الشركة القابضة
لمياه الشرب والصرف الصحي

برنامج إدارة مياه الشرب و الصرف الصحي
Water and Wastewater Management Program

gtz

Since the 1st of January 2011
giz Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit (GIZ) GmbH

ميكروبيولوجيا المياه
البرنامج الرابع
الطرق والعناصر البكتريولوجية الخاصة بمعايير مياه الشرب

Water Microbiology
Module 4
Specific Bacteriological Methods & Parameters Standers for Drinking Water

ميكروبيولوجيا المياه

البرنامج الرابع : الطرق والعناصر البكتريولوجية الخاصة
معايير مياه الشرب

Water Microbiology

Module 4: Specific Bacteriological Methods Parameters
Standards for Drinking Water

ميكـــروبـــيولـــوجيا المـــياه

WATER MICROBIOLOGY

البرنامج الرابع

Module 4

الطرق والعناصر البكتريولوجية الخاصة

معايير مياه الشرب

Specific Bacteriological Methods & Parameters Standards for Drinking Waters

Prof. Helmy Tawfik El-Zanfaly
National Research Center

July 2008

Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit - GTZ
Water and Wastewater Management Programme
GTZ Project No. 06.2006.3

المحتويات

	صفحة
مقدمه	1
الباب الأول **البكتريا البغيضة أو المؤذية**	7
الباب الثانى **عد، تخصيب، وعزل بكتريا الحديد والكبريت**	21
الباب الثالث **بكتريا الحديد**	25
الباب الرابع **بكتريا الكبريت**	29
الباب الخامس **سيدوموناس ايريوجينوزا المياه الجوفيه**	39
الباب السادس **الاضرار الخلوى لبكتريا القولون**	47
الباب السابع **زيادة الاستخلاص**	51
الباب الثامن **طرق الكشف السريعة**	57
الباب التاسع **العد الكلى المباشر للبكتريا**	69
الباب العاشر **الفطريات**	73

المقدمـــــة

مقدمة عامة

حوالى 2.2 مليون من البشر يموتون كل عام من أمراض مرتبطة بأساسيات صحية مثل الاسهال، معظم هؤلاء من الاطفال من ابناء الدول النامية. تداخل الصحة، النظافة، الامداد بالمياه أثبت أن لها دورها فى التحكم فى هذه الأمراض. ولقد اتضح أن الامداد بالمياه الآمنة والوسائل الصحية خطوة أساسية لخفض الاصابة بهذه الأمراض.

وعلى الرغم من ذلك فان الامداد بمصدر جيد للمياه وتوفير الوسائل الصحية الأساسية ظلا أمرا محيرا. وفى تصريح مع نهاية الألفية الثانية ظهر تراجع فى نسبة كلا من الذين لا تصل اليهم مياه الشرب النقية أو خدمات الصرف الصحى ولكن ظل خفض نسبة الذين لا تصل اليهم مياه الشرب الى النصف هدف مخطط له أن يتحقق عام 2015.

والامداد بمياه شرب مقبولة من حيث الصفات الميكروبيولوجية مع خفض مخاطر الاصابة بالأمراض المعدية يحتاج الى عناصر أساسية تتضمنها خطة المياه الآمنة. وفى أى خطة مياه آمنه فان التركيز يقع على التحكم والكشف عن التلوث البرازى لمياه الشرب وكذلك مصادره. والطرق المعتادة فى قياس التلوث البرازى تعتمد على بكتريا أو مجموعة من البكتريا يعتد بها كدليل على التلوث البرازى. وقياس أى مؤشر بكتيرى للتلوث البرازى يحتاج الى شخص متدرب، بيئات ومواد أخرى مدعمة وكذلك امكانيات تتوافر فقط فى معمل الميكروبيولوجى أو استعمال وسائل للتحليل الميكروبيولوجى فى الحقل.

وعدم توافر معمل أو وسائل التحليل الحقلى يعتبر عائقا أمام امداد العديد من المجتمعات والشعوب فى انحاء العالم بمياه الشرب الآمنه ميكروبيولوجيا. ومن الجهود لحل تلك المشكلة، اقترحت وطورت عدد من بدائل الكشافات والاختبارات للكشف عن التلوث البرازى فى مياه الشرب. بعض من تلك الكشافات المقترحة واختباراتها بسيطة، منخفضة التكاليف ولا تحتاج الى معمل ميكروبيولوجى او وسائل الاختبار الحقلى. بعض من هذه الكشافات البرازية منخفضة التكلفة بدأ استخدامها فى عمليات الامداد بمياه الشرب. ومن ضمن هذه الاختبارات ما يسمى اختبار كبريتيد الأيدروجين أو H_2S ، والذى يتم فبه الكشف أو تقدير البكتريا المنتجة لكبريتيد الأيدروجين، على اعتبار أن تلك البكتريا مرتبطة بالتلوث البرازى.

الاختبار نشأ أصلا للكشف، فى حجم من الماء، عن انتاج كبريتيد الأيدروجين بالبكتريا المعوية المرتبطة بالتلوث البرازى وذلك من خلال تكوينها راسب اسود ينتج من تفاعل يتم فى البيئة المستخدمة بين كبريتيد الأيدروجين والحديد. وهذا الاختبار بدأ استخدامه عام 1982 وتمت عليه بعد

ذلك عدة تطورات. وتوجد عدة صور للاختبار تختلف عن بعضها فى تركيب البيئة المستخدمة، تحضيرها، المواد المدعمة، حجم العينة، مدة وحرارة التحضين، وتقييم النتائج. ولم يتم وضع الاختبار فى الصورة القياسية فى كثير من دول العالم وتمت دراسات مقارنة ما بين هذا الاختبار والاختبارات البكتريولوجية الأخرى للتلوث البرازى. على أن وجود عدة صور لاختبار كبريتيد الأيدروجين وكذلك اختلاف طرق التقييم فى الدراسات المعملية والحقلية جعل عملية المقارنة صعبة.

الكشف عن والاختبار لدليل التلوث البرازى فى مياه الشرب، القرينة، أغراضه، الحاجة اليه ومعاييره

- **خطط أمان مياه الشرب والكشف عن الدلائل البرازية فى مياه الشرب**

هدف اساسى لتوفير مياه شرب آمنة أن تكون أساسا خالية من الكائنات الدقيقة الممرضة. ومنذ بداية القرن العشرين، استعمل الكشف عن الدليل البرازى البكتيرى كأساس للمعايير، الخطوط الاسترشادية والمقاييس للحدود المقبولة للتلوث البرازى وكأساس للحكم أو التنبؤ عن امكانية وجود او غياب الكائنات الممرضة. ولقد دعمت الخطوط الاسترشادية لمنظمة الصحة العالمية وغيرها من الهيئات استخدام الدلال البكتيرية وقياسها كأساس للحكم وتأكيدا لنوعية مياه الشرب. ومع ذلك، فان التحليل لأدلة التلوث فى مياه الشرب كمقياس لنوعية المنتج النهائى وتقدير مخاطر الأمراض الميكروبية ما هو الا واحد من العديد من المقاييس والأنشطة فى النظام بأكمله للامداد بمياه الشرب الآمنة. وفى تحديث الخطوط الاسترشادية لمنظمة الصحة العالمية فان الهدف من الامداد بمياه شرب آمنة سوف يعزز من خلال تطوير واستعمال خطة المياه الآمنة. هذه الخطة تشمل تقييم المخاطر، تقييم النظام المائى وعملية التحكم التى تختبر كل خصائص مياه الشرب من مصدره، خلال المعالجة والتوزيع (أو التجنيع والتخزين) الى المستهلك. يستعمل خلال ذلك خطة اداره والتى تشتمل على تحلبل الخطر-نقط التحكم الحرجة Hazard Analysis-Critical Control Points . وفى أى خطة قياس تواجد أو مستويات الكشاف لبرازى فى المياه هو واحد من أدوات الادارة وليس دائما من بين تلك الأكثر حرجا لعملية التحكم أو خلال الجمع, الانتاج وتوصيل مياه الشرب المقبولة ميكروبيولوجيا. وعلى الرغم من ذلك، المقاييس او الدلائل لنوعية المياه، وعلى الأخص التى تقييس أو تدل على التلوث البرازى، نافعة اذا لم تكن أدوات أساسية فى توفير مياه شرب آمنة. عوامل السرعة، السهولة والقدرة على الكشف عن التلوث البرازى فى مياه الشرب ما زال هدف مرغوب ونهاية لكل الجهود للامداد بمياه شرب آمنة (منخفضة المخاطر) ميكروبيولوجيا.

- **الأغراض والحاجة الى الكشف عن أدلة التلوث البرازى فى مياه الشرب**

تقدير النوعية الميكروبية لمياه الشرب عن طريق الكشف عن التواجد، الغياب أو بقياس تركيز الأدلة البكتيرية طبقت عالميا بهدف: (1) المطابقة مع المواصفات القياسية والخطوط الاسترشادية، (2) لتقدير نوعية مصدر المياه ، كفاءة نظام المعالجة وسلامة نظام التوزيع ،(3) للاعلان عن خطط أمان المياه، تقييم المخاطر ونظم الادارة. هذا وفى بعض الدول والمناطق وللتجارة الدولية (المياه المعبأة التجارية) والنقل (الطائرات، القطارات ووسائل السفر الأخرى) تحليل مياه الشرب ربما يكون مطلوبا بالقانون أو حكوميا.

بالاضافة الى هذه الأهداف والاحتياجات، قياس النوعية الميكروبية للمياه لتواجد التلوث البرازى يمكن أن يجرى وكما يجرى الآن لأهداف أخرى نافعة. واحد من الأهداف هو اشراك المجتمع فى تدبير ، ادارة، مراقبة مياه الشرب، ويشمل ذلك المصدر والمعالجة. جهود كبيرة جرت لتشجيع المشاركة المحلية فى تدبير المياه الآمنة وفى الاشراف أو مراقبة تدبيرها بواسطة طرف مسئول آخر (الحكومات، شركات المياه الخاصة، متعهدى الامداد بالمياه، بائعى المياه، وغيرهم). وعلى ذلك فان المقدرة على اختبار مياه الشرب للتلوث البرازى هى أداة قوية ومدعمة لهذه الأهداف.

غرض آخر مفيد لقياس نوعية المياه ميكروبيولوجيا هو تعليمى. تدريس نوعية المياه ميكروبيا وأسس نظرية الجراثيم خلال محيط التعليم وعلى امتداد برامج المياه والصحة والوسائل لصحية على مستوى الفرد، المنزل، المجتمع واقليميا هو استمراريه وهدف طويل الأجل تمهيدا للصحة الشاملة. لتوصيل تلك الرسائل التعليمية يلزم توفير اختبارات للتلوث البرازى لمياه الشرب تتصف بالبساطة السهوله، عمليه. فى بعض المواقف أحسن الاختبارات لتحقيق تلك الأهداف هى الأبسط فى التطبيق، المفهومة، الواضحة، والممكن تفسير نتائجها. هذا بسبب ان بعض الاختبارات من الممكن أن ينتشر بكثرة مباشرة بواسطة المعلمين وبعد ذلك خلال الاتصالات فى المنزل، العائلات، المدارس ، والمجتمعات ووسائل أخرى (مواد تعليمية مثل الملصقات، العلامات، الكتيبات. لهذه الأسباب فان اختبار كبريتيد الأيدروجبن والاختبارات البسيطة الأخرى لها قيمة كبيرة واستعمال قوى وحتى استعمال كبير لادارة مصدر مياه الشرب والتعليم الصحى فى قطاعى المياه والصحة.

وعى ذلك فان تحقيق هذه الاحتياجات والأغراض من الممكن أن يخدم فقط اذا كانت الاختبارات حقيقية وتعطى النتائج الصحيحة. اذا كانت غير حقيقية واذا كانت تعطى نتائج غير صحيحة (نتائج ايجابية أو سلبية غير صحيحة) ، فان استعمالها وفوائدها تكون مشوهة أو مضللة. وعى ذلك فان اختبارات كبريتيد الأيدروجين وغيرها البسيطة للكشف وتقدير التلوث البرازى لمياه الشرب يجب تقيمها وتحكيمها على أساس مدى حقيقتها ودقتها وكذلك ارتباطها وتطبيقها وقدراتها.

- **معايير أو مقاييس الكشف عن التلوث البرازى لمياه الشرب باستعمال الأدله أو الكشافات**

لأكثر من مائة عام، استعملت الاختبارات البكتريولوجيه للكشف عن التلوث البرازى لمياه الشرب, وكذلك بالنسبة لنوعيات المياه الأخرى باستعمال بيئات أخرى مثل المخلفات السائله والأغذية. وخلال هذا الوقت ، كان هناك تقدم وتطور فى الأدلة البكتيرية للتلوث البرازى فى مياه الشرب والمياه الأخرى. المعايير السائدة للدليل المثالى أو المفضل للتلوث البرازى حددت بواسطة منظمة الصحة العالمية وغيرها من الجهات الرسمية عام 2002 على أنها:

- الدليل يجب أن يكون غائب فى المياه الغير ملوثة ويتواجد عندما يكون مصدر الميكروبات الممرضه من التلوث البرازى متواجده.
- الدليل يلزم أن يتواجد باعداد كبيرة عن الميكروبات المرضية
- الدليل يكون من السهل عزله، تنميته وتصنيفه.
- الدليل يلزم أن يتجاوب مع الظروف البيئية الطبيعية ومع عمليات معالجة المياه بشكل مشابه للميكروبات المرضية
- الاختبار يجب أن يكون غير مرتفع التكاليف (اقتصادى) وعلى ذلك يكون من السهل اجراء تحليلات متعددة
- الدليل يجب أن لا يكون ميكروب مرضى للحد من المخاطر الصحية بالنسبة للقائم بالتحليل
- الدليل يجب أن لا يتكاثر فى البيئة.

والمنطق فى هذا الشرط الأخير هو أن كثافة تواجد الدليل يجب أن تعكس درجة التلوث البرازى. وعلى ذلك فان تكاثر الميكروب فى البيئة يمكن أن يتواجد الميكروب باعداد كبيرة فى حين أن التلوث البرازى قد لا يتواجد أو يتواجد بمستوى منخفض جدا.
وبناء على ذلك فان أى دليل للتلوث البرازى فى مياه الشرب ومصادرها يجب أن ينطبق عليه هذه المعايير.

- **اختبارات التواجد وعدم التواجد الميكروبية واستخدامها فى الكشف وتقدير التلوث البرازى**

بالاضافة الى المعايير التى ذكرت فان بغض الاختبارات الميكروبية للتلوث البرازى فى المياه يرتكز على التواجد أو عدم التواجد للدليل الميكروبى فى حجم محدد من الماء ويسمى اختبار التواجد –عدم التواجد (غياب) (Presence/absence test). فى تطبيق اختبارات التواجد وعدم التواجد للكشف عن الدلائل البكتيرية للتلوث البرازى فى مياه الشرب فان حجم العينة المختبرة يكون 100

ملل. وطبقا لبعض المعايير والخطوط الاسترشادية ، فان التلوث البرازى يتوقع أو يحتاج أن يكون غائبا فى كل أو معظم (95%) العينة المكونة من 100 ملل المختبرة تباعا خلال فترة معينة. وفى بعض الطرق الأخرى خلاف طريقة التواجد وعدم التواجد للكشف عن أدلة التلوث غان الميكروب المستهدف يقدر باستعمال غينات متكررة ومختلفة الحجم ، كلا منها تسجل نتيجتها كموجبة أو سالبه للميكروب المختبر. وهذه النتائج تستعمل لحساب تركيز الميكروب بطرق احصائية (العدد الأكثر احتمالية (Most Probable Number Method). وكبديل حللت المياه للدليل الميكروبى البرازى بطريقة التنمية والتى فيها تركيز البكتريا فى وحدة الحجوم من الماء يعبر عنها بوحدات تكون المستعمرات (Colony Forming Unit , CFU) فى وحدة الحجوم.

استخدام فكرة التواجد –عدم التواجد واختبارات التواجد –عدم التواجد كدليلا على لتلوث البرازى البكتيرى، بدءا ببكتريا القولون، بكتريا القولون البرازية، وايشيرشيا كولاى (Eschericia coli, E.coli) لها تاريخ من التطوريرجع الى أكثر من اربعون عاما. جهود فائقة فى صورة تحليل الخبير والحكم أدت الى تطوبر وتطبيق اختبارات التواجد-وعدم التواجد لهذه الميكروبات فى مياه الشرب.كثير من هذا الجهد يشمل الأخذ فى الاعتبار الثروة التاريخية المتوافرة من النتائج عن تواجد الكشافات البكتيرية هذه فى مياه الشرب، اعتمادا على تكرارية النتائج الايجابية فى 100 ملل من مياه الشرب وقبول (مخاطر) مياه الشرب اعتمادا على هذه التكرارية الملاحظه. هذه التحاليل أدت الى خطوط استرشادية ومواصفات قياسية للنوعية الميكروبية لمياه الشرب ارتكازا على النتائج الايجابية لاختبار التواجد-عدم التواجد. وعلى ما يبدوا فان نشأة اختبار كبريتيد الأيدروجين لم يحظى بقدر من التحليل وحكم الخبراء قدر ما حظى اختبار التواجد-عدم التواجد. وكبديل أو عرضا ، نتائج اختبارات التواجد-عدم التواجد وكبريتيد الأيدروجين قورنت بنتائج اختبارات الأدلة الميكروبية البرازيه لتقدير مدى التطابق فى النتائج الايجابية أو السلبية. وفى تجربة استخدم الاختبار لعينات مختلفة من مياه الشرب من عدة مدن فى الهند وتحتوى على 10 أو أكثرمن بكتريا القولون بطريقة العد الاحتمالى وعرضت لاختبار كبرينيد الأيدروجين باستخدام 20 ملل من العينة فى صورة تواجد-عدم تواجد. وعلى هذا الأساس، فان اختبار كبريتيد الأيدروجين الايجابى اعتبرت غير ناجحة كمياه شرب لأنها تحتوى 10 أو أكثر من بكتريا القولون الكلية (Total coliform) وكانت ايجابية لاختبار كبريتيد الأيدروجين. وبعد ذلك قارن آخرين اختبارات كبريتيد الأيدروجين باختبارات بكتريا القةلون البرازيه باستعمال هذه المعايير أو غيرها.

وتهدف هذه الدورة الى توجية النظر الى جزئية هامة من البكتريا تلعب دورها فى التأثير السلبى على جودة المياه خلال مرورها فى نظم التوزيع وفى الخزانات كذلك تؤثر على المواسير الناقلة للمياه فتسبب تآكلها. تلط المجموعة من البكتريا يطلق عليها Nuisance bacteria أى البكتريا البغيضة أو المؤذية. من هذه المجموعة مجموعة بكتريا الكبريت ومجموعة بكتريا الحديد فهى تغير من

الخواص الطبيعية للمياه من حيث اللون والطعم والرائحة علاوة على التأثير على مواد صناعة المواسير فتسبب التآكل. لذلك فان الميكروبيولوجى يجب أن يكون ملم بمخاطرها وكيفية عزلها وتعريفها.

كذلك فانه نتيجة للمعالجة بالكلور واستنفاذ الكلور فى الشبكات لذلك فان تواجد البكتريا فى الشبكات نتيجة تواجد القيلم الحيوى Biofilm وما يمكن أن يحتويه من بكتريا القولون ونتيجة عدم تواجد الكلور بالجرعة الكافية للقضاء عليها يحدث لها ما يسمى Injury or Stressing وبالتالى لا يمكن تنميتها بالطرق العادية لحدوث اضار بها ولكونها حية ولكن لا يمكن تنميتها فانها تحتاج الى طرق خاصة لادراك وجودها واخراجها من الحالة التى هى عليها لذلك يلفت الانتباه الى التعامل مع عينات الشبكات والمياه المعالجة بالكلور بطرف خاصة للكشف عن تواجد أدلة التلوث وحتى لا تكون النتيجة سلبيه ولكن سلبيتها غير حقيقية Faklse negative result.

كذلك سنتناول الطرق السريعة للكشف عن صلاحية المياه فى حالات الطوارىء وحتى يمكن اتخاذ الاجراءات الوقائية فى الوقت المناسب.

وسيتم تناول الطرق الغير تقليدية والتى أقلاتها وكالة حماية البيئة وكذلك الطرق اللونية باستخدام Chromogenic media.

وسيتم التعرف على طرق جديدة لتقدير العدد الكلى للبكتريا بالطرق المباشرة Fluoregenic وتقدير ATP الخلايا.

وبالنسبة للمياه الجوفية سيتم ذكر تقدير البكتريا المختزلة للكبريتات والكلوستريديم كمؤشرات للتلوث.

وسيتم مناقشة المواصفات المصرية القياسية على ضوء ما تناولناه فى الدورات وبالطبع سيتم القيلم بجميع الطرق معمليل وبصورة منفردة بالنسبة لكل متدرب.

الفصل الأول

البكتريا البغيضة أو المؤذية
Nuisance Organisms

الفصل الأول

البكتريا البغيضة أو المؤذية
Nuisance Organisms

- **مقدمة**

هناك مجموعة من الكائنات التى تظهر فى مصدر المياه والتى ليس لها مغزى من حيث التأثير على الصحة العامة ولكنها مسئولة عن مشاكل متنوعة تشمل التآكل، الطعم، الرائحة، اللون الأحمر للمياه، اللزوجة. هذه البكتريا البغيضة وجد أنها المسبب لصعوبات فى التشغيل لعمليات نقل المياه الجوفية أو لها صلة بشكاوى المستهلكين عن الناحية الجمالية للماء. توصيف مشكلة الطعم، الرائحة، اللون من خلال عملية المراقبة للبكتريا البغيضة والنواتج الثانوية لعمليات التمثيل الغذائى تعطى الفرصة لوضع واستعمال أساليب المنع والوقاية قبل تصاعد شكاوى المستهلك.

هذه المجموعة المتنوعة تشمل كلا من البكتريا، الفطر، والطحالب يمكن أن تسبب مشاكل متنوعة فى معالجة المياه، خزانات مصادر المياه ، نظم التوزيع. والعديد من هذه الكائنات تحصل على الطاقة اللازمة لها من أكسدة المواد الغير عضوية (الأمونيا، الكبريت، واختزال الحديد و/أو المنجنيز).

بينما نجد أن البعض الآخر ينشط بواسطة النيتروجين الغير عضوى (N)، الفوسفور الغير عضوى (P)، أشعة الشمس والتمثيل الضوئى، و حالات المياه الدافئة. والسيادة فى المجموعة تتحقق فى بعض البيئات من مصادر المياه بسبب الخواص الكيميائية لمصدر المياه أو البيئة المحيطة.

ولقد وجد أن التركيزات المحسوسة من المواد الغير عضوية الأساسية غالبا ما تلعب دورا أساسيا . هذه المكونات الكيميائية ربما تتواجد طبيعيا فى مصدر المياه ولكن غالبا تدخل فى مياه الأمطار الشديدة والمندفعة والتى تأتى بالمخصبات الزراعية وجزيئات التربة الى مصدر المياه بينما المخلفات الصناعية تضيف الكبريتيدات ، الفوسفات، وغيرها من المواد الغير عضوية . ويتعظم النشاط الميكروبى لبعض هذه الكائنات فى قاع المياه للبحيرات الطباقية Stratified lakes مع تحول الكبريتيدات ومركبات المنجنيز Manganous compounds، والحديدوز المتواجدة فى قاع البحيرا الطبافية المستنزف أكسيجينه Oxygen-depleted.

ازدهارات كثيفة Massive blooms من الطحالب (تسود أجناس الطحالب الخضراء والزرقاء المخضرة Blue green algae) غالبا ما تحدث فى الصيف، وتنشط بالتركيزات العالية من النيتروجين والفوسفور الغير عضوى. معظم ازدهارات الطحالب تحدث عندما تصل تركيزات

النيتروجين والفوسفورالى 8,. و 4,. مجم/اللتر على الترتيب. وحددت خالة الازدهار بالنسبة الى الطحالب عنما تصل كثافتها الى 500 خلية او أكثر / ملل من مياه المصدر الخام. وتحت هذه الظروف، فان الكائنات تسد المرشحات فى عملية المعالجة، والتجمعات من الطحالب توفر الحماية بالنسبة للبكتريا من التعرض الى المطهر ، ويزداد الاحتياج الى المطهر Disinfecant demand. بعض الطحالب الزرقاء-المخضرة (Cyanobacteria) يمكن أن تنتج التوكسينات والتى اذا ابتلعت بتركيز كاف ، ربما تسبب التهابات معوية واسهال حاد. والازدهارات من الطحالب الزرقاء-المخضرة تسبب مشطلة الطعم والرائحة كنتيجة لانتاج مادة الجوسامين Geosmin بتركيزات تزيد عن نقطة الاحساس Threshold point. والجوسامين ينتج أيضا بالاكتينوميسيتس ، وخاصة بأعضاء جنس ستربتوميسيس Streptomyces، والذى ينمو فى المياه السطحية الراكدة الدافئة والتى تستعمل لامداد محطات المعالجة.

