المملكة العربية السعودية
وزارة التعليم العالي
جامعة القصيم
مركز الأبحاث الواعدة في المكافحة الحيوية
والمعلومات الزراعية

BCARC

جامعة القصيم
Qassim University

الدليل المبسط
للكشف عن التلوث الميكروبي للمياه

إعداد

د . محمد جمال الدين الزيني

إصدار

مركز الأبحاث الواعدة في المكافحة الحيوية والمعلومات الزراعية

(١٤٣٣ هـ - ٢٠١٢ م)

مقدمة :

يعتبر الماء اكثر المواد الغذائية استهلاكا خلال فترة عمر الإنسان ، لذلك فإن جودة المياه تمثل اهتمام أساسيا لدى المنتجين و الجهات الرقابية و المستهلكين لذلك ان حدوث أدنى تلوث للمياه يشكل خطورة حقيقة على الصحة. و من ثم فإن المراقبة والتقييم المستمرين للمياه عامة و مياه الشرب خاصة هما امران متطلبان لحماية الصحة العامة و الذي يتم من خلال التأكد أن المياه ذات جودة عالية و خالية من كافة الملوثات و التي يأتي على رأسها الملوثات الميكروبية.

يتطلب التقدير المباشر للميكروبات و بخاصة المرضات **Pathogens** و الفيروسات و وحيدات الخلية المتطفلة كلفة مرتفعة و طرق تحتاج لوقت طويل إضافة إلى فنيين مدربين. يزداد الوضع صعوبة عندما يتم التتبع الدوري لمئات من المرضات و المتطفلات في مصانع المياه و مياه الآبار و مياه الصرف و الأغذية و التربة و العديد من العينات البيئية الأخرى. لذلك كانت الحاجة الماسة لتتبع دلائل التلوث الدالة عن الملوثات البرازية أمر مرغوب فيه. في عام ١٩١٤ م اتخذت الهيئة الأمريكية للصحة العامة مجموعة من بكتريا القولون كدلالة على التلوث البرازي في مياه الشرب. فيما بعد تم إدراج العديد من الميكروبات الى قائمة تلك الدلائل. و لقد اختيرت تلك الدلائل على ان يتوافر فيها مجموعة من الخصائص اهمها :

١. أن يكون احد الكائنات التي تشملها الفلورا المعوية للحيوانات من ذوات الدم الحار.
٢. يجب أن يتلازم تواجده طالما تواجدت المرضات و يغيب في العينات الغير ملوثة.
٣. يجب أن يتواجد بأعداد تفوق أعداد الكائن المرض.
٤. يجب أن يكون الدليل الميكروبي يملك صفات لمقاومة الظروف البيئية و المطهرات على اقل تقدير تتساوى و تلك التي يملكها الكائن المرض.
٥. يجب أن يتم تقديره و التعرف عليه بطرق سهلة و سريعة و غير مكلفة.
٦. يجب أن يكون الدليل الميكروبي غير ممرض.

حددت العديد من الهيئات الدولية و المحلية المنظمة للمواصفات و المقاييس مثل منظمة الصحة العالمية **WHO** و المنظمة العالمية للمواصفات و المقاييس **ISO** و هيئة المواصفات و المقاييس السعودية و الخليجية **SASO** ، طرق مرجعية **Reference methods** للكشف عن جودة مياه الشرب بواسطة العديد من الدلائل الميكروبية **Microbial indicators** مثل بكتريا القولون الكلي و الغائطي **Total & fecal coliform** وبكتريا الايشيرشيا كولاي ***Escherichia coli*** و غيرها. تعتبر تلك الدلائل بمثابة محددات لجودة المياه **Water quality attributers** و أيضا كمقياس للسلامة **Safety measures**. تتصف طرق تقدير تلك الدلائل الميكروبية بسرعة و سهولة في الأداء مع دقة النتائج. هذا و قد صاحب ظهور تلك الطرق تطورات تقنية حديثة ساعدت على تطوير و تجويد الطرق القياسية بل و ظهور طرق بديلة توفر الجهد مع سرعة الحصول على النتائج. تستعرض هذه النشرة الفنية أهم الدلائل الميكروبية و اكثرها شيوعا و استخداما و وصف طرق تقديرها في مجال تحديد سلامة و جودة المياه

١. بكتريا القولون الكلي و البرازي Total and Fecal Coliform Bacteria

تنتمي مجموعة بكتريا القولون الكلي لعائلة البكتريا المعوية ***Enterobacteriaceae*** و هي بكتريا هوائية و لا هوائية اختيارا ، سالبة لصبغة جرام و هي لا تكون جراثيم ، ذات شكل عصوي ، تستطيع تخمير سكر اللاكتوز منتجة حمضا و غازا خلال ٤٨ ساعة على درجة حرارة تحضين ٣٥ م°. و تشتمل مجموعة بكتريا القولون الكلي على الأجناس التالية:

Escherichia, Enterobacter, Klebsiella, and Citrobacter.

تخرج تلك البكتريا مع البراز الآدمي و الحيواني بأعداد كبيرة نسبيا و ذلك بشكل يومي تصل الى **2×10^9 coliforms/day/capita** إلا انه من الجدير بالذكر ليست كل اجمالي هذه البكتريا من أصل برازي.

بكتريا القولون البرازي **Fecal Coliform** هي بكتريا تتبع بكتريا القولون الكلي الا انها محبة للحرارة تستطيع النمو و تخمير سكر اللاكتوز عند درجة حرارة ٤٤.٥م °. تشمل تلك المجموعة على النوعين الايشرشيا كولاي ***Escherichia coli*** و الكلبسيلا نيمونيا ***Klebsiella pneumonae***. وجود بكتريا القولون البرازي يدلل على التلوث بفضلات برازية ذات الصلة بالحيوانات من ذوات الدم الحار.

العالم ايشارش في عام ١٨٨٥ م تعرف على نوعين من البكتريا في البراز الآدمي و أطلق عليه ***Bacterium coli*** و الذي يعرف الآن باسم ***Escherichia coli***. بالطبع كان من الصعب تمييز تلك البكتريا دون باقي بكتريا القولون الأخرى الا انه منذ بداية ١٩٠٠م امكن عمل ذلك.

