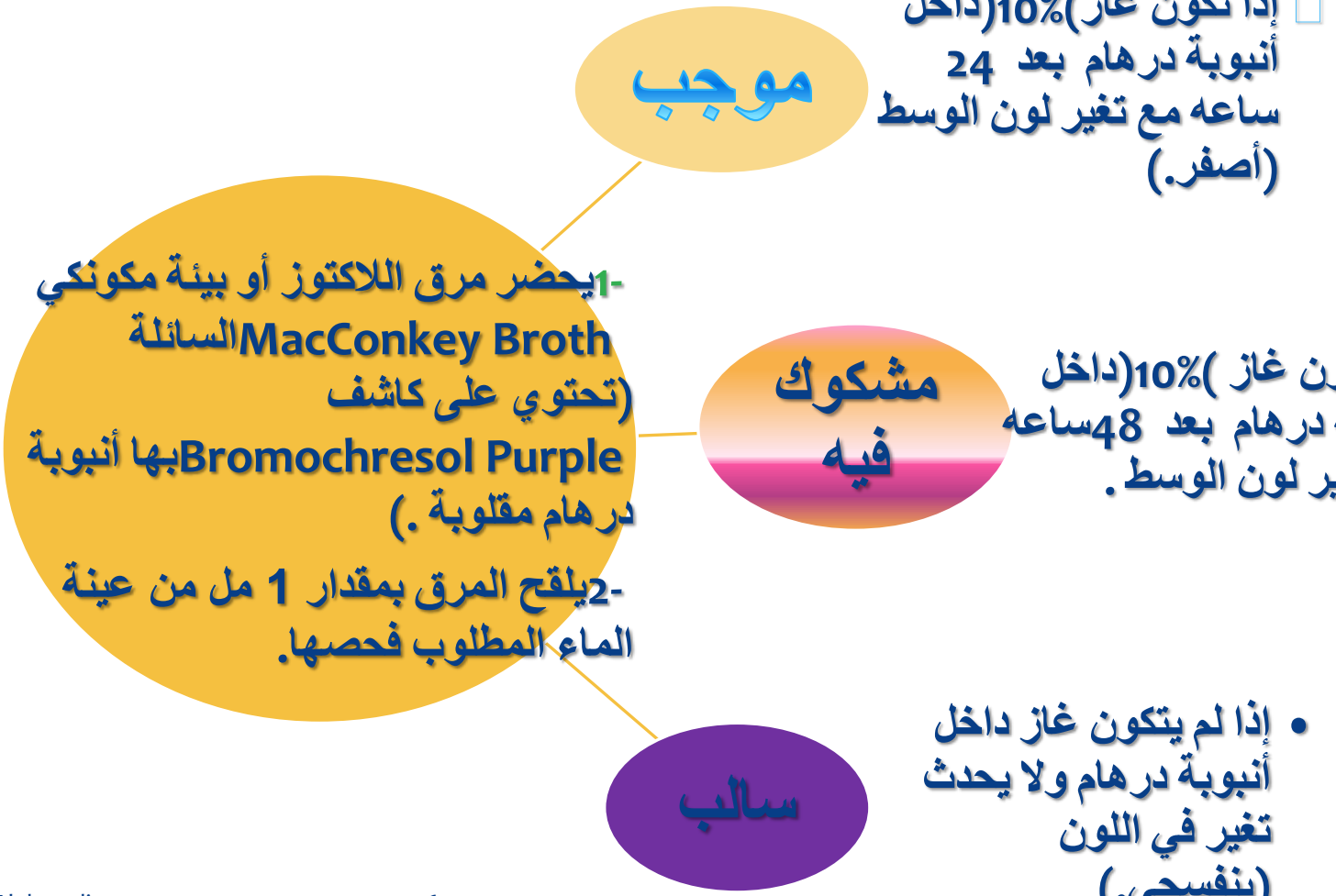
تتواجد عادة في أمعاء ذوات ا لدم الحار، ويدل وجودها في الماء على تلوث الماء ببراز هذه الكائنات.

نظراً لصعوبة الكشف عن الميكروبات المرضيه واستهلاكها للكثير من الوقت، تختبر المياه لوجود مجموعة القولون من عدمه.

إذا وجدت في المياه فإن ذلك دليل على تلوثها بمياه المجاري وبالتالي احتمال وجود ميكروبات مرضيه أخرى كالفيروسات الممرضه وتكون المياه غير صالحه للشرب أو الاستعمال الآدمي عموماً.

