الفصل التاسع

التحليل البكتريولوجي لمياه الشرب باستخدام طريقة الأنابيب المتعددة

الفصل التاسع

التحليل البكتريولوجي لمياه الشرب باستخدام طريقة الأنابيب المتعددة

أهداف التدريب (التعلم):

بانتهاء التدريب على أعمال هذا الفصل ينبغى أن يكون المتدرب قادراً على أن:

- يذكر طريقتين لتحديد عدد البكتريا القولونية.
- يشرح طريقة تعيين العد الكلى للبكتريا الحية فى المياه بواسطة اختبار عد الأطباق القياسى.
- يذكر طرق الكشف عن المجموعة القولونية وبكتريا القولون البرازى.
- يشرح الغرض من طريقة تخمر الأنابيب المتعددة والمراحل التى يمر بها الاختبار.
- يشرح كيفية تطبيق طريقة الأنابيب المتعددة على المياه الملوثة وعلى المياه غير الملوثة.
- يصف الطريقة المباشرة لفحص القولونيات الغائطية.
- يشرح طريقة العد الاحتمالى لفحص البكتريا السبحية المعوية وفحص بكتريا سودوموناس إيروجنزا.

مقدمـة

يسبب وجود بعض أنواع البكتريا أمراضاً عديدة للإنسان، وتسمى البكتريا المرضية (Pathogenic Bacteria)، كذلك فإن وجود بعض الكائنات الأخرى مثل الفيروسات، والديدان، والطفيليات فى المياه يؤدي إلى ظهور بعض الأمراض.

ويعتبر اختبار الكشف عن القولونيات الكلية هاماً لتحديد الكائنات التى تسبب أمراضاً وفيه يتم الكشف عن بكتريا القولون البرازية او الغائطية (Escherichia Coli) (E. Coli)، التى توجد، فى البراز الذي يحتوى على نسبة عالية من كل أنواع البكتريا، ويشير وجود هذه البكتريا فى المياه إلى حدوث تلوث من الصرف الصحي، والبقايا الآدمية، والحيوانية، ووجود الأنواع الأخرى من البكتريا، وغياب (E.Coli) عزى إلى حدوث تلوث من التربة والمزروعات، ويجب ألا يحتوى ١٠٠ ملليلتر من المياه على أكثر من أثنين من الخلايا البكتيرية على ألا يتكرر ذلك فى عينتان متتاليتان من نفس المصدر مع مراعاة أن تكون ٩٥ % من العينات التى يتم فحصها خلال العام خالية تماماً من بكتريا القولون.

طرق التحاليل البكتريولوجية

يعتـبر وجود البكتريا القولونية فى المـياه وخصوصاً تلك المقاومة للحرارة مؤشراً لتعرض المياه لنشاط الكائنات ذات الدم الحار ومنها الإنسان.

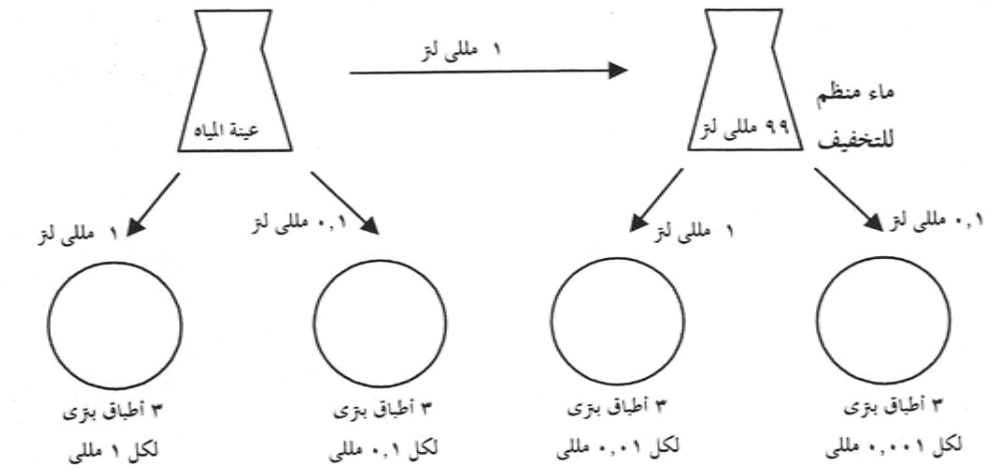
وحيث أن الأمراض التى تنتقل بالماء تحدث نتيجة لوجود مواد غائطية، لذا يمكن تقدير الخطورة على الصحة من خلال تقدير نسبة وجود هذه البكتريا. ويدل وجود البكتريا الغائطية (E. Coli) على وجود تلوث غائطى حديث.

ويعتمد اختبار الكشف عن البكتريا القولونية الغائطية على أثرها فى تخمر اللاكتوز لينتج حامض وغاز عند درجة حرارة ٣٦ و ٤٤°م فى أقل من ٢٤ ساعة. وأيضاً ينتج الأندول فى ماء الببتون. ويتم تحديد عدد البكتريا القولونية بطريقتين قياسيتين:

١- اختبار الأنابيب المتعددة والتى تعطى دلالة على العدد الإحتمالى للبكتريا الموجودة (MPN).
٢- اختبار الترشيح الغشائى (MF) التى تعطى عدداً مباشراً للبكتريا.

كما حددت وكالة حماية البيئة الأمريكية (EPA) العدد الكلى للبكتريا المسموح به (عد الأطباق) فى عينات المياه بما لا يزيد عن ٥٠٠ مستعمرة بكتيرية/ مللى لتر من العينة حيث أن العدد المثالى فى الطبق يتراوح ما بين ٣٠-٣٠٠ مستعمرة.

ويمكن اختيار كميات العينات وتخفيفاتها لتصل إلى هذا المدى وخصوصاً عينات مياه المجارى والمياه العكرة والمياه الملوثة الأخرى. ويوضح الشكل رقم (٩-١) طريقة تخفيف العينات للفحص البكتريولوجى



شكل رقم (٩-١)
طريقة تخفيف العينات للفحص البكتريولوجى

ويعتبر العدد الكلى للبكتريا الحية فى درجة ٣٧°م أكثر دلالة على تلوث المياه منه عند ٢٠°م، إذ تجرى التجربة عند درجة حرارة مماثلة لدرجة حرارة جسم الإنسان فيزداد نمو وتكاثر البكتريا التى تعيش فى جسم الإنسان أو الحيوان مما يكون أكثر دلالة على تلوثها بفضلات الإنسان أو الحيوان.

ولا يفضل التخفيف بالمياه المعقمة لأننا فى هذه الحالة نزيل المواد المغذية (Nutrient). كما أنه لا يفضل أن يمضى أكثر من ٢٠ دقيقة بعد عمليات التخفيف لزرع البكتريا حتى لا تعطى نتائج خاطئة.

أولاً: اختبار عد الأطباق القياسى

(Standard Plate Count Test) هى طريقة لتعيين العدد الكلى للبكتريا الحية فى المياه فى درجة ٢٠° م، ٣٧° م. ونتائج هذه التجربة قد تختلف عن العدد الحقيقى للبكتريا فى المياه لعدة أسباب منها أن البكتريا قد توجد فى مستعمرات (تجمعات) والرج الشديد للعينة قد لا يفكك هذه التجمعات البكتيرية (Bacterial Cluster) مما يتعذر معه التفرقة بين حدوث النمو من كائن واحد حى أو من مجموعات. كما أن البيئة الواحدة ودرجة حرارة الحضانة المستخدمة قد لا تكون كافية لمتطلبات نمو كل البكتريا.

وتتمثل الطريقة فيما يلى:

- أخذ ١ مللى لتر كحد أقصى للعينة باستخدام ماصة (معقمة فى فرن فى درجة حرارة ١٦٠ – ١٨٠°م لمدة ساعة) وتوضع فى طبق بترى سعة ١٠٠مم^{٣} بعد إسالة بيئة مستنبت خميرة الآجار، وتصب فيها وتمزج العينة مع بيئة الآجار بحركة دائرية للطبق وتترك لتتجمد.
- توضع العينة فى حضانة عند درجة حرارة ٣٥–٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة.
- يتم عد المستعمرات البكتيرية فى الطبق بعد ذلك وتكون النتيجة: عدد المستعمرات البكتيرية/ ١ مللى لتر من العينة، أو (العدد الكلى للبكتريا/ ١ مللى لتر عند ٣٥°م).
- تتم نفس الخطوات السابقة وتحضن العينة عند درجة حرارة ٢٠°م لمدة ٤٨ ساعة وتكون النتيجة: العدد الكلى للبكتريا/١ مللى لتر (عند درجة ٢٠°م).