و حديثا اقترح بعض الباحثون استخدام ***E. coli*** بمفردها كدلالة على التلوث بالبراز نظرا لسهولة تمييز الميكروب من بقية أفراد مجموعة بكتريا القولون (لاختصاصها ببعض الصفات الفسيولوجية مثال على ذلك سالبية انزيم اليورياز **urease** و انتاج انزيم البيتا جلوكيورونيداز **β-glucuronidase**)

بشكل عام فان بكتريا القولون البرازية ذات معدلات بقاء تعادل لحد كبير الممرضات البكتيرية إلا أنها اقل قدرة في الدلالة على التلوث و وجود الفيروسات و البروتوزوا. لذلك لا يمكن الاعتماد على المواصفات القياسية لبكتريا القولون لتحديد التلوث بالفيروسات و وحيدات الخلية في البيئات المائية.

تقدير بكتريا القولون الكلى و البرازي:

تقوم بكتريا القولون الكلي بتخمير سكر اللاكتوز و تنتج حمضا و غازا خلال ٤٨ ساعة عند درجة حرارة ٣٥م °. يتم التعرف على ذلك بطريقتين هما طريقة العدد الأكثر احتمالا **Most Probable Numbers (MPN)** و طريقة الترشيح الغشائي **Membrane Filtration**.

طريقة العدد الاكثر احتمالا Most Probable Numbers (MPN)

يتم هذا الاختبار على مرحلتين تعرف الاولى بالاختبار التخميني و تعرف الثانية بالاختبار التأكيدي، و يتم ذلك بواسطة التحليل بطريقة أنابيب التخمر المتعددة (الثلاثية أو الخماسية) **Multible Fermentation Tubes Method** و يعقب ذلك تحويل اعداد الانابيب الموجبة لقيم رقمية و ذلك بواسطة جداول احصائية تعبر عن العدد الاكثر احتمالا **Most Probable Numbers (MPN)** من

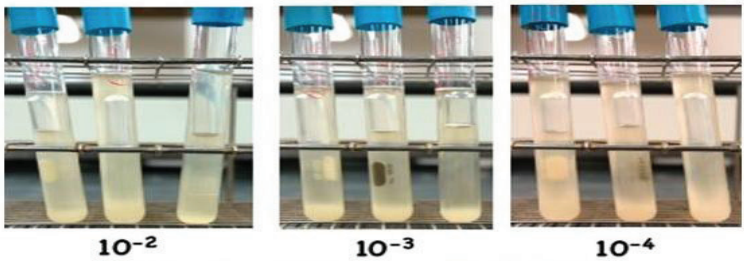
البكتريا في العينة. الشكل (١) يوضح مراحل اجراء الاختبار اما الجدول (١) يمثل جداول تحديد معامل العدد الاكثر احتمالا.

في الاختبار التخميني يتم استخدام مجاميع من الانابيب كل مجموعة تحتوي على ثلاثة او خمسة انابيب (سعة ٢٥ مل).تحتوي كل انبوبة على ٩ مل من بيئة مرق كبريتات اللوريل **Lauryl Sulphate Broth (LSB)** يوجد بداخلها انبوبة صغيرة لجمع الغاز تعرف بأنابيب درهم **Durham** كخطوة أولى لانتشال **(Enumeration)** بكتريا القولون الكلي. في مجموعة الانابيب الاولى تضاف عينة حجمها ٩مل للحصول على تخفيف ١/١ لكل أنبوبة من الثلاثة أنابيب. في المجموعة الثانية يضاف ١ مل عينة للحصول على تخفيف ١/١٠ لكل انبوبة من الثلاثة أنابيب و بالمثل يضاف ٠,١ مل عينة لكل أنبوبة في المجموعة الثالثة للوصول الى تخفيف ١/١٠٠ . يستمر اجراء تخفيف العينة تحت التحليل في الاختبار التخميني تبعا لحجم تلوث عينة المياه و تبعا لمصدرها. ثم يتم التحضين على درجة ٠,٥± ٣٥م° لمدة ١٨- ٢٤ ساعة. تعتبر الانابيب التي تكون بها غاز داخل انانيب درهم موجبة في الاختبار التخميني. يلي ذلك الاختبار التأكيدي حيث يتم نقل ١٠٠ µl من كل انبوبة موجبة تكون بها غاز داخل أنبوبة درهم في الاختبار التخميني إلى أنابيب تحتوي كل منها على ٩ مل من بيئة مرق دليل الأخضر اللامع **(BGB) Brilliant Green Broth** و بها انابيب درهم. يلي ذلك تحضين الانابيب الملقحة على درجة ٠,٥± ٣٥م° لمدة ١٨- ٢٤ ساعة. تسجل نتائج الأنابيب الموجبة التي احتوت على غاز. تحول أعداد الأنابيب الموجبة في كل مجموعة من مجاميع انابيب الاختبار التخميني و تأكدت في الاختبار التأكيدي الى العدد الأكثر احتمالا من بكتريا القولون الكلي لكل ١٠٠مل ماء باستخدام جداول قياسية (جدول ١).