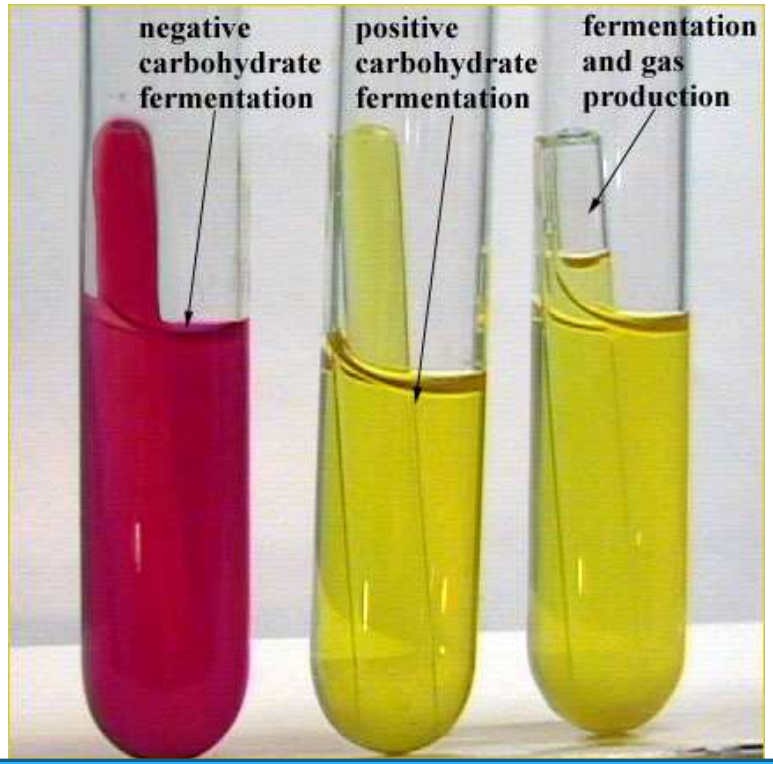
* الغرض من الاختبار الاحتمالي:

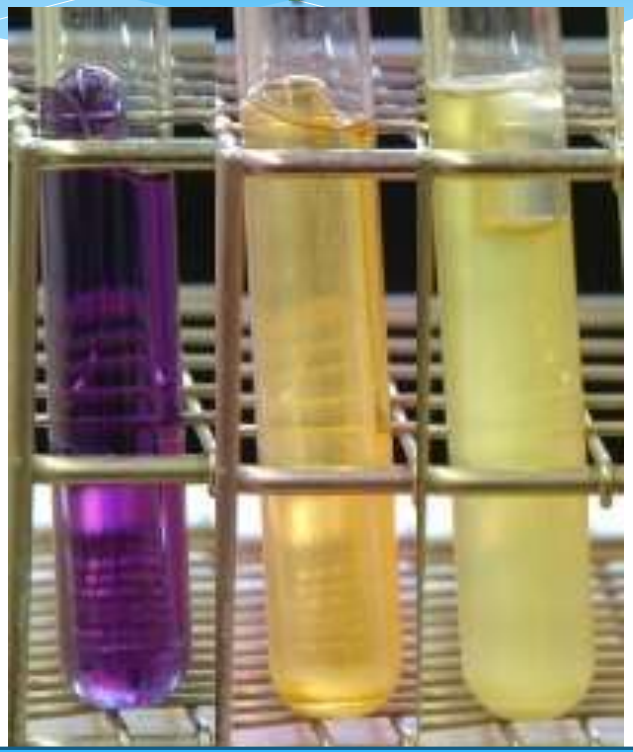
اختبار قدرة البكتيريا الموجوده في العينه على تخمير سكر اللاكتوز هوائياً إلى حمض وغاز.



1-الاختبار الاحتمالي Presumptive Test

أمثلة على تفاعل السلالات البكتيريه مع مرق التخمر.