- **البكتريا المؤكسدة للكبريت** Sulfur-oxidizing bacteria (Beggiatoa and Thiobacillus) تصبح فعالة ونشيطة خاصة فى المياه السطحية التى تستقبل كميات كبيرة من المخلفات السائلة التى تحتوى على كبريت معدنى Elemental sulfur ، ثيو سلفات أو كبريتيدات. والنمو الزائد من الأجناس الخيطية Filamentous species تتسبب فى مشاكل اتلاف لعمليات المعالجة ، بينما سلالات أخرى تتسبب فى مشاكل التآكل Corrosion بالنسبة للانشاءات الخرسانية المستخدمة فى عمليات التخزين والتوزيع. ومن دواعى الاهتمام اللحظى تكون المركبات الكبريتية والتى تؤدى الى مشاكل الطعم والرائحة.
- **البكتريا المختزلة للكبريتات** Sulfate-reducing bacteria (Desulfovibrio) يمكن أن تكون هى البكتريا البغيضة Nuisance bacteria الشائعة فى مياه قاع الخزان والمياه الحتجزة المستنزفة الأكسوجين Oxygen depleted. هذه الكائنات لاهوائية حتما Strict anaerobes مع احلال الكبريتات محل الأكسوجين فى عمليات أكسدة الرواسب النباتية والمتجمعة فى رواسب القاع. وكبريتيد الأيدروجين الناتج عن هذا النشاط الميكروبى (اختزال الكبريتات الى H_2S) يمكن أن يتسبب فى مشاكل الرائحة ، ينتج مواد معلقة سوداء، ويمكن أن يكون عامل تآكل بالنسبة للصلب والمعادن الأخرى المعرضة للماء فى شبكة التوزيع. ومجموعة Desulfonema عديدة الخلايا ولديها خاصية الحركة الانزلاقية Gliding motility. ومجموعة أخرى هى المجموعة الخضراء التى تقوم بالتمثيل الضوئى ومجموعة بكتريا الكبريت

استعمال الأمونيا فى المياه المحتوية على كلور لانتاج الكلورامين أو الاستعمال للتحكم فى تكون التراى هالوميثان Trihalomethanes ربما ينشط بعض بكتريا النترته Nitrifying

bacteria فى المياه لأكسدة الزيادة من الأمونيا الى نيتريت. ونتيجة لعمل هذه البكتريا، فانها تكون لزوجة على حوائط المواسير والتى تسقط Slough على فترات وتظهر فى مياه الصنبور بالمنزل. سلالات من النيتروزوموناس Nitrosomonas هى الشائعة من بكتريا النترته ومشاركة فى تكون المادة اللزجة ، ولكنها قد تكون مصحوبة بكائنات أخرى مثل البكتريا العصوية Bacillus، الكروية Micrococcus،سيدوموناس Pseudomonas , و أكروموباكتر Achromobacter تكون مسئولة عن نمو الطيقة اللزجة فى نهايات شبكة التوزيع. ومصدر هذه الكائنات ربما يكون اما مياه المصدر أو التربة والتى تدخل الى المواسير خلال الانشاء والاصلاح.

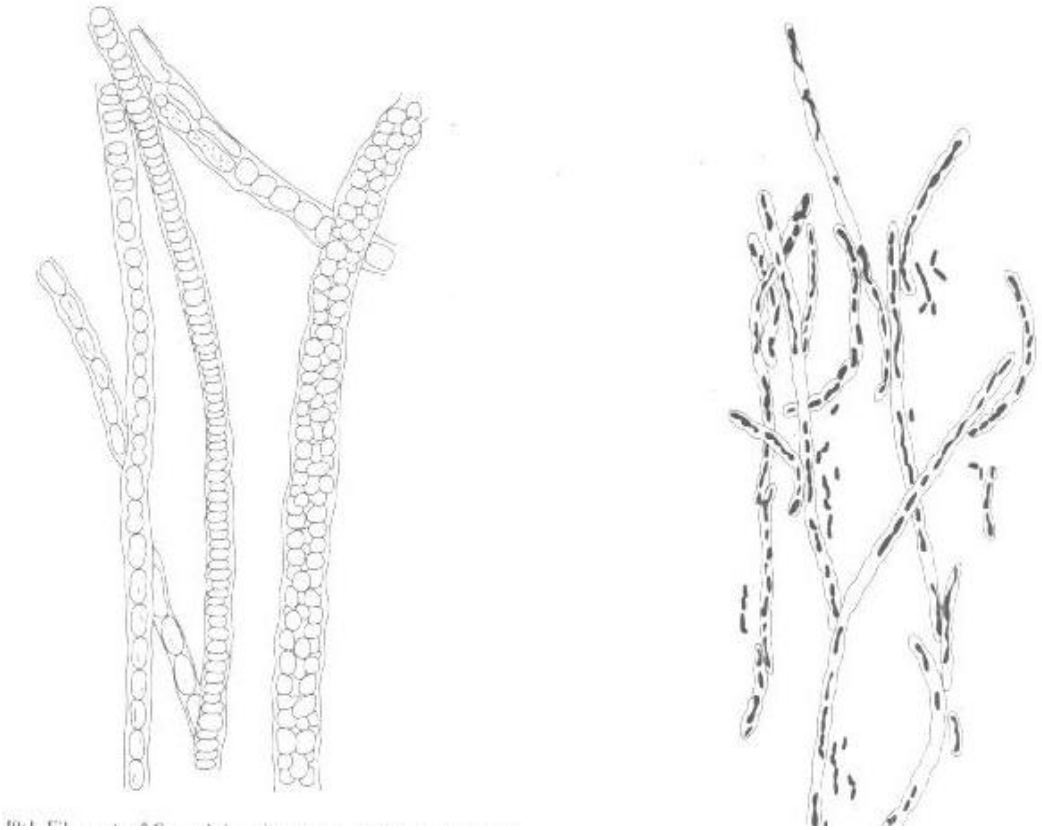
- **البكتريا البغيضة فى المياه الجوفية تتسبب فى مشكلة خاصة حادة فى مصادرالمياه الجوفية،** وتؤثر ليس فقط على الناحية الجمالية(الطعم، اللون، و الرائحة) ولكن تنتج أيضا الفيلم الحيوى Biofilm والذى يحد من حركة المياه خلال المواسير المبطنة للبئر أو فى مواسير التوزيع. والعوامل المشاركة فى تآكل خطوط المواسير أو تتداخل مع عمليات استخراج المياه الجوفية تشمل التركيزات المرتفعة من مركبات الحديدوز والمنجنيز Manganou ، الكبريتيدات أو غيرها من الأملاح الغير مؤكسدة بالكامل Incompletely. oxidized minerals هذه المواد الغير عضوية ربما تتواجد طبيعيا فى التربة وترشح الى المياه. والمصادر الأخرى تدخل خلال نزوح أو ارتحاح التلوث أو يتواجد فى تآكل مواسير الحديد.

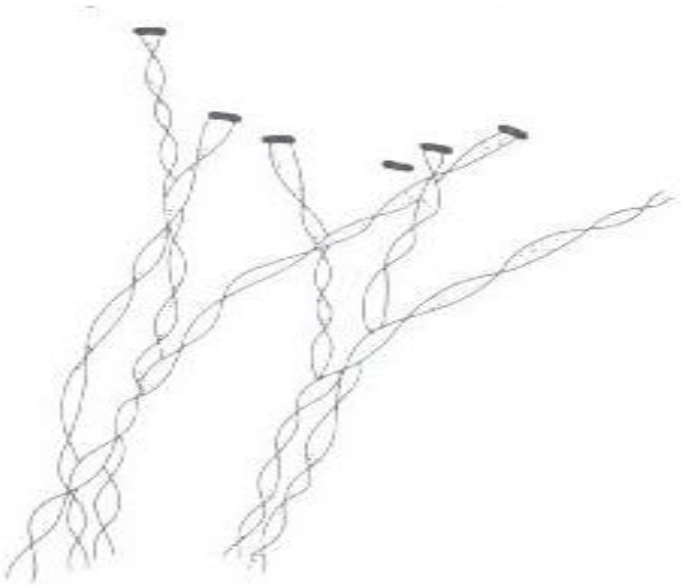
لأن المياه الجوفية عادة ما تكون مستنزفة الأكسيجين الذائب، فان النشاط الميكروبى يتواجد فى المواسير المبطنة للبئر Well casing، على جدران الخزان أو فى مواقع أخرى فى النظام عندما تكون هناك فرصة تلامس للهواء مع المياه اللاهوائية. وعند هذه المواقع، فان البكتريا المتلفة أو الكريهة Fouling bacteria) Sphaerotilus, Leptothrix, Crenothrix, Gallionella) تصبح فعالة، وتستعمل مصادر المغذيات الغير عضوية المتاحة، وبالتالى تسبب ترسب الحديدوز. هذه الرواسب من أكسيد الحديد أو أيدروكسيد الحديد على سطح خلايا البكتريا يكون طبقة حماية والتى نضعف من فعالية عملية التطهير. والتغيرات الأخرى الغير مرغوبة تشمل اكساب المياه مظهر الصدأ البنى أو الأسود ونشوء طعم يجعل مصدر المياه غير مستساغ. وبالنظر الى المشاكل المتسببة والمنتشرة عالميا من البكتريا البغيضة ، فانه من المدهش أن القليل معروف عن كثافة تواجدها فى مصادر المياه الخام.

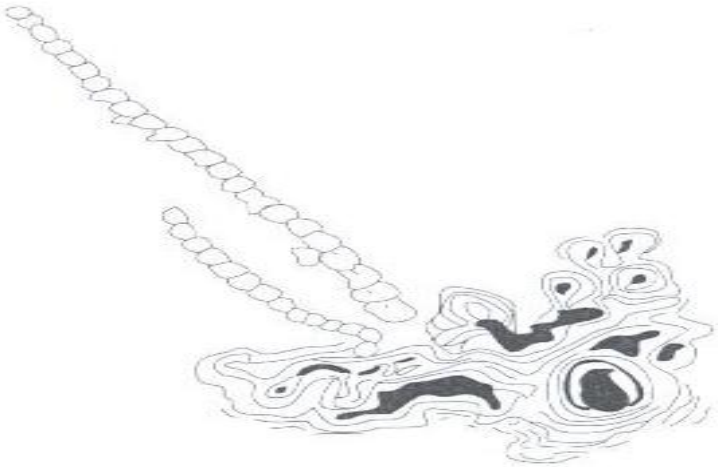
أولا :بكتريا الحديد Iron Bacteria

- **جمع العينات والتصنيف Collection of Samples and Identification**

أمثلة على بكتريا الحديد تظهر فى الأشكال التالية:







تصنيف بكتريا الحديد البغيضة يعتمد عادة على الفحص الميكروسكوبى للمادة المشتبه فيها. اختبر الحماة المنشطة، النمو الميكروبى الكثيف فى البحيرات، الأنهار، النهيرات، والنمو اللزج فى مياه أبراج التبريد. الاشتباه فى نشوء بكتريا الحديد فى ميا ه الآبار أو فى نظم التوزيع ربما يحتاج الى مجهود خاص لتأمين عينات للتصنيف.

رسب أو اجر طرد مركزى على العينات المسحوبة مباشرة من آبار واختبرالرواسب ميكروسكوبيا. ضع جزء من الراسب على شريحة ميكروسكوبية، غطها بغطاء شريحة ، واختبر تحت القوة الصغرى للميكروسكوب للخيوط وقشورالحديد الخيطية. المواد الحجوزة على الفلتر والمتواجدة فى امام خلفية صمام العوامة تعتبر عينات ممتازة لبكتريا الحديد. مياه طلمبات الآبارربما تمر خلال أغشية ترشيح 0,45 ميكرون ويختبر الفلتر بعد جفافه ميكروسكوبيا ويجعل شفاف بواسطة اضافة زيت السيدر الى الفلتر مباشرة. والميكروسكوب العاكس Phase contrast microscope جعل من السهل اجراء عملية الفحص دون صبغ. استعمل الحبر الهندى India ink أو لاكتوفبنول الأزرق للصبغ فى حالة استعمال الميكروسكوب العادى بالاضاءة. ويمكن ايضا ملاحظة بكتريا الحديد باستخدام Epifluorescence microscope .

الرواسب الكثيفة من الحديد التى تنشأ بأكسدة الحديدوز بالهواء أو بالتغيرات البيئية الأخرى غالبا ما تحجب الأغماد أو السويقات من بكتريا الحديد. الخلايا فى الخيوط غالبا تموت وتتحلل والخيوط تميل الى التجزئة أو الصحن بواسطة كتلة الحديد المترسب.

لاذابة رواسب الحديد يمكن استخدام حامض الهيدروكلوريك قوة 1 نورمال أو مركبات مختزلة مثل صوديوم اسكوربيت Sodium ascorbate وبالتالى يمكن رؤية التركيب الخلوى. ولتفرقة المادة الحديدة، أضف محلول من Potassium ferrocyanide الى عينة على غطاء شريحة فى وجود حامض الهيدروكلوريك فيتكون لون أزرق بروسيا فى الحديد حول الخلايا أو يذيب الخيوط.

طريقة الشريحة العائمة أوالمعلقة ربما تستعمل لتقدير وجود الخيوط أو بكتريا الحديد الأخرى. وفى طريقة التعويم ثبت شريحة ميكروسكوب زجاجية فى قطعة فلين ودعها تعوم لمدة يوم الى يومين على سطح مياه مأخوذة من المصدر. الشرائح ربما تعلق بسلك أو خيط على أعماق مختلفة فى المياه لفترات مختلفة قبل ازالتها وفحصها ميكروسكوبيا لوجود بكتريا الحديد (Wojcik,& Wojcik, 1986) . نشأت طريقة زراعة تسمى اختبار تواجد بكتريا الحديد Iron bacteria presence test للكشف عن بكتريا الحديد (Cullimore & McCann, 1977).

ويمكن أن تصنف الكائنات بمقارنتها بأشكال بكتريا الحديد الفوتوغرافية.

References on Iron Bacteria:

Wojcik, W. & Wojcik, M. 1986. Monitoring biofouling . In: D.R. Cullimore, ed. Proc InternationalSymposium on biofouled Aquifers: Prevention and Restoration. American Water Resoueces Assoc. Bethesida, Md.

Cullimore, D.R. & McCann, A.E. 1977. The identification, cultivation and control of iron bacteria in ground water. In: F.A. Skinner & J.M. Shewan. Eds. Aquatic Microbiology. Academic Press. New York, N.Y.

Lueschow, L.A. & Mackenthun, K.M. 1962. Detection and enumeration of iron bacteria in municipal water supplies. J. Amer. Water Works Assoc. 54: 751.

Strockes, J.L. 1954. Studies on the filamentous sheathed iron bacterium Sphaerotilus natans. J. Bacteriol. 67:278.

Kucera, S. & Wolfe, R.S. 1957. A selective enrichment method for Gallionella ferruginea. J. Bacteriol. 74: 344.

Wolfe, R.S. 1958. Cultivation, morphology, and classification of the iron bacteria. J. Amer. Water Works Assoc. 50:1241.

Wolfe, R.S. 1960. Microbial concentration of iron and manganese in water with low concentration of these elements. J. Amer. Water Works Assoc. 52:1335.

Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfenning, N. & Holt, J.G., eds. 1989. Bergy's Mannual of Systematic Bacteriology. Vol. 3. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

Ghiorse, W.C. 1984. Biology of iron and manganese depositing bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 38;515.

ثانيا: بكتريا الكبريت Sulfur Bacteria

- **الخواص العامة General Characteristics**

البكتريا التى تؤكسد أو تختزل كميات محسوسة من مركبات الكبريت الغير عضوية لها اشكال وخواص كيماوية حيوية مختلفة. مجموعة البكتريا المختزلة للكبريتات تتركب أساسا من خلية واحدة تنمو لاهوائيا وتختزل الكبريتات SO_4^{2-} الى كبريتيد الأيدروجين H_2S. عضو من هذه المجموعة، Desulfonema عديد الخلايا وله حركة انزلاقية gliding motility.

مجموعة ثانية من بكتريا الكبريت، هى مجموعة بكتريا التمثيل الضوئى Photosynthetic الخضراء والارجوانية، تنمو لاهوائيا فى وجود الضوء وتستعمل كبريتيد الأيدروجين كمعطى للأيدروجين Hydrogen donor للتمثيل الضوئى.

وأعضاء مجموعة ثالثة عديمة اللون خيطية Myxotrophic تستعمل مصادر عضوية من الكربون ولكن ربما تحصل على الطاقة اللازمة من أكسدة مركبات الكبريت المختزلة. الكبريتيدات تأكسدت الى كبريت أو كبريتات.

المجموعة الرابعة، هى المجموعة المؤكسدة هوائيا للكبريت ، وهى تؤكسد مركبات الكبريت المختزلة هوائيا للحصول على الطاقة للنمو من خلال الأكسدة الكيميائية للمواد البسيطة الغير عضوية Chemoautotrophic.

من بكتريا الكبريت الهامة فى مجال المياه والمخلفات السائلة هى البكتريا المختزلة للكبريتات Sulfate-reducing bacteria والتى تشمل Desulfovibrio ، والبكتريا وحيدة الخلية الهوائيه المؤكسدة للكبريت من جنس Thiobacillus. البكتريا المختزلة للكبريتات تساهم بدرجة كبيرة عمليات التآكل فى خطوط المياه وكذلك تسبب مشاكل الطعم والرائحة فى المياه. الثيوباسيلس من خلال انتاجها لحامض الكبريتيك، تساهم فى تكسير خطوط الصرف الخرسانية وكذلك التآكل الحامضى للمعادن.

- **جمع العينات والتصنيف Collection of Samples and Identification**

تصنيف بكتريا الكبريت البغيضة عادة يجرى على أساس الفحص الميكروسكوبى للمواد المشكوك فيها.

اختبر عينات من المواد اللزجة المعلقة فى المياه، مسحات من السطوح المعرضة لهذه المواد اللزجة، أو الرواسب مباشرة.

ثلاثة مجاميع من بكتريا الكبريت ربما تلاحظ ميكروسكوبياك بكتريا الكبريت الخضراء والارجوانيه، وبكتريا الكبريت عديمة اللون الغير خيطية، الكبيرة.
المجموعة الرابعة، تتركب من البكتريا المختزلة للكبريتات والبكتريا المؤكسدة للكبريت من جنس ثيوباسيلس لا يمكن تصنيفها من المظهر فقط.

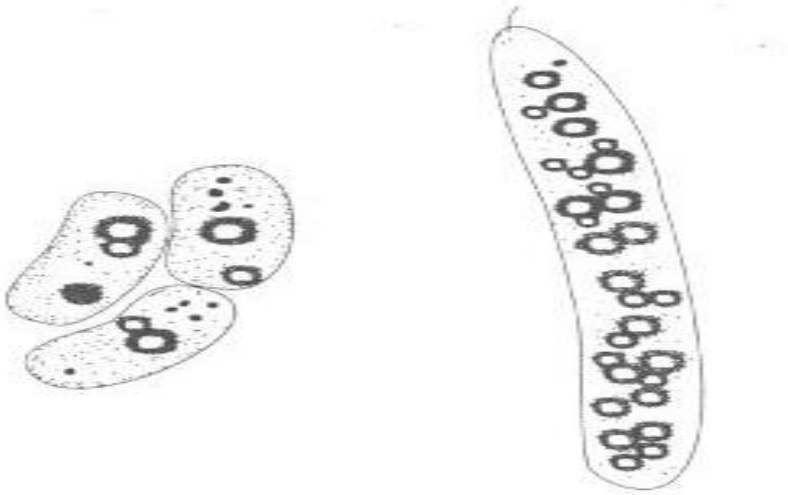
2 . 1 . بكتريا الكبريت الخضراء والارجوانية

2 . 1 . 1 . بكتريا الكبريت الخضراء Green sulfur bacteria

تتواجد غالبا فى المياه المحتوية على كبريتيد الأيدروجين. وهى صغيرة، بيضية Ovoid الى عصوية فى الشكل، غير متحركة ، عامة أقل من 1 ميكرون فى القطروتكون كتل صفراء مخضرة فى اللون. جسيمات الكبريت نادرا ان لم يكن لا تترسب فى الخلايا.

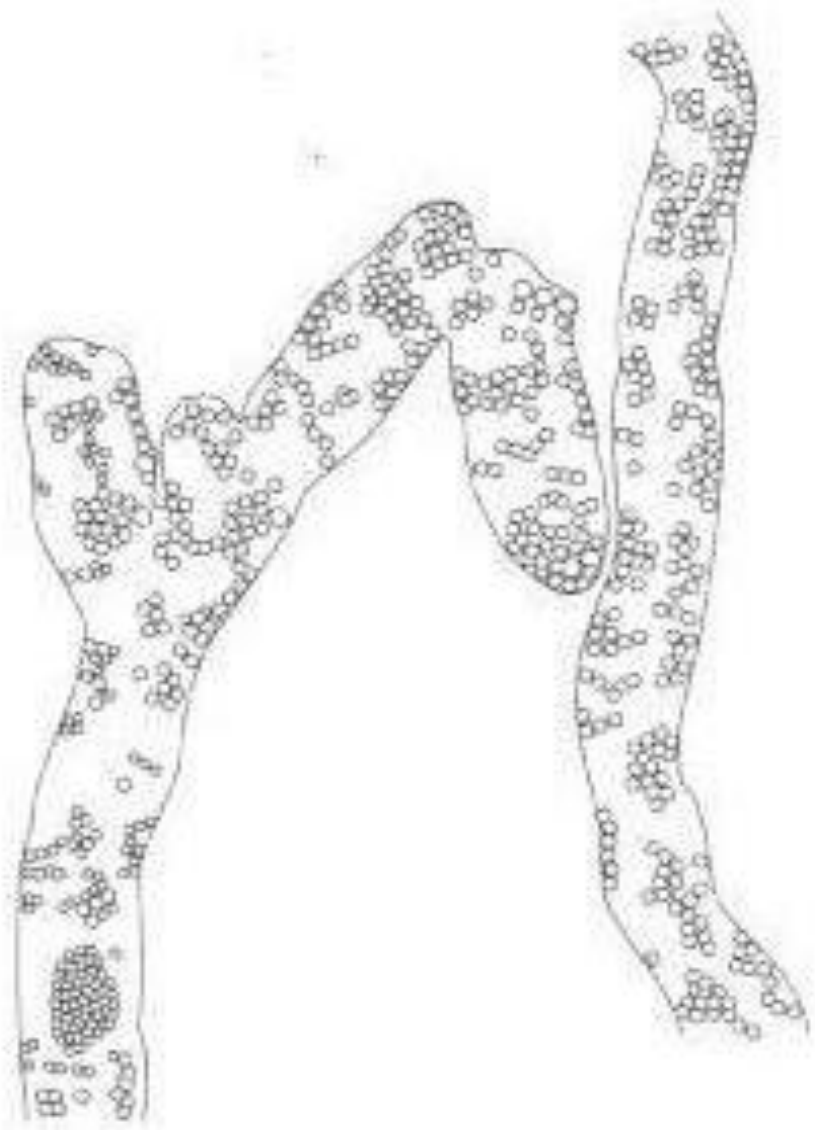
2 . 1 . 2 . بكتريا الكبريت الارجوانيه Purple sulfur bacteria

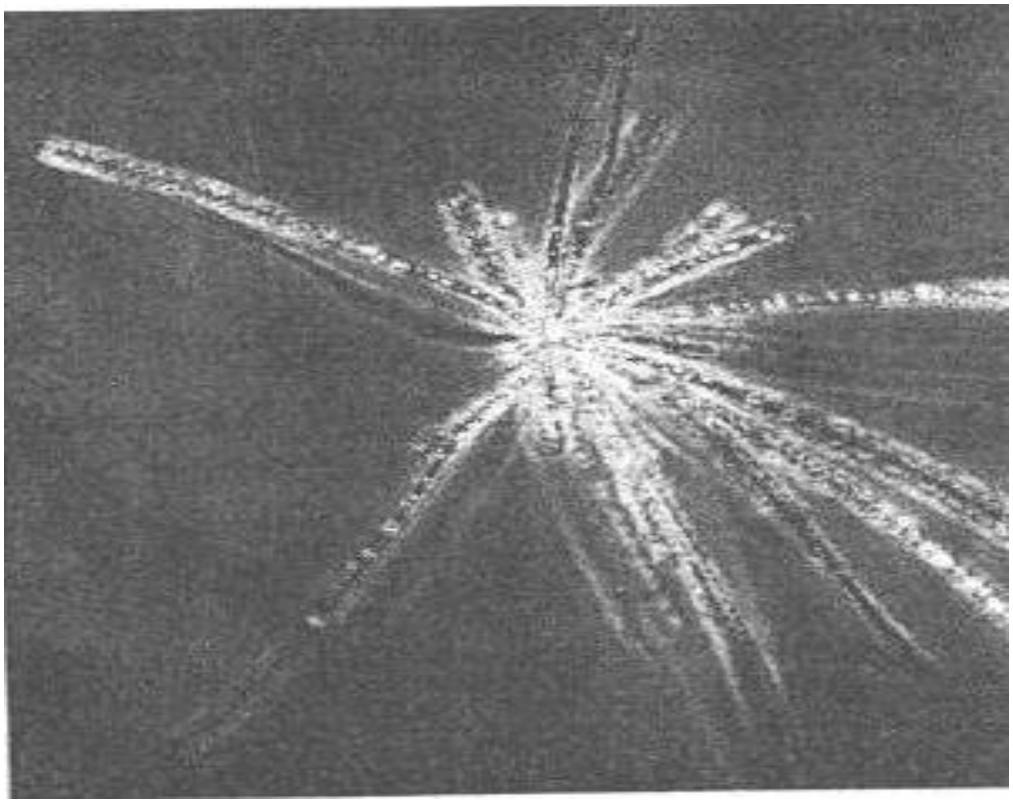
تتواجد فى المياه المحتوية على كبريتيد الأيدروجين. وهى كبيرة، بها حبيبات الكبريت وغالبا صبغات كثيفه تجعل الخلايا تبدو حمراء. كتل كبيره كثيفة وملونة ترى بالعين المجردة بسهولة. وجود البكتريا التى تقوم بالبناء الضوئى فى تركيزات متكتلة يمكن أن تؤكد باستخلاص الكتلة ويمسح Scanning المستخلص فى منطقة الانفرا ريد Infrared. الكلوروفيل البكتيرى سيمتص بقوة فى مجال 660 – 870 نانومتر.