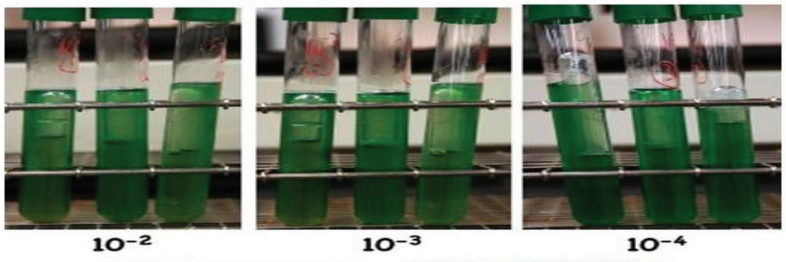
للكشف عن بكتريا القولون البرازي يتم نقل ١٠٠ µl من أنابيب بيئة مرق دليل الأخضر اللامع **(BGB)** الموجبة في الاختبار التأكيدي و التي أحتوت على غاز داخل أنابيب درهم الى انابيب تحتوي على ٩مل من بيئة مرق الايشيرشيا الكولاي **EC broth** و انابيب درهم. يلي ذلك التحضين على درجة ٠,٥± ٤٤م° لمدة ١٨- ٢٤ ساعة. تسجل نتائج الأنابيب الموجبة التي احتوت على غاز. تحول أعداد الأنابيب الموجبة في كل مجموعة من مجاميع انابيب الاختبار التخميني و تأكدت في الاختبار التأكيدي الى العدد الأكثر احتمالا من بكتريا القولون الغائطي لكل ١٠٠مل ماء باستخدام جداول قياسية (جدول ١). للتعرف على تواجد بكتريا ***E. coli*** يتم اختبار أنابيب مرق الايشيرشيا الكولاي **EC broth** الموجبة لانتاج الغاز بواسطة التعرف على القدرة على إنتاج الاندول و عدم القدرة على انتاج أنزيم الاوكسيداز و مظهر المستعمرات المتكونة على بيئة اجار ازرق المثلين و الأيوسين **Eosin Methylene Blue agar (EMP)** (شكل ٢). يوضح الجدول (٢) اهم الفروق الفسيولوجية بين الاجناس البكترية الاربع التابعة لبكتريا القولون الكلي. تحول أعداد أنابيب مرق الايشيرشيا الكولاي **EC broth** الموجبة و التي أعطت الخصائص الفسيولوجية لبكتريا الايشيرشيا كولاي في كل مجموعة الى العدد الأكثر لكل ١٠٠ مل ماء باستخدام جداول قياسية.

شكل (١) يوضح طريقة العدد الاكثر احتمالا **Most Probable Numbers (MPN)** للكشف عن بكتريا القولون الكلي و الغائطي. الاختبار ثلاثي الانابيب في خمسة مجاميع كل مجموعة تمثل تخفيف محدد من العينة.

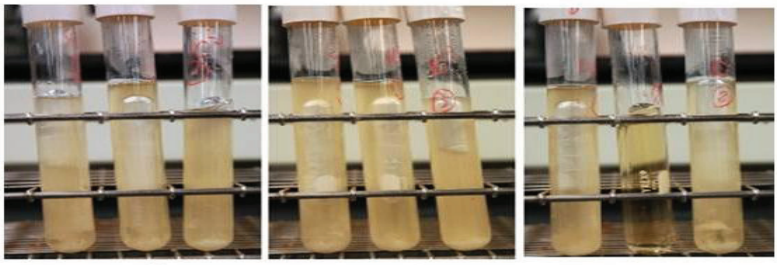
١- الاختبار التخميني لبكتريا القولون الكلي في مرق كبريتات اللوريل **Lauryl Sulphate Broth (LSB)**



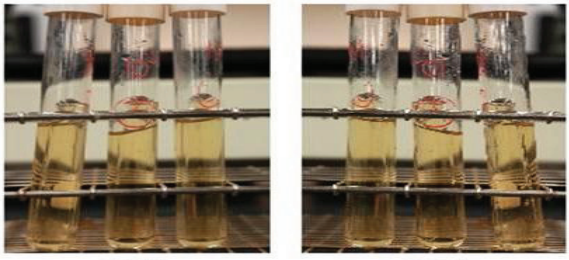
٢- الاختبار التأكيدي لبكتريا القولون الكلي في مرق دليل الأخضر اللامع **Brilliant Green Broth (BGB)**



٣- الاختبار التاكيدي لبكتريا القولون البرازي في مرق EC broth



10^{-2} 10^{-3} 10^{-4}



10^{-5} 10^{-6}

جدول (١) الجداول الاحصائية لحساب معامل العدد الاكثر احتمالا **Most Probable Numbers (MPN)**. حيث يتم حساب العدد بضرب المعامل المحدد من الجدول (تحدده نتائج الانابيب في ثلاثة مجاميع) في مقلوب التخفيف للمجموعة الوسطى.

العدد الاكثر احتمالا MPN للقاح في لانابيب المجموعة الوسطى	أعداد الانابيب الموجبة		
	المجموعة الثالثة	المجموعة الثانية	المجموعة الاولى
٠,٠٣›	٠	٠	٠
٠,٠٣	١	٠	٠
٠,٠٦	٢	٠	٠
٠,٠٩	٣	٠	٠
٠,٠٣	٠	١	٠
٠,٠٦١	١	١	٠
٠,٠٩٢	٢	١	٠
٠,١٢	٣	١	٠
٠,٠٦٢	٠	٢	٠
٠,٠٩٣	١	٢	٠
٠,١٢	٢	٢	٠
٠,١٦	٣	٢	٠
٠,٠٩٤	٠	٣	٠
٠,١٣	١	٣	٠
٠,١٦	٢	٣	٠
٠,١٩	٣	٣	٠
٠,٠٣٦	٠	٠	١
٠,٠٧٢	١	٠	١
٠,١١	٢	٠	١
٠,١٥	٣	٠	١
٠,٠٧٣	٠	١	١
٠,١١	١	١	١
٠,١٥	٢	١	١
٠,١٩	٣	١	١

٠,١١	٠	٢	١
٠,١٥	١	٢	١
٠,٢٠	٢	٢	١
٠,٢٤	٣	٢	١
٠,١٦	٠	٣	١
٠,٢٠	١	٣	١
٠,٢٤	٢	٣	١
٠,٢٩	٣	٣	١
٠,٠٩١	٠	٠	٢
٠,١٤	١	٠	٢
٠,٢٠	٢	٠	٢
٠,٢٦	٣	٠	٢
٠,١٥	٠	١	٢
٠,٢٠	١	١	٢
٠,٢٧	٢	١	٢
٠,٣٤	٣	١	٢
٠,٢١	٠	٢	٢
٠,٢٨	١	٢	٢
٠,٣٥	٢	٢	٢
٠,٤٢	٣	٢	٢
٠,٢٩	٠	٣	٢
٠,٣٦	١	٣	٢
٠,٤٤	٢	٣	٢
٠,٥٣	٣	٣	٢
٠,٢٣	٠	٠	٣
٠,٣٩	١	٠	٣
٠,٦٤	٢	٠	٣
٠,٩٥	٣	٠	٣
٠,٤٣	٠	١	٣
٠,٧٥	١	١	٣
١,٢	٢	١	٣