ثانياً: طرق الكشف عن المجموعة القولونية وبكتريا القولون البرازى

هناك طريقتان للفحص البكتريولوجى للمياه:

١. طريقة تخمر الأنابيب المتعددة (Multiple Tube Fermentation Method).
٢. طريقة الترشيح الغشائى (Membrane Filter Method).

١. التحليل البكتريولوجي باستخدام طريقة تخمر الأنابيب المتعددة (Multiple Tube Fermentation Method):

الغرض من الطريقة:

تستخدم هذه الطريقة لتعيين وجود وعد بكتيريا المجموعة القولونية (مخمرات سكر اللبن) عن طريق زرع سلسلة أجزاء مقاسة الحجم من العينة داخل أنابيب محتوية على أوساط زرع ملائمة.

إعتبارات خاصة بطريقة تخمر الأنابيب المتعددة:

- يجرى الاختبار من خلال ثلاث مراحل محددة:
  ١- الاختبار الأولى.
  ٢- الاختبار التأكيدى.
  ٣- الاختبار المكمل.

ومن الممكن إيقاف فحص عينة المياه عند نهاية أى من هذه المراحل إذا ما تحقق الهدف من الاختبار أو استكمال الفحص مباشرة من مرحلة إلى المرحلة التالية.

- والاختبار المكمل (Complete Test) هو الاختبار القياسى لتعيين مدى مطابقة المياه للمعايير القياسية وصلاحيتها للشرب من الوجهة البكتريولوجية. وتحت هذه المقاييس يمكن أن ينتهى الفحص بعد الاختبار

التأكيدى، ولكن بعد أن يثبت أن الاختبار التأكيدى قد أعطى نتائج مكافئة للاختبار المكمل بسلسلة من الاختبارات المتوازنة.

- فى المعمل الروتينى توقف الاختبارات البكتريولوجية لمعظم مصادر المياه العامة عند نهاية الاختبارات التأكيدية. والاختبار التأكيدى له أهمية كبيرة فى فحص عينات من مصادر إمداد المياه ومن الأجزاء المختلفة فى محطة معالجة المياه.

- طريقة الأنابيب المتعددة مبنية على قوانين الإحتمالية وتستخدم للحصول على تقدير العدد البكتيرى فى العينة معبراً عنه بالعدد الاحتمالى (MPN)، وبعد إتمام الخطوات المعملية تسجل كل النتائج الإيجابية والسلبية ثم يتم الربط بين هذه النتائج وأحجام العينة التى تم زرعها. وفى النهاية يتم تعيين العدد الاحتمالى بالرجوع إلى جدول الأعداد الاحتمالية أو باستخدام القانون الآتى:

$$\text{العدد الاحتمالى} = \frac{\text{عدد العينات التى أعطت نتائج إيجابية} \times ١٠٠}{\sqrt{\text{عدد الملليلترات من العينات التى أعطت نتائج سلبية} \times \text{عدد الملليلترات من العينات فى كل الأنابيب}}}$$

وهناك عدة طرق مختلفة لزرع العينة منها:

- الزرع المبدئى لخمسة أجزاء كل منها ٢٠ مللى لتر ويستخدم فى اختبار نوعية مياه الشرب.
- الزرع بطريقة السلسلة العشرية وهى: زرع خمسة أجزاء كل منها ١٠ مللى لتر، خمسة أجزاء ١ مللى لتر، خمسة أجزاء ٠.١ مللى لتر. وتطبق فى اختبار المياه الخام أو عندما يكون معلوماً أن بكتيريا المجموعة القولونية موجودة، ويكون الغرض من هذا الاختبار فى هذه الحالة هو تعيين العدد.

وطبقاً لكثافة بكتيريا المجموعة القولونية المتوقعة، يمكن توضيح السلسلة العشرية (خمس أنابيب لكل منها) لكل ١٠٠ مللى لتر كما فى الجدول رقم (٩-١).

جدول رقم (٩-١)
كثافة المجموعة القولونية المتوقعة

كثافة المجموعة القولونية المتوقعة لكل ١٠٠ مل	السلسلة العشرية (خمس أنابيب لكل منها)
٢ – ٥٤٢	١٠، ١، ٠.١ ٠.١ مللى لتر
٢٠ – ٥٤٢٠	١، ١ ٠،.١ ٠.٠١ مللى لتر
٢٠٠ – ٥٤٢٠٠	٠.١ ٠،.٠١ ٠،.٠٠١ ٠.٠٠١ مللى لتر
٢٠٠٠ – ٥٤٢٠٠٠	٠.٠١ ٠،.٠٠١ ٠،.٠٠٠١ ٠.٠٠٠١ مللى لتر

المبدأ الأساسى:

فى طريقة الأنابيب المتعددة، تلقح سلسلة من الأنابيب المحتوية على مستنبت مرقى مناسب بمقادير اختبارية من عينة الماء. وبعد مدة حضانة معينة فى درجة حرارة محددة، يعتبر كل أنبوب يتكون به غاز (إيجابياً ظنياً) (Presumptive positive) لأن هذا يدل على احتمال وجود قولونيات. ولكن بما أن الغاز قد ينتج بواسطة جراثيم أخرى، يستلزم تأكيد ذلك بإجراء اختبار لاحق. ويعرف الاختباران بالاختبار الظنى والاختبار المؤكد على التوالي.

ففى حالة الاختبار المؤكد، يلقح مستنبت أكثر انتقائية بجزء مأخوذ من الأنابيب الإيجابية. وبعد فترة مناسبة تفحص الأنابيب لمعرفة ما إذا كان قد تكون غاز. وعندها يمكن تقدير درجة تركز الجراثيم فى العينة من عدد الأنابيب الملقحة وعدد الأنابيب الإيجابية فى الاختبار المؤكد. ويمكن تقدير العدد الأكثر احتمالاً ((Most Probable Number (MPN) للجراثيم الموجودة

باستخدام جداول إحصائية مبتكرة خصيصاً لهذا الغرض. وتعرف هذه الطريقة بطريقة العدد الأكثر احتمالاً (MPN).

التلقيح يمكن استخدام مقادير اختبارية مختلفة لتحضير سلسلة من التخفيفات العشرية وتتوقف التخفيفات على إعداد جراثيم القولونيات المتوقعة فى عينة الماء التى يجرى فحصها. وتعتمد مصداقية النتيجة (Reliability) التى يتم الحصول عليها على عدد الأنابيب الملقحة بكل مقدار اختباري. وفى حالات معينة يمكن خفض هذا العدد إلى ثلاثة أنابيب فى كل خطوة من خطوات التخفيف. ولكل مجموعة من الأنابيب الملقحة جدولها الخاص من قيم الأعداد الأكثر احتمالاً (MPN).

المياه غير الملوثة يمكن بصورة عامة افتراض وجود تلوث قليل أو عدم وجود تلوث، فى المياه التى تدخل الشبكة أو المياه الموجودة فيها. وفى هذه الحالة يحتاج الأمر إلى تلقيح خمسة أحجام من ماء العينة، كل منها ١٠ ملليلتر، فى خمسة أنابيب يحتوى كل منها على ١٠ ملليلتر من مستنبت مزدوج القوة (Double-strength).

المياه الملوثة المياه التى يشتبه بأنها أكثر تلوثاً، مثل المياه غير المعالجة التى تجلب من مصادر معينة للماء الخام، تحتاج للفحص باستخدام أحجام تلقيح مختلفة فى تخفيفات عشرية. وفيما يلي التلقيحات التى تجرى فى العادة:

١. ١٠ ملليلتر من العينة فى كل من خمسة أنابيب يحتوى كل منها على ١٠ ملليلتر من مستنبت مزدوج القوة.
٢. ١.٠ ملليلتر من العينة فى كل من خمسة أنابيب يحتوى كل منها على ١٠ ملليلتر من مستنبت مفرد القوة.
٣. ١.٠ ملليلتر من تخفيف ١ : ١٠ من العينة (أى ٠.١ ملليلتر من العينة) فى كل من خمسة أنابيب يحتوى كل منها على ١٠ ملليلتر من مستنبت مفرد القوة.