إذا كان النوع لا يخمر السكر المختبر فإن لون الكاشف يظل كما هو بنفسجي ولا يتكون أي غاز **(الأنبوبة اليسرى.)**

إذا كان النوع مخمر للسكر المختبر هوائياً فغالباً ما ينتج الحمض فيسبب انخفاض درجة pH فيتغير لون المرق إلى الأصفر **(الأنبوبة الوسطى.)**

بعض الأنواع تنتج غاز الهيدروجين خلال عملية التخمر وهذا الغاز يتم حجزه داخل أنبوبة درهام المقلوبه ويظهر في صورة فقاعه غازيه داخلها **(الأنبوبة اليمنى.)**

2-الاختبار التأكيدي Confirmatory Test

* يجب إجراء هذا الاختبار في حالة العينات التي أظهرت نتيجة موجبه أو مشكوك فيها من الاختبار الاحتمالي ، أي ظهور أي كمية من الغاز بعد 48ساعه من التحضين.

* **الغرض من الاختبار التأكيدي**

التأكد من إيجابية وجود مجموعة القولون باستخدام بيئات صلبة تحتوي على كواشف معينه.

1-بيئة آجار إيوسين أزرق الميثلين Eosine Methylene Blue ويرمز لها E.M.B.

Enterobacter aerogenes on EMB

تظهر في صورة مستعمرات بنية المركز وخالية من اللمعان المعدني.

E. coli on EMB

تظهر في صورة مستعمرات ذات مركز أسود ولمعان معدني مخضر

Brown colonies with metallic sheen

2-الاختبار التأكيدي Confirmatory Test

2-بيئة آجار الإندو Endo Agar.

تظهر المستعمرات وردية اللون وليس لها مركز داكن.

تظهر المستعمرات ذات مركز داكن وتتلون البيئة حولها بلون أحمر داكن وقد يكون لها لمعان معدني.

تفسير الاختبار التأكيدي
Mode of Action

1-بيئة آجار إيوسين أزرق الميثلين Eosine Methylene Blue ويرمز لها E.M.B.

يتوقف لون المستعمرات على هذه البيئة على عاملين:

1. تتفاعل صبغة الإيوسين Eosine (حامضيه) مع أزرق الميثلين Methylene blue (صبغة قاعدية)فتتكون صبغه مركبة ذات خواص حامضيه أو متعادلة.
2. تكوين كمية من الأحماض نتيجة لتخمر سكر اللاكتوز مما يؤدي إلى خفض درجة pHللوسط مما يسبب امتصاص الصبغة المركبه على الخلايا المكونة للمستعمرة.

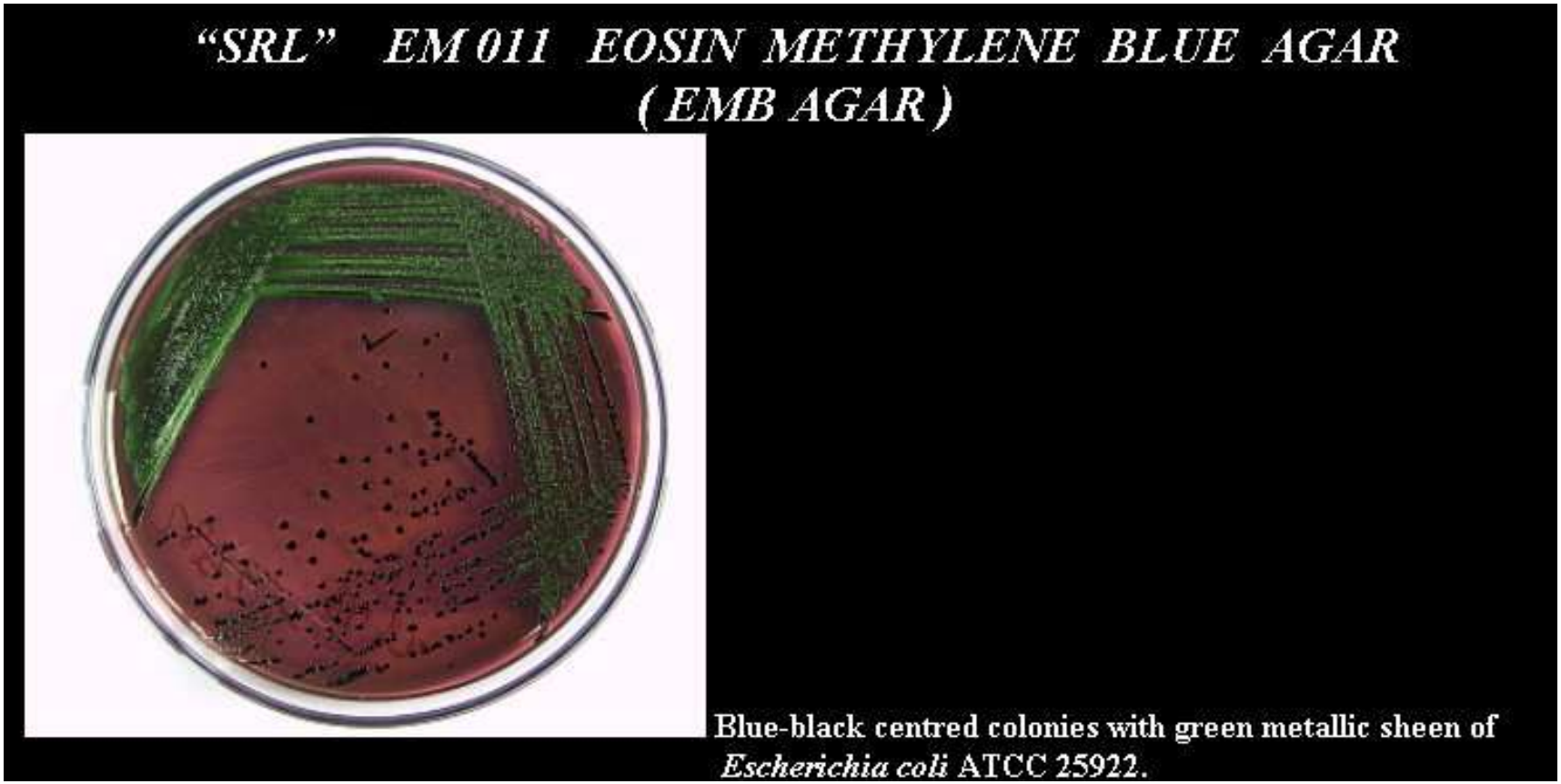
2-بيئة آجار الإندو Endo Agar.