١,٦	٣	١	٣
٠,٩٣	٠	٢	٣
١,٥	١	٢	٣
٢,١	٢	٢	٣
٢,٩	٣	٢	٣
٢,٤	٠	٣	٣
٤,٦	١	٣	٣
١١	٢	٣	٣
٢٤٠	٣	٣	٣

جدول (٢) أهم الفروق الفسيولوجية بين الاجناس التابعة لبكتريا القولون فيما يعرف MIViC

indole	methyl red	Voges-Proskauer	citrate	probable identification
+ (-)	+	-	-	*Escherichia coli*
- (+)	(+) -	+	+	*Enterobacter* or Klebsiella
- (+)	+	-	+	*Citrobacter*

شكل (٢) مظهر مستعمرات بكتريا ***Esherichia. coli*** ، ***Enterbacter aerogens*** على بيئة **EMB**. للبكتريا الاولى لون اسود و مظهر معدني اخضر لامع و الاخرى تعطي مظهلا يعرف بعين السمكة

coli-type colonies fish-eye colonies

بالنظر الى الشكل (١) لاعطاء مثال عن كيفية حساب العدد الاكثر احتمالا لكل ١٠٠ مل عينة. كل مجاميع الانابيب بمختلف التخفيفات (من ١/١٠٠ حتى١/١٠٠٠٠٠٠) اعطت غاز في الاختبار التخميني و تأكد ايجابيتها في الاختبار التأكيدي. على ذلك يتم الرجوع الى الجداول القياسية (جدول ١) لحساب معامل العدد الاكثر احتمالا على اساس نتائج الانابيب في اخر ثلاثة تخفيفات (١/١٠٠٠٠، ١/١٠٠٠٠٠، ١/١٠٠٠٠٠٠) و التي كانت كلها موجبة اي ٣:٣:٣ و بذلك يكون المعامل = > ٢٤ (جدول ١) و بضرب هذا المعامل في مقلوب التخفيف الاوسط في التخفيفات الثلاث يكون العدد الاكثر احتمالا = > ٢٤ X ١٠٠٠٠٠ = ٢٤ X ١٠^٥/ ١٠٠ مل مياه.

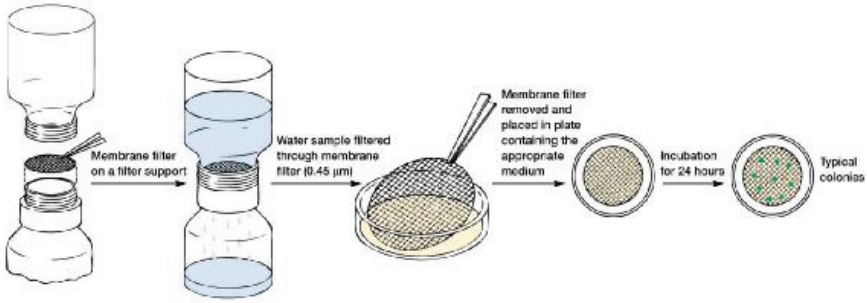
طريقة الترشيح الغشائي Membrane Filtration Method.

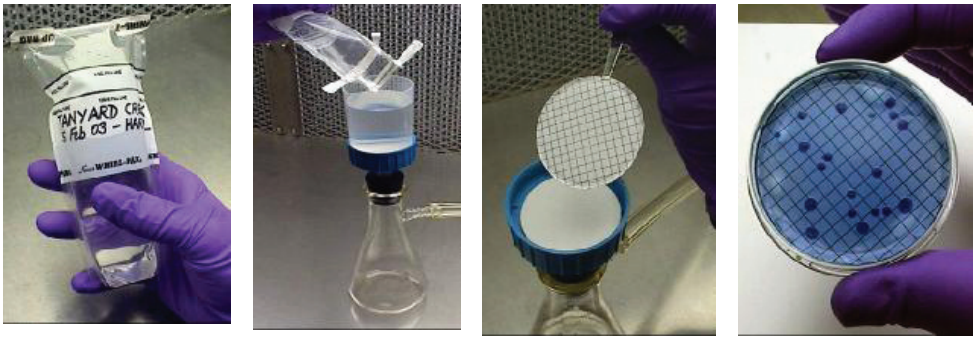
الاساس في هذه الطريقة هو حجز البكتريا المتواجده في عينة المياه على قرص ترشيح مسامي له قدرة على احتجاز البكتريا بما له من حجم ثقوب دقيقة تصل اقطارها الى/او تقل عن ٠,٤٥ ميكرون (µ) ثم تنمية تلك البكتريا المحتجزة على سطح الاقراص بوضعها في اطباق بتري تحتوي على بيئات غذائية صلبة فتنمو البكتريا مكونة مستعمرات مميزة لبكتريا القولون سواء الكلي او الغائطي (شكل ٣).

خلال التجربة يتم ترشيح ١ مل من عينة المياه من خلال قرص ترشيح متخصص ذو ثقوب ذات اقطار ٠,٤٥µ. ثم يتم تحضين قرص الترشيح علي اطباق تحتوي على بيئة اجار الترجيتول ٧ **Tergitol 7 (LTTC)** حيث تظهر المستعمرات الموجبة لتخمر اللاكتوز- القولون الكلي- باللون الأصفر. أيضا استخدمت بيئة مرق ام أي **MI broth** حيث تظهر مستعمرات القولون الكلي بلون الأزرق بينما مستعمرات الايشيرشيا كولاي ***E. coli*** تعطي وميض فلوروسنتي ازرق اللون تحت الأشعة الفوق بنفسجية **UV** عند طول موجة **364 nm** لاحتواء تلك البيئة الغذائية على مادة **MUGA (4-methylumbelliferone-β-D-galactoside)** التي تكشف انتاج الايشيرشيا كولاي لانزيم البيتا جلوكيورونيداز. بكتريا القولون الغائطي تنتج غاز عند نموها على مرق **EC** ***(E. coli)*** عند درجة حرارة ٤٤,٥م ° أو تعطي مستعمرات زرقاء اللون عند نموها على بيئة **m-FC** الاجار عند ٤٤,٥م °

يتم تأكيد وجود ***E. coli*** بأخذ اربعة مستعمرات ثم زراعتها على بيئة اجار التربتوز و الصويا **Tryptose soya agar (TSA)** ثم اجراء الاختبارات التأكيدية الاضافية مثل عدم القدرة على انتاج الاوكسيداز و إنتاج الغاز من اللاكتوز عند ٤٤ م° و إنتاج الاندول من التربتوفان.