2 . 2 . بكتريا الكبريت الخيطية عديمة اللون Colorless filamentous sulfur bacteria

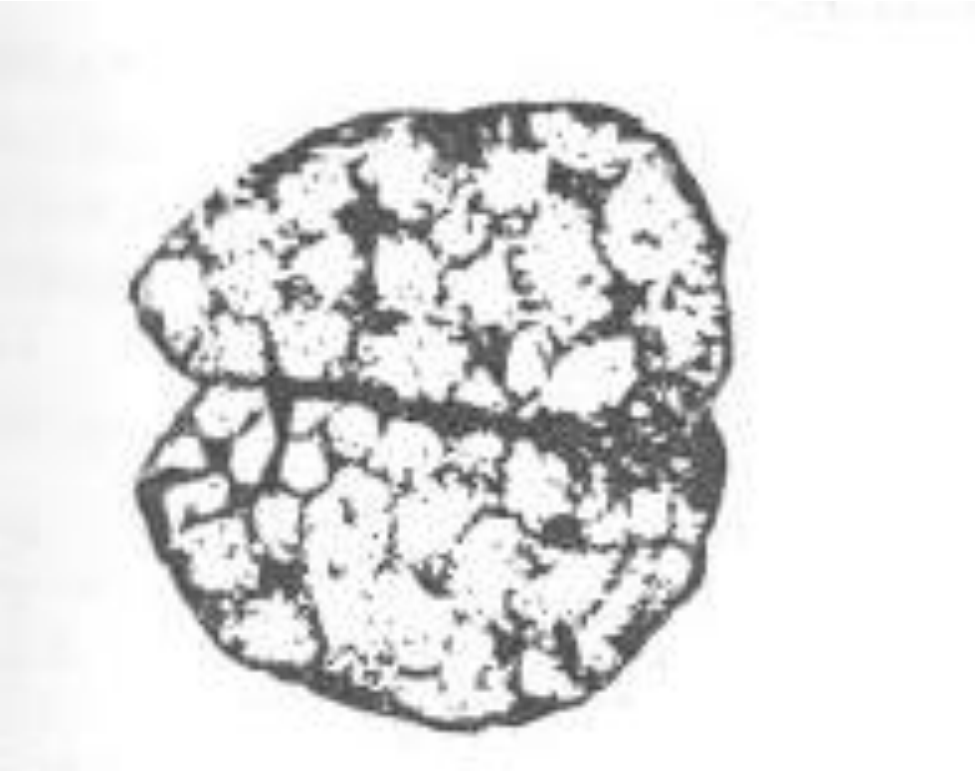
بكتريا الكبريت الخيطية عديمة اللون والتى تظهر فى الأشكال التالية تتواجد فى المياه عند تواجد كلا من الأكسجين وكبريتيد الأيدروجين . ربما تكون جدائل أو بساط لها مظهر أبيض مصفر قليلا راجع الى ترسيب حبيبات الكبريتالداخلية. وهى عموما كبيرة وربما تكون متحركة بالحركة الانزلاقية Gliding movement. وتصنف بالمقارنه بالصور المتاحة.





2 . 3 . بكتريا الكبريت عديمة اللون الغير متشعبة Colorless nonfilamentous sulfur bacteria

بكتريا الكبريت عديمة اللون الغير متشعبة (الشكل التالى كمثال) عادة تكن مرتبطة بالطحالب المتحللة. متحركة، بيضية الى عصوية الشكل مع وجود حبيبات الكبريت وكربونات الكالسيوم كرواسب. وهى عامة كبيرة جدا.



2 .4 . بكتريا الكبريت عديمة اللون الصغيرة والبكتريا المختزلة للكبريتات

Colorless small sulfur bacteria and sulfate-reducing bacteria

خلاياها صغيرة مفردة والبكتريا المختزلة للكبريتات مثل Thiobacillus spp. Desulfovibrio لا يمكن تصنيفها بالفحص الميكروسكوبى. أنواع الثيوباسيلس صغيرة، عديمة اللون، متحركة، عصوية الشكل وتتواجد فى البيئة المحتوية على كبريتيد الأيدروجين. جسيمات الكبريت غائبة. وتصنيف أنواع الثيوباسيلس Thiobacills ، ديسلفوفبريو Desulfovibrio وغيرها من البكتريا المختزلة للكبريتات يتم فسيولوجيا .

References

Lackey, J.B. & Lackey, E.W. 1961. The habitat and description of a new genus of sulfur bacterium. J. Gen. Microbiol. 26: 28.

Faust, L. & Wolfe, R.S. 1961. Enrichment and cultivation of Begiottoa albas. J. Bacter. 81: 99.

Morgan, G.B. & Lackey, J.B. 1965. Ecology of a sulfuretum in a semitropical environment. Z. Allg. Mikrobiol. 5: 237.

Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfenning, N. & Holt, J.G. 1989. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 3. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

الفصل الثـــانى

عد، تخصيب، وعزل بكتريا الحديد والكبريت
Enumeration, enrichment, and Isolation of Iron and Sulfur Bacteria

الفصل الثانى

عد، تخصيب، وعزل بكتريا الحديد والكبريت

Enumeration, enrichment, and Isolation of Iron and Sulfur Bacteria

لا توجد وسيلة جيدة لعد بكتريا الحديد والكبريت بخلاف البكتريا المختزلة للكبريتات و Thiobacilli. الزراعة والعزل المعملى لمزارع نقية صعب والنجاح فى العزل غير مؤكد. هذا صحيح على وجه خاص بالنسبة لمحاولات عزل البكتريا الخيطية من الحمأة المنشطة أو مصادر أخرى حيث يتواجد العديد من أنواع البكتريا المختلفة.

1 . البيئة Media

1 . 1 . Casitone-glycerol-yeast autolysate broth (CGY) for the Sphaerotilus group:

هذه البيئة ربما لا توجد جاهزة لذلك تحضر من مكوناتها وربما تحضر فى صورة صلبة باضافة 1,5% آجار.

Casitone	5 g
Glyserol	10 ml
Yeast autolysate	1 g
Reagen-grade water	1 L

1 . 2 . بيئة عزل (بكتريا الحديد) Isolation medium (iron bacteria)

Glucose	0.15 g
Ammonium sulfate $(NH_4)_2 SO_4$	0.5 g
Calcium nitrate, $Ca(NO_3)_2$	0.01g
Dipotassium hydrogen phosphate, K HPO	0.05 g
Magnesium sulfate, $MgSO_4 .7H_2 O$	0.05 g

Potassium chloride, KCl	0.05 g
Calcium carbonate, $CaCO_3$	0.1 g
Agar	10.0 g
Cyanocobalamin	0.01 g
Thiamine	0.4 g
Reagent-grade water	1 L

1 . 3 . بيئة الابقاء لبكتريا الحديد Maintenance (SCY) medium (iron bacteria)

Sucrose	1 g
Casitone	0.75 g
Yeast extract	0.25 g
Trypticase soy broth without dextrose	0.25 g
Agar	10.0 g
Thiamine	0.4 g
Cyanocobalamin	0.01 g
Reagent-grade water	1 L

1 . 4 . Mn agar no.1

Manganous carbonate, $MnCO_3$	2 g
Beef extract	1 g
Ferrous ammonium sulfate, $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$	150 mg
Sodium citrate	150 g
Yeast extract	75 mg
Cyanocobalamin	0.005 mg
Agar	10 g
Reagent-grade water	1 L

حضر وعقم البيئة بدون Cyanocobalamin.

غقم Cyanocobalamin بالترشيح وضفه قبل تصلب البيئة.

1 . 5 . Mn agar No. 2

حضر بيئة حديثة كل مرة من المكونات

Manganous sulfate, $MnSO_4 .H_2O$	10 mg
Agar	15 g
Natural water	1 L

1 . 6 . بيئة الحديد المؤكسد Iron Oxidizing medium (Thiobacillus ferroxidants)

Basil salts:

Ammonium sulfate, $(NH_4)_2 SO_4$	3 g
Potassium chloride KCl	0.1 g
Dipotassium hydrogen phosphate $K_2 HPO_4$	0.5 g
Magnesium sulfate, $MgSO_4 .7H_2O$	0.5 g
Calcium nitrate $Ca(NO_3)_2$	0.01 g
$H_2 SO_4$. 10 N	1 mL
Energy source:	
Reagen-grade water	700 mL
Ferrous sulfate, $FeSO_4 . 7H_2O$, 14.74 % solution (w/v) ……	300 mL

عقم منفصلا كلا من مصدر الطاقة والأملاح الأساسية واخلطهم عندما يبردا. خزن فى الثلاجة ووتخلص من المتبقى بعد اسبوعين. سيتكون راسب والبيئة ستكون براقة وخضراء. يجب أن يكون pH بين 3 و 3,6.

1 . 7 . آجار كبريتيد الحديدوز Ferrous sulfide agar (Gallionella ferruginea)

Agar layer:

Ferrous sulfide, FeS (washed precipitate and liquid)	500 mL
Sodium sulfide, $Na_2 S$	15.6 g
Ferrous ammonium sulfate $Fe(NH_4)_2 (SO_4)_2 6H_2O$	78.4 g
Boiling reagent-grade water	1 L
Agar (liquid) (30 g/L)	500 mL
Liquid overlay:	
Ammonium chloride $NH_2 Cl$	1 g
Dipotassium hydrogen phosphate$K_2 HPO_4$	0.5 g
Magnesium sulfate, $MgSO_4 .7H_2 O$	0.2 g
Calcium chloride , $CaCl_2$	0.1 g
Reagent-grade water ……	1 L

حضر Fe S بتفاعل كميات عيارية متساوية من Na_2S مع $Fe(NH_4)_2 (SO_4)_2$ فى مياه تغلى Reagent-grade water. دع الراسب يستقر من المحلول الساخن فى زجاجة مملوءة تماما ومغلقة

باحكام Stoppered. اغسل الراسب 4 مرات وصفى الجزء العلوى واجع ماء مغلى يحل محله. خزن FeS فى زجاجة محكمة الغلق ومملوءة الى النهاية بماء مغلى اضافى.
أضف حجوم متساوية من FeS، 3% آجار عند 45 درجة مئوية. حضر بيئة مائلة فى أنابيب ذات غطاء قلاووظ. حضر المحلول المغطى Liquid overlay،أمرر ثانى أكسيد الكربون خلالها لمدة 10 – 15 ثانية، وأضف بضع ملل الى بالآجار المائل.

الاختلاف فى البيئة الأساسية Basic medium يحتاج اضافة 5, ملل فورمالين (محلول 40% فورمالدهيد) الى زجاجات تخفيف ذات غطاء قلاووظ تحتوى 10 ملل FeS آجار ، 100 ملل بيئة التغطية السائلة. أضف 001, % بروموثيمول بلو ، 004, % بروموكريزول بيربل الى سائل التغطية.

1

. 8 . بيئة اختزال الكبريتات Sulfate-reducing medium

Sodium lactate	3.5 g
Beef extract	1.0 g
Peptone	2.0 g
Magnesium sulfate, $MgSO_4. 7H_2O$	2.0 g
Sodium sulfate , $Na_2 SO_4$	1.5 g
Dipotassium hydrogen phosphate, $K_2 HPO_4$	0.5 g
Ferrous ammonium sulfate , $Fe(NH_4)_2 (SO_4)_2 .6H_2O$	0.392 g
Calcium chloride, $CaCl_2$	0.10 g
Sodium ascorbate	0.10 g
Reagent-grade water	1 L

pH يجب أن يكون 7,5 +/- 03, بعد التعقيم.
حضر البيئة مع استبعاد Ferrous ammonium sulfate ، أسكوربات الصوديوم ، وزع فى أنابيب اختبار ذات غطاء قلاووظ ، وعقم. للاستعمال يجب أن تكون الأنابيب ممتلئة تماما ؛ ولذلك، عقم فى دورق بيئة اضافية لاضافتها الى الأنابيب. وفى يوم الاستعمال، حضر محلول Ferrous ammonium sulfate منفصل (3,92 جرام/100 ملل) وأسكوربات الصوديوم (1 جرام/100 ملل) ، عقم بامرار المحلول خلال غشاء ترشيح Membrane filter 0.45 micron، وبطريقة معقمة أضف 01, ملل من كل محلول/ 10 ملل من البيئة الأساسية Basal medium.

الفصل الثـــالث

بكتريا الحديد
Iron Bacteria

الفصل الثالث

بكتريا الحديد Iron Bacteria

1 . Sphaerotilus-Leptothrix

1 . 1 . بكتريا الحديد، خاصة تلك التى تنتمى الى مجموعة Sphaerotilus-Leptothrix، تزدهر فى البيئة شديدة التخفيف والتى تدعم تكاثر الكائنات سريعة النمو. وأحد البيئات الانتخابية جزئيا Partially selective لبكتريا Sphaerotilus (BOD dilution water مدعمة بصوديوم لاكتات 100 مجم / اللتر). توزع البيئة فى زجاجات مربعة French square bottles وتعقم عند ضغط 60 kPa لمدة 15 دقيقة. ولحقن العينة أضف 25 ملل من مياه المجرى أو 1 ، 5 ، 10 ملل من مياه المخلفات السائلة الساكنة الى زجاجات مزدوجة من البيئة. حضن عند 22 الى 25 درجة مئوية لمدة 5 أيام ولاحظ النمو الخيطى. اعزل مزرعة نقية عن طريق التقاط خيط من بيئة BOD lactose broth والتخطيط على 0,05% Meat extract agar. بعد التحضين لمدة 24 ساعة على 25 درجة مئوية، التقط خيط نموذجى متجعد بمساعدة ميكروسكوب تشريحى Dissecting microscope وانقل الى Casitone-glycerol-yeast autolysate broth. ذا تكون غشاء رقيق Pellicle دون عكارة أسفله خلال 2 – 3 أيام، انقل خيط الى Casitone –glycerol-yeast autolysate agar على صورة مائلة Slant، حضن عند 25 درجة مئوية حتى يرى نمو، وخزن فى الثلاجة. وربما يضاف مستخلص قش نبات ألفا ألفا أو البسلة للتخصيب.

1 . 2 . بيئة العزل والحفظ طورت بنجاح لتصنيف المجاميع المختلفة من الكائنات الخيطية وتشمل بكتريا الحديد. حضر آجار مائل من هذه البيئة وبطريقة معقمة قطر 3 ملل من مياه الصنبور المعقمة والمزال منها الكلور Dechlorinated على سطح الآجار المائل. لقح أنابيب وحضن عند درجة حرارة الغرفة حتى ملاحظة العكارة الناتجة عن النمو فى الطبقة السائلة. والخلايا تظل حية لمدة 3 شهور فى الثلاجة.

1 . 3 . بيئة حفظ أخرى لزراعة مجموعة Sphaerotilus هى بيئة Casitone-glycerol-yeast autolysate (CGY).

1 . 4 . Leptothrix (Sphaerotilus discophorous) يمكن أن تفرق عن Sphaerotilus natans بالقدرة على أكسدة أيونات المنجنيز. استعمل Mn agar No. 1 كبيئة تفرقة. كبديل،فان Leptothrix ربما تنو عن طريق الزرع المباشر على MN agar No. 2.

2 . Thiobacillus ferrooxidans :

على الرغم من أن هذا الكائن هو أيضا بكتريا مؤكسدة للكبريت، فان أهميته الأساسية فى مخلفات المناجم الحامضية. والبيئة المناسبة لتقدير الأعداد الاحتمالية MPN فى المتناول. بعض أكسدة للحديد تحدث خلال التعقيم ولكن الفقد فى أيونات الحديدوز لا يمكن تقديره. والبيئة يكون بها راسب (من المحتمل أن يكون فوسفات الحديدوز والحديديك) براق وأخضر، ذا pH 3 – 3,6 ويحتوى 9جرام/ اللتر أيونات الحديدوز. نمو الكائن يظهر بالاخفاض فى pH وزيادة تركيز الحديد المؤكسد. وباستعمال مرجعيات غير ملقحة، فان زيادة فى اللون البرتقالى –البنى يمكن أن يرى فى الأنابيب او الدوارق المخصبة الموجبة مقارنة بالسلبة. هز أنابيب اختبار التخفيفات يوميا لأن هذا الكائن هوائى.

3 . Gallionella ferruginea :

لزرع هذا الكائن استعمل Ferrous sulfide agar. احقن أنابيب بقطرة من معلق الرواسب المشكوك فى أنها تحتوى على جاليونيلا. والنمو على درجة حرارة الغرفة يحتاج الى 18 – 36 ساعة ويظهر كرواسب بيضاء على جوانب انبوبة الاختبار. حلقة المستعمرات تتواجد على مستوى معين يعكس التوازن ما بين الانتشار الى أعلى upward diffusion لأيونات الحديدوز والانتشار الى أسفل لجزيئات الأكسجين. وربما ينجح عزل مزرعة نقية من خلال اضافة الفورمالين الى Ferrous sulfide agar.

4 . بكتريا الحديد الأخرى Other iron bacteria:

عزلت Metallogenium المؤكسدة للحديد والقادرة على تحمل الحموضة (pH 3.5 – 5.0) باستعمال بيئة تحتوى على :

$(NH_4)_2 SO_4$, 0.1% ,
CaCO3, 0.01%,

$MgSO_4$, 0.02%,
$K_2 HPO_4$, 0.001%,
Potassium acid phthalate, o.4%,
and 250 mg/L ferrous iron from acidified
$FeSO_4$ .7 H_2 O,solution

أضف 4, . % فورمالين الى 100 ملل من البيئة فى دورق 250 ملل.

فى حالة بكتريا الحديد الهتيروتروفية المرسبه استعمل بيئة Ferric ammonium citrate تتركب من: $(NH_4)_2 SO_4$, 0.5 g/L ; $NaNO_3$, 0.5 g/L; K_2HPO_4 0.5 g/L $MgSO_2$.$7H_2O$,0.5 g/L; and ferrous ammonium citrate 10 g/L.

أضبط pH عند 6,6 الى 6,8 وعقم. ولجعل البيئة صلبة أضف 15 جرام آجار/ اللتر.

وكبديل تنمى بكتريا الحديد بخلط 20 ملل بيئة مرق، 10 ملل ماء خام أو عينه، 3 جرام أكسيد حديد Iron oxide. حضن لمدة 48 – 72 ساعة على 25 درجة مئوية على هزاز لانتاج نمو مرئى.

الفصل الرابع

بكتريا الكبريت
Sulfur Bacteria

الفصل الرابع

بكتريا الكبريت Sulfur Bacteria

1 . البكتريا المختزلة للكبريتات Sulfate-reducing bacteria

1 . 1 . لتنمية البكتريا المختزلة للكبريتات مثل Desulfovibrio ، استعمل بيئة اختزال الكبريتات sulfate-reducing medium (Lewis, 1965).

احقن الأنابيب واملأها تماما بالبيئة المعقمة لايجاد ظروف لاهوائية. للمقارنة، حضن مرجعيات غير محقونة. بالنسبة للعينات ذات الحجم أكبر من 10 ملل، مرر العينة خلال غشاء مرشح Membrane Filter 45,. ميكرون وانقل الفلتر الى بيئة فى انبوبة ذات غطاء قلاووظ. اذا تواجدت البكتريا المختزلة للكبريتات، سوف تظهر الأنابيب لون اسود خلال 4 – 21 يوم من التحضين عند 20 – 25 درجة مئوية.

1 . 2. هناك بيئة محتوية على الآجار مناسبة لتنمية (Iverson, 1966) وعد البكتريا المختزلة للكبريتات. البيئة تتركب من:

Trypticase soy agar, 4% , agar 0.5%, 60% sodium lactate (0.4 % v/v); hydrated magnesium sulfate, 0.2%. and ferrous ammonium sulfate, 0.2%.أضبط pH عند 7,2 الى 7,4 وعقم. من الازم أن تكون البيئة رائقة تماما وخالية من أي رواسب. احقن الأطباق خلال 1-4 ساعة من تصلب الأطباق المصبوبة بالبيئة لمنع التشبع بالأكسجين. ولمنع تكثف الرطوبة على أغطية الأطباق البترى، استبدل الأغطية بأغطية امتصاص خلال 10 – 15 دقيقة من بعد تصلب الآجار. ضع الأطباق الغير مقلوبة فى حوض زجاجى أو مجفف واستبدل الهواء بنيتروجين أو هيدروجين بالتفريغ واحلال الغاز. وكبديل، استعمل نظام للتخلص من الأكسجين (GasPak, BBL). حضن على درجة حرارة الغرفة (21-24 درجة مئوية) أو (28-30 مئوية) وهى الدرجة المثلى لتلك الكائنات. النمو وظهور اللون الأسود حول المستعمرات هو الصفة الخاصة بالبكتريا المختزلة للكبريتات وربما يتواجد فى أى وقت بين 2 الى 21 يوم على الرغم من أن الوقت المعتاد هو 2 – 7 أيام.

1 . 3 . هناك بيئات أخرى مناسبة لعد وعزل الاجناس المختلفة من البكتريا المختزلة للكبريتات (Lechevallier & Pramer, 1970; Marra & Williams, 1970, and Kreig & Holt, 1986

2 . Photosynthetic purple and green sulfur bacteria

لأن تلك الكائنات متخصصة ونادرا ما تسبب مشاكل فى عمليات معالجة المياه والمخلفات السائلة، فطرق عزلها وعدها لم نشملها هنا. فى بعض الحالات يمكن أن تكون نافعة لقدرتها على اكسدة كبريتيد الأيدروجين وبالتالى تخفض الروائح. وتركيب البيئات وطرق الزرع لأى من المجموعة يمكن الحصول عليه من المرجع (Pfennig, 1967).