يعمل الفوكسين وكبريتات الصوديوم على تثبيط نمو البكتيريا الموجبة لجرام.

يتوقف لون المستعمرات على هذه البيئة على مادة Acetaldehyde، وهي عباره عن مركب وسطي ينتج من تخمير اللاكتوز وتكون مركب مع كبريتيت الصوديوم ثم يتحلل هذا المركب وينشأ عن ذلك ظهور لون الفوكسين الأحمر في منطقة المستعمرات المنتجة للأسيتالدهيد.

أي أن هذه البيئة تعمل كبيئة تحجز الاسيتالدهيد. Trapping Acetaldehyde

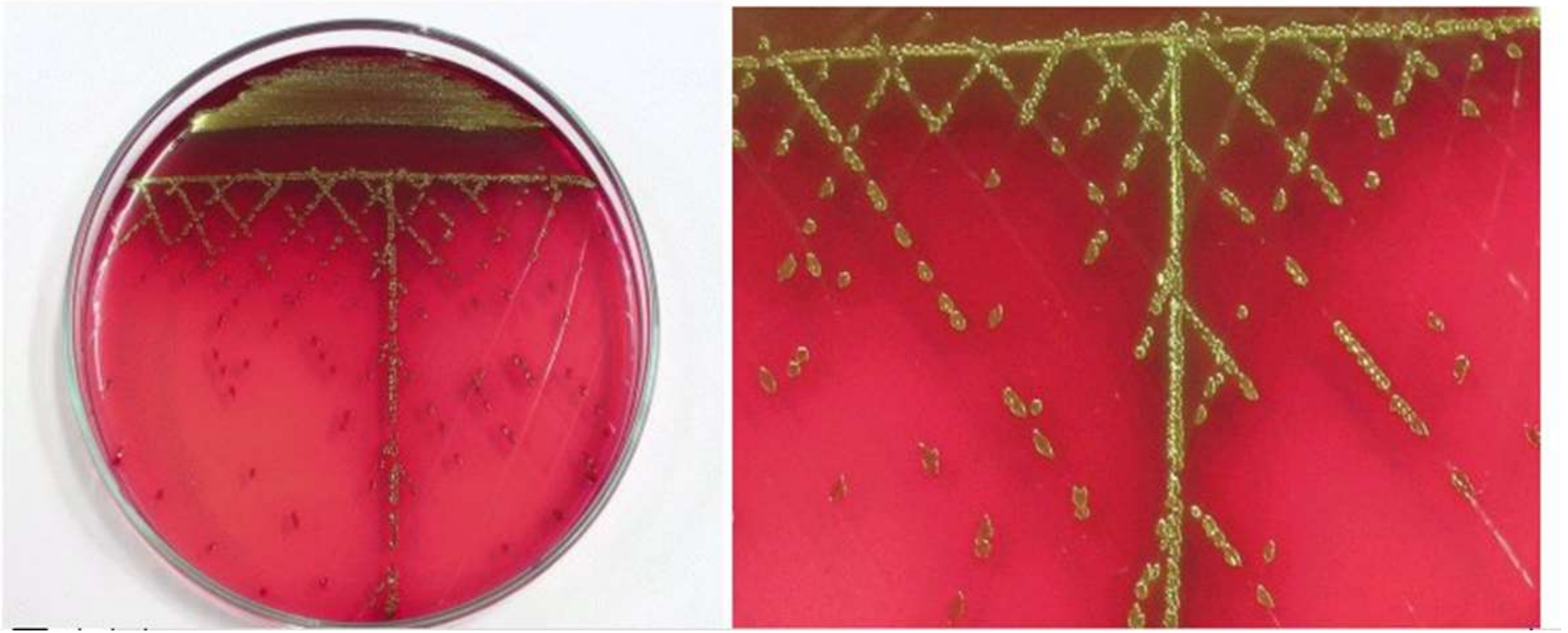
صورة توضح نمو بكتيريا E. coli على وسط الإيوسين وأزرق الميثلين EMB Agar.