شكل (٣) يوضح كيفية اجراء طريقة الترشيح الغشائي **Membrane Filtration Method**.
حيث تم تنمية البكتريا المحتجزة على اقراص الترشيح الغشائي على بيئة مرق ام أي **MI broth** حيث تظهر مستعمرات القولون الكلي بلون الأزرق





تؤثر العديد من العوامل على المقدرة على استعادة و انتشال بكتريا القولون المتواجدة بالعينات. ومن هذه العوامل نوع بيئة النمو و نوع المحلول المستخدم في تخفيف العينة و طبيعة غشاء الترشيح و مقدار التعكير في العينة و معدل تواجد بكتريا أخرى غير بكتريا القولون. هناك أيضا عامل شديد التأثير ألا وهو وجود خلايا متضررة من بكتريا القولون في العينات البيئية. حيث لا تنمو تلك البكتريا بصورة جيدة في بيئات النمو المتخصصة و التي تحتوي على مواد انتخابية مثل أملاح الصفراء إضافة الى التحضين على درجات حرارة عالية (٤٤ م°) أعلى من تلك المتواجدة في الظروف البيئية الطبيعية. لذلك فأن انخفاض

المقدرة على استعادة الخلايا المتضررة في العينات من بيئات متعددة تقلل من الأعداد المقدرة من بكتريا القولون الكلي.

الطرق السريعة لتقدير بكتريا القولون طريقة الكولي لرت ١٨ (Colilert18®):

تعتبر الطرق الإنزيمية بديل جيد و سريع للطرق القياسية لتقدير بكتريا القولون الكلي و بكتريا ***E. coli*** في عينات المياه و العينات البيئية. يعتمد تقدير بكتريا القولون الكلي في اغلب الطرق المستخدمة على تقدير نشاط إنزيم البيتا جلاكتوسيداز **β-galactosidase**. يتم استخدام مادة تفاعل (جواهر) مرتبطة بمادة ملونة تنطلق لتعطي دلالة على انتاج الإنزيم بواسطة تلك البكتريا و من امثلة تلك الجواهر :

ONPG (o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside), CPRG (chlorophenol red-β-D galactopyranoside), X-GAL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) or cyclohexenoesculetin-β-D-galactoside.

كذلك يتم ربط مواد التفاعل بجواهر عند انفصالها تعطي وميض فلوروسنتي يظهر تحت الأشعة الفوق بنفسجية مثل :

MUGA (4-methylumbelliferone-β-D-galactoside) or FDG (fluorescein-di—β-galactopyranoside)

تعتمد الطرق السريعة لتقدير ***E. coli*** على تحلل مادة **MUG** بواسطة انزيم البيتا جلوكيورينيداز –الإنزيم الذي تفرزه تلك البكتريا تحديدا دون بقية افراد بكتريا القولون الكلي. يعطي الناتج النهائي للتحلل وميض فلوروسنتي يمكن تقديره بالتعرض للموجات الطويلة من الأشعة الفوق بنفسجية عند طول موجة **365 nm**. تستخدم هذه الطرق للتعرف على وجود بكتريا ***E. coli*** في عينات المياه و الأغذية و العينات البيئية و المسحات الطبية. تتم هذه الطرق بتحضين العينة في بيئة مرق تربتوز اللوريل المضاف لها تركيز ١٠٠ مجم/لتر من مادة **MUG** ثم ملاحظة تكون الوميض الفلورسنتي بعد التحضين لمدة ٢٤ ساعة عند درجة حرارة تحضين ٣٥م °. حورت تلك الطريقة لتناسب تقنية الترشيح الغشائي حيث اضيفت تلك الجواهر للبيئات الغذائية الصلبة التي يوضع عليها اقراص الترشيح لتنمية البكتريا المحتجزة مما يؤدي ان تعطي المستعمرات النامية و الموجبة لإنتاج إنزيم انزيم البيتا جلوكيورينيداز وميض فلوروسنتي او هالة لها نفس الوميض عند فحصها تحت الأشعة الفوق بنفسجية **(UV lamb)** . من تلك الطرق التجارية طريقة الكولي لرت **Colilert 18®** التي تقوم بانتشال و تنمية كل من بكتريا القولون الكلي و ***E. coli*** خلال ٢٤ ساعة.

شكل (٤) طريقة الكولي لرت ١٨ **Colilert18®** للتعرف على وجود بكتريا القولون الكلي و الغائطي في نفس الطريقة. العبوة عديمة اللون تحتوي على ١٠٠ ماء معقم (العينة المنضبطة) ، العبوة ذات اللون الاصفر يتواجد بها بكتريا القولون الكلي ، العينة التي تعطي وميض ازرق تحت الاشعة الفوق بنفسيجية تدل على تواجد بكتريا ***E. coli***

حيث يتم إضافة العينة (١٠٠ مل) داخل عبوات يحتوي كل منها على جوهر يتكون من أملاح و مواد التفاعل الإنزيمية المتخصصة و التي تعتبر أيضا المصدر الوحيد للكربون للميكروب المراد التعرف عليه. تتكون مواد التفاعل الإنزيمية من مادتي **ONPG** لتقدير بكتريا القولون الكلي و **MUG** المتخصصة للتعرف على ***E. coli***. بعد اضافة العينة و التحضين لمدة ٢٤ ساعة عند درجة حرارة ٣٥ م° تتلون العينات الموجبة لوجود بكتريا القولون الكلي بلون الأصفر بينما تعطي العينات الموجبة لوجود بكتريا ***E. coli*** لون ازرق تحت الأشعة الفوق بنفسجية. أظهرت العديد من الدراسات المسحية عن الجودة في مياه الشرب و منها تلك التي قام بها معمل ميكروبيولوجيا البيئة و الأغذية بقسم علوم الأغذية و تغذية الإنسان أن لتقنية الكولي لارت حساسية مماثلة للطرق القياسية مثل تقنية أنابيب التخمر المتعددة **(Multiple Tube Fermentation)** أو تقنية الترشيح الغشائي **(Membrane –Filtration)**.