3 . .Thiobacillus spp:

البيئة المناسبة لعد بكتريا Thiobacillus thiooxidans و Thiobacillus thiopurus بطريقة العد الاحتمالى يتم فيها حقن البيئة والتحضين لمدة 4 – 5 أيام على 25 – 30 درجة مئوية. نمو الثيوباسيلس ينتج كبريت معدنى، الذى يترسب فى القاع مع انخفاض فى pH وعكارة البيئة. والاختبار الكيميائى لتكون الكبريتات يلزم اجراؤه لتأكيد وجود Thiobacillus.

4 . البكتريا الخيطية المؤكسدة للكبريت Filamentous sulfur-oxidizing bacteria

1 . 4 . بيجياتا Beggiatoa

تتواجد البجياتا فى معظم البيئات المائية وتشمل نظم المياه العذبة ومياه البحار، الرواسب والمخلفات السائلة عند تواجد الكبريتيد والأكسوجين (Lackey et al., 1965). ولأن البجياتا بكتريا عديدة الخلايا Multicellular bacterium فلاتوجد طريقة دقيقة لتقدير أعداد الخلايا الحية فى عينة ما. وتقديرها يتم من خلال العد الميكروسكوبى المباشر للخيوط. البجياتا البحرية ربما تكون كبيرة نوعا ما، تصل الى 100 ميكرون أو أكثر فى القطر. لم يمكن تنميتها فى المعمل. وعلى ذلك فان الأجناس البحرية الصغيرة (حتى 5 ميكرون فى

القطر) هى التى تم عزلها. والبيئة اللازمة فى حالة المياه العذبة تختلف قليلا عن تلك الخاصة بالمياه المالحة.

4. 1 . 1 . التخصيب Enrichment– احقن انبوبة لمستخلص القش (التبن) بكمية كافية من الماء وقليل من الطين من موقع العينة لملأ الأنبوبة الى عمف 8 سم على الأقل. تحضن لمدة أسبوع على الأقل وتختبر لتواجد "خصل شعرية Tufts" أو كرات منتفخة "Puff-balls" تتكون من خيوط متشابكة Tangled filamentsمن البجياتا. تختبر بواسطة Phase contrast microscope لوجود الخيوط الفردية. اذا لم تتواجد الكرات المنتفخة، يستكمل التحضين لأسبوع آخر ويعاد الاختبار. ويستمر اختبار المخصب حتى 4 أساييع قبل التخلص منه.

4 1. 2 . العزل **Isolation -** باستعمال ملقط دقيق الطرف معقم مع ميكروميكروسكوب Dissecting microscope ، انقل الخصل الشعرية من البجياتا من بيئة التخصيب الى طبق بترى صغير يحتوى على البيئة الأساسية Basal medium معقمة. رج الخصل الشعرية بالملقط لازالة البكتريا المصاحبة وتنقل الخصل الشعرية الى طبق بترى جديد مع البيئة الأساسية المعقمة. استمر حتى يتم غسل الخصل على الأقل 5 مرات.

انقل الخصل الى طبق جاف يحتوى على البيئة الأساسية مع 1.6% آجار لمدة حوالى دقيقة لازالة المحلول الزائد، بعد ذلك انقل الخصل الى منتصف أطباق منفردة من بيئة MY أو MP

(Strohl & Larkin, 1978, and Larkin, 1980). حضن الأطباق عند درجة حرارة الغرفة أو أقل واختبر بميكروسكوب Dissecting microscope كل 5 – 10 ساعات لوجود البجياتا الخيطية. اختار الخيوط الغير ملوثة وانقلها الى أطباق من نفس البيئة باستعمال ابرة تلقيح معقمة ومفلطحة أو باستعمال خلة الأسنان المعقمة Toothpick.خذ مع نقل الخيط القليل من الآجار لمنع الجفاف. اختبرأطباق النقل الأول كل 5 – 10 ساعات كما سبق وانقل الخيوط النقية الى بيئة جديدة.

البيئة الأساسية Basal medium:

Ammonium chloride,4% solution	5 mL
K_2HPO_4 , 1% solution	1 mL
$MgSO_4 .7H_2O$, 1% solution	1 mL

$CaSO_4 .2H_2O$, saturated solution	20 mL
Trace elements (see below)	5 mL
Reagent-grade water	968 mL

Trace elements العناصر النادرة:

Reagent-grade water	920 mL
$ZnSO_4 .7H_2O$, 0.1 % solution	10 mL
Mn SO_4 .4 H_2O. 0.02% solution	10 mL
$CuSO_4 .5H_2O$.0.00005% solution	10 mL
Boric acid, 0.1% solution	10 mL
Cobalt nitrate , 0.01% solution	10 mL
Sodium molybdate $2H_2O$, 0.01% solution	10 mL
EDTA solution 2% EDTA with 7% ferrous sulfate with 1 mL conc. HCl/100 mL	20 mL

MP agar

Basal medium	1 L
Sodium acetate	0.1 g
Sodium sulfide solution (make up and separately autoclave a 10% solution of Na_2 $S.9H_2O$	3 mL
Agar	15 g

MY agar

Basal medium	1 L
Sodium acetate	0.1 g
Nutrient broth powder	0.1 g
Yeast extract	0.1 g
Sodium sulfide solution (see above)	3 mL
Agar	15 g

أضبط pH بين 7 – 7,5 وسخن لاذاية الآجار. عقم فى الأوتوكلاف لمدة لاتزيد عن 15 دقيقة وبرد فى حمام مائى الى 45 – 50 درجة مئوية. أضف محلول كبريتيد الصوديوم فورا قبل صب الأطباق. اذا كانت البيئة تستعمل فى أنابيب ذات قلاووظ فان الكبريتيد ربما يضاف قبل التعقيم.

4 . 2 . ثيوثريكس Thiothrix– مكسوتروفيك حتما Obligately myxotrophic. عزلت من ينابيع كبريتية ومياه أخرى متدفقة تحتوى على الكبريتيد وعرفت خصائصها. عزلت سلالات هتيروتروفية من الحمأة المنشطة من محطات معالجة المخلفات السائلة وعرفت خصائصها. وبينما أن طريقة عزل كلا من السلالات المكسوتروفيك والهتيروتروفيك متماثلتان نجد أن بيئات العزل تختلف.

4 . 2 . 1 . عزل المكسوتروفيك ثيوثريكس Isolation of myxotrophic Thiothrix

- اجمع خصل شعرية بكتيرية من الصخور، مواسير المياه، أو مصادر أخرى.

وباستعمال ميكروسكوب Dissecting microscopeن التقط خيوط بملقط دقيق الطرف، رج لازالة البكتريا الملوثة، وانقل الى بيئة أساسية Basal medium معقمة. كرر 5 مرات على الأقل لمحاولة الحصول على خيوط قليلة أو عديمة التلوث.

باستعمال Pasteur pipet انقل نقطة الى حافة اطباق MP or MY agar وحرك الأطبق بحيث تجرى النقط من جانب الى الآخر للطبق. اسحب الرطوبة الزائدة بماصة وحضن الأطباق على درجة حرارة الغرفة أو أقل لحوالى 48 ساعة. اختبر الأطباق تحت Dissecting microscope

لظهور مستعمرات خيطية نموذجية. وباستعمال خلة أسنان معقمة ، التقط المستعمرات المنعزلة وانقلها منفردة الى أطباق جديدة من نفس البيئة. خطط المادة المنقولة باستعمال Loop. بعد حوالى 48 ساعة تحضين ، اختبر الأطباق وأعد تخطيط المستعمرات التى تبدوا نقية.

4 . 2 . 2 . عزل الثيوثركس الهتيروتروفية Isolation of heterotrophic Thiothrix

هناك طريقتان مختلفتان للاستعمال، تعتمد على تركيز وحجم خيوط الثيوثركس فى العينة. فى احدى الطريقتان، اغسل الخيوط المفردة أو السلالات الكبيرة الوردية من الثيوثركس العديد من المرات فى مرق MSV، بالنقل باستعمال Pasteur pipet مع الملاحظة باستخدام ميكروسكوب Dissecting microscope. بعد الغسيل المتكرر انقل خيوط الى

كمية صغيرة من MSV (1 – 3 ملل) وازرع على بيئة أو أكثر من البيئات التالية AcS, SS, GS, SUC, J, S, or LT ، اضبط pH عند 7,2 – 7,5. يمكن عمل البيئة على صورة صلبة باضافة 12 جرام آجار.

MSV:

$(NH_4)_2 SO_4$	0.5g
$K_2 HPO_4$	0.11g
$KH_2 PO_4$	0.085 g
$MgSO_4 .7H_2O$	0.1 g
$CaCl_2 .2H_2O$	0.05 g
$FeCl_2 .H_2O$	0.002 g
EDTA	0.003 g
Vitamin mix	1 mL
Reagent-grade water	1 L

Vitamin mix:

Calcium pantothenate	0.01 g
Niacin	0.01 g
Biotin	0.0005 g
Cyanocobalamin	0.0005 g
Folic acid	0.0005 g
Pyridoxine	0.01 g
p-aminobenzoic acid	0.01 g
Cocarboxylase	0.01 g
Inositol	0.01 g
Thiamine	0.01 g
Riboflavin	0.01 g
Reagent-grade water	100 mL

AcS:

Sodium acetate	0.15 g
Sodium sulfide $9H_2O$	0.187 g
MSV	1 L

SS:

Sucrose	0.15 g
Sodium sulfide, $9H_2O$	0.187 g
MSV	1 L

GS:

Glucose	0.15 g
Sodium sulfide 9 H_2 O	0.187 g
MSV	1 L

SUC:

Sodium succinate	0.15 g
MSV	1 L

I :

Glucose	0.15 g
MSV	1 L

S :

Sodium sulfide $9H_2O$	0.15 g
MSV	1 L

LT :

Sodium lactate	.0.5 g

Sodium thiosulfate	0.5 g
MSV	1 L

اذا كانت الخيوط صغيرة أو نادرة ، ركز العينة بالطرد المركزى. خفف 1 : 5 فى MSV ، عامل بالموجات فوق المغنطيسية Sonicate عند 30 وات لمدة 15 ثانية، اغسل 3 مرات بالطرد المركزى عند 1900 Xg لمدة 2 – 5 دقائق. الجزء العلوى Supernatant يحتوى على خيوط حرة والتى تستعمل لتلقيح واحدة أو أكثر من البيئات الصلبة سابقة الذكر.

References on Nuisance Bacteria:

Symons, J.M. 1969. Water Quality Behavior in Reservoirs. PHS Pub. 1930. Cincinnati, OH.

Ridley, J.E., and Symons. 1972. New Approaches to Water Quality Control in Improvements. In: Microbiology of Polluted Waters. R. Mitchell, Ed., Wiley-Interscience, New York.

Walesh, S.G. 1967. Natural Processes and their Influence on Reservoir Water Quality Control. Jour. Amer. Water Works Assoc., 59:63-79. Bemhardt, H. 1967. Aeration of Wahnbach Reservoir without Changing the Temperature Profile. Jour. Amer. Water Works Assoc., 59:943-961.

Tortoriella, R.C. 1971. Manganic Oxide Reduction by Microorganisms in Freshwater Environments. Dissertation Abs. 32:B:3406. Water Poll. Abs. (G.B.) 44:2602.

Lackey, J.B. 1949. Plankton as Related to Nuisance Conditions in Surface Water. In: Limnnological Aspects of Water Supply and Waste Disposal. Amer. Assoc. Advanc. Sci., Washington, D.C. pp. 56-63.

Mackenthun, K.M. and Ingram, W.M. 1967. Biological Associated Problems in Freshwater Environments. U.S. Dept of the Interior, FWPCA, Washington, D.C.

Carmichael, W.W. 1981. Freshwater Blue-Green Algae (Cyanobacteria) Toxins- A Review. In: The Water Environment: Algal Toxins and Health, W.W. Carmichael, Ed., Pleum Press, New York. Pp.1-14.

Izaguirre, G., Hwang, C.J., Krasner, S.W., and McGuire, M.J. 1982. Geosmin and 2-Methylisoborneol from Cyanobacteria in Three Water Supply Systems. Appl. Environ. Microbiol., 43: 708-714.

Medsker, L.L., Jenkins, D., and Thomas, J.F. 1968. Odorous Compounds in Natural Waters. An Earthy-Smelling Compounds Associated with Blue-Green Algae and actinomycetes. Environ. Sci. Technol., 2:461-464.

Montgomery, J.M. Consulting Engineers. 1985. Water Treatment Principles and Design. Wiley-Interscience, New York.

Mackenthun, K.M. 1969. The Practice of Water Pollution Biology. U.S. Department of the Interior. U.S. Government Printing Office, Wahington, D.C.

Cullimore, D.R. and McCann, A.E. 1977. The Identification, Cultivation and Control of Iron Bacteria in Groundwater. In: Aquatic Microbiology, F.A. Skinner and J.M. Shewan, Eds., Academic Press, New York.

Harder, E.C. 1919. Iron-Deposting Bacteria and their Geologic Relations. U.S. Geol. Survey, Prof. Paper 113.

Cliver, D.O. and Newman, R.A. 1987. Drinking Water Microbiology. Jour. Environ. Pathol. Oncol., 7:1-361-366.

Lewis, R.F. 1965. Control of sulfate-reducing bacteria. J. Amer. Water Works Assoc. 57:1011.

Iverson, W.P. 1966. Growth of Desulfovibrio on the surface of agar media. Applied Microbiol. 14: 529.

LeChevallier, H.A. & Pramer, D. 1970. The Microbes. 1st ed. J.B. Lippincott Co., Philadelphia, Pa.

Mara, D.D. & Williams, D.J.A. 1970. The evaluation of media used to enumerate sulfate reducing bacteria. J. Appl. Bacteriol. 33: 543.

Kreeg, N.R. & Holt, J.G. 1986. Bergey's Manual of systematic Bacteriology, Volume 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

Pfennig, N. 1967. Photosynthetic bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 21: 285.

Lackey, J.B., Lackey, W.W. & Morgan, G.B. 1965. Taxonomy and ecology of the sulfur bascteria. Eng. Prog. Univ. Fla. Bull. Ser. 119.
Strohl, W.R. & Larkin, J.M. 1978. Enumeration, isolation, and characterizat-ion of Beggiatoa from fresh water sediments. Appl. Environ.Microbiol. 36:755.

Larkin, J.M. 1980. Isolation of Thiothrix in pure culture and observation of a filamentous epiphyte on Thiothrix. Curr. Microbiol., 4: 155.

Larkin, J.M. & Shinabarger, D.L. 1983. Characterization of Thiothrix nivea. Int. System. Bacteriol. 33: 841.

Williams, T.M. & Unz, R.F. 1985. Isolation and characterization of filamentous bacteria present in bulking activated sludge. Appl. Microbiol. Technol. 22:273.

الفصل الخامس

سيدوموناس ايريوجينوزا المياه الجوفية

Pseudomonas aeruginosa

الفصل الخامس

سيدوموناس ايريوجينوزا Pseudomonas aeruginosa (المياه الجوفية)

سيدوموناس ايريوجينوزا هى اكثر سيدوموناد Pseudomonad شيوعا فى مياه الشرب. سيدومونادس هى بكتريا فريدة فهى قادرة على الانتشار فى نوعيات واسعة من البيئات (المياه السطحية، المياه الجوفية، مياه البحر، التربة، والنباتات). بعض منها من ضمن مزيلات اليتروجين الشهيرة Denitrifiers بينما البعض الآخر ينمو بدرجة مذهلة فى وعلى وسائل المعالجة الثلاثية Tertiary treatment devices مثل أغشية التناضح العكسى Reverse-osmosis والتحليل الكهربى Electrodialysis وفى مرشحات الرمل والكربون. ولقد وجدت سيدوموناس فى بعض مصادر مياه الشرب وتشمل P. aeruginoas, P. cepacia, P. fluoresens, P. mallei, P. malttophila, P. putida, and P. testosteroni

ويمكن اضافة P.stutzeri, P. diminuta, and P. acidovarans الى القائمة السابقة والتى وجدت فى المياه المعبأة بكثافة تتراوح مابين 1×10^{3} الى 1×10^{5} / ملل. وهذه الكائنات تأقلمت من حيث التمثيل الغذائى لكى تبقى على الحدود الدنيا من المغذيات والتى هى من خواص مياه الشرب والمياه الجوفية المحمية.

وقدرة P. aeruginosa على أن تستعمر بسرعة بيئات مختلفة تشمل الانسان الحساس، يجعلها من أعظم الممرضات الانتهازية وخاصة P. aeruginosa serogroup 11, 9 والتى تمثل غالبية السلالات المرضية المعزولة. وتواجد السيدوموناس فى الدم لاقى الاهتمام فى حالات الجروح Trauma كذلك فى حالة شفاء المرضى الحساسين من الحروق، الجراحات المركزة وغيرهم من المتعرضين للعلاج من السرطان. الاصابات الخرى للافراد الحساسين تشمل العين، الأنف، وأحيانا القناة الهضمية.

وتواجد السيدوموناس النادر فى القناة الهضمية (3 – 19%) يدل على أن استعمار النظام المعوى نادرا ما يحدث فى الأشخاص الأصحاء، ويظهر أن هناك جهاز دفاعى قوى فى العائل ضد هذه المجموعة من البكتريا السالبة لجرام. ولأن مخلفات الصرف الصحى تحتوى على خليط من المخلفات الآدمية، مخلفات الصناعة و ناتج الأمطار الغزيرة فانه لا يكون مستبعد وجود سيدوموناس ايريوجينوزا فى 90% من عينات الصرف الصحى. كثافة سيدوموناس ايريوجينوزا فى المياه

السطحية والتى تتلقى مخلفات ربما تتراوح ما بين 1 اى 10000 خلية / ملل يتأثر بالمغذيات المتوافرة ودرجة حرارة المياه الموسمية.

تواجدت سيدوموناس ايريوجينوزا فى مصادر المياه الملوثة وارتبطت بحالة تفشى outbreak متولدة عن المياه حدثت فى دار حضانة لحديثى الولادة. وفى هذه الحالة كان مصدر المياه الجوفية ملوث من سيب من الصرف الصحى وكذلك رشح من مياه سطحية ملوثة. ولأن سيدوموناس ايريوجينوزا هى السيدوموناس الشائعة فى مرض الانسان، فان تواجدها حدد فى المجتمع الأوروبى بأقل من 1 كائن فى كل 250 ملل من مياه الشرب المعباة. اجناس السيدوموناس الأخرى التى تتواجد أحيانا فى الماء (P. fluoresens, P. putida, P. multivorans, P. maltophilia, and P. stutzeri)

لم تترتبط بعد بالمتفشيات المتولدة عن المياه، وهذا يعنى أنها من بكتريا المياه الطبيعية وتتواجد فى أى بيئة مائية.

وعلاوة على ما سبق فان مياه التنزه Recreational water سواء كانت مياه عذبة أو مالحة من الممكن أن تكون ملوثة بالسيديموناس علاوة على تلوثها بغيرها من البكتريا مثل ستافيلوكوكى والتى مصدرها الجلد، الأنف وفم مرتادى تلك الأماكن. وكذلك هناك امكانية تواجد الممرضات مثل السالمونيلا والشيجيلا والانتيروفيرس والبروتوزوا والطفيليات عديدة الخلايا. على أن ذلك كله لا ينفى ضرورة اختبار مياه المتنزهات لايشيرشيا كولاى (mTEC agar + urea substrate test) ومجموعة الانتيروكوكى لأنهم أكثر ارتباطا بالحالات المرضية الناشئة عن تلوث مياه المتنزهات.

والاختبار للسيدوموناس ايريوجينوزا Pseudomonas aeruginosa من الممكن أن يتم بالنسبة للمياه، وما ينطبق على المياه المعبأة يطبق على المياه الجوفية ، باستخدام طريقة المرشحات الغشائية Membrane filtration أو طريقة العد الاحتمالى بالأنابيب المتعددة MPN كالتالى:

1 . طريقة أغشية الترشيح لتقدير السيدوموناس ايريوجينوزا

Membrane Filter Technique for Pseudomonas aeruginosa

1. 1 . البيئة

M-PA agar . 1 . 1 . 1

L-Lysine HCl ..... 5 g
Sodium chloride ..... 5 g
Yeast extract ..... 2 g
Xylose ..... 2.5 g
Sucrose ..... .1.25 g
Lactose ..... 1.25 g
Phenol red .....0.08 g
Ferric ammonium citrate ..... 0.8 g
Sodium thiosulfate ..... 6.8 g
Agar ..... 15 g
Reagent grade water .....1 L

يضبط pH البيئة عند 6,5 +/- 1,. وعقم فى الأوتوكلاف. برد الى 55 الى 60 مئوية؛ وأعد ضبط pH عند 7,1 -/+ 2,. وأضف المضادات الحيوية التالية /اللتر : سلفابيريدين 176 مجم؛ كناميسين 8،5 مجم ؛ نلاديكسيك أسيد 37 مجم وسيكلوهكساميد 150 مجم. بعد الخلط وزع بكميات 3 ملل فى أطباق بترى 50 X 12 مم. خزن الأطباق المصبوبة عند 2 – 8 درجة مئوية. تخلص من البيئة الغير مستعملة بعد شهر.

Modified M-PA agar . 2 . 1 . 1

مثل البيئة السابقة (جاهزة) مضاف اليها كبريتات مغنسيوم ، كناميسين ونلادكسيك أسيد.

:Milk agar (Brown and Scott Foster Modification) . 3 . 1 . 1

Mixture A:

Instant nonfat milk ..... 100 g

Reagent-grade water ..... 500 mL

Mixture B:

Nutrient broth ..... 12.5 g

Sodium chloride ..... 2.5 g

Agar ..... 15 g

Reagent-grade water ..... 500 mL

حضر كلا من الخليط أ ،ب كلا على انفراد وعقم، برد بسرعة الى 55 مئوية وبطريقة معقمة امزج الخليطين ووزع بكميات 20 – 25 ملل فى كل طبق بترى.

Procedures الطرق . 4 . 1 . 1

Presumptive tests الاختبارات المبدئية . 1 . 4 . 1 . 1

رشح 200 ملل أو أقل من العينة من المياه الطبيعية أو حتى 500 ملل فى حالة حمامات السباحة خلال أغشية الترشيح المعقمة. ضع كل غشاء على طبق من البيئة (M-PA). اقلب الأطباق وحضن عند 41,5 -/+ 5,. درجة مئوية لمدة 72 ساعة.

مستعمرات P. aeruginosa المثالية قطرها يتراوح ما بين 8,. – 2,2 مم مستوية Flat فى مظهرها ذات حواف لامعة ومركز بنى الى أخضر مسود . عد المستعمرات النموذجية (يفضل الغشاء المحتوى على 20 – 80 مستعمرة). استعمل قوة تكبير 10 – 15 كمساعد فى العد.

Confirmation tests الاختبارات التأكيدية . 2 . 4 . 1 . 1

استعمل بيئة آجار اللبن لتأكيد المستعمرات النموذجية والغير نموذجية (Typical and atypical)

اعمل خط واحد بطول 2 الى 4 سم من مستعمرة منعزلة على طبق من آجار اللبن وحضن عند 35 -/+ 1,. درجة مئوية لمدة 24 ساعة. P. aeruginosa تحلل الكازين وتنتج صبغة منتشرة ذات لون أصفر الى أخضر.

الاختبار التأكيدى غير مطلوب روتينيا وفى هذه الحالة تسجل النتيجة على أنها عدد السيدوموناس. ايريوجينوزا المبدئى / 100 ملل.

2 . تقدير سيدوموناس ايريوجينوزا بطريقة الأنابيب المتعددة

Multiple-Tube Technique for Pseudomonas aeruginosa

2 . 1 . البيئات

2 . 1 . 1 . مرق الاسباراجين Asparagine broth

Asparagine, DL …….. 3 g

$K_2 HPO_4$ …….. 1 g

$MgSO_4 ,7H_2O$ …….. 0.5 g

Reagent-grade water …….. 1 L

اضبط pH البيئة عند 6،9 – 7,2 قبل التعقيم.