وإذا كان من المتوقع أن تكون العينة مفرطة التلوث، تلقح مقادير متساوية حجمها ١.٠ ملليلتر من تخفيفات عشرية متسلسلة من كل خطوة تخفيف فى خمسة أنابيب على ١٠ ملليلتر من مستنبت مفرد القوة.
وإذا كان عبء العمل ثقيلاً جداً والوقت المتاح محدوداً، يمكن خفض عدد الأنابيب على ثلاثة فى كل سلسلة. ولكن تلقيح خمسة أنابيب بكل حجم من العينة يعطى نتيجة بالعدد الأكثر احتمالاً (MPN) يوثق بها إحصائياً أكثر من النتيجة التى يحصل عليها بتلقيح ثلاث أنابيب فحسب.

البيئات وماء التخفيف

الأوساط (Media) المجففة المتاحة فى الأسواق تبسط عملية تحضير مرق الزرع، ولذلك يوصى باستعمالها فى المختبر، وينتج هذه الأوساط صانعون مختلفون كمساحيق يمكن وزنها بسهولة وإذابتها فى ماء مقطر ووضعها فى أطبق وأنابيب الزرع تمهيداً لتعقيمها.
وهناك مستنبتات مختلفة متعددة متاحة للاختبار الظني، مثل:

- مرق لوريل تربتوز (LTB).
- مرق ماك كونكي (MacConkey).
- مرق لاكتوز (Lactose).

واستعمال هذه الأوساط الثلاثة شائع فى بلدان عديدة. وتعتمد انتقائية مرق ماك كونكي ومرق لوريل تربتوز على التوالي على وجود أملاح الصفراء (Bile salts) والعامل السطحي النشاط (Surface-active)، كبريتات اللوريل، أما مرق لاكتوز فهو وسط غير انتقائي.

ويستعمل مرق لاكتوز الصفراء الأخضر اللامع (BGB) أو مرق الماكونكي على نطاق واسع كوسط تأكيدي (Confirmatory medium) لفحص إجمالي القولونيات. ولتأكيد وجود القولونيات الغائطية يستخدم إما مرق (BGB) أو مرق القولونية البرازية (FC).

تحضير الأوساط (البيئات):

يجب أن تحضر الأوساط بموجب تعليمات الصانع، على الوجه التالي:

أ- أذب الكمية المعينة من الوسط المجفف فى ماء مقطر للحصول على وسط ظنى مزدوج أو مفرد القوة (فى حالة التحليل التأكيدي يستعمل الوسط المفرد القوة فحسب).

ب- وزع الحجم المطلوب فى أنابيب زرع تحتوى على أنبوب (Durham) مقلوب، وغط أنابيب الزرع.

ج- عقم الأنابيب فى جهاز التعقيم أو آنية طهى بالضغط (Pressure Cooker) فى درجة حرارة ١١٤°م لمدة ١٠ دقائق (أو حسب توصيات الصانع). ومن المهم بصفة خاصة عدم وضع الأوساط التى تحتوى على مواد ثنائية السكريات (Disaccharides)، مثل اللاكتوز، فى جهاز التعقيم، وفى درجة حرارة أكثر ارتفاعاً.

د- يجب أن يخزن الوسط المعقم فى درجة حرارة الغرفة (٢٥° م تقريباً)، للإبقاء على تعقيمة. وبالإضافة إلى ذلك يجب وقاية المحلول من التعرض للضوء لأن هناك صبغات متعددة حساسة للضوء.

ماء التخفيف

يستعمل محلول منظم (Buffer) معقم خصيصاً لتحضير تخفيفات من عينات للتلقيح فى المستنبتات. ويحضر الماء من محلول أصلي (Stock) مركز من محلول منظم فوسفاتي (Phosphate Buffer) و محلول كلوريد ماغنسيوم.

تحضير محلول منظم فوسفاتى (محلول ١):

لتحضير المحلول الأصلي، يذاب ٣٤.٠ جراماً من فوسفات ثنائي هيدروجين البوتاسيوم (KH_2PO_4) فى ٥٠٠ مل من الماء المقطر. ويجب أن يكون الرقم الهيدروجيني (pH) للمحلول ٧.٢ (ينبغي التحقق من ذلك بواسطة قياس الرقم الهيدروجيني). ويمكن زيادة الرقم الهيدروجيني إذا لزم ذلك بإضافة قطرات

من محلول هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) تركيزه مول واحد باللتر (٤٠.٠ جرام مذاب فى ١٠٠ ملليلتر من الماء المقطر). ثم يضاف قدراً كافياً من الماء المقطر حتى يصبح الحجم لتراً واحداً. وعند عدم استعمال المحلول المختزن ينبغى حفظه فى زجاجة محكمة الإغلاق فى درجة حرارة ٤-١٠°م، وذلك لتأخير النمو الجرثومي.

تحضير محلول كلوريد الماغنسيوم (٢):

يوزن ٨١.١ جم كلوريد الماغنسيوم ($MgCl_2.6H_2O$) وتضاف إلى ١ لتر من ماء مقطر.

تحضير ماء التخفيف:

يحضر محلول التخفيف المستعمل وقت إجراء التجربة على النحو التالي:

- ١.٢٥ ملل من المحلول رقم (١).
- ٥ ملل من المحلول رقم (٢).
- ١٠٠٠ ملل ماء مقطر.

ثم يصب فى أنابيب بحجم ٩ ملليلتر أو ٩٩ ملليلتر فى كل أنبوبة وتعقم فى جهاز التعقيم لمدة ١٥ دقيقة.

التطبيق على المياه غير الملوثة:

<u>الطريقة:</u>

نوضح فيما يلى الطريقة التى تستعمل لفحص مياه غير ملوثة نسبياً، كالمياه المعالجة فى شبكات المياه.

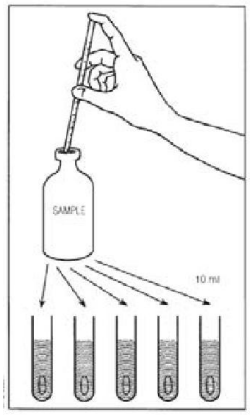
أ. أنزع الورق الملفوف على زجاجة العينة.

ب. رج الزجاجة بقوة بينما السدادة فى موضعها وذلك حتى تتوزع الجراثيم توزيعاً متساويا، وإذا كانت الزجاجة ممتلئة فإنزع السدادة وأفرغ منها ٢٠-٣٠ ملليلتر، وبعد ذلك ضع السدادة ورج الزجاجة حتى تمام المزج.

(ب)

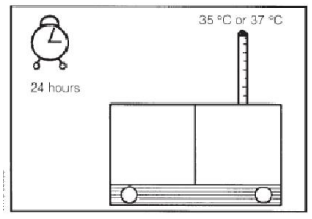
(أ)

ج. باستعمال ماصة معقمة سعة ١٠ ملليلتر، ضع ١٠ ملليلتر من العينة فى كل أنبوبة من خمسة أنابيب تحتوى على ١٠ ملليلتر من مرق الفحص الظني (مزدوج القوة). ومن المستحسن رج الأنابيب بهدوء حتى تتوزع العينة بالتساوي فى المستنبت كله.



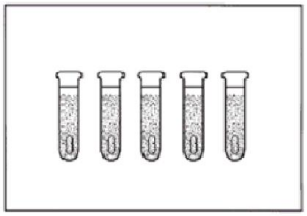
(ج)

د. أحضن الأنابيب فى الحاضنة فى درجة حرارة ٣٥°م أو ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة.