هذا و قد أمكن تحويل طريقة الكولي لرت من مجرد طريقة وصفية الى طريقة كمية تماثل في مفهومها طريقة العدد الاكثر احتمالا بأدخال قالب التخفيف المعروف بالكونتيتراي **Quanti-tray®** (شكل ٥). يحتوي القالب (الطبق) على ٤٩ تجويف كبير الحجم و ٤٩ تجويف صغير الحجم. يتم الاختبار باضافة ١٠٠ مل من عينة المياه مع الكمية المحددة من جوهر **Colilert 18®** ، يتم المزج حتى تمام الذوبان. يتم صب العينة المحتوية على جوهر **Colilert 18®** بداخل طبق **Quanti-tray®**. يتم توزيع و تجانس العينة ثم لحام و غلق الطبق باستخدام جهاز توزيع و لحام خاص توفره الشركة المنتجه للكولي لرت. يتم التحضين على درجة ٣٥م° ±٠,٥ لمدة ١٨- ٢٤ ساعة. الفتحات و التجاويف ذات اللون الأصفر تدل على الإيجابية تجاه تواجد مجموعة بكتريا القولون الكلي بينما الفتحات ذات اللون الأصفر و ذات الوميض الفلوروسنتي تحت الأشعة الفوق بنفسجية **UV** عند طول موجة **364 nm** فتدل على تواجد بكتريا

الايشيرشيا كولاي. باستخدام جداول العدد الأكثر احتمالا و المزودة من قبل الشركة المصنعة يمكن تحويل أعداد الفتحات الموجبة إلى العدد الأكثر احتمالا لكل مجموعة ميكروبية /١٠٠ مل من عينة المياه.

شكل (٥) قالب التخفيف **Quanti-tray®** و تظهر به مربعات ذات لون اصفر تدل على تواجد بكتريا القولون الكلي يستخدم عدد المربعات الموجبة الكبيرة و الصغيرة للتعرف على العدد الكثر احتمالا و ذلك من خلال جداول خاصة

البكتريا البرازية الكروية السبحية Fecal Streptococci

تحتوي تلك المجموعة على بكتريا كروية موجبة لصبغة جرام و تشمل على عائلة البكتريا الكروية المعوية **(Enterococci)**،هذه المجموعة تستوطن الجهاز الهضمي للإنسان أو الحيوانات ذوات الدم الحار، لذلك فإنها تستخدم للتعرف على التلوث بالمتبقيات البرازية في المياه. تستطيع افراد هذه المجموعة البقاء لفترت أطول مقارنة بالدلائل البكترية الأخرى إلا أنها لا تتكاثر في البيئة التي تتواجد بها. تشمل أفراد ما تحت النوع التابعة لتلك البكتريا السبحية على مجموعة تعرف بالكرويات المعوية و هي ***E. faecalis, E. faecium , E. durans E. gallinarum and E. avium***. تمتلك تلك الافراد القدرة على النمو عند تركيز مرتفع من ملح الطعام يصل إلى ٦.٥٪ و مدى قلوية يصل الى ٩.٦ **pH** و حرارة عالية تصل إلى ٤٥°م. يقترح استخدام تلك المجموعة كدلائل على تواجد الفيروسات و بالأخص في البيئات البحرية و المواد العضوية الصلبة.

يمكن التعرف علي تواجد البكتريا السبحية البرازية/الكروية المعوية باستخدام البيئات الغذائية المتخصصة بطريقتي العد الأكثر احتمالا أو بالترشيح الغشائي. كما يمكن استخدام الطرق الإنزيمية للتعرف على البكتريا مثل إضافة مواد تفاعل تنتج مواد لها وميض فلوروسنتي **(Fluorogenic)** مثل مادة

MUD (4-methylumbelliferone β-D-glucoside) أو مواد تفاعل تنتج مواد ملونة مثل IDG (indoxyl- β -Dglucoside)

تعتمد هاتان المادتان على التعرف على انتاج انزيمي

pyroglutamyl aminopeptidase and β-D-glucosidase.

من الاختبارات التجارية اختبار الانتيرولارت Enterolert الذي يعطي نتيجة خلال ٢٤ ساعة و يمكن ايضا حساب العدد بطريقة العدد الأكثر احتمالا.

٢- البكتريا اللاهوائية Anaerobic Bacteria

تعتبر بعض الأنواع من البكتريا اللاهوائية من الفلورا البرازية و التي يمكن أن تعتبر من الدلائل الميكروبية للتلوث بالمتبقيات البرازية. و من تلك الامثلة:

١- بكتريا *Clostridium perfringens*

تعتبر بكتريا الكلوستريديم من الميكروبات المرضية الظرفية Opportunistic pathogens إلا أنها أيضا تستطيع إحداث العديد من الأمراض مثل التيتانوس كما في بكتريا *C. tetani* و التسمم البوتشيليني كما في بكتريا *C. botulinum* و التقرح الشديد كما في بكتريا *C. difficile* .

بكتريا *Clostridium perfringens* بكتريا لاهوائية ، موجبة لصبغة جرام ، تنتج جراثيم، تختزل الكبريتيت، و تمثل ٠,٥٪ من اجمالي الفلورا الطبيعية لبكتريا البراز. اعتمدت لوائح الاتحاد الأوربي تلك البكتريا كدليل اختياري و حددت المواصفات مدى قبولها في مياه الشرب عند مستوى صفر/ ١٠٠ مل. إلا أن الجدل مازال دائر حول جدية اتخاذ تلك البكتريا كدليل للتلوث نظرا لان قدرتها على تكوين الجراثيم تجعلها شديدة المقاومة. لذلك يمكن أن تستخدم لتتبع Tracer تواجد الميكروبات المرضية. لذلك ينصح باستخدام *Clostridium perfringens* لدلالة على وجود الفيروسات و وحيدات الخلية المتطفلة في محطات معالجة المياه.