2 . 1 . 2 . مرق الأسيتاميد Acetamide broth

Acetamide ……10 g

Sodium chloride …….. 5 g

$K_2 HPO_4$ ……1.39 g

$KH_2 PO_4$ .....0.73 g

$MgSO_4 ,7H_2O$ ..... 0.5 g

أذب 1,2 جرام أحمر الفينول Phenol red فى 1,. نورمال صودا كاوية ، 1 ملل / اللتر مرق الاسيتاميد. استعمل محلول أحمر الفينول خلال عام. أضبط pH عند 7,1 الى 7,3 قبل التعقيم.

pH النهائى يلزم أن يكون 7 -/+ 2،. حضر مرق الأسيتاميد كما شرح أعلاه. اذا فضل عمل Slant أضف 15 جرام آجار / اللتر وسخن لاذابة الآجار ووزع بكميات حوالى 8 ملل فى الأنابيب. بعد التعقيم أمل الأنابيب لتوفير سطح مائل كبير.

2 . 1 . 3 . الطرق Procedures

2 . 1 . 3 . 1 . الاختبار المبدئى Presumptive test

اجر اختبار الخمس أنابيب. استعمل 10 ملل من بيئة الأسباراجين مفرد التركيز لحقن 1 ملل أو أقل من العينة و10 ملل من البيئة مضاعفة التركيز فى حالة استخدام 10 ملل من العينة. حضن الأنابيب على 35 – 37 مئوية. بعد 24 ساعة ، 48 ساعة من التحضين، اختبر الأنابيب تحت أشعة فوق بنفسجية طويلة الموجة فى غرفة مظلمة . انتاج صبغةخضراء مشعة Fluorescent هى علامة الاختبار المبدئى الموجب.

2 . 1 . 3 . 2 . الاختبار التأكيدى Confirmed test

أكد الأنابيب الموجبة للاختبار المبدئى بحقن 1,. ملل من المزرعة فى مرق الأسيتاميد أو على سطح الأسيتاميد آجار المائل فى الأنابيب. ظهور لون ارجوانى (دليل على الوسط القاعدى) خلال 24 – 36 ساعة من التحضين على درجة 35 – 37 مئوية دليل على تأكيد الايجابية لتواجد سيدوموناس ايريوجينوزا.

References on P. aeruginosa :

Geldreich, E.E. 1990. Microbiological Quality Control in Distribution Systems. In: Water Quality and Treatment. F.W. Pontius, Ed., McGraw-Hill, New York.

GambaSSINI, l., Sacco, C., Lanciotti, E., Burrini, D., and Griffini, O. 1990. Microbial Quality of the Water in the Distribution System of Florence. Aqua, 39: 258-264.

Hernandez Duquino, H. and Rosenberg, F.A. 1987. Antibiotic-resistant Pseudomonas in Bottled Drinking Water. Can. Jour. Microbiol., 33: 286-289.

Lindberg, R.B. 1974. Culture and Identification of Commonly Encountered Gram-Negative Bacilli: Pseudomonas, Klebsiella-Enterobacter, Serratia, Proteus, and Providencia. In: Opportunistic Pathogens. J.E. Prier and H. Friedman, Eds. University Park Press, Baltimore, MD.

Holder, I.A. 1977. Epidemology of Pseudomonas aeruginosa in a burns hospital. In: Pseudomonas aeruginosa:Ecologucal Aspects and Patient Colonization. V.M. Young, Ed., Raven Press, New York.

Tinne, L.E., Gordon, A.M., Bain, W.H., and Mckey, W.A. 1967. Gross-Infection by Pseudomonas aeruginosa as a Hazard of Intensive Surgery. Brit. Med. Jour., 4: 313-315.

Schimpff, S.C., Greene, W.H., Young, Y.M., and Wiernik, P.H. 1973. Pseudomonas septicemia:Incidence, Epidemiology, Preventionand Therapy in Patients with Advanced Cancer. Eur. Jour. Cancer, 9: 449-455.

Jacobson, Jay A. 1985. Pool-Associated Pseudomonas aeruginosa Dermatitis and other Bathing-Associated Infections. Infect. Control, 6: 398-401.

Hunter, C.A. and Ensign, P.R. 1947. An Epidemic of Diarrhea in a Newborn Nursery Caused by Pseudomonas aeruginosa. Amer. Jour. Pub. Health. 37: 1166-1169.

Young, V.M. 1977. Pseudomonas aeruginosa: Ecological Aspects and Patient Colonization, Paven Press, New York.

Stoodley, B.J. and Tom, B.T. 1970. Observations on the Intestinal Carriage of Pseudomonas aeruginosa . Jour. Med. Microbiol., 3: 367-375.

Buck, A.C. and Cooke, E.M. 1969. The fate of Ingested Pseudomonas aeruginosa in Normal Persons. Jour. Med. Microbiol., 2: 521-525.

Ringen, L.M. and Drake, C.H. 1952. A Study of the Incidence of Pseudomonas aeruginosa from Various Natural Sources. Jour. Bact., 64:841-845

الفصل السادس

الاضرار الخلوى لبكتريا القولون
Coliform Cellular Stress (Injury)

الفصل السادس

الاضرار الخلوى لبكتريا القولون
Coliform Cellular Stress (Injury)

مقدمة

الاضرار ببكتريا القولون ينتج عن أى تغير فى عمليات التمثيل الغذائى العادية، خاصة من خلال فقد فى النشاط الانزيمى، تحلل فى أحماض الريبونيوكليك RNA ، كسر فى الجديلة الأحادية والثنائية لحامض الديسوكسى ريبونيوكليكٍ Single and double strand breakage in DNA ، أو تسرب فى مكونات السيتوبلازم Leakage of cytoplasmic constituents. أى من هذه التغيرات فى تركيب الخلية، النفاذية Permeability ، وخصائص البناء الحيوى ليس من الضرورى أن تقتل الكائنات، ولكن تتطلب اطالة الوقت للاصلاح الخلوى Cellular repair قبل امكانية حدوث النمو والتكاثرمرة أخرى. والكشف عن تواجد بكتريا القولون المضارة يجب أن يحظى بالاهتمام فى عمليات معالجة المياه لأنها تكشف عن عدم مناسبة عمليات المعالجة كمانع أو حاجز أمام التلوث البكتيرى وبالتالى امكانية مرور العوامل الممرضة. بعض التواجد لهذه المشكلة يظهر فى الجدول التالى ص 227. هذه المستويات المعنوية من الاضرار الغير مميت ربما ينشأ فى مصدر المياه الملوث بالمعادن الثقيلة، الفينولات، المياه الحامضية ، والمعالجة بالأشعة الفوق بنفسجية. وربما تنشأ مواقف أخرى فى معالجة المياه كنتيجة لعدم مناسبة التعرض للمطهرمن حيث التركيز أو زمن التعرض CT values، خطوط الخدمة من النحاس، والتضاد Antagonistic responses من خلال انتخاب البكتريا الهتيروتروفية بكثافات عالية. وخلاف ذلك، فان هذه البكتريا تتعرض لتثبيط غير قاتل Sublethal inactivation فتصبح مفرطة الحساسية Hypersensitive لاضرارات ثانوية Secondary stresses تنشأ من استخدام عوامل الانتخاب Selective agents فى بيئات الزراعة المستخدمة فى المعمل. وكنتيجة، فان وقت التجهيز أو الاعداد Lag time فى منحنى النمو يمتد الى 2 – 5 ساعات اعتمادا على قوة الاضرار.

الاضرار الثانوى المتسبب عن تشغيل العينة فى المعمل Laboratory processing يجب أن يحد منه من خلال الاهتمام بجمع العينة. فيجب أن يتم فى وجود مقدار كاف من عامل ازالة الكلورDechlorinating agent فى زجاجة جمع العينةلايقاف فعل الكلور بسرعة. بالاضافةالى ذلك، فان العينة يجب ان تبقى باردة خلال النقل لمنع النمو المضطرد للكائنات التى تتداخل فى

الاختبار Interfering أو يكون لها فعل مضاد Antagonistic. العينات التى لا تختبر فور استلامها فى المعمل تتعرض للتغير المحسوس فى سيادة الكائنات Predominance of organisms وربما تحجب النشاط التمثيلى لبكتريا القولون المضارة.

على أن البكتريا المتواجدة فى المياه تتعرض لعوامل طبيعية وكيماوية أثناء خطوات المعالجة لانتاج مياه الشرب. فالكلور وغيره من المواد التى تضر البكتريا، عند التركيزات المنخفضة ، تكون قاتلة لاعداد قليلة من البكتريا المعرضة بينما يحدث الضرر ما دون الموت بالنسبة لباقى البكتريا المعرضة.

ولوجود بكتريا القولون المضارة خلال عمليات المعالجة، فان المياه تدخل نظام التوزيع أو من المناطق الساكنه من نطام التوزبع لا تكون ثابته الخواص اطلاقا. على أن المعمل يجب أن يأخذ فى الاعتبار البحث فى ناتج المعالجة خلال الشتاء وتوزيع مناطق سكون المياه خلال الصيف وعندما تزيد اعداد البكتريا الهتيروتروفية عن 1000 كائن/ملل. وفى أى من الوضعين فان الكشف عن بكتريا القولون ربما يعاق.

ولوحظ سابقا، أن عوامل الانتخاب Selective agents المستعملة فى البيئات الروتينية ربما تشارك فى الاضرار الثانوى والذى يضعف من الكشف على بكتريا القولون المضارة الا اذا امتدت فترة التحضين القياسية 2 – 4 ساعات او استعمال خطوة انعاش Resuscitation فى زراعة أولية قبل النقل الى البيئة المتخصصة Selective medium والمحتوية على المكونات ذات النشاط السطحى مثل الديسوكسى كوليت Deoxycholate.

باستخدام البيئات المعتاد استعمالها فى الكشف كميا عن بكتريا القولون فى مياه الشرب، مثل الاندو آجار m-Endo agar ، تكون مصحوبة بمعلات منخفضة من أعداد البكتريا المضارة مع انخفاض امكانية التفرقة ما بين بكتريا القولون والبكتريا الأخرى. وهناك اتجاه واعد وعن طريق استخدام بيئة m-T7 لتحسين استخلاص بكتريا القولون الكلية المضارة فى مياه الشرب.

وعلى ذلك، فان الاضرار Injury يمكن أن يؤدى الى تقديرات غير حقيقية للدلائل البكتيرية طالما أن من 10الى أكثر من 90% من البكتريا المتواجدة فى مياه الشرب ربما تكون مضارة وبلتالى لا يمكن اكتشاف وجودها (McFeters et al., 1986, and McFeters, 1990) وربما يؤدى ذلك الى الحصول على نتيجة سالبة غير حقيقية False negative results وبالتالى يكون تحديد نوعية مياه الشرب غير صحيح مما يدع فرصة لامكانية حدوث أضرار صحية لاحتمال وجود ممرضات أو قد يؤدى الى تخلل الدلائل خلال مراحل المعالجة. هذا ولقد تم الربط ما بين تواجد البكتريا المضارة وعملية التطهير الجزئية أو الغير مناسبة .

وما تم نشره يدعم المغزى الصحى لبكتريا القولون المضارة (McFeters, 1990, LeChevallier et al., 1985, Singh & McFeters, 1986, and Singh, et al., 1986).

هذه التقارير تظهر أن البكتريا المعوية المرضية أقل حساسية من بكتريا القولون للاضرار Injury تحت ظروف مشابهة لتلك فى المياه والمخلفات السائلة المعالجة، وبالتالى فان الممرضات المضارة تحتفظ بقوة الشراسة Virulence وتشفى بعد ابتلاعها. وبناء على ذلك، فان الطرق التى تسمح بتنمية وعد بكتريا القولون المضارة تنتج تقدير أكثر حساسية لقوة المخاطر الصحية. هذا الاستنتاج أيد أكثر بالملاحظة أن الفيروسات والممرضات المتولدة عن المياه والتى تكون حويصلات Cysts هى الأخرى أكثر مقاومة عن الدلائل البكتيرية لضغوط البيئية .

جمع وتداول العينة Sample Handling and Collection

بعض المعامل تتبع طريقة فى جمع العينات ربما ينتج عنها اضرار أو تعمل ضغط ثانوى على الكائن (McFeters, 1990 and McFeters et al., 1982). هذا يشمل التخزين لمدة طويلة ، الاحتفاظ بالعينة المخففة أكثر من 30 دقيقة قبل حقنها فى بيئة التنمية كذلك بالعينات الملقحة قبل التحضين على الحرارة المناسبة، تركيب البيئة الغير صحيح، عدم خلط العينة جيدا بالبيئة المركزة، التعرض للبيئة المسالة والغير ملطفة Tempered. العدد المرتفع من البكتريا الأخرى غير الدلائل ايضا تتداخل مع الكشف عن الدلائل بأن تسبب اضرارا (LeChevallier & McFeters, 1985).

References on Stressed Coliform

McFeters, G.A. 1990. Enumeration, Occurrence, and Significance of Injured indicator Bacteria in Dronking Water. In: Drinking Water Microbiology, G.A. McFeters, ED. Springer-Verlag, New York, pp.478-492.

Zaske, S.K., Dockins, W.S., and McFeters, G.A. 1980. Cell Envelop Damage in Escherichia coli Caused by Short-Term Stress in Water. Appl. Environ. Microbiol., 40: 386-390.

Domek, M.J., LeChevallier, M.W., Camerson, S.C., and McFeters, G.A. 1984. Evidence for the Role of Copper in the Injury Process of Coliforms in Drinking Water. Appl. Environ. Microbiol., 48: 289-293.

Domek, M.J., Robbins, J.E., Anderson, M.E., and McFeters, G.A. 1987. Metabolism of Escherichia coli Injured by Copper. Can. Jour. Microbiol., 33: 57-62.

Kapuscinski, R.B. and Mitchell, R. 1981. Solar Radiation Induces Sublethal Injury in Escherichia coli in Seawater. Appl. Environ. Microbiol., 41: 670-674.

Fujioka, R.S. and Narikawa, O.T. 1982. Effect of Sunlight on Enumeration

of Indicator Bacteria under Field Conditions. Appl. Environ. Microbiol., 44: 395-401.

LeChevallier, M.W. and McFeters, G.A. 1985. Enumerating Injured Coliforms in Drinking Water. Jour. Amer. Water Works Assoc., 77: 81-87.

Camper, A.K., and McFeters, G.A. 1979. Chlorine injury and the enumeration of water-borne coliform bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 37: 633-641.

Egan, A.F. 1978. Enumeration of stressed cells of Escherichia coli. Can. J. Microbiol. 25: 116-118.

Singh, A., Yeager, R., and McFeters, G.A. 1986. Assessment of in vitro revival, growth, and pathogenicity of Escherichia coli strains after copper and chlorine-induced injury. Appl. Environ. Microbiol. 52: 822-837.

Singh, A., and McFeters, G.A. 1986. Repair of heat-stable enterotoxin by E. coli following copper injury. Appl. Environ. Microbiol., 51`:738.

LeChevallier, M.W. & McFeters, G.A. 1985. Interactions between heterotrophic plate count bacteria and coliform organisms. Appl. Environ. Microbiol. 49:1338.

الفصل السابع

زيادة الاستخلاص
Recovery Enhancement

الفصل السابع

زيادة الاستخلاص

Recovery Enhancement

بالنسبة للعينات المعالجة بالكلور يجب التأكد من:

- وجود كمية كافية من عامل ازالة الكلور فى زجاجة العينة (راجع مذكرة QC/QA)،
- مع تواجد تركيزات عالية من أيونات العناصر الثقيلة فى العينة احرص على اضافة Chelating agent (راجع مذكرة QC/QA)
- حد من زمن التخزين (راجع مذكرة QC/QA)
- عند تخفيف العينة فى وجود أيونات المعادن الثقيلة استخدم محلول منظم من ماء الببتون Buffered peptone water وحد من استخدام الماء المنظم Buffered water.
- بعد عمل التخيف احقن البيئة خلال 30 دقيقة.

انعاش الكائنات المضارة أو المضغوطة Stressed or injured organisms يزيد بحقن العينات فى بيئة تخصيب Enriched، غير قاتلة عند درجة حرارة متوسطةز

وعلى الرغم من عدم تواجد اختبار بسيط لتأكيد تواجد البكتريا المضارة فى عينة معطاه، فان البكتريا الموجودة فى مياه معروف أنها تحتوى على مواد مضيرة مثل المطهرات او معادن ثقيلة فانها غالبا تضار. وعندمما تكون نتائج اختبار أنابيب التخمر المتعددة Multiple tube fermentation test عاليةعن نتائج أغشية الترشيح Membrane filter أو يكون هناك علامة على ان استخلاص الأخيرللبكتريا ليس كامل فانه يكون هناك احتمال الاضرار Injury واستعمل واحدة أو أكثر من الطرق التالية فى الكشف عن البكتريا المضارة:

طرق الكشف عن البكتريا المضارة:

1. البكتريا المضارة من خلال التأثير على المثيل الغذائى لها Metabolically injured:

يمكن تدارك وجودها من خلال الفرق بين الاعداد الناتجة بالزراعة على media Minimal بتلك الأعداد التى تظهر على بيئة كاملة Complete media. (Moss & Speck, 1966; and Straka & Stokes, 1959)

2. استخلاص بكتريا القولون الكلية باستخدام أغشية الترشيح

Recovery of Injured Total Coliform Bacteria Using Membrane Filtration

2 . 1 . m-T7 agar

استخدم بيئة m-T7 مع طريقة أغشية الترشيح السلبق ذكرها. وتركيب البيئة كما يلى:

Proteose peptone No. 3 ……..5 g.
Yeast extract ……. 3 g.
Lactose ……. 20 g.
Tergitol 7 …… 0.4 ml
Polyoxyethylene ether W1 ……..5 g.
Bromothymol blue ……. 0.1 g.
Bromocresol purple …….. 0.1 g.
Agar ……15 g.
Reagent grade water …….. 1 L.

أضبط الى pH 7,4 باستعمال 0,1 نورمال صودا كاوية بعد التعقيم عند 121 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة. بطريقة معقمة أضف 1 ميكروجرام بنسيلين ج / ملل عندما تكون البيئة قد بردت الى حوالى 45 درجة مئوية.

بعد ترشيح العينة من خلال غشاء الترشيح ضع الغشاء على بيئة m-T7 وحضن على 35 مئوية لمدة 22 -24 ساعة. مستعمرات بكتريا القولون تكون صفراء. تحقق من Verify مالا يقل عن 10% من مستعمرات بكتريا القولون بالطريقة السابق ذكرها (Module 3). ويجب التمييز الجيد ما بين المستعمرات الصفراء والخلفية التى تظهر من البكتريا التى لا تتيع بكتريا القولون.

2 . 2 . اضافة كبريتيت الصوديوم Addition of sodium sulfite

اضافة كبريتيت الصوديوم الى بعض البيئة (0,05 – 0,1 %) يمكن أن يحسن من الكشف عن بكتريا القولون بعد التعرض للكلورامين وليس الكلور (Waters et al., 1989).

3 . استخلاص بكتريا القولون البرازية المضارة باستخدام أغشية الترشيح

Recovery of Injured Fecal Coliform Bacteria Using Membranr Filtration

3 . 1 . التعجيل بالتخصيب-الحرارة Enrichment-temperature acceleration

استعمل طبقتان من الآجار M-FC عليها طبقة من بيئة غير متخصصة Nonselective لا تحتوى على جلوكوز مثل Tryptic soy agar مع التحضين ساعتين على 35 مئوية متبوعة بالتحضين على 44,5 مئوية لمدة 22 ساعة (Rose et al., 1975). تحضر الأطباق بها طبقة بيئة M-FC ولكن لا تضاف الطبقة العليا من البيئة الغير متخصصة الا قبل الاستعمال بساعة على الأكثر.

وكبديل استعمل التخصيب المسبق Pre-enrichment فى بيئة مرق فينول ريد لاكتوز والتحضين عند 35 مئوية لمدة 4 ساعات متبوعة بالتحضين على بيئة M-FC على 44,5 مئوية لمدة 22 ساعة (Lin, 1976).

وكبديل آخر ، حضر الطبقتان من البيئة الغير متخصصة والمتخصصة وحضن 1,5 على درجة حرارة الغرفة (22-26 مئوية) متبوعة بالتحضين على 35 مئوية لمدة 4,5 ساعة ثم على 44,5 لمدة 18 ساعة (Stuart et al., 1977).

3 . 2 . التأقلم الحرارى Temperature acclimation (Green et al., 1977)

هذه الطريقة هى تطير لطريقة الحرارة المرتفعة Elevated temperature procedure من خلال التحضين المسبق Preincubation للمزارع على بيئة M-FC لمدة 5 ساعات على 35 مئوية، متبوعة بالتحضين على 44,5 مئوية لمدة 18 +/- 1 ساعة . استعمل حضانة مبرمجة بحيث يتم رفع الحرارة أوتوماتيكيا بعد الفترة الأولى لكى تكون الطريقة عملية وتكون مناسبة للتطبيق.

3 . 3 . حذف المادة المثبطه Deletion of suppressive agent (Presswood & Strong, 1977)

حذف حامض الروزوليك Rosolic acid من بيئة M-FC والتحضين للمزارع على 44,5 +/- 2, درجة مئوية لمدة 24 ساعة. مستعمرات بكتريا القولون البرازية تكون زرقاء على البيئة المعدلة وتفرق عن المستعمرات الكريم، الرمادية، والخضراء الباهتة والتى تنتج من البكتريا الأخرى والتى لا تتبع بكتريا القولون البرازية.

3 . 4 . بيئة بديلة-التأقلم الحرارى Alternative medium-temperature acclimation

استخدم بيئة m-T7 مع التحضين 8 ساعات على 37 مئوية متبوعة بالتحضين على 44,5 لمدة 12 ساعة (LeChevallier et al., 1984).

3 . 5 . التحقق من بكتريا القولون البرازية المضارة

Verification of stressed fecal coliform bacteria

تعديل البيئات والطرق ربما يقلل من انتقاء selectivity وتفريق مستعمرات بكتريا القولون البرازية. وعلى ذلك، فاذا أستعملت أى طريقة معدلة ، تحقق من مالا يقل عن 10 % من المستعمرات الزرقاء من عينات مختلفة. استعمل مرق لوريل Luryl tryptose broth عند 35 مئوية لمدة 48 ساعة مع النقل من المزارع المنتجة للغاز الى بيئة مرق EC والتحضين عند 44,5 لمدة 24 ساعة. انتج الغاز عند 44,5 يؤكد وجود بكتريا القولون البرازية.

4 . استخلاص البكتريا السبحية البرازية المضارة باستخدام أغشية الترشيح

Recovery of Stressed Fecal Streptococci Using Membrane Filtration

باستعمال بيئة مرق الصفراء Bile broth ينتج استخلاص مقارن بلاختبارات أنابيب التخمر المتعددة Multiple tube fermentation(Lin, 1974). التحضين المسبق لأغشية الترشيح على بيئة تخصيب لمدة ساعتين على 35 درجة مئوية متبوعة بالزرع على بيئة m-enterococcus agar لمدة 48 +/- 2 ساعة على درجة 35 مئوية.

التحقق من البكتريا السبحية البرازية المضارة يتم على 10% على الأقل من المستعمرات من عينات مختلفة باستعمال الاختبارات التأكيدية (Module 3).

Reference on Recovery of Injured cells:

McFeters, G.A. & Camper, A.K. 1983. Enumeration of coliform bacteria exposed to chlorine. In: A.I. Laskin, ed. Advances in Applied Microbiology. Vol. 29. p. 177.

Domek, M.J., LeChevallier, M.W., Camerson, S.C. & McFeters, G.A. 1984. Evidence for the role of metals in the injury process of coliforms in drinking watere. Appl. Environ. Microbiol. 48: 289.

LeChevallier, M.W. & McFeters, G.A. 1985. Interactions between heterotrophic plate count bacteria and coliform organisms. Appl. Environ. Microbiol. 49:1338.

LeChevallier, M.W., Camerson, S.C. & McFeters, G.A. 1983. New medium for the improved recovery of coliform bacteria from drinking water. Appl. Environ. Microbiol. 45: 484.