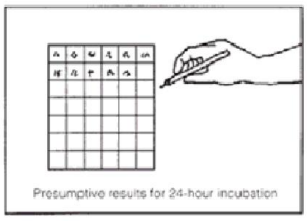
(د)

هـ. عند انتهاء ٢٤ ساعة من الحضانة، أفحص كل أنبوب بحثاً عن الغاز. فإذا كان هناك غاز فسوف يمكن رؤيته فى أنبوبة (Durham)، أما إذا لم يوجد غاز فترج الأنبوبة بهدوء، فإذا شوهد فوران من الفقاعات الصغيرة، تعتبر الأنبوبة إيجابية.



(هـ)

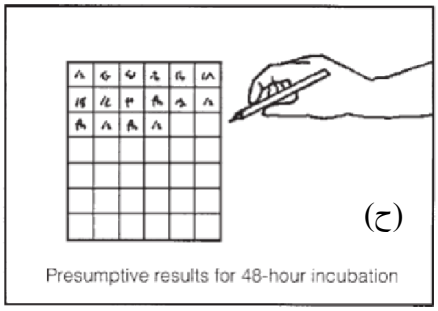
و. سجل عدد الأنابيب الإيجابية بعد ٢٤ ساعة فى جدول.



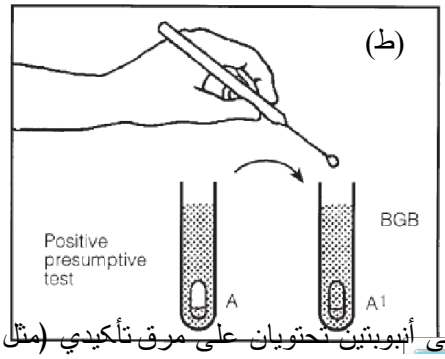
(و)

ز. أعد حضانة الأنابيب السلبية لمدة ٢٤ ساعة أخرى وبعد انتهاء هذه المدة أفحص الأنابيب من جديد بحثاً عن الغاز كما فى الخطوة هـ ويعتبر الغاز المنتج فى نهاية ٢٤ ساعة أو ٤٨ ساعة من الحضانة تأكيد عن وجود قولونيات فى العينة.

ح. سجل عدد الأنابيب الإيجابية بعد ٤٨ ساعة على الجدول.

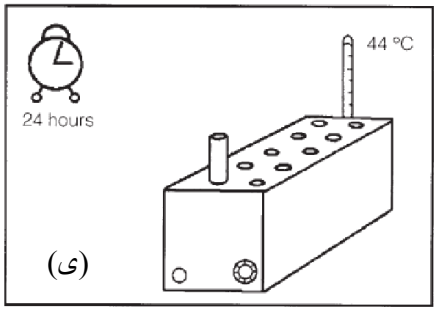


ط. يجرى الفحص التأكيدي فى نهاية كل من الحضانة لمدة ٢٤ ساعة ولمدة ٤٨ ساعة على السواء. وباستعمال عروة أنقل نقطة أو نقطتين من كل أنبوبة ذات نتيجة إيجابية ظنية إلى أنبوبة مقابلة معقمة تأكيدية حجمها ١٠ ملليلتر وتحتوى مثلاً على مرق لاكتوز الصفراء الأخضر المتألق BGB. وقبل كل عملية نقل تعقم العروة على لهب ثم تترك لتبرد.



ى. إذا أريد أيضاً تحرى وجود القولونيات الغائطية تزرع مزارع ثانوية فى أنبوبتين تحتويان على مرق تأكيدي (مثل مرق لاكتوز الصفراء الأخضر المتألق BGB)، وتحضران من كل من الأنابيب الإيجابية الظنية.

ك. لتأكيد وجود القولونيات أحضن فى الحاضنة أنبوبة مزرعة ثانوية من كل أنبوبة إيجابية ظنية لمدة ٤٨ ساعة فى درجة حرارة ٣٥°م أو ٣٧°م.



ل. أفحص الأنابيب فى نهاية ٤٨ ساعة من الحضانة فإذا وجد غاز فإن ذلك يؤكد وجود القولونيات فى العينة. سجل النتائج فى الجدول.

م. لتأكيد وجود القولونيات الغائطية أحضن فى الحاضنة أنبوبة مزرعة ثانوية أخرى من كل أنبوبة إيجابية ظنية لمدة ٢٤ ساعة فى درجة حرارة ٤٤–٤٥°م.

ن. إذا تكون غاز فى الأنابيب بعد حضانة لمدة ٢٤ ساعة، فإن ذلك يؤكد وجود قولونيات غائطية.

تعيين العدد الأكثر احتمالاً:

فى حالة الماء المعالج، حيث تلقح ٥ أجزاء من العينة حجم كل منها ١٠ ملليلتر، يمكن معرفة العدد الأكثر احتمالاً (MPN) من نتائج الاختبار بواسطة الجدول رقم (٩-٢).

جدول (٩-٢)

الأعداد الأكثر احتمالاً (MPN) لتوافيق مختلفة من نتائج إيجابية وسلبية عند استعمال ٥ أجزاء من العينة كل منها ١٠ ملليلتر

عدد الأنابيب ذات التفاعل الإيجابي من ٥ أنابيب سعة كل منها ١٠ ملليلتر	العدد الأكثر احتمالاً (MPN)
صفر	صفر
١	٢
٢	٥
٣	٩
٤	١٦
٥	أكثر من ٢٣

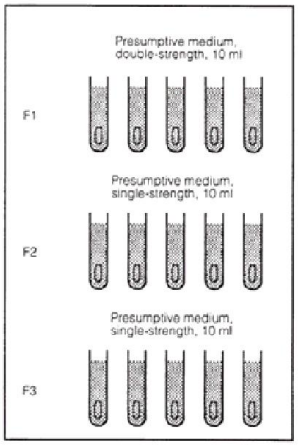
فإذا كانت هناك ثلاثة أنابيب إيجابية مؤكدة بالنسبة لمجموعة إجمالي القولونيات. فمن الجدول يمكن أن نرى أن القيمة المقابلة للعدد الأكثر احتمالاً (MPN) هى ٩ إجمالي القولونيات فى كل ١٠٠ ملليلتر من العينة. وفيما يختص بالقولونيات الغائطية، لم يكن هناك سوى أنبوبة إيجابية واحدة مؤكدة فحسب. وبالتالي فإن قيمة العدد الأكثر احتمالاً (MPN) هى ٩.٢ اجمالي قولونيات فى كل ١٠٠ ملليلتر من العينة. وفيما يختص بالقولونيات الغائطية، لم يكن هناك سوى أنبوبة إيجابية واحدة مؤكدة فحسب. وبالتالي فإن قيمة العدد الأكثر احتمالاً (MPN) هى ٢.١ فى كل ١٠٠ ملليلتر.

التطبيق على المياه الملوثة (بطريقة التخفيف):

الطريقة:

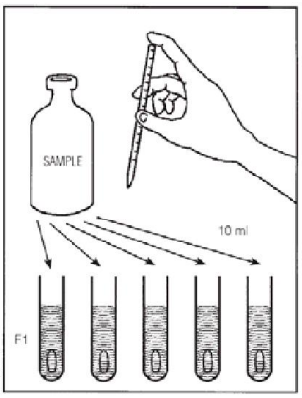
الطريقة التى تستعمل لفحص مياه يتوقع أن تكون ملوثة حتى ولو كان قد سبق معالجتها مبينة فيما يلي، وهى فى جوهرها مماثلة للطريقة الموصوفة سالفاً، باستثناء استعمال تخفيفات متعددة فى هذه الطريقة.

أ. رتب ثلاثة صفوف يتألف كل منها من خمس أنابيب فى رف لأنابيب الاختبار. يحتوى كل من الأنابيب فى الصف الأول (ف١) على ١٠ مل من وسط ظنى مزدوج القوة، بينما تحتوى على أنبوبة فى الصفين الثاني والثالث (ف،٢ ف٣) على ١٠ مل من وسط ظنى مفرد القوة.



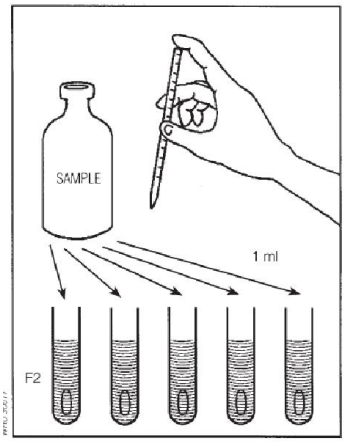
(أ)

ب. ضع ١٠ مل من العينة فى كل من الأنابيب الخمسة فى الصف ف١ باستعمال ماصة معقمة.