صورة توضح نمو بكتيريا *E. coli* على وسط الإندو Endo Agar.

EM 012 'SRL' ENDO AGAR

Escherichia coli ATCC 25922 (Pink to red colonies with metallic sheen)



3-الاختبار التكميلي
Complementary Test

يشمل خطوتين:

1-أن الميكروب المعزول من الاختبار الاحتمالي الايجابي يستطيع تخمير اللاكتوز ثانية.

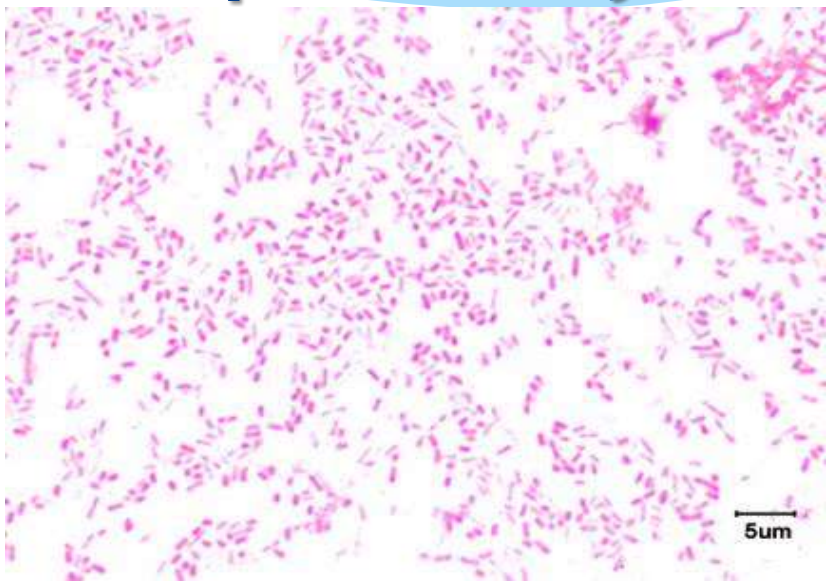
2-أن المستعمرات الناميه على البيئتين السابقتين تظهر عند فحصها ميكروسكوبياً بعد صبغها بصبغة جرام ، سالبة الجرام عصوية قصيرة غير متجرثمة وبالتالي فهي تتبع محموعة القولون Coliform bacteria.

* **الغرض من الاختبار التكميلي:**

التأكد من أن مستعمرات *E. Coli* و*Enterobacter aerogenes* التي ظهرت على أطباق بيئتي E.M.B. و Endo agar تابعة لمجموعة القولون.

3-الاختبار التكميلي
Complementary Test

صورة مجهرية لخلايا بكتيريا *Escherichia coli* سالبة الجرام عصوية قصيرة غير متجرثمه.



صورة الكترونيه بواسطة المجهر الالكتروني النافذ لبكتيريا *Escherichia coli*