Waters, S.K., Pyle, B.H., LeChevallier, M.W. & McFeters, G.A. 1989. Enumeration of E. cloacae after chlorine exposure. Appl. Environ. Microbiol. 55: 3226.

Rose, R.E., Geldreich, E.E. & Litsky, W. 1975. Improved membrane filter method for fecal coliform analysis. Appl. Environ. Microbiol., 29:532.

Lin, S.D. 1976. Membrane filter method for recovery of fecal coliforms in chlorinated sewage effluents. Appl. Environ. Microbiol. 32:547.

Stuart, D.S., McFeters, G.A. & Schillinger, J.E. 1977. Membrane filter technique for quantification of stressed fecal coliforms in the aquatic environment. Appl. Environ. Microbiol. 34:42.

Green\, B.L., Clausen, E.M. & Litsky, W. 1977. Two-temperature membrane filter method for enumerating fecal coliform bacteria from chlorinated effluents. Appl. Environ. Microbiol. 33: 1259.

Presswoood, W.G. & Strong, D. 1977. Modification of M-FC medium by eliminating rosolic acid. Amer. Soc. Microbiol. Abs. Annu. Meeting. ISSN-0067-2777:272.

LeChevallier, M.W., Jakanoski, P.E., Camper, A.K. & McFeters, G.A. 1984. Evaluation of m-T7 agar as a fecal coliform medium. Appl. Environ. Microbiol. 48:371.

Lin, S.D. 1974. Evaluation of fecal streptococci tests for chlorinated secondary effluents. J. Environ. Eng. Div. Proc. Amer. Civil Engr. 100:253.

References on Method of Injured Bacteria Detection

Moss, C.W., and Speck, M.L. 1963. Injury and death of Streptococcus lactis due to freezing and frozen storage. Appl. Microbiol., 11: 326-329.

Straka, R.P., and Stokes, J.L. 1959. Metabolic injury to bacteria at low temperatures. J. Bacteriol., 78: 181-185.

LeChevallier, M.W., and McFeters, G.A. 1985. Enumeration of injured coliforms in drinking water. J. Am. Water Works Assoc., 77:81-87.

McFeters, G.A., and Camper, A.K. 1983. Enumeration of Indicator bacteria exposed to chlorine. Adv. Appl. Microbiol. 29:171-193.

LeChevallier, M.W., Cameron, S.C., and McFeters, G.A. 1983. New medium for improved recovery of coliform bacteria from drinking water. Appl. Environ. Microbiol. 45:484-492.

McFeters, G.A., Cameron, S.C., and LeChevallier, M.W. 1982. Influence of diluents, media, and membtane filters on the detection of injured waterborne coliform bacteria. Appl. Environ, Microbiol., 43:97-103.

McFeters, G.A., Kippin, J.S., and LeChevallier, M.W. 1986. Injured coliforms in drinking water. Appl. Environ. Microbiol. 51: 1-5.

Schiff, L.J., Morrison, S.M., and Mayevx, J.V. 1970. Synergistic false-positive coliform reaction on m-Endo MF medium. Appl. Environ. Microbiol. 20: 778-781.

الفصل الثامن

طرق الكشف السريعة
Rapid Detection Methods

الفصل الثامن

طرق الكشف السريعة
Rapid Detection Methods

مقدمة

هناك حاجة واضحة الى الطرق التى تسمح بتقدير النوعية البكتريولوجية للمياه سريعا. واستعمال الطرق السريعة ربما يشمل تحليل المخلفات السائلة وكذلك تقييم نوعية مياه الشرب. وفى الحالة الأخيرة، وخلال الحالات الطارئة والتى تشمل عدم نجاح عملية المعالجة، كسر فى خطوط توزيع المياه، أو اى تلف ف مصدر المياه ناتج عن كارثة يكون هناك حاجة ماسة الى التقييم السريع للحالة الصحية للمياه.

ومثاليا، فالطرق السريعة يجب أن تكون نتائجها حقيقية وذات مستوى حساسية مساوية للاختبارات القياسية والتى تستخدم روتنيا. وعلى ذلك، فان حساسية الطرق السريعة ربما تسوى Compromised لأن الحدود البكتيرية التى يفكر فيها ربما تكون أقل من الحدود الدنيا لتركيز البكتريا الأساسية للكشف السريع. والاختبارات السريعة تقع فى نوعيتين، تلك التى تشمل تعديل فى الطرق التقليدية Conventional procedures وتلك التى تحتاج الى اجهزة ومواد خاصة.

1 . اختبار السبع ساعات لبكتريا القولون البرازية Seven- Hour Fecal Coliform Test

هذه الطريقة (Van Donsel et al., 1969 & Reasoner et al., 1979) هى مشابهة لطريقة أغشية الترشيح ولكن مع استعمال بيئة وحرارة تحضين مختلفتين لاعطاء نتائج فى 7 ساعات والتى هى مشابهة للطريقة القياسية لبكتريا القولون البرازية:

1 . 1 . البيئة

M-7 h FC agar هذه البيئة ربما لا تكون متاحة على صورة جاهزة لذا يلزم تحضيرها من مكوناتها وهى:

Proteose peptone No. 3 or polypeptone …… 5 g.
Yeast extract …….. 3 g.

Lactose …….. 10 g.
d-Mannitol …… 5 g.
Sodium chloride …….. 7.5 g.
Sodium lauryl sulfate …….. 0.2 g.
Sodium desoxycholate …….. 0.1 g.
Bromocresol purple ……..0.35 g.
Phenol red …… 0.3 g.
Agar ……. 15 g.
Reagent-grade water ……1 L

رشح حجم مناسب من العينة خلال مرشح غشائى وضع الفلتر على سطح طبق يحتوى على بيئة M-7 h FC agar وحضن عند 41,5 درجة مئوية لمدة 7 ساعات . مستعمرات بكتريا القولون البرازية تظهر بلون أصفر (وهذا يدل على تخمر سكر اللاكتوز).

References on 7 hr Test:

Van Donsel, D.J., Twedt, R.M. & Geldreich, E.E. 1969. Optimum temperature for quantitation of fecal coliforms in seven hour on membrane filter. Bacteriol. Proc. Abs. No. G46, p.25.
Reasoner, D.J., Blannon, J.C. & Geldreich, E.E. 1979. Rapid seven hour coliform test. Appl. Environ. Microbiol. 38: 229.

2 . طرق خاصة Special Techniques

هناك فى الجدول التالى ملخص للطرق الخاصة السريعة. معظمها ليس حساس بالدرجة كافية لقياس نوعية مياه الشرب أو انها غير متخصصة. ربما تكون نافعة فى عمليات المراقبة Monitoring للمخلفات السائلة والمياه الطبيعية ولكنها تحتاج الى دلائل Reagents ليست متوافرة بصفة عامة، تحتاج الى تداول خاص أو نظام تحضين غير مناسب مع برامج معظم المعامل. وفيما عدا الطرق اللونية Cholorimetric test، فلا يوجد ما هو مناسب للاستعمال الروتينى وربما تستعمل كوسائل بحثية. ويجب أن يشير المستعمل الى المراجع عن الطريقة والمذكورة فى الجدول عن التفاصيل ، ظروف الاستعمال، وحدود الطريقة. والطرق الموافق عليها هى طريقة الأدينوسين تراى فوسفات ATP، الاختبار اللونى لتقدير العدد الكلى، وطريقة Radiometric لتقدير بكتريا القولون البرازية والتى يستخدم فيها الكربون المشع.

TABLE 9211:I. SPECIAL RAPID TECHNIQUES

Microbial Group	Rapid Method	Test Time h	Sensitivity cells/mL	Reference
Nonspecific microflora	Bioluminescence	1	100 000	1-3
	Chemiluminescence	1	500 000	3-5
	Impedance	3-12	100 000	6-9
	Colorimetric	0.02	10 000	10
	Epifluorescence/fluorometric	<1-several	—	11-13
Fecal coliforms	Radiometric	4-5	2-20	14
	Glutamate decarboxylase	10-13	0.01-500 000	15-17
	Electrochemical	1-7	1 000 000	18-20
	Impedance	6-12	200-100 000	6-9
	Gas chromatographic assay	9-12	>50	21
	Colorimetric	8-20	5-130 000	22
	Potentiometric	3.5-15	0.1->10 000 000	23
Gram-negative bacteria	Limulus assay	2	500-3000	24-27
	Fluorescent antibody	2-3	—	28-30

والربط ما بين تركيز البكتريا وتركيز ATP من خلال استخلاص ATP من تخفيفات متتالية من معلق البكتريا، أو باستخدام الطرق المشعة عن طريق قياس ثانى أكسيد الكربون المشع والناتج عن تركيز معين من بكتريا القولون البرازية فى عينات طبيعية، وليست مزارع نقية. وباستعمال أي طريقة سريعة، تقدر كثافة البكتريا الأصلية باستعمال طريقة مناسبة مثل طريقة عد أطباق البكتريا الهتيروتروفية أو بكتريا القولون الكلية أو البرازية، وتقارن مع النتائج المتحصل عليها باستخدام الطرق السريعة الخاصة.

2 . 1 . اختبار بيوليومينيسنس (تقدير العدد الكلى للميكروبات الحية)

Bioluminescence Test (Total Viable Microbial Measurement)

اختبار Firefly luciferase test لتقدير ATP فى الخلايا الحية يعتمد على التفاعل مابين انزيم ليوسيفيريز، ليوسيفرين الذى يعمل عليه الانزيم، أيونات المغنسيوم، و ATP. يشع الضوء خلال التفاعل ويمكن قياسه كميا ويربط Correlate مع كمية ATP المستخلصة من عدد معين من البكتريا. وعندما تكون كل مواد التفاعل عدا ATP بكمية زائدة، فان ATP يكون هو العامل المحد Limiting factor. اضافة ATP يقود التفاعل، ينتج نبضات من الضوء طبقا لتركيز ATP. التقدير لا يستغرق أكثر من ساعة . ولمراقبة المجتمعات الميكروبيه فى المياه، فان تقدير ATP يحدده الحاجة الى تركيز البكتريا من العينة لتحقيق أقل مستوى من الحساسية لقياس ATP، والذى هو 10^5 خلية/ملل. وعند ترشيح 1 لتر على أغشية الترشيح فان الطريقة تعطى مستوى الحساسية المطلوب.

2 . 2 . الكشف بالقياس الاشعاعى

Radiometric Detection (Fecal Coliforms)

فى هذا الاختبار ، ينطلق ثانى أكسيد الكربون المشع $^{14}CO_2$ من استعمال ^{14}C . الطريقة تسمح بتقدير مبدئى Presumptive detection لما بين 2 -20 من بكتريا القولون البرازية فى 4,5 ساعة. الاختبار يستعمل مرق M-FC، مانيتول مشعع ^{14}C-mannitol، ودرجتى حرارة تحضين؛ 24 ساعة عند 35 مئوية متبوعة بساعتين ونصف الساعة عند 44,5 مئوية وذلك بالنسبة لبكتريا القولون البرازية. ويضاف اللاكتوز المشعع عند بداية التحضين عند 44,5 مئوية. وتستعمل اغشية الترشيح لتركيز الكائنات من العينة ويوضع الفلتر على مرق M-FC broth فى وعاء محكم. الناتج من ^{14}CO يجمع بالتعرض لأقراص ورق ترشيح مشبعة بأيدروكسيد الباريوم $Ba(OH)_2$. ويقد ر النشاط الاشعاعى للكربون بطريقة Liquid scintillation spectrometry.

References on Special techniques

Chappelle, E.W. & Picciolo, G.L. 1975. Laboratory Procedures Manual for the Firefly Luciferase Assay for Adenosine Triphosphate (ATP)> NASA GSFC Doc. X-726-75-1, National Aeronautics & Space Admin., Washington, D.C.

Picciolo, G.L., Chappelle, E.W., Deming, J.W., Thomas, R.R., Nible, D.A. & Okrend, H. 1981. Firefly luciferase ATP assay development for monitoring bacterial concentration in water supplies. EPA-600/S2:81-014,

U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio; NTIS No. 88-103809/AS, National Technical Information Serv., Springfield, Va.
Setz, W.R. & Neary, M.P. 1974. Chemiluminscence and bioluminescence. Anal. Chem. 46:188A.

Wheller, T.G. & Goldschmidt. 1975. Determination of bacterial cell concentrations by electrical measurements. J. Clin. Microbiol. 1:25.

Silverman, M.P. & Munoz, E.F. 1979. Automated electrical impedance technique for rapid enumeration of fecal coliforms in effluents from sewage treatment plants. Appl. Environ. Microbiol. 37:521.

Munoz, E.F. & Silverman, M.P. 1979. Rapid, single-step most-probable-number method for enumerating fecal coliforms in effluents from sewage treatment plants. Appl. Environ. Microbiol. 37:527.

Wallis, C. & Melnick, J.L. 1985. An instrument for the immediate quantification of bacteria in potable waters. Appl. Environ. Microbiol. 49:1251.

Sieracki, M.E., Johnson, P.W. & Sieburth, J.M. 1985. Detection, enumeration, and sizing of planktonic bacteria by image-analyzed epifluoresence microscopy. Appl. Environ. Microbiol. 49:799.

3 . الاختبار الانزيمى لبكتريا القولون Enzyme Substrate Coliform Test

الاختبار الانزيمى يستخدم مادة قابل للتحلل المائى للكشف المتزامن عن انزيمات بكتريا القولون الكلية وايشيريشيا كولاى. عند استعمال الطريقة الانزيمية، فان مجموعة القولون الكلية تحدد بأنها كل البكتريا التى لديها انزيم بيتا-دلتا- جالاكتوسيديز B-D-galactosidase، الذى يكسر المادة الملونة Cleaves the chromogenic substrate، ويؤدى الى انفصال المادة الملونه Chromogen. ايشيريشيا كولاى تحدد على أنها البكتريا التى تعطى استجابة لبكتربا القولون الكلية ولديها انزيم بيتا-جليكيرونيديزB-glucuronidase ، والذى يكسر المادة الملونه وتنفصل مادة تتوهج Fluorogen. ويمكن استعمال الاختبار فى صورة الأنابيب المتعددة Multiple-tube ، الحفر المتعددة Muti-well، أو التواجد-الغياب Presence-absence (عينة واحدة 100 ملل).

3 . 1 . أساسيات

3 . 1 . 1 . بكتريا القولون الكلية

المواد مولدة الصبغات Chromogenic substrates مثل ارثو- نيتروفينيل- بيتا- دلتا- جالاكتوبيرانوسيد Ortho-nitrophenyl-B-D- galactopyranoside (ONPG) أو كلورو-فينول ريد – بيتا – دلتا- جالاكتوبيرانوسيد Chloro- phenol red-B-D- galactpyranoside (CPRG) استعملت للكشف عن انزيم بيتا-دلتا-جالاكتوسيديز B-D-galactosidase والذى ينتج بواسطة بكتريا القولون الكلية. انزيم بيتا-دلتا-جالاكتوسيديز B-D-galactosidase يحلل مائيا المادة التى يعمل عليها Substrate وينتج تغير فى اللون، والذى يدل على ان الاختبار موجبلبكتريا القولون الكلية بعد 24 ساعة (ONPG) أو 28 ساعة (CPRG) بدون طرق أخرى. البكتريا التى لا تتبع بكتريا القولون مثل أجناس ايروموناس Aeromonas وسيدوموناس Pseudomonas، ربما تنتج كميات صغيرة من انزيم بيتا-دلتا-جالاكتوسيديز B-D-galactosidase، ولكن تثبط وعادة لا تنتج استجابة موجبة خلال زمن التحضين الا اذا وجد أكثر من 10^4 وحدة تكوين المستعمرات CFU / ملل.

3 . 1 . 2 . ايشيرشيا كولاى Escherichia coli

تستعمل مادة يعمل عليها الانزيم Fluorogenic مثل 4-ميثيل –امبيليفيريل-بيتا-دلتا-جلوكيورنيد 4-methyl-umbelliferyl-B-D- glucuronide (MUG)، لملاحظة وجود انزيم بيتا-جلوكيرينيديز B-glucuronidase، والذى تنتجه ايشيريشيا كولاى . هذا الانزيم يحلل المادة المستخدمة MUG وينتج مادة تتوهج Fluorescent فى وجود الأشعة الفوق بنفسجية طويلة الموجه (365 nm). وجود هذا التوهج يدل على الايجابية لايشيريشيا كولاى. بعض السلالات من الشيجيلا ربما تظهر هى الأخرى ايجابية للاختبار فتعطى التوهج تحت الأشعة الفوق بنفسجية . ولأن الشيجيلا هى الأخرى مرضية للانسان ، فان وجودها الآخر يدل على الخطورة من تناول المياه أى أن وجودها يدل على الحالة الصحية للمياه وعلى ذلك لا يؤخذ على الاختبار ايجابيتة لبكتريا أخرى خلاف ايشيريشيا كولاى.

3 . 2 . التطبيقات Applications

الاختبار الانزيمى لبكتريا القولون يوصى به لتحليل عينات مياه المصدر والشرب. ويوجد اختبار لمياه البحر. والمعامل التى تخطط لاستعمال هذه الطريقة يجب أن تجرى فى نفس الوقت اختبارات كمية(تشمل الاختلافات الموسمية)بأحد الاختبارات القياسية لبكتريا القولون لتقييم فعالية الاختبار لنوعية معينة من الماء ستحلل ولتقدير مقارنة الطريقتين. هذا يكون له أهمية خاصة عند اختبار مصادر المياه.

عينات المياه الحتوية على هيوميك او مواد أخرى ربما تتلون. اذا كان هناك خلفية ملونه، قارن الأنابيب الملقحة بالنسبة لأنبوبة مرجعية Control تحتوى عينة مياه فقط. فى بعض نوعيات المياه، املاح الكالسيوم المرتفعة تستطيع أن تسبب ترسيب ولكن هذا لا يجب أن يؤثر على التفاعل.

لا تستعمل مادة يعمل عليها الانزيم Substrate لتأكيد مزارع بكتريا قولون مبدئية Presumptive coliform culture أو مستعمرات من أغشية الترشيح Membrane filter colonies، لأن المادة التى يعمل عليها الانزيم ربما تتأثر بالجرعة العالية من البكتريا الغير تابعة لبكتريا القولون والتى تنتج انزيم بيتا-دلتا-جالاكتوسيديز الضعيف B-D- galactosidase وتعطى نتائج ايجابية زائفة False positive results.

الاختبار الانزيمى Enzyme Substrate Test

2.3 . 1 . البيئة Substrate Media

التراكيب متوافرة تجاريا (Colilert and Colilert 18 for multi-tube, PLA and tray formats, Colilert MW for multi-tube format, and Colisure for multi-tube and P/A formats, available from IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME.).

على صورة أنابيب جاهزة للاستعمال عند الحاجة Disposable طريقة الأنابيب المتعددة ، وفى صورة حفر متعددة Multi-wells(Quanti-Tray) فى حالة طريقة الحفر المتعددة، أو فى أوعية التى سوف تحوى 100 ملل من العينة لطريقة التواجد/ الغياب. امنع تعرض المادة التى يعمل عليها الانزيم طويلا لأشعة الشمس المباشرة. خزن البيئة طبقا للتوجيهات واستعملها قبل انقضاء تاريخ الصلاحية . تخلص من البيئة التى تغير لونها.

3 . 2 . 2 . الطريقة Procedure

3 . 2 . 2 . 1. طريقة الأنابيب المتعددة Multiple-tube procedure

اختار العدد المناسب من الأنابيب لكل عينة والتى سبق ووزعت البيئة بهالاختبار الأنابيب المتعددة ويكتب عليها. اتبع تعليمات المصنع لتحضير التخفيفات المتتابعة لمختلف التركيبات. بطريقة معقمة أضف 10 ملل من العينة لكل أنبوبة، غطها باحكام، واخلط بشدة لتذوب. المخلوط يبقى عديم اللون فى اختبار ONPG فى الاساس ويتحول الى اللون الأصفر فى حالة CPRG . بعض الجزيئات ربما تبقى غير ذائبة خلال الاختبار؛ هذه سوف لا تؤثر على كفاءة الاختبار. حضن عند 35 +/- 5, درجة مئوية لمدة يحددها مصنع المادة التى يؤثر عليها الانزيم Substrate.

ويمكن اجراء الطريقة أيضا باضافة كميات مناسبة من البيئة التى بها المادة التى يعمل عليها الانزيم الى العينة وخلطها بشدة ثم توزيعها فى خمسة أو عشرة أنابيب معقمة ، حضن طبقا لطريقة الأنابيب المتعددة.

3 . 2 . 2 . 2 . طريقة الحفر المتعددة Multi-well procedure

طريقة الحفر المتعددة تجرى باستخدام اسبات جاهزة معقمة Sterilized disposable. baskets أضف العينة الى اناء 100 ملل مع المادة التى يؤثر عليها الانزيم، هز بشدة، وصب فى الصينية Tray. < توزع العينة فى الحفر Wells وتغلق العبوة باحكام. حضن عند 35 +/- 5, درجة مئوية لمدة تحدد بواسطة مصنع المادة التى يعمل عليها الانزيم.

3 . 2 . 2 . 3 . طريقة التواجد/الغياب Presence/absence procedure

بطريقة معقمة أضف البيئة السابق وزنها الى 100 ملل من العينة فى زجاجة بوروسليكات، معقمة، شفافة لا تتوهج Nonfluorescent. اختياريا، أضف 100 ملل من العينة الى المادة التى يعمل عليها الانزيم فى وعاء معقم من امداد المصنع. بطريقة معقمة غط واخلط بشدة للاذابة. حضن طبقا لارشادات المصنع.

4. التفسير Interpretation

4 . 1 . بكتريا القولون الكلية Total coliform bacteria

بعد أقل فترة تحضين مناسبة ، اختبر الأنابيب أو الأوعية للتغير المناسب فى اللون وطبقا للجدول التالى. ONPG يتحلل بانزيم البكتريا ليعطى لون أصفر. CPRG يتحلل بانزيم البكتريا ليعطى لون أحمر. اذا لم يكن اللون متناسق خلال الأنبوبة، اخلط بالقلب قبل القراءة. اقرأ تعليمات المصنع والخطوط الاسترشادية لتفسير النتائج. بعض المصنعين ينصح بمقارنة لون الأنابيب بألوان مقارنه متاحة من المصنع العينات تكون سالبة لبكتريا القولون الكلية اذا لم يلاحظ لون فى اختبارات ONPG أو اذا كانت الأنبوبة صفراء عند استعمال CPRG. اذا كانت الاستجابة اللونية محل تساؤل بعد 18 أو 24 ساعة بالنسبة لاختبار ONPG، حضن لمدة 4 ساعات اضافية. اذا كانت الاستجابة سالبة بعد 28 ساعة بالنسبة لاختبار CPRG حضن لمدة 20 ساعة اضافية. اذا كان التلوين كثيف فان العينة تكون موجبة لبكتريا القولون الكلية، أما اذا لم يكن، فان العينة تكون سالبة.

Color Changes for Various Media

Substrate	Total Coliform +	E.coli +	Negative result
ONPG-MUG	Yellow	Blue fluorescence	Colorless
CPRG_MUG	Red or magneta	Blue fluorescence	Yellow

4. 2. ايشيرشيا كولاى Escherichia coli

اختبر الأنابيب الموجبة لبكتريا القولون الكلية للتوهج Fluorescense باستعمال لمبة أشعة فوق بنفسجية طوياة الموجه 365 nm ويفضل أن تكون قوتها 6 وات. وجود التوهج يدل على أن الاختبار ايجابى لايشيريشيا كولاى. اذا كان التوهج محل شك أو غير واضح، حضن لمدة 4 ساعات اضافية لاختبارات ONPG وحتى20 ساعة لاختبارات CPRG ووجود توهج مركز يدل على الايجابية.

5 . التقرير Reporting

اذا اجريت طريقة العد الأكثر احتمالا MPN، فيحسب العدد الأكثر احتمالا لبكتريا القولون الكلية وايشيريسيا كولاى من عدد الأنابيب الموجبة. واذا استخدمت طريقة التواجد/الغياب ، فان النتائج تكتب على صورة بكتريا القولون الكلية وايشيريشيا كولاى تتواجد أو غائبة فى 100 ملل من العينة.