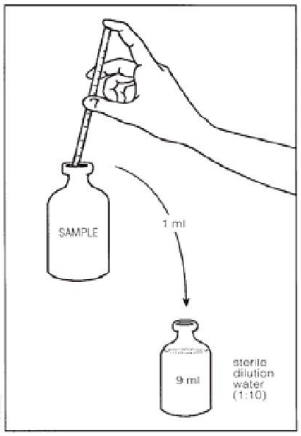
(ب)

ج. ضع ١ مل من العينة فى كل من الأنابيب الخمسة فى الصف ف٢ باستعمال ماصة معقمة.



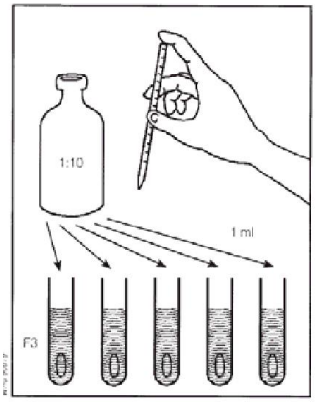
(ج)

د. حضر محلول ١ : ١٠ من العينة بإضافة ٩ مل من الماء المخفف (استعمل ماصة معقمة سعة ١ مل). اغلق الزجاجة المحتوية على العينة المخففة ورجها بقوة.



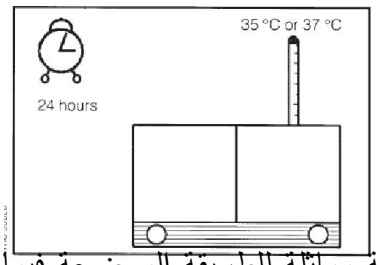
(د)

هـ. أضف ١ مل من السائل المخفف ١ : ١٠ بواسطة ماصة معقمة أخرى إلى كل من الأنابيب الخمس فى الصف ف٣.



(هـ)

و. بعد رج الأنابيب برفق لمزج الزرعة (Incoulum)، ضع الرف ومعه الخمس عشرة أنبوبة فى درجة حرارة ٣٥°م أو ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة فى الحاضنة. وبعدها تابع الطريقة الخاصة بالماء غير الملوث.



(و)

تعيين العدد الأكثر احتمالاً:

يتم التوصيل إلى العدد الأكثر احتمالاً بطريقة مماثلة للطريقة الموضحة فيما سبق، ولكن بالنظر للعدد الكبير من الأنابيب، يتعين استخدام الجدول (٩-٣) الأكثر تعقيداً.

ويبين المثال التالي كيفية الحصول على النتائج:

لنفرض أنه تم الحصول على النتائج التالية بعد تأكيد وجود إجمالي القولونيات:

- ٥ أنابيب إيجابية فى الصف ف١ (حجم العينة الملقحة ١٠ مل).
- ٣ أنابيب إيجابية فى الصف ف٢ (حجم العينة الملقحة ١ مل).

- أنبوبة إيجابية واحدة فى الصف ف ٣ (حجم العينة الملقحة ٠.١ مل).

وهكذا يمكن أن يرمز للنتائج بالأرقام ٥-٣-١،٠ وهى تمثل الاختبار المؤكد للقولونيات. ويشير الجدول رقم (٩-٤) بأن النتيجة المشفرة ٥-٣-١ (٥ × ١٠ مل إيجابي، ٣ × ١ مل إيجابي، ١ × ٠.١ مل إيجابي) تعطى قيمة العدد الأكثر احتمالاً وقدرها ١١٠، أى أن عينة الماء تحتوى على حوالى ١١٠ قولونيات فى كل ١٠٠ مل تقريبا.

ويجرى الاختبار المؤكد للقولونيات الغائطية بنقل ما تحمله أبرة التعقيم من كل أنبوبة اختبار إيجابية ظنياً إلى أوساط تأكيدية، ووضعها فى الحاضنة فى درجة ٤٤ ± ٠.٥°م لمدة ٢٤ ساعة. ولنفرض أن هذا الاختبار يعطى قيمة مشفرة هى ٤ - ٣- صفر. عندما يعطى الجدول رقم (٩-٣) قيمة العدد الأكثر احتمالاً وقدرها ٢٧ أى وجود قولونية غائطية فى كل ١٠٠ ملليلتر من العينة، ثم لنأخذ مثالاً لماء مفرط التلوث، فقد تعطى الطريقة الموضحة أعلاه نتيجة مشفرة قدرها ٥-٥-٥،٠ ونتيجة كهذه لا تعطى قيمة محددة للعدد الأكثر احتمالاً. فعند الاشتباه بتلوث شديد كهذا تلقح عادة أكثر من ثلاث تخفيفات عشرية التركيز. ويجب عمل سلسلة التخفيفات العشرية (Tenfold) هذه بطريقة ما بحيث يتحتمل حدوث نتيجة سلبية لأعلى تخفيف ملقح على الأقل. فإذا لقح فى البداية ٥ × ١.٠ م،ل ٥ × ٠.١ م،ل ٥ × ٠.٠١ مل و ٥ × ٠.٠٠١ مل وتم الحصول على نتيجة مشفرة مؤكدة قدرها ٥-٥-٤-١،٠ عندها يتعين استخدام ثلاث فقط من هذه النتائج للحصول على قيمة العدد الأكثر احتمالاً من الجدول رقم (٩-٤).

وينبغى انتقاء هذه النتائج بأخذ أصغر حجم للعينة (فى هذه الحالة ٠.١ مل) تعطى فيه كافة الأنابيب نتيجة إيجابية، والتخفيفين الأعلى اللذين يليانه مباشرة، وعندها تستعمل النتيجة المشفرة للأحجام الثلاثة للحصول على قيمة العدد الأكثر احتمالاً من الجدول (٩-٣)، ففى المثال المذكور أعلاه تختار النتيجة ٥-٤-١ التى تمثل الأحجام ٠.١، ٠.٠١، ٠.٠٠١ مل من العينة.

وقيمة العدد الأكبرالذي يتم الحصول علية من الجدول رقم (٩-٣) يجب أن تضرب فى ١٠٠ للحصول على العدد الأكثر احتمالاً لهذه العينة بالذات (أنظر أدناه)، وتكون هذه النتيجة فى هذه الحالة هى ١٧٠٠٠ لكل ١٠٠ مل.

وأحياناً قد يجد عامل المختبر صعوبة فى تعيين معامل الضرب لاستخدامه فى الحصول على العدد الأكثر احتمالاً (MPN) المناسب لعينة جرى فحصها. فالطريقة البسيطة لتعيين العدد الأكثر احتمالاً هى تقسيم قيمته التى يتم الحصول عليها من الجدول رقم (٩-٣) على حجم العينة ممثلاً بالعدد الأوسط فى الرمز المختار. فعلى سبيل المثا،ل خذ رمزاً (Code) قدره ٥-٢-صفر يمثل فيه العدد ٢ حجم عينة قدرها ٠.٠١ م،ل كما هو موضح بالجدول رقم (٩-٣). فالعدد الأكثر احتمالاً للرمز ٥-٢-صفر من الجدول رقم (٩-٣) هو ٤٩. لهذا تكون قيمة العدد الأكثر احتمالاً للعينة المفحوصة = ٩ / ٠.١ = ٤٩ × ١٠٠ = ٤٩٠٠.

ويبين الجدول (٩-٤) أمثلة للعوامل التى تستخدم لضرب قيمة العدد الأكثر احتمالاً المستخرج من الجدول (٩-٣) للحصول على العدد الأكثر احتمالاً الملائم للتخفيفات المختلفة.