٢- جنس *Bacteroides* spp

هذه البكتريا غير متجرثمة، لاهوائية اجبارا، تتواجد في الأمعاء بأعداد تصل إلى 10^{11} خلية/ جم من الفضلات الغائطية. تمثل ثلث حجم بكتريا البرازية للإنسان. بوجه عام يعتبر استخدام تلك البكتريا اللاهوائية إجبارا Obligate Anaerobic Bacteria كدليل ميكروبي للتلوث من الأمور المرغوبة نظرا لكون تلك البكتريا ترتبط فقط بالحيوانات ذات الدم الحار و لا تبقى لفترات طويلة عند انتقالها للمياه، و مع ذلك فإنها تعتبر أكثر صعوبة في تنميتها في البيئات الغذائية تحت الظروف المعملية مقارنة ببكتريا القولون و البكتريا الكروية المعوية.

٣- جنس *Bifidobacteria* spp

بكتريا البيفيدو هي بكتريا لاهوائية ، غير متجرثمة ، موجبة لصبغة جرام و تتواجد في أمعاء الإنسان و الحيوان. اقترحت منذ أمد بعيد من ضمن الدلائل الغائطية Fecal Indicators. بكتريا البيفيدو هي ثالث أكثر الاجناس شيوعا في أمعاء الإنسان، لذلك فقد استخدمت كأداة للتفرقة بين التلوث الآدمي عن التلوث الحيواني. تستطيع العترات ذات المصدر الآدمي تخمير السكريات مثل السربيتول

و لذلك يمكن عزلها على بيئة اجار السوربيتول. مع ذلك لم يتم استخدام تلك البكتريا كدليل على التلوث الآدمي نظرا لان حساسيتها تجاه الظروف البيئية تعد مشكلة أساسية عند تقديرها.

٤- جراثيم البكتريا الهوائية Aerobic Bacterial Spores

تعتبر البكتريا المتجرثمة الهوائية و بوجه عام الغير المرضية، تتواجد في البيئات البحرية بمعدل أعلى من وحيدات الخلية، لا تنمو في تلك المياه و طرق تقديرها سهلة و غير مكلفة و سريعة نسبيا. جراثيم بكتريا باسيليس sp ***Bacillus*** يمكن أن تعمل كوسيلة جيدة للتعرف على كفاءة إزالة وحيدات الخلية مثل ***Cryptosporidium*** في محطات مياه الشرب و محطات معالجة المخلفات.

يعتبر اختبار التعرف على الجراثيم البكترية من الاختبارات سهلة الاداء و تتم بداية بمعاملة العينة معاملة حرارية تشبه البسترة على ٦٠°م لمدة ٢٠ ق ثم التبريد ثم ترشيح العينة خلال مرشح غشائي ثم تحضين المرشح على بيئة الاجار المحتوية على دليل ازرق البروموثيمول .

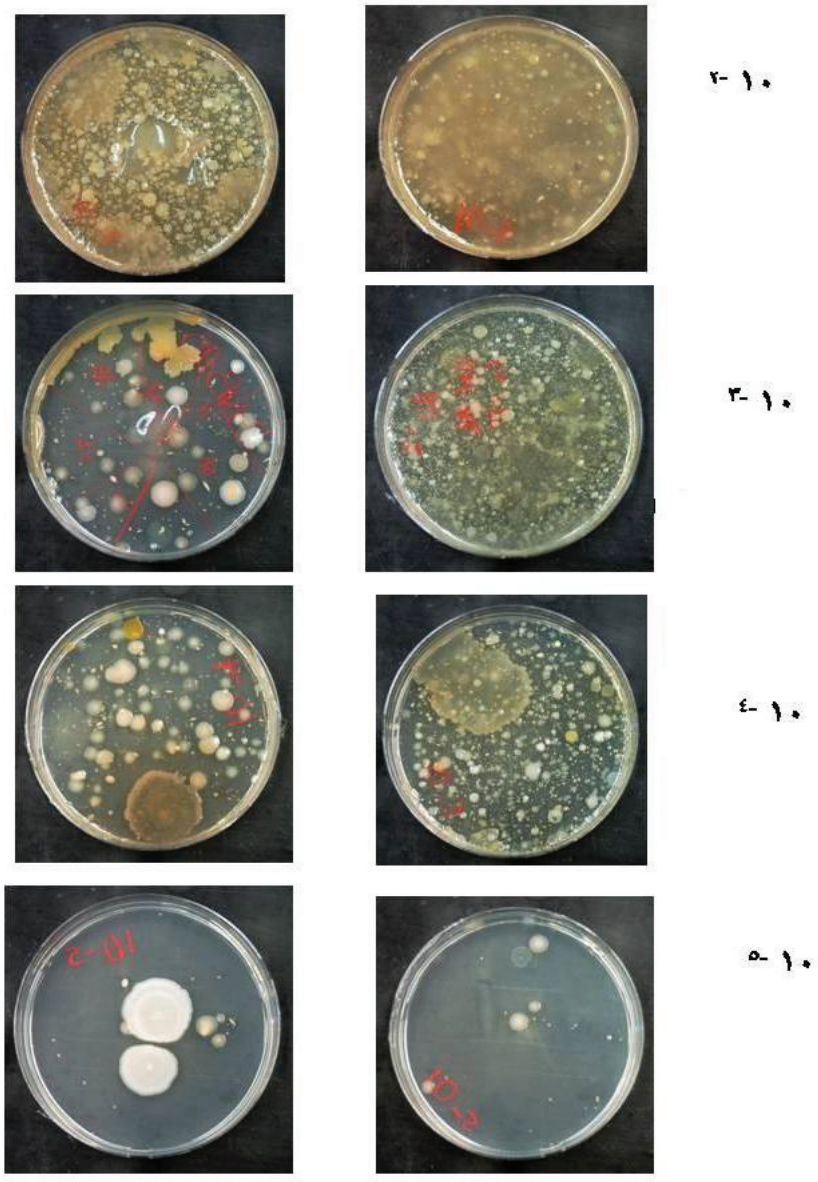
٥- أطباق أعداد البكتريا مختلطة التغذية Heterotrophic Plate Count (HPC)