6 . التحكم فى الجودة Quality Control

اختبر كل لوط من البيئة المشتراه لكفاءتها بالحقن بثلاث بكتريا مرجعية: ايشيريشيا كولاى, بكتريا قولون كلية خلاف ايشيريشيا كولاى مثلا انتيروباكتر كلوكا ، بكتريا لا تتبع بكتريا القولون. وايضا أضف مياه معقمة مرجعية. أذا اعطت المياه المرجعية توهج باهت أو نتيجة ايجابية باهتة بالنسبة لبكتريا القولون، اهمل واستعمل Batch جديد من المادة التى يعمل عليها الانزيم Substrate. تجنب استعمال حقن كثيف Heavy inoculum. اذا استعملت Pseudomonas كمثال للبكتريا الغير قولونية اختار جنس لا يعطى توهج Nonfluoresent species. حضن المرجعيات Controls عتد 35 +/- 5, درجة مئوية . اقرأ وسجل النتائج .

References

Edberg, S.C., Allen, M.J., Smith, D.B. & The National Collaborative Study. 1988. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration of total coliforms and Escherichia coli from drinking water: Comparison with the standard multiple tube fermentation method. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1595.

Edberg, S.C. & Edberg, M.M. 1988. A defined substrate technology for the enumeration of microbial indicators of environmental pollution. Yale J. Biol. Med. 61: 389.

Covert, T.C., Shadix, L.C., Rice, E.W., Hanes, J.R. & Freyberg, R.W. 1989. Evaluation of the Autoanalysis Colilert test for detection and enumeration of total coliforms. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2443.

Edberg, S.C. & Smith, D.B. 1989. Absence of association between total heterotrophic and total coliform bacteria from a potable water supply. Appl. Enviro. Microbiol. 55: 380.

Edberg, Sc., Allen, M.J., Smith, D.B. & Kriz, N.J. 1990. Enumeration of total coliform and Escherichia coli from source water by the defined substrate technology. Appl. Environ, Microbiol. 56:366.

Rice, E.W., Allen, M.J. & Edberg, S.C. 1990. Efficacy of B-glucuronidase assay for the identification of Escherichia coli by the defined substrate technology. Appl. Environ. Microbiol. 56:1203.

Rice, E.W., Allen, M.J., Brenner, D.J.& Edberg, S.C.1991. Assay for B-glucuronidase in species of the genus Escherichia and its application for drinking water analysis. Appl. Environ. Microbiol.57: 592.

الفصل التاسع

العد الكلى المباشر للبكتريا
Direct Total Microbial Count

الفصل التاسع

العد الكلى المباشر للبكتريا

Direct Total Microbial Count

1 . مقدمة

عد خلايا البكتريا المباشر فى المياه أو المخلفات السائلة عادة يفوق الأعداد المتحصل عليها من عد البكتريا الهتيروتروفية بالأطباق وذلك راجع للخطأ المتسبب عن الظواهر المتعلقة بالحيوية مثل الانتقاء Selectivity لبيئة النمو، تجمع الخلايا Clumbing والبطء فى معدل النمو.

2 . Epifluorescence Microscopic Method

2 . 1 . مناقشة عامة

هذه الطريقة تعطى عد مباشر للعدد الكلى بسرعة (20 – 30 دقيقة) وبحساسية. وهى لا تسمح بالتفرقة بين خلايا البكتريا على أساس التقسيم، نشاط التمثيل الغذائى، أو الحيوية، و ولا يمكن استعمالها لتقدير الكتلة الميكروبية Microbial biomass للاختلافات الكبيرة فى حجم الخلايا. الطريقة تحتاج الى خبرة الفنى الذى يستطيع التفرقة ما بين الخلايا الميكروبية والرواسب على أساس الشكل.

تتركب الطريقة من تثبيت العينة للتخزين، الصبغ بصبغة Fluorochrome الترشيح بالتفريغ على غشاء بولى كربونات Nonfluorescing polycarbonate membrane، والعد بواسطة Epifluorescence microscopic .

2 . 2 . الأجهزة Apparatus

2 . 2 . 1 . ميكروسكوب Microscope

مصدر للأشعة الفوق بنفسجية رأسى بحقل مستوى، عدسة زيتية 100 X لتعطى قوة تكبير كلية 1000 X على الأقل.

2 . 2 . 2 . عينية للعد Counting graticule

عدسة عينية ميكروميتريه ocular lens micrometer مدرجة بمسرح ميكرومترى Calibrated with stage micrometer

2 . 2 . 3 . مرشحات Filters وتشمل فلاتراثارة Excitation filters (KP 400 and LP 455) ، شاطر أشعة Beam splitter(LP 510) وفلتر حاجز Barrier filter (LP 520 using mercury lamp, HBO 50).

2 . 2 . 4 . خلاط أو جهاز فورتكس Blender or vortex mixer

2 . 2 . 5 . وحدة ترشيح Filtration unit مناسبة للاستعمال بأغشية ترشيح قطر 25 مم.

2 . 2 . 6 . أغشية ترشيح Membrane filters من نوع البولى كربونات قطر 25 مم، قطر الثقوب 0,2 ميكرون (يكون غير متوهج Nonfluorescent أو يجهز بغمس الغشاء فى Irgalan black [2 جرام /اللتر من 2% حامض خليك] لمدة 24 ساعة ، ويغسل فى الماء ويجفف هوائيا) ؛ سليولوزى قطر 25 مم، قطر الثقوب 5 ميكرون.

2 . 2 . 7 . سرنجات Syringes 3 ملل لا يعاد استعمالها ويركب عليها فلاتر 0,2 ميكرون ولا يعاد استخدامها أيضا.

2 . 2 . 8 . أنابيب اختبار Test tubes زجاجية بغطاء قلاووظ 13 X125 مم.

3 . الدلائل أو الكشافات Reagents

3 . 1 . محلول فوسفات منظم Phosphate buffer أذب 13,6 جرام KH_2PO_4 فى ماء وخفف الى ا لتر . أضبط عند pH 7 ؛ رشح خلال غشاء ترشيح 2, ميكرون.

3 . 2 . مثبت Fixative 5 % (وزن/حجم) جلوتارلدهيد فى محلول فوسفات منظم محضر حديثا.

3 . 3 . فلوركروم FDluorochrome 1, % (حجم/ وزن) اكريدين برتقالى فى محلول فوسفات منظم .

3 . 4 . زيت للعدسة الزيتية منخفض التوهج Immersion oil, low fluorescing

4 . الطريقة Procedure

اجمع العينات. أضف 9 ملل من العينه الى انبوبة اختبار محتوية علة 1 ملل مثبت. العينة المثبته يمكن تخزينها عند 4 مئوية حتى 3 أسابيع بدون نقص معنوى فى أعداد الخلايا.

وزع وخفف عينات من مصادر mesotrophic or eutrophic للحصول على نتائج .

اخلط عينه باستعمال خلاط أو فورتكس، وخفف 10/1 فى محلول فوسفات منظم. عينات المياه النقية ربما لا تحتاج الى تخفيف ولكن الحجوم الكبيرة (أكبر من 100 ملل) ربما يحتاج اليها للحصول على أعداد حقيقية.

ضع 1 ملل من العينة أو تخفيف منها على مرشح بولى كربونات غير متوهج nonfluorescent مدعم بغشاء سليولوزى Cellulosic membrane filter فى Filter holder.

باستعمال فلاتر تركب على سرنجة، أضف 1 ملل فلوركروم وانتظر دقيقتان، أضف حوالى 3 ملل محلول منظم من الفوسفات المرشح للسماح بتوزيع أكثر للخلايا. وكبديل، اخلط الفلوركروم مع العينة فى انبوبة صغيرة، واسمح بالتفاعل، أضف خليط الى Filter holder.

رشح بالتفريغ (حوالى 13 kPa) . اغسل باستعمال 2 ملل من الفوسفات المنظم ورشح.

أزل مرشح البولى كربونات بملقط وجفف هوائيا لمدة 1 – 3 دقيقة. يمكن قطع الفلتر الى 4 أجزاء ويحفظ اذا لزم. ضع الفلتر المجفف على نقطة من الزبت Immersion oil على شريحة ميكروسكوب نظيفة. أضف نقطة صغيرة من نفس الزيت على سطح الفلتر. بلطف

غط الفلتر بغطاء شريحة Cover. يمكن تخزين العينة بضع شهور بدون فقد للتوهج Fluoresence.

اختبر على الأقل 10 مجالات عشوائية مختارة على الفلتر باستعمال عدسة زيتية 100 X (اذا لم تكن توزيع الخلايا منتظم خفف العينة وعاود الخطوات). يفضل عد 10 – 50 خلية فى المجال. عد الخلايا فى 20 مربع على الأقل وباستعمال عدسة عينية مقسمة.

5 . الحسابات Calculations

احسب المتوسط لاعداد الخلايا على الفلتر.

عدد الخلايا/ملل= (متوسط الخلايا/المربع) X (مربعات/فلتر) X (معامل التخفيف)/ حجم العينة ملل.

References on Epifluorescence microscopic method

Hobbie, J.E., Daley, R.J. & Jasper, S. 1977. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. Appl. Environ.Microbiol. 33: 1225.

Sierack, M.E., Joenson, P.W. & Sieburth, J. McH. 1985. Detection, enumeration, and sizing of planktonic bacteria by image-analyzed epifluorescence microscopy. Appl, Environ, Microbiol. 49: 799.

American Society For Testing And Materials. 1987. Standard test method for enumeration of aquatic bacteria by epifluorescence microscopy counting procedure. ASTM D4455-85. Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.02, Water. American Soc. Testing & Materials, Philadelohia, Pa.

الفصل العاشر

الفطريات
FUNGI

الفصل العاشر

الفطريات

FUNGI

1 . مغزاها ، تواجدها ، وحيويتها

Significance, Occurrence and Survival

الفطريات وليدة المياه هى الأخرى كائنات انتهازية والتى هى غالبا ذات مدلول صغير من وجهة نظر الصحة العامة، وعلى ذلك فان تواجدها فى بعض الحالات يؤدى الى استعمار جسم الانسان ومن الممكن أن تؤدى الى مضاعفات مميته. وفى مواقف أخرى تنشأ الاصابات الفطرية من استعمال جرعات عالية من المضادات الحيوية والعلاج الذى يؤدى الى انخفاض المناعة. وفى حالة الاصابات العرضية الغير مميته، ربما يتسبب الفطر فى ظهور الحساسية، التوكسينات الفطرية Mycotoxins اصابات جلدية، الأظافر، الشعر، اصابات فى أعضاء التناسل. وسيلة الانتقال فى الغالبية العظمى عن طريق الهواء أو الماء فى المنزل، المستشفيات، والينابيع الساخنة Spa. وجدت الفطريات الخيطية شائعة فى البيئات المائية، ولكن لم يحظى تواجدها فى مياه الشرب سوى اهتمام قليل. وكنتيجة لتجزء الميسيليا ومقاومة الجراثيم للتطهير، ربما تمر السلالات المختلفة المتواجدة فى مصادر المياه الخام خلال المرشحات الرملية وتقاوم عمليات التطهير بدرجات واسعة والتى تؤدى الى الاختلاف فى الازالة. وبينما معالجة المياه الخام بالتجلط الكيماوى والتطهير فعالة لازالة الفطريات، فان تلك الكائنات تواجدت فى 4 من 12 عينة معالجة. فشل عمليات المعالجة فى ازالة خيوط الفطر وجراثيمه بالكامل يجعل من ذلك طريق الى التواجد فى نظم التوزيع. وهناك مصادر اضافة أخرى للفطر الى خزانات المياه المعالجة تنشأ من التلوث بالتراب الموجود الهواء أو نتيجة دخول التربة الملوثة الى الشبكات من خلال كسرأو اثناء عمليات الاصلاح. وبدخول الفطريات نظام التوزيع، ربما يثبت الفطر نفسه وبسرعة فى رواسب المواسير وفى مناطق نشوء الفيلم الحيوى. على أن المناطق المفضلة لاستيطان الفطر هى مكان وصلات المواسير والمركبات المستخدمة لمنع التسرب بين الوصلات. ولأن الكونيديا فى الفطريات الخيطية المتشعبة Filamentous مقاومة للكلور المتبقى فى خطوط التوزيع (3,. مجم/اللتر) فان عمليات استيطان الفطر تتم دون القضاء

عليها بعمليات التطهير المعتادة. وفى الحقيقة فان النمو الزائد للفطر فى مواطن تكون الفيلم الحيوى Biofilm يمكن أن يشكل احتياج الى الكلور Chlorine demand والذى من شأنه أن يخفض من المتبقى من المطهر فى شبكة المواسير.

تكرارية تواجد وتوزيع الأجناس Profile من الفطر فى مصدر المياه ربما يختلف كانعكاس للاختلاف الموسمى فى درجة الحرارة، مصدر المياه، ونظم المعالجة. فمثلا، 17,6 % من 978 عينة جمعت من خطوط النقل ونظام التوزيع لمحطة مياه بنيفادا الجنوبية كانت ايجابية للفطر. وفى دراسة أخرى على 6 نظم مياه جوفية معالجة بالكلور فى بنسلفانيا ونيو جيرسى تواجد الفطر فى 55،2 % من 727 عينة مختبرة. والمياه الدافئة تعتبر مناسبة لنمو الفطر فى نظم التوزيع. وكان النمو عند 13 – 20 درجة مئوية أكثر من الحرارة المرتفعة ما بين 20 – 29 درجة مئوية. ربما يرجع ذلك الى التنافس بنمو البكتريا الهتيروتروفية عند الحرارة المرتفعة والتى يكون لها تأثير معاكس على نمو الفطر.

والفطريات تختلف حسب نوعية مصدر المياه الخام. ولقد وجد أن مياه النهر تحتوى فطريات محبة للحرارة Thermophilia fungi اكثر من ماء البحيرة. والقليل معروف عن التنوع فى الفطريات فى خطوات المعالجة على أنه لوحظ أن هناك تغيرات فى نوعيات الفطر مع التغير فى pH كنتيجة المعالجة بالجير ,كذلك نتيجة للمعالجة بالكلور.

ولقد وجد ان كثافة الفطر فى مصادر المياه مختلفة، جزئيا بسبب البيئة المختارة للزرع ودرجة حرارة ومدة التحضين. عدد الفطريات الخيطية المختلفة والخميرة التى وجدت فى 978 عينة مجمعة من محطة المياه فى جنوب نيفادا خلال فبراير- يوليو 1988 صنفت فى 20 جنس وكانت الأجناس الشائعة هى Cladosporium, Phoma, and Candida parapsilosis.

فى حين كانت فى حالة نظامى توزيع (أحدهما معالج بالكلور والآخر غير معالج) فى جنوب كاليفورنيا ، هى Penecillium, Sporocybe, Acremonium, and Paeciolomyces .

وكان متوسط الكثافة للفطر فى حالتى النظام المعالج والغير معالج هو 34 و 18 كائن / 100 ملل، على الترتيب.

فى أوروبا لوحظ نفس النموذج من الفطريات الخيطية، فكان الجنس Aspergillus fumigatus **هو** الشائع فى نظم التوزيع لخمسة عشر مصدر فى فنلندا.

وفى انجلترا كان الشائع Cephalospdrium sp,Verticillium sp., Trichoderma sporulosum, Nectria veridesceus, Phoma sp., and Phialophora sp

وكان عدد الفطر فى هذه المياه أقل من 100/10 ملل.

ولأن الفطر يتكاثر عادة بالجراثيم أكثر من التجزئة Fragments للميسيليا، ربما كان ذلك حجة على أن تواجد الفطر فى مصادر المياه هو وليد المصادفة يعنى أنه ينتج من التلوث من الهواء أكثر

من امكانية استعماره نظام التوزيع. والشواهد المتاحة تدل على أن، عدد الفطر المرتفع جدا والمتواجد فى بعض العينات يمكن تفسيره بدخول الجراثيم عرضيا الى النظام أو اثناء جمع العينة. استعمار الفطر يتواجد فى اماكن الفيلم الحيوى والذى ربما يكون صنبور الحريق، الخزانات أو الملحقات على مواسير التوزيع فى المساكن. النمو اللزج Slime الذى يظهر على مخارج التسرب البطىء من الصنابير وجد أنه يرجع الى نمو هيفات الفطر لجنسين من Fusaria . وفى هذه الحالة فان هذا النمو يعود الى تلوث عند منطقة التسرب وليس نتيجة وجود الفطر فى المياه وخروجه عند فتحة الصنبور.

والفطر شاملا الخميرة والأجناس الخيطية أو العفن، واسع الانتشار. وهى كائنات هتيروتروفية لها نواة وذات جدر صلبة. وهى ربما تتواجد حيث تتواجد المواد العضوية الغير حية، على الرغم من أن بعض الأجناس مرضى والبعض الآخر طفيلى. وعادة فان المياه شديدة التلوث يكون أصل الفطر فيها من النوعيات التى تعيش فى التربة. على أن الارتباط ما بين كثافة الفطر وتواجد المادة العضوية جعل هناك امكانية اتخاذ تواجد الفطر على أنه دليل على التلوث. ولسوء الحظ لم يمكن اتخاذ جنس معين أو مجموعة معينة على أنها مهمة فى هذا الشأن. وهناك بعض الاستثناءات، فلكون الخميرة Candida lambica لديها القدرة على استخدام سكريات البنتوز ، اتخذ تواجدها دليل على التلوث بمخلفات صناعة الورق والتى هى غنية بالسكريات من هذا النوع. وبعض أجناس الخميرة والفطر الخيطى تعتبر من صفات المياه الدافئة ولذلك ربما تكون نافعة كدليل على التلوث الحرارى.

ولأن الفطريات لديها القدرة على انتاج العديد من الانزيمات، فان لها القدرة على النشاط التحليلى لمعظم المواد الطبيعية المعقدة وكذلك بعض المركبات التركيبية وتشمل المبيدات الحشرية. ومعظم الفطر هوائى أو قليل الاحتياج للأكسوجين Microaerophilic، علىالرغم من أن القليل يظهر تمثيل غذائى لاهوائى وقليل جدا منها له القدرة على النمو لاهوائيا تماما. بعض الأجناس لا تحتاج الى هواء. من الممكن أن يكون الفطر مصدر الطعم فى المياه.

فيما عدا Aspergillus fumigatus, A. flavus and A. niger فان الفطريات التى عزلت من المياه لا يمكن اعتبار أن لها أهمية طبية. على أن الاصابة بالفطريات اعتبرت أن لها أهمية فى حالة الأفراد منخفضى المناعة.

2 . الفطريات فى مياه التنزه Fungi in recreational waters

بعض الفطريات الممرضة للانسان ربما تتواجد فى مياه التنزه مثل حمامات السباحة والشواطىء وفى أماكن الاستحمام (الدش).

Trichophyton mentagrophytes يسبب التينيا tinea pedis والتهاب القدم athletes foot وعزلت من أرض الدش. وكثير من الأجناس الممرضة عزلت من رمال الشواطىء فى هاواى والمانيا.

حيويتها مع المعالجة بالكلور Survival on chlorination

عزلت خمائر من المخافات السائلة المعالجة بالكلور. هذه الخمائر قاومت 1 مجم من الكلور الحر لمدة 20 دقيقة فى حين أن ايشيرشيا كولاى لم تقاوم أكثر من 5 دقائق مقاومة لوجود 03، . مجم كلور. ولقد وجد أن الكانديدا البيكانس Candida albicans لا تقاوم 4 مجم كلور لمدة 30 دقيقة عندما كان عددها 10^5 / ملل. وبالنسبة للخميرة من نوع C. parapsilosis وهى تسبب مشاكل صحية فى المناطق الاستوائية وجد أنها شديدة المقاومة عن بكتريا القولون. خلايا الفطر وخاصة الكونيديا يمكن أن تقاوم الكلور أكثر من بكتريا القولون وذلك عند التعرض لمدة 10 دقائق لمقدار 10 مجم / اللتر من الكلور عندما كان عدد الجراثيم 10^6 / ملل.

3 نماذج النمو Growth patterns

فى المياه يوجد نموذجين لنمو الفطر. فطريات الماء الحقيقية True aquatic fungi تنتج Zoospores أو جاميطات Gametes متحركة بفلاجلا. وبعض الفطريات خاصة المتواجدة فى الحشرات لها طور طور أميبى Amoeboid stage.

يوجد نموذج آخر لنمو الفطر يكون غير متحرك فى جميع مراحل دورة الحياة. ويكون النمو والتكاثر لاجنسى Asexual. ولقد أمكن معرفة 3 عمليات نمو (1) نمو خيطى Filamentous growth بجراثيم تنتج بتركيب خاص (2) نمو خيطى متفرع مع التجزء لتكون جراثيم فردية تسمى arthroconidia (3) نمو خلوى فردى ينتج على كل خلية أبوية تسمى التبرعم Budding كم فى الخميرة.

وحيث تتكاثر الفطريات تتوافر المادة العضوية فى المياه أو التربة. وتواجد أكثر من نوع هو دليل على تأقلم تلك الأنواع للظروف البيئية المتوافرة.

وبحصر تواجد الفطريات فى المياه، المخلفات السائلة والمواد العضوية الملوثة وجد 984 جنس: 133 جنس تنتمى الى Mastigomycotina لها Zoospores بفلاجلا؛ 79 تنتمى الى Zygpmycotina؛ 161 تنتمى الى Ascomycotina؛ 18 Baidiomycotina؛ 593 تنتمى الىDeuteromycotina.

4 . طرق الزراعة:

4 . 1 . طريقة الأطباق المصبوبة Poured plate

4 . 1 . 1 . العينات

تجمع العينات كما سبق (QC/QA) ويمكن استعمال أمبولات بلاستيكيه لها غطاء محطم. وهى عادة معقمة وتنقل رأسية ويتخلص منها بعد الاستعمال. يمكن الاحتفاظ بالعينات 24 ساعة. اذا لم يتم التحليل عقب الجمع تحفظ العينات فى الثلاجة.

4 . 1. 2 . البيئات

للعد، Neopeptone-glucose-rose bengalk-aureomycin agar هى البيئة المعتادة ولو أن الخبرة أظهرت أن Czapek agar (فى حالة Aspergillus, Penicillium and related fungi) و Yeast extract-malt extract-glucose agar or Diamalt agar(للخمائر) ربما تكون مفضلة و لتقدير الخصائص Inventory استعمل Neopeptone-glucose agar.

4 . 1 . 2 . 1. Neopeptone-glucose-rose Bengal aureomycin agar

5 g. neopeptone, 10 g. glucose, 3.5 mL rose Bengal solution (1 g/100 ml reagent-grade water), 20 g. agar in 1 L reagent-grade water.

يفضل توزيعها فى أنابيب بكميات 10 ملل وتعقم فى الأوتوكلاف ، pH النهائى حوالى 6,5.

حضر محلول كلورتتراسيكلين أو تتراسيكلين (1جرام مضاد قابل للذوبان / 150 ملل reagent-(grade water واحفظه فى الثلاجة. قبل الاستعمال، عقم بالترشيح. ولاستكمال

البيئة، أضف 5,. ملل محلول معقم لى 10 ملل من البيئة الأساسية المنصهرة والمبردة عند 45 مئوية.

4 . 1. 2 . 2 . Czapek (or Czapek-Dox) agar

أذب 30 جرام سكروز، 3 جرام نترات االصوديوم ، 1 جرام داى بوتاسيوم هيدروجين فوسفات، 5,. جرام سلفات المغنسيوم ، 5,. جرام كلوريد البوتاسيوم، 1,. كبريتات الحديدوز، 15 جرام آجار فى لتر Reagent-grade water. بعد التعقيم يكون pH 7,3. هذه البيئة نافعة عند عزل Aspergillus, Penicillum, Paecilomyces وبعض الفطريات الأخرى المشابهة فى الاحتياجات الفسيولوجية.

4 . 1. 2 . 3 . Yeast extract-malt extract-glucose agar

أذب 3 جرام مستخلص الخميرة، 3 جرام مستخلص المولت، 5 جرام نيوببتون، 10 جرام جلوكوز و 20 جرام آجار فى لتر Reagent-grade water . لا حاجة لضبط pH. هذه البيئة مفيدة فى عزل الخمائر.

4 . 1. 2 . 4 . Diamalt agar

أذب 150 جرام دياموات و 20 جرام آجار فى لترReagent-grade wate لا حاجة لضيط pH. البيئة تكون عكرة ولا حاجة للترشيح. هذه البيئة مفيدة فى تنقية عزلات الخميرة ولدراسة أجناس الخميرة فى الاختبارات الخاصة المختلفة.