جدول رقم (٩-٣)

الأعداد الأكثر احتمالاً (MPN) لنتائج توافيق مختلفة إيجابية وسلبية

عند استخدام ٥ مقادير كل منها ١٠ مل و٥ مقادير كل منها ١ مل و٥ مقادير كل منها ٠.١ مل

عدد الأنابيب التى تعطى تفاعلاً إيجابياً من أصل			العدد الأكثر احتمالاً	عدد الأنابيب التى تعطى تفاعلاً سلبياً من أصل			العدد الأكثر احتمالاً
٥ كل منها ١٠ مل	٥ كل منها ٠.١ مل	٥ كل منها ١ مل		٥ كل منها ١٠ مل	٥ كل منها ٠.١ مل	٥ كل منها ١ مل	
0	0	0	<1.8	4	0	3	25
0	0	1	1.8	4	1	0	17
0	1	0	1.8	4	1	1	21
0	1	1	3.6	4	1	2	26
0	2	0	3.7	4	1	3	31
0	2	1	5.5	4	2	0	22
0	3	0	5.6	4	2	1	26
1	0	0	2	4	2	2	32
1	0	1	4	4	2	3	38
1	0	2	6	4	3	0	27
1	1	0	4	4	3	1	33
1	1	1	6.1	4	3	2	39
1	1	2	8.1	4	4	0	34
1	2	0	6.1	4	4	1	40
1	2	1	8.2	4	4	2	47
1	3	0	8.3	4	5	0	41
1	3	1	10	4	5	1	48
1	4	0	10	5	0	0	23
2	0	0	4.5	5	0	1	31
2	0	1	6.8	5	0	2	43
2	0	2	9.1	5	0	3	58
2	1	0	6.8	5	1	0	33
2	1	1	9.2	5	1	1	46
2	1	2	12	5	1	2	63
2	2	0	9.3	5	1	3	84
2	2	1	12	5	2	0	49
2	2	2	14	5	2	1	70
2	3	0	12	5	2	2	94
2	3	1	14	5	2	3	120
2	4	0	15	5	2	4	150
3	0	0	7.8	5	3	0	79
3	0	1	11	5	3	1	110
3	0	2	13	5	3	2	140
3	1	0	11	5	3	3	170
3	1	1	14	5	3	4	210
3	1	2	17	5	4	0	130
3	2	0	14	5	4	1	170
3	2	1	17	5	4	2	220
3	2	2	20	5	4	3	280

عدد الأنابيب التى تعطى تفاعلاً إيجابياً من أصل			العدد الأكثر احتمالاً	عدد الأنابيب التى تعطى تفاعلاً سلبياً من أصل			العدد الأكثر احتمالاً
٥ كل منها ١٠ مل	٥ كل منها ٠.١ مل	٥ كل منها ١ مل		٥ كل منها ١٠ مل	٥ كل منها ٠.١ مل	٥ كل منها ١ مل	
3	3	0	17	5	4	4	350
3	3	1	21	5	4	5	430
3	3	2	24	5	5	0	240
3	4	0	21	5	5	1	350
3	4	1	24	5	5	2	540
3	5	0	25	5	5	3	920
4	0	0	13	5	5	4	1600
4	0	1	17	5	5	5	>1600
4	0	2	21				

جدول رقم (٩-٤)

أمثلة لعوامل الضرب لتعيين العدد الأكثر إحتمالاً للتخفيفات المختلفة للعينة

المثال	عدد الأنابيب التى تعطى تفاعلاً إيجابياً من أصل					النتيجة المشفرة المختارة	عامل الضرب للعدد الأكثر احتمالاً
	٥ كل منها ١ مل	٥ كل منها ٠.١ مل	٥ كل منها ٠.٠١ مل	٥ كل منها ٠.٠٠١ مل	٥ كل منها ٠.٠٠٠١ مل		
١	٥	٥	٢	صفر	صفر	٥-٢- صفر	١٠٠
٢	٥	٥	٤	١	صفر	٥-٤-١	١٠٠
٣	٥	٣	صفر	صفر	صفر	٥-٣- صفر	١٠
٤	٥	٥	٣	٣	١	٥-٣-١	١٠٠٠
٥	صفر	١	صفر	صفر	صفر	صفر-١-صفر	١٠

التطبيق على المياه الملوثة (الطريقة "المختصرة):

إن إجراءات الطريقة المختصرة هى فى الواقع مماثلة للطريقة المذكورة سابقاً، والفرق الوحيد هو أن ثلاثة أنابيب فقط من كل حجم تلقح بـدلاً من خمسة أنابيب، مما يجعل من الضروري استخدام جدول مختلف وهو الجدول رقم (٩-٥) لتعيين العدد الأكثر احتمالاً.

انتقاء الأنابيب للاختبار المؤكد:

يجب أن يتضمن كل تحليل جرثومي الاختبار المؤكد Confirmed Test فإذا اقتصر الفحص على خمس نابيب فقط من حجم ١٠ ملليلتر، يتعين إجراء الاختبار المؤكد الخاص بالقولونيات والقولونيات الغائطية فى جميع الأنابيب التى يتكون فيها الغاز. ولكن إذا تضمن التلقيح خمسة أنابيب أو ثلاثة لكل من أحجام العينات التى تزيد عن ثلاثة (مثلاً ١،٠ ١،٠ ٠،٠١ ٠،٠٠١ مل) عندها لا يكون من الضروري إجراء الاختبارات التأكيدية على كل الأنابيب الإيجابية.

ويعرض الجدول رقم (٩-٥) الأعداد الأكثر احتمالاً لتوافيق مختلفة من النتائج الإيجابية والسلبية عند استعمال ثلاثة مقادير كل منها ١٠ مل وثلاثة مقادير كل منها ١ مل وثلاثة مقادير كل منها ٠.١ مل (الطريقة "المختصرة").

جدول رقم (٩-٥)
الأعداد الأكثر احتمالاً

عدد الأنابيب التى تعطى تفاعلاً إيجابيا من أصل			
٣ كل منها ١٠ مل	٣ كل من ١ مل	٣ كل منها ٠.١ مل	العدد الأكثر احتمالاً
صفر	صفر	صفر	< ٣
صفر	صفر	١	٣
صفر	١	صفر	٣
١	صفر	صفر	٤
١	صفر	١	٧
١	١	صفر	٧
١	١	١	١١
١	٢	صفر	١١
٢	صفر	صفر	٩
٢	صفر	١	١٤

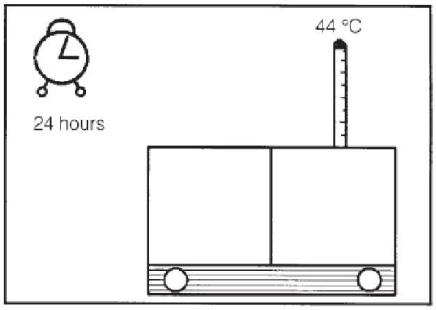
إذا كانت الأنابيب الخمسة (الثلاثة) كلها إيجابية فى تخفيفين متتاليين أو أكثر. عندها يتعين انتقاء مجموعة الأنابيب التى تمثل الأصغر بين أحجام العينة التى تكون فيها الأنابيب جميعها إيجابية. ويجب إجراء الاختبار المؤكد على جميع هذه الأنابيب وجميع الأنابيب الإيجابية المتطابقة مع الأحجام التالية الأدنى. وفيما يلي مثال يوضح هذه الطريقة : بعد وضع الأنابيب فى الحاضنة لمدة ٢٤ ساعة كانت النتائج الإيجابية فى خمسة أنابيب سعة كل منها ١٠ م،ل وخمسة أنابيب سعة كل منها ١.٠ م،ل وخمسة أنابيب سعة كل منها ٠.١ م،ل وأربعة أنابيب كل منها ٠.٠١ م،ل وأنبوبة واحدة سعة ٠.٠١ مل وهكذا. وإجراء الاختبار المؤكد على الأنابيب التى لقحت فى البداية بمقادير من العينة مقدارها ٠.١ مل و ٠.٠١ مل و ٠.٠٠١ مل.