يشمل العد الميكروبي على تلك الاطباق على عد البكتريا الهوائية و اللاهوائية اختيارا و التي تحصل على الطاقة من خلال هدم المركبات العضوية (شكل ٦). تشمل تلك المجموعة على بكتريا سالبة لجرام و منها ***Pseudomonas, Aeromonas, Klebsiella, Flavobacterium, Enterobacter, Citrobacter, Serratia,Acinetobacter, Proteus, Alcaligenes, Enterobacter, Moraxella*** . بعضا من اجناس تلك البكتريا ممرضة ، إلا انه لا تتوافر معلومات حول تأثير الأعداد الكبيرة لتلك البكتريا على صحة الإنسان. مستويات تلك البكتريا في مياه الشرب يجب ألا تزيد عن ٥٠٠ خلية/مل. ارتفاع أعداد تلك البكتريا عن هذا المعدل يعتبر مؤشر يدل على ضعف جودة المياه في شبكة توزيع المياه.

تعتبر أعداد تلك الأطباق ذات فائدة لمشغلي محطات معالجة المياه و ذلك لعدة أسباب هي:

١- التعرف على كفاءة خطوات معالجة المياه بما فيها خطوة التطهير
٢- متابعة الجودة الميكروبية للمياه المنتجة خلال مراحل التخزين و التوزيع
٣- التعرف على مقدرة الميكروبات في العودة للنمو في المياه المنتجة داخل شبكة التوزيع

شكل (٦) اطباق العد للبكتريا مختلطة التغذية **Heterotrophic Plate Count (HPC)** يظهر عليها تنوع الاجناس المتواجدة في عينة مياه قبل المعالجة.



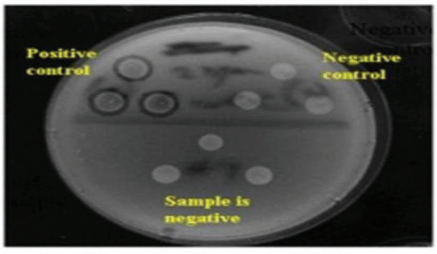
٦- ملتقمات البكتريا Bacteriophages

الفيروسات التي تنمو عل البكتريا أو ما يعرف بملتقمات البكتريا لها تركيب أساسي مشابه للفيروسات الحيوانية. تستطيع تلك الفيروسات إحداث العدوى و اصابة مدى واسع من البكتريا. تحفز تلك الفيروسات دورة تحلل داخل الخلايا البكترية الأمر الذي يؤدي لتكاثر الفيروس و بالتالي تحطيم خلايا العائل.

تقدير الفيروسات البكترية في العينات البيئية يبدأ بتركيز العينة ثم إزالة التلوث بالعينة و يعني ذلك إزالة البكتريا ، و التي تحتجز على المرشحات الغشائية ذات اقطار ثقوب ٠.٤٥ µl اما الفيروسات فتمر و من ثم تقدير الفيروس باستخدام طريقة الطبقة الأحادية أو طريقة الطبقة المزدوجة. حيث يتم استخدام عوائل عديدة من البكتريا لتنمية الفيروسات بالعينة. تتباين تلك العوائل في قدرتها على إعالة تلك الملتقمات. يمكن اختبار وجود ملتقمات بكتريا الايشرشيا كولاي **Coliphage** بأستخدام بكتريا ***E. coli*** **C**. بينما الكشف عن ملتقمات متخصصة الذكورة **male-specific phage** يتم باستخدام بكتريا ***Salmonella typhimurum*** **WG49** و ***E. coli*** **HS** . إلا أن الأمر يصبح أكثر تعقيدا عند تنمية الملتقمات الجسدية **Somatic phages**. هناك طريقتين معتمدتين للتعرف على تواجد ملتقمات الايشيرشيا كولاي **Coliphage** في العينات البحرية. في الطريقة الأولى يتم التحضين طوال الليل للعينة للمساعدة في انتشال الفيروس يتبع ذلك إضافة العينة المحضنة فوق أجار مزروع به بكتريا العائل المناسبة. في الطريقة الاخرى يتم اضافة كلوريد المغنسيوم و بكتريا العائل و اجار سائل ثنائي القوة الى ١٠٠ مل من عينة الماء. يصب الخليط في اطباق بتري حيث تعد اشكال الصفائح **plaques** المتكونة من البكتريا بعد التحضين طوال الليل (شكل ٧).

هناك ثلاثة مجاميع من ملتقمات البكتريا اتخذت كدلائل و هي **somatic coliphage,** و **male-specific RNA coliphage phage** و **phage** المعدي ***Bacteroides fragilis***.

شكل (٧) يظهر النتائج الموجبة للتعرف على ملتقمات بكتريا **coliphage** ، و التي تظهر كمنطقة رائقة حول المناطق الملقحة ببكتريا ***E. coli***



Positive results for coliphage appear as a clear halo around the spot in the surrounding E. coli lawn.

الخلاصة:

قدمت هذه النشرة الطرق المستخدمة للتعرف على سلامة و جودة مياه الشرب و العينات البيئية المختلفة من خلال مجموعة من الدلائل الميكروبية سواء التقليدية أو الأكثر حداثة و ذلك للتعرف على معدل التلوث بالممرضات. إلا أنه لازال هناك جدل قائم حولتحديد أي من تلك الكائنات الدقيقة يمكن الاعتماد عليه كدليل ميكروبي و ذلك نظرا لوجود علاقة ارتباط ضعيفة أحيانا بين بعض تلك الدلائل و الممرضات أو المتطفلات من وحيدات الخلية و التي من المفترض أن تقوم تلك الدلائل بتمثيل تواجدها. لا يوجد على الأغلب دليل ميكروبي مثالي يمكنه بمفرده أن يقدم كل المواصفات المطلوبة ويعمل لتمثيل تواجد كل الممرضات سواء البكترية و الفيروسية او وحيدات الخلية و ان ينجح مهما كانت نوعية العينة و الظروف البيئية التابعة لها. لذلك فان الطرق السريعة المباشرة قد تستخدم للتعرف على وجود الممرضات الى جانب تقدير الدلائل الميكروبية.

Qassim University

جامعة القصيم