الطريقة المباشرة لفحص القولونيات الغائطية:

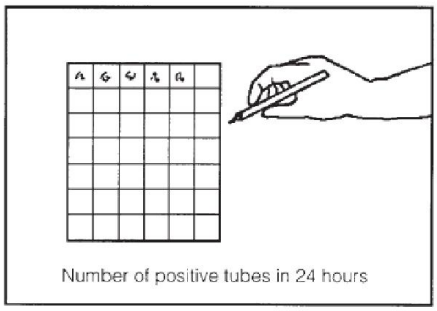
في حالة فحص ماء غير مكلور من مرفق مياه مجتمعي صغير، ويكون فيه الاهتمام منصبا علي القولونيات الغائطية فحسب، يمكن استخدام طريقة متعددة الأنابيب مباشرة لفحص القولونيات الغائطية. ويمكن أن تستخدم هذه الطريقة فى البلدان النامية أو أثناء الاستقصاءات الميدانية إذا كان المكان والقوى العاملة وتسهيلات الحضانة محدودة. وتقوم هذه الطريقة على طريقة العدد الأكثر احتمالاً العادية التى يستخدم فيها مرق لاكتوز كوسط للفحص الظني، ولكن تتم حضانة الأنابيب فى حمام مائي فى درجة ٤٤ ± ٠.٥° م بدون فحص مسبق لإجمالي القولونيات فى درجة ٣٥° م أو ٣٧° م لمدة ٢٤ ساعة.

وهذه الطريقة مماثلة لتلك المذكورة فيما يتعلق بفحص الماء الملوث، ولكن يستخدم فيها مرق لاكتوز أو مرق ماك كونكي كوسط ظني. ولإجراء ذلك حضر ١٥ أنبوبة من كل من العينة والوسط كما هو موضح سابقاً.

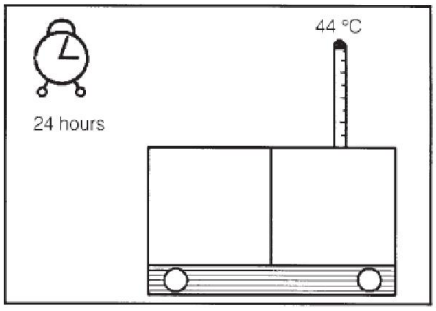
بعد رج الأنابيب برفق لخلط المحتويات ضع الخمس عشرة أنبوبة فى درجة ٤٤°م ± ٠.٥°م فى الحاضنة لمدة ٢٤ ساعة.



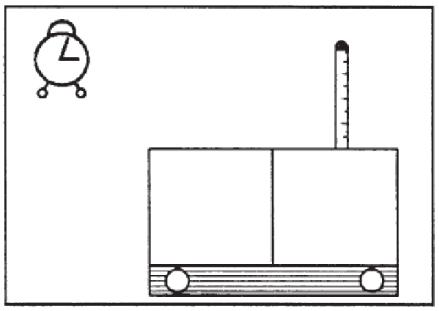
أفحص كل أنبوبة لاكتشاف وجود غاز فيها ثم سجل عدد الأنابيب الإيجابية بعد ٢٤ ساعة فى الجدول المناسب.

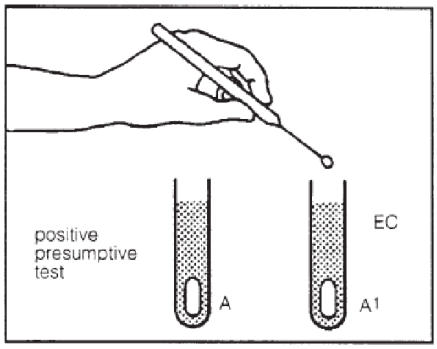


يجب أن توضع الأنابيب السلبية فى الحاضنة ثانية لمدة ٢٤ ساعة أخرى، وأن تفحص بعد ذلك بحثاً عن وجود غاز فيها.



تأكد من النتائج الظنية بعد ٢٤ ساعة و٤٨ ساعة بنقل جزء من المرق بواسطة العروة إلى مرق تأكيدي ووضعه فى الحاضنة فى درجة ٤٤°م لمدة ٢٤ ساعة.





يتأكد وجود القولونيات الغائطية إذا تكون غاز باستخدام المرق التأكيدي بعد ٢٤ ساعة فى درجة حرارة ٤٤°م. عين العدد الأكثر احتمالاً MPN

استمارات التسجيل

التحليل الذي يجرى لعينة معينة يعطى نتائج متعددة، وينبغى أن تكون الاستمارة التى تعد لتسجيل هذه النتائج كاملة، وليس بالضرورة ان تكون معقدة، وينبغى أن يتضمن النموذج معطيات وتعريف مفصل عن العينات (Sampling) تساعد أيضاً فى التعرف على العينات، ومعطيات مسجلة على استمارة إرسال العينة، وأخرى عن التحليل الجرثومي نفسه، ويبين الشكل رقم (٩-٢) استمارة شاملة مقترحة.

برنامج مراقبة جودة المياه

تحليل المياه الجرثومي

(المحافظة.....)

رقم العينة:

المنطقة:

الموقع الذي جمعت منه العينة:

المكان:

المصدر:

المرسل:

تاريخ أخذ العينة: ـــــ / ـــــ / ـــــ الوقت:

تاريخ التحليل: ـــــ / ـــــ / ـــــ الوقت:

الكلور الحر المتبقي | | ملليجرام/ لتر

النتائج

إجمالي القولونيات /١٠٠ مل

القولونيات الغائطية (باسيل القولوني النموذجي) / ١٠٠ مل

المياه من الناحية الجرثومية .....

فني المختبر

جيدة / غير مقبولة .....

(توقيع)

مديرالمعمل

شكل رقم (٩-٢)

نموذجً للبروتوكول المستخدم

فحص البكتريا السبحية المعوية:

ويجرى الاختبار بطريقة العد الاحتمالي (Most probale number) باستخدام بيئة الأزيد دكستروز بروث (Azide dextrose broth)، وفى حالة استخدام ١٠ مل من العينة للفحص تستخدم بيئة مضاعفة التركيز وتركيبها كالآتي:

٩ جم خلاصة لحم
٣٠ جم تربتون
١٥ جم جلوكوز
١٥ جم ملح طعام
٠.٤ جم ثنائي فوسفات أحادي صوديوم أزيد
٢ مل بروموكريزول قرمزى (بربل) (بعد إذابة ١.٥ جم فى ١٠٠ مل كحول)
فى حالة استخدام البيئة السابقة بوزن ٧٠ جم/ لتر.

تحضير الأوساط (البيئية):

تخلط المقادير جيداً وتعقم بعد ضبط الرقم الهيدروجيني ٧.٢-٧.٤ وتعبأ فى أنابيب معقمة ١٠ مل فى كل أنبوبة.

إجراء الاختبار:

أ. تحقن خمس أنابيب من المستنبت المضاعف التركيز بعشرة مل من العينة المراد فحصها فى كل أنبوبة بواسطة ماصة معقمة وتحضن عند درجة حرارة ٣٧° م لمدة ٤٨ ساعة.

ب. تقرأ الأنابيب التى أعطت عكارة والتى من المحتمل احتوائها على بكتريا المجموعة السبحية المعوية، ويلزم بعد ذلك إجراء الاختبارات التأكيدية التالية:

الاختبار التأكيدي الأول:

باستخدام بيئة كاناميسين اسكولين أزيد أجار. وتركيبه كالآتي:

- ٢٠ جم تربتون.
- ٥ جم خلاصة خميرة.
- ١ جم كلوريد الصوديوم.
- ١ جم صوديوم سترات.
- ١ جم اسكولين.
- ٥ جم سترات أمونيوم أحادية.
- ٠.١٥ جم صوديوم أزيد.
- ١٠ جم ماء مقطر.

وفى حالة استعمال البيئة السابقة التجهيز يوزن ٤٢.٦ جم/ لتر.

طريقة تحضير البيئة:

تخلط المكونات ويضبط الرقم الهيدروجيني ٧.٢ وتعقم وتبرد إلى درجة ٤٢°م ثم يضاف إليها زجاجة واحدة من كاناميسين لكل ٥٠٠ جم من البيئة ويصب ١٠ مل من المستنبت فى أطباق بترى معقمة وتحفظ فى الثلاجة.

طريقة إجراء الاختبار التأكيدي:

يزرع من كل أنبوبة إيجابية (بها عكارة) على طبق كاناميسين أسكولين أزيد أجار بواسطة أبرة زرع، ويحضن الطبق عند درجة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة، وتفحص الأطباق للمستعمرات سوداء اللون ويجرى لها اختبار فوق أكسيد الهيدروجين (Catalase test) باستعمال محلول فوق أكسيد الهيدروجين تركيز ٣% بوضع نقط قليلة منه على شريحة زجاجية وإذابة المستعمرة فيها على الشريحة وملاحظة تكون فوران وحدوث فقاعات غازية من عدمه، وتكون العينة سالبة إذا لم يحدث فقاعات وفوران باستخدام فوق أكسيد الهيدروجين (Catalase negative)، كما تحضر أفلام من المستعمرات التى لونها أسود على أطباق كاناميسين أسكولين أزيد أجار وتصبغ بصبغة "الجرام" وتفحص تحت الميكروسكوب لوجود المكورات السبحية الإيجابية لجرام.

وتعتبر العينة إيجابية للبكتريا السبحية البرازية إذا:

أ. أعطت فى الاختبار التمهيدي عكارة على مستنبت أزيد دكستروز بروث.

ب. ثم أعطت مستعمرات سوداء اللون على أطباق كاناميسين أزيد أجار فى الاختبار التأكيدي.

ج. إذا كانت المستعمرات سوداء اللون فى الاختبار التأكيدي سلبية الاختبار (Catalase).

د. الفحص المجهرى للمستعمرات سوداء اللون سلبية الاختبار (Catalase). والمصبوغة بصبغة الجرام إيجابية تكون تلك المستعمرات على شكل مكورات ثنائية أو رباعية أو سلاسل قصيرة (Short chain)، بعد ذلك تقرأ النتائج للأنابيب فى الاختبار التمهيدي.

ه. وكانت كل الاختبارات التأكيدية السابقة إيجابية، ويعرض الجدول رقم (٩-٦).

جدول رقم (٩-٦)
العـــــدد الاحتمالي

عدد الأنابيب الإيجابية فى الاختبار التمهيدي والاختبارات التأكيدية	العدد الاحتمالي للبكتريا السبحية المعوية
أنبوبة واحدة	٢
٢	٥
٣	٩
٤	١٦
٥	أكثر من ٢٣

وتكون العينة صالحة للاستهلاك الآدمي إذا كانت خالية من البكتريا السبحية المعوية.

ملحوظة:

فى حالة استخدام البيئة سابقة التجهيز تتبع تعليمات الشركة المنتجة.

طريقة تحضير البيئة:

تخلط المقادير حتى الذوبان وتعقم عند درجة ١٢٠° م لمدة نصف ساعة ثم تبرد وترشح عند درجة ١٠٠°م وتضاف إليها ١٥ جم أجار فى فصل الشتاء ومن ٢٠-٢٥ جم فى فصل الصيف وبعد إذابة الأجار يضبط الرقم الهيدروجيني ٧.٤-٧.٦ ويرشح مرة أخرى ويعبأ فى أنابيب ١٠ مل فى كل أنبوبة ويعاد التعقيم عند درجة ١٢٠° م لمدة نصف ساعة، وعند الاستعمال يوضع فى حمام مائي عند درجة ٤٥° م.

فحص بكتريا سودوموناس ايروجنوزا:

لإجراء عملية الفحص لهذه البكتريا (Pseudomonas aeruginose) سودوموناس ايروزجنوزا تستخدم طريقة العد الاحتمالي (MPN) باستعمال بيئة الاسبارجين.

وتركيبها كالآتي:

ملحوظة:

فى حالة فحص عينة من الماء ١٠ سم^3 فأكثر تحضر البيئة مضاعفة التركيز أى تضاعف الكميات الآتي بيانها:

- ٣ جم اسبارجين.
- ٠.٥ جم كبريتات ماغنسيوم.
- ١٠ جم كبريتات بوتاسيوم.
- ١ جم ثنائي فوسفات أحادي هيدروجين البوتاسيوم.
- ١٠٠٠ جم ماء مقطر.

تحضير البيئة:

تخلط المكونات جيداً أو ترج وتوضع عند درجة ١٠٠°م فى الأوتوكلاف ويضبط الرقم الأيدروجيني ما بين ٦.٩-٧.٢ وتعبأ فى أنابيب.

طريقة إجراء الاختبار:

١. خمسة أنابيب فى كلاً منها ٥٠ مل من البيئة مضاعفة التركيز + ٥٠ مل من العينة المراد فحصها.
٢. خمسة أنابيب فى كلاً منها ١٠٠ مل من البيئة مضاعفة التركيز + ١٠ مل من العينة المراد فحصها.
٣. خمسة أنابيب فى كلاً منها ١٠ مل من البيئة مضاعفة التركيز + ١ مل من العينة المراد فحصها.
٤. تقرأ الأنابيب الإيجابية السودوموناس ذات اللون الأخضر البراق.

الاختبار التأكيدي:

يجري عليها الاختبار التأكيدي التالي باستخدام بيئة الاسيتاميد أجار

(Acetamid agar) تركيبها كالآتي:

- ١٠ جم استياميد.
- ١٥ جم أجار.
- ١.٤ جم أحادي هيدروجين ثنائي بوتاسيوم.
- ٠.٠٧ جم ثنائي هيدروجين أحادي بوتاسيوم.
- ٥ جم ملح طعام.
- ٠.٥ جم كبرتيات ماغنسيوم.
- ٠.٠١٢ جم دليل أحمر فينول.
- ١٠٠٠ مل ماء مقطر.

تحضير البيئة:

تخلط المقادير السابقة وتعقم فى الأتوكلاف مع ضبط الرقم الهيدروجيني عند ٦.٩-٧.٢ . تصب فى أنابيب ٨ مل فى كل أنبوبة وتترك للتصلب مائلة بحث تعطى سطح مائل من البيئة.

طريقة إجراء الاختبار التأكيدي:

يتم فرد ٠.١ مل من الأنابيب الموجبة ذات اللون الأخضر البراق على سطح بيئة الاستاميد وتحضن عند درجة ٣٧°م لمدة من ٢٤ ساعة إلى ٣٦ ساعة، وتعتبر الأنبوبة موجبة فى حالة ارتفاع الرقم الهيدروجيني للبيئة وذلك بتغيير لون الاستاميد إلى اللون القرمزي، وتقرأ النتائج من جدول العد الاحتمالي.

فحص بكتريا المكورات العنقودية:

لفحص هذا النوع من البكتريا (Staphlococcus aureus) تستخدم طريقة العد الاحتمالي (MPN) على بيئة (M. Staphlococcus broth) ستافيلوكوكس مانيتول بروث.

ملحوظة:

فى حالة فحص عينة من الماء ١٠ سم^3 فأكثر تحضر البيئة مضاعفة التركيز أى تضاعف الكميات الآتي بيانها:

- ١٠ جم تربتون.
- ٢.٥ جم خلاصة خميرة.
- ٢ جم لاكتوز.
- ١٠ جم مانيتول.
- ٥ جم ثنائي بوتاسيوم أحادي هيدروجين فوسفات.
- ٧٥ جم ملح طعام.
- ٠.٠٤٩ جم صوديوم أزيد.
- ١٠٠٠ جم ماء مقطر.

تحضير البيئة:

تذاب المكونات وتعقم فى الأوتوكلاف عند درجة ١٢٠°م لمدة ١٥ دقيقة ويضبط الرقم الهيدروجيني ما بين ٧.٤-٧.٦ وتبرد حتى درجة ٥٠°م ويضاف ٥٠ مل من (Egg yolk tellurite) لكل لتر من البيئة ثم يصب فى أطباق للاستعمال.

الاختبار التأكيدي:

١. تزرع الأطباق من العينات الإيجابية فى الاختبار الأول التى أعطت عكارة بواسطة أبرة الزرع، ثم تحضن الأطباق عند ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة وتكون الأطباق إيجابية إذا أعطت نموات لها لون غامق (Opaque) ومحاطة بمساحة صفراء اللون حولها (Yellow zone).
٢. يجرى لهذه النموات اختبار الـ (Catalase) وتكون العينة إيجابية إذا كانت (Catalase positive).
٣. يعمل أفلام وتصبغ بصبغة الجرام وتفحص تحت الميكروسكوب لإظهار البكتريا العنقودية موجبة الجرام (Staplylscocci).