4 . 1. 2 . 5 . Neopeptone-glucose agar

أذب 5 جرام نيوببتون، 10 جرام جلوكوز ، 20 جرام آجار فى لتر Reagent-grade water. بعد التعقيم يكون pH البيئة 6,5. وهذه البيئة معروفة باسم Emmon's Sabouraud Agar أو Emmon's Sabouraud Dextrose Agar. البيئة مفيدة لحفظ المزارع.

4 . 1 . 3 . الطريقة Procedure

يمكن تحليل 40 عينة بواسطة شخص واحد، ولكن المفضل أن تكون 20 عينة.

4 . 1 . 3 . 1 . التحضير والتخفيف Preparation and dilution

الى دورق معقم سعة 250 ملل أضف 135 ملل Reagent0grade water مقم ، 15 ملل من العينة لتحصل على تخفيف 1 : 10 من العينة. استعمل وسيلة قياس معقمة لكل عينة، أو أقل تفضيلا، اغسل وسيلة أخذ العينة بماء معقم بين العينات المختلفة. اخلط العينة جيدا قبل سحب الجزء منها (15 ملل) . هز الدورق على هزاز على 120-150 دورة فى الدقيقة لمدة 30 دقيقة أو انقل محتويات الدورق الى خلاط، غطه واخلط عند السرعة المنخفضة لمدة دقيقة أو عند السرعة العالية لمدة 30 ثانية. يفضل استعمال كأس خلاط معقم لكل عينة، أو اغسل جيدا بين العينات بماء معقم. ربما يتم عمل تخفيفات أكثر باضافة 45 ملل ماء معقم الى 5 ملل من تخفيف 1 : 10.

للعينات المأخوذة من مجرى تخفيف 1 : 10 يكون عادة مناسب.خفف العينات ذات المحتوى العالى من المواد العضوية مثل الرواسب الى 1 : 100 أو 1 : 1000 . جوانب المجرى أو عينات التربة تخفف الى 1 : 1000 أو 1: 10000.

4 . 1 . 3 . 2 . عمل الأطباق Plating

للاختبار حضر 5 أطباق من كل تخيف. لاستخدام Neopeptone-glucose-rose Bengal-aureomycin agar انقل بطريقة معقمة 10 ملل من البيئة عند 45 درجة مئوية الى طبق بترى قطر 9 سم . أضف 1 ملل من تخفيف العينة المناسب واخلط كما سبق فى حالة اختبارات البكتريا. وكبديل أضف الى طبق البترى 1 ملل من العينة، 5.و. محلول مضاد حيوى، 10 ملل من البيئة عند 43 الى 45 مئوية . دع الآجار يتصلب بسرعة .

4 . 1 . 3 . 3 . التحضين

لا تقلب الأطباق. حضن على درجة حرارة الغرفة (20 – 24 مئوية) فالضوء ولكن امنع التعرض لضوء الشمس المباشر. اختبر وعد الطباق بعد 7,5,3 أيام .

4 . 1 . 3 . 4 . العد

عد الفطريات فى الأطباق يمدنا بالأساس للمقارنة الكمية الغير دقيقة بين العينات والتخصيص يمدنا بمعلومات أهم عن الأجناس.

عند تحضير الأطباق استعمل جزء من العينة الذى من الممكن أن يعطى حوالى 50 الى 60 مستعمرة على الطبق. وعند اختبار نوعية جديدة اختبر على الأقل تخفيفين من العينة. يمكن عد حتى 300 مستعمرة ولكن استبعد الأطباق الكثر ازدحاما. البيئة المحتوية على Rose Bengal تميل الى اعطاء مستعمرات منفصلة كما تسمح بنمو الكائنات البطيئة فى نموها. التصنيف المباشر مطلوب ويعتمد أساسا على المورفولوجى ويمكن حساب نسبة كل جنس من العدد الكلى فى العينة بانسبة للحجم المختبر والتخفيف المستخدم من العينة.

4 . 2 . طريق فرد الأطباق Spread plate technique

4 . 2 . 1 . العينات

كما سبق فى طريقة الأطباق المصبوبة

4 . 2 . 2 . البيئات Media

استعمل أى من البيئات التالية: Aureomycin-rose Bengal-glucose-peptone agar and streptomycin-tetramycin-malt extract agar

وهى ذات فائدة فى تحليل عينات المياه والصرف الصحى.

Neopeptone-glucose-rose Bengal aureomycin agar, Czapek , Yeast extract-malt extract-glucose agar, Diamalt agar.

4 . 2 . 2 . 1 . لتحضير بيئة Aureomycin-rose Bengal- glucose- peptone agar أذب 10 جرام جلوكوز، 5 جرام ببتون، 1 جرام بوتاسيوم داى هيدروجين فوسفات، 5,. جرام كبريتات المغنسيوم ، 35.,. جرام روز بنجال ، 20 جرام آجار فى 800 ملل Reagent-grade water وعقم. أذب 70 مجم أوروميسين هيدروكلوريد فى 200 ملل Reagent-grade water، عقم بالترشيح وأضفها الى الآجار المبرد (42-45 مئوية). ال pH يجب أن يكون 5,4. صب 25 ملل فى أطباق معقمة ودع البيئة تتصلب. الأطباق المصبوبة يمكن حفظها عند 4 مئوية لمدة تصل الى 4 أسابيع.

4 . 2 . 2 . 2 . ولتحضير بيئة Streptomycin-terramycin-malt extract agar أذب 30 جرام مستخلص المولت، 5 جرام ببتون، 15 جرام آجار فى 800 ملل Reagent-

grade water وعقم. أذب 70 مجم من كلا من الاستربتوميسين والتيراميسين كلا فى 100 ملل Reagent-grade water وعقم بالترشيح، أضفها الى الآجار المبرد (42-45 مئوية) . pH البيئة يجب أن يكون 5,4. صب حوالى 20 ملل فى أطباق معقمة ودعها تبرد. الأطباق المصبوبة يمكن الاحتفاظ بها عند 4 مئوية لمدة تصل الى 4 أسابيع.

4 . 2 . 3 . الطريقة Procedure

4 . 2 . 3 . 1 . التحضير والتخفيف Preparation and dilution

أنظر طريقة الأطباق المصبوبة. اجر التخفيف فى ماء منظم Buffered water ، واختار التخفيفات التى تعطى ما بين 20 الى 150 مستعمرة فى الطبق.

4 . 2 . 3 . 2 . اعداد الأطباق Plating

الأطباق يسبق تجفيفها مفتوحة فى Laminar flow على درجة حرارة الغرفة ورطوبة نسبية 30% لمدة 1- 1,5 ساعة. حضر 3 أطباق أو 5 ،اذا كانت النتائج سيتم تحليلها احصائيا، لكل عينة أو تخفيف. باستعمال ماصة معقمة انقل 1 ملل من العينة أو التخفيف الى سطح كل طبق سبق تجفيفه. وزع على سطح الطبق باستعمال قضيب زجاجى على شكل حرف L كما سبق بالنسبة للاختبارات البكتريولوجية أو باستخدام جهاز لفرد العينة.

4 . 2 . 3 . 3 . التحضين

الأطباق المغلقة وبعد جفافها على حرارة الغرفة، اقلب الأطباق، وحضن عند 15 مئوية لمدة 7 أيام، فى جو عالى الرطوبة (90 – 95 %). وكبديل حضن عند 20 مئوية لمدة 5 – 7 أيام. الفطر ذا النمو البطىء ربما لا ينتج مستعمرات مرئية حتى 6 أو 7 أيام.

4 . 3 . العد والتسجيل Counting and recording

عد المستعمرات باستخدام Quebec colony counter على الطبق. اذا كان من الضرورى تأخير العد استثنائيا، احفظ الأطباق على 4 مئوية لمدة لا تزيد عن 24 ساعة. اعتمادا على حجم المستعمرة، الأطباق المحتوية على حوالى 150 مستعمرة يمكن عدها ولكن العدد الأمثل هو 100 مستعمرة فى الطبق.

سجل النتائج كوحدة نكوين المستعمرة / 100 ملل CFU/100 mL من العينة الأصلية. وبالنسبة للعينات الصلبة أو شبه الصلبة يقدر العدد كوحدة تكوين المستعمرة CFU/ جرام رطب أو جاف ويفضل الجاف. اذا استعمل 3 أطباق أو أكثر لكل عينة، استعمل المتوسط . أذا كان هناك أطباق لم تعطى أعداد يسجل العدد أقل من 1 مضروبا فى أعلى تخفيف. واذا كان هناك أعداد أعلى من 150 فى الطبق سجل النتيجة على أنها أعداد كبيرة لآ تعد Too numerous to count (TNTC). اذا كانت المستعمرات مزدحمة ومتلامسة أو متركبة Overlapping منتشرة، تسجل النتيجة ظلامية Obscured (OBSC) وكرر التحليل مع استخدام تركيزات أقل (تخفيفات لى) أو فحص مبكر.

4 . 4 . طريقة أغشية الترشيح Membrane filter technique

استخدم بيئة aureomycin-rose Bengal-glucose-peptone agar المعدلة أو غير المعدلة وكذلك يمكن استعمال بيئة modified streptomycin-terramycin-malt extract agar. هذه البيئات حضرت طبقا للتركيب السابق للبيئة الغير معدلة فيما عدا أن المضاد الحيوى رفع من 70 مجم / اللتر الى 200 مجم/اللتر. توزع البيئة بكمية 5 – 7 ملل فى كل طبق ويفضل الأطباق محكمة الغلق.

يستعمل حجم العينة أو التخفيف منها الذى يعطى من 20 – 100 مستعمرة فى الطبق. تحضين الأطباق مقلوبة ويتم على 15 مئوية لمدة 5 أيام فى جو رطب. وكبديل حضن عند 20 مئوية لمدة 3 أيام أو أطول اعتمادا على تواجد الفطر.

العد وحفظ الأطباق كما سبق. الأطباق النموذجية تحتوى على 20 – 80 مستعمرة على الفلتر.

5. الخميرة Yeast

ذكر أن الخميرة تتواجد فى مصادر المياه، ولكن المعلومات عن تكرارية تواجدهان كثافتها، استعادة النمو محدودة. هذا الوضع ليس لأن هذه الكائنات ليس لها مغزى كممرضات انتهازية، ولكن البحث أكثر فى هذا المجال مطلوب اجراؤه على كل ما يرتبط بالبيئة والتى تؤدى الى ايجاد بيئة للخميرة فى الماء ودورها فى الامراض الناتجة عن التلامس مع الماء.

كانديدا البيكانز Candida albicans تنتمى الى الممرضات الانتهازية والتى تصبح خطيرة بالنسبة للأشخاص المجهدين Stressed من الاصابة بالسكر، السرطان ، وانخفاض المناعة المصاحبة للاصابة بالايدز أو استعمال مثبطات المناعة Immunosuppressants فى نقل الأعضاء واستعمال المضادات الحيوية الممتدة المفعول Broad-spectrum. الاصابات بالخميرة من الحفاضات بين الأطفال والأعضاء التناسلية فى السيدات نتيجة استعمال مياه ملوثة أو الممارسة الجنسية هى اصابات أقل حدة ولكن لازالت تضعف المصاب.

من المعروف أن الخميرة تتواجد فى مختلف الحيوانات ذات الدم الدافىء وتشمل الانسان، الكلاي، الحمام، نورس لبحر. كثافتها فى المخلفات الآدمية ربما تصل الى 100,000/جرام وفى مخلفات الصرف الصحى الخام Raw sewage تتفاوت ما بين بضع آلاف الى 25,000مستعمرة / اللتر. وفى الصرف الصحى المعالج بالكلور وجدت بكثلفة 400 مستعمرة/ اللنر، بينما فى مياه النهر وجدت بكثافة ما بين أقل من 2 الى 125. فى البحيرات تذبذب وجود الخميرة حسب نوعية المياه ممثلة فى المادة العضوية الناتجة من صرف المخلفات والأمطار الغزيرة ، موت وتحلل النباتات موسميا، ازدهار الطحالب Algal blooms، وانقلاب مياه البحيرة Lake turnover.

عملية التجلط الكيماوية Chemical coagulation لمصدرالمياه الخام تزيل 90 – 99% من الخميرة مع ازالة على الأقل 90% من المتبقى بالترشيح الرملى. ولسوء الحظ، فان التطهير يكون أقلفعالية. فلقد وجد أن الخميرة تقاوم الكلور المتبقى حتى مستوى 1,2 مج/اللترفى مياه الصنبور. هذه الزيادة فى المقاومة لكلور الحر بالنسبة للخميرة ناتج مبدئيا عن سمك وصلابة Rigidity الجدار الخلوى والذى يكون مانع للنفاذية بالنسبة للكلور. وعلى العكس فان التطهير بالأوزون يكون فعال بدرجة مساوية لتأثيره على البكتريا.

كثافة الخميرة فى مياه الشرب ربما تكون بمتوسط 1,5 كائن / اللتر. هذا العدد البسيط يمكن أن يتوقع زيادته قليلا فى شبكة التوزيع حيث تضبط الخميرة نفسها مع الظروف بيئة المواسيروتستعمرها ببطء. والمواقع ذات الكثافة العالية من الخميرة ربما تكون أجزاء المواسير القديمة ، نهايات الشبكات، والأماكن ذات المياه الساكنة فى الشبكة. كثافة الخميرة فى دراسة على نظامى توزيع فى فرنسا حيث المعالجة بالكلور تراوحت ما بين 1 – 28 / ملل وتواجدت فى 50% من العينات

المختبرة. وبتصنيف الخميرة المعزولة من المياه الموزعة وجد أنها تتبع Candidaparapsilosis, C. albicans, Cryptococcus laurentii, Rhodstorula glutins and R. rubraومن هذا فان أجناس الكانديدا هى الممرضات الانتهازية الأكثر خطورة.

5 . 1 . طريقة للخمائر Technique for yeasts

من أعداد الفطريات المتصل عليها من المياه الملوثة حوالى 50% ربما تكون مستعمرات خميرة. البيئات الصلبة السابق ذكرعا لا تسمح بنمو كل الخمائرن وعلى ذلك، فان طريقة التخصيب الكمية Quantitative enrichment ربما تكون ذات فائدة بالاضافة الى عد الأطباق Plate count.

5 . 2 . البيئات

للتخصيب Enrichment استعمل مرق Yeast nitrogen base-glucose broth وللعزل استعمل Yeast extract-glucose agar or Diamalt agar.

5 . 2 . 1 . Yeast nitrogen base-glucose broth أذب 13,4 جرام Yeast nitrogen base فى لتر Reagent-grade water، عقم بالترشيح. حضر 500 ملل من كلا من التركيزين 2% ، 40 % من الجلوكوز وعقم كلا منفرد بالترشيح. لعمل البيئة النهائية، أضف بطريقة معقمة الى 250 ملل دورق معقم 25 ملل من محلول Yeast nitrogen base ، 25 ملل من أى من 2% أو 40% من محلول الجلوكوز لعمل 1% أو 20% تركيزجلوكوز نهائى. سد الفلاسكة بسدادة قطن وخزنها الى وقت الاستعمال.

5 . 2 . 2 . Yeast extract-malt extract-glucose agar سبق ذكرها.

5 . 2 . 3 . Diamalt agar سبق ذكرها.

5 . 3 . الطريقة

5 . 3 . 1 . تحضير العينة والتخفيف Sample preparation and dfilution كما سبق

5 . 3 . 2 . التخصيب Enrichment

فى دورق 250 ملل حضر yeast nitrogen base medium containing 1% glucose وفى آخر yeast nitrogen base medium containing 20% glucose . احقن 1 ملل من التخفيف المناسب من العينةوحضن على درجة حرارة الغرفة على هزاز (120 – 150 لفة / الدقيقة لمدة 64 ساعة على الأقل.

5 . 3 . 3 . العزل Isolation

خذ الدوارق من على الهزاز ودعها ساكنة لمدة 4 – 5 ساعات. اذا تواجدت خلايا الخميرة سترسب وتبقى البكتريا والفطريات الخيطية فى المعلق ويطفو الفطر وربما يتعلق بجدار الدورق الزجاجى. بواسطة لوب من سلك النيكل كروم خذ لوب من الراسب عند سطح التقاء الراسب مع السائل أعلاه وازرع بالتخطيط على Yeast extract –malt extract glucose agar. استعمل 3 أطباق لكل دورق. حضن على حرارة الغرفة بعيدا عن ضوء الشمس المباشر لمدة يومين الى ثلاث أيام. ليس من الضرورى قلب الأطباق. للحصول على مزرعة نقية التقط من مستعمرات منفصلة وأعد التخطيط على أطباق من نفس البيئة أو على أطباق من بيئة Diamalt agar.

5 . 3 . 4 . العد Counting

من الصعب الوصول الى عدد حقيقى بعد عملية التخصيب والعزل.اذا افترض أن خلية واحدة فى العينة الأصلية سوف تنتج مستعمرة واحدة أو أكثر على الطبق بعد التخصيب، فيمكن أن يذكر أن الخمائر أو نوع معين منها، يتواجد عند الحد الأدنى من الأعداد اعتمادا على التخفيف الأعلى الموجب.

6 . الفطر الممرض للانسان Fungi Pathogenic to Human

6 . 1 . تواجده ومغزاه Occurrence and Significance

العزل الروتينى للفطر من المجارى المائية الملوثة ومحطات معالجة المخلفات السائلة عادة ينتج أجناس قليلة نوعا ما ممرضة للانسان وغيره من الحيوانات الراقية. Geotrichum candidum وجد أنه مرتبط بحالات مرضية فى الولايات المتحدة وعزل عالميا.

Exopphiala mansonii هو أحد مسببات عادة فى المناطق الاستوائية Chromomycosis.

كذلك Aspergillus fumigatus المسبب لحالة Pulmonary aspergillosis.

Pseudallescheria boydii المسبب لحالة Eumycotic mycetomas . الاصابة تحدث من جرح تلوث باستخدام مواد ملوثة أو استنشاق مواد ملوثة مثل المواد المتناثرة (الرذاذ) فى محطات الصرف الصحى أو الهواء الملوث.

الفطر Scedosporium apiospermum وجوده فى مجرى مائى ربما يمثل انسياب من التربه. وفطريات أخرى Zoopathogenic نادرا ما تم عزلها باعداد بسيطه من المجارى المائية سواء كانت ملوثة أو غير ملوثة. وخميرة Candida albicans استخلصت باعداد مختلفة محطات معاجة المخلفات السائلة ، المجارى المائية التى تستقبل مخلفات وكذلك من مياه التنزه. فى الانسان هذا الفطر عادة يكون معايش أو رفيق، مثل Geotrichum candidum ويتواجد مع العائل فى تناسق؛ حتى 80% من البالغين الاصحاء يتواجد لديهم Candida albicans عند مستوى محسوس فى البراز، بينما 35% حاملى لتلك الخميرة فى تجويف الفم وذلك فى غياب أى حالة مرضية. جزء كبير جدا من الاناث لديهم هذه الخميرة فى الجهاز التناسلى بدرجات متفاوته من الكثافة. تواجد الكانديدا البيكنس فى المخلفات السائلة الغير معالجة، نواتج محطات معالجة المخلفات السائلة، أو المياه الملوثة ليس من المدهش. وعزلت من هذه البيئات على البيئات الروتينية المضاف لها المضادات الحيوية والمواد التى تقضى على البكتريا ولكن ليس على البيئات التى ذكرت فى طريقة الطباق المصبوبة أو المذكورة تحت عنوان طرق للخميرة. وعزلت من البيئة البحرية على بيئة

.Maltose-yeast nitrogen base-chloramphenicol-cycloheximide

6 . 2 . تصنيف Candida albicans

يمكن تصنيفها ضمن الخمائر البيضاء والقرنفلية Pink تنمو على أغشية الترشيح السوداء ذات الثقوب قطر 8,. ميكرون على بيئة Maltose-yeast nitrogen base- chloramphenicol-. cyclohexamide . من كل مستعمرةن احقن 5,. ملل من سيرم العجل أو الانسان، حضن عند 37 مئوية لمدة 2 – 3 ساعات، انقل نقطة أو اثنين الى شريحة، اختبر ميكروسكوبيا لانتاج انابيب جرثومية germ tubes من معظم الخلايا. من الخمائر البيضاء، Candida albicans فقط هى التى تنتج الهيفات القصيرة من الخليى الأب خلال 2 – 3 ساعات من التحضين.

References on Fungi:

Seeliger, H.P.R. 1975. Increasing Spectrum of Opportunistic Fungal Infections. In: Opportunistic Fungal Infections, E.W.Chick, A. Balows, and M.L. Farcolow, Eds., Charles C. Thomas, Springfield, IL.

Gutman, A.A. 1985. Allergens and other Factors Important in Atopic Disease. In: Allergic Diseases: Diagnosis and Management, 3rd ed. R. Patterson, Ed., Lippincott, New York.

Atterholm, I., Ganrot-Norlin, K., Hallberg, T., and Renger, O. 1972. unexplained Acute Fever after a Hot Bath. Lancet, ii:682-684.

Metzer, W.J., Patterson, R., Semerdjan, R., and Roberts, M. 1976. Sauna Takers Disease: Hypersensitivity Pneumonitis Due to Contaminated Water in a Home Sauna. Jour. Med. Assoc., 236: 2209-2211.

Gronoos et al. 1980. An Epidemic of extrinsic Allergic Alvcolistis Caused by Tap Water. Clin. Allergy, 10: 77-90.

Rosenzweig, W.D., Minnigh, H., and Pipes, W.O. 1986. Fungi in Potable Water Distribution Systems. Jour. Amer. Water Works Assoc., 78: 53-55.

Rosenzweig, W.D. and Pipes, W.O. 1986. Survival of Fungi in Potable Water Systems. Amer. Water Works Assoc., Water Quality Tech. Conf. Portland, OR. Pp. 449-456.

West, P.R. 1986. Isolation Rates and Characterization of Fungi in Drinking Water Distribution Systems. Amer. Water Works Assoc., Water Quality Tech. Conf., Portland, OR. Pp. 457-473.

Burman, N.P. 1965. Taste and Odour due to Stagnation and Local Warming in Long Lengths of Piping. Soc. Water Treat. Exam., 14: 125-131.

Bays, L.R., Burman, N.P., and Lavis, W.M. 1970. Taste and Odour in Water

Supplies in Great Britain: A study of the Present Position and Problems for the Future. Water Treat. Exam. Jour. Soc. Water Treat. Exam., 19: 136-160.

Nagy, L.A. and Olson, B.H. 1982. Occurrence of Filamentous Fungi in Drinking Water Distribution Systems. Can. Jour. Microbiol., 28:667-671.

Niemi, R.M., Knuth, S., and Lundstrom, K. 1982. Actinomycetes and Fungi in Surface Waters and in Potable Water. Appl. Environ. Microbiol., 43:378-388.

Rosenzweig, W.D., Minnigh, H.A., and Pipes, W.O. 1983. Chlorine Demand and Inactivation of Fungal Propagules. Appl. Environ. Microbiol. 45:182-186.

Nagy, L.A. and Olson. B.H. 1985. Occurrence and Significance of Bacteria, Fungi, and Yeast Associated with Distribution Pipe Surfaces. Amer. Water Qual. Technol. Conf. Houston, TX, Dec. 8-11, AWWA, Denver, CO. pp. 213-236.

Hinzelin, F. And Block, J.C. 1985. Yeast and Filaments Fungi in Drinking Water. Environ. Technol. Latt., 6:101-106.

Rosenzweig, W.D. and Pipes, W.O. 1988. Fungi from Potable Water: Interaction with Chlorine and Engineering Effects. Water Sci. Technol., 20: 153-160.

References on Yeast

Nagy, L.A. and Olson, B.H. 1982. Occurrence of Filamentous Fungi in Drinking Water Distribution Systems. Can. Jour. Microbiol., 28:667-671.

Rosenzweig, W.D., Minnigh, H.A., and Pipes, W.O. 1983. Chlorine Demand and Inactivation of Fungal Propagules. Appl. Environ. Microbiol. 45:182-186.

Hinzelin, F. And Block, J.C. 1985. Yeast and Filaments Fungi in Drinking Water. Environ. Technol. Latt., 6:101-106.

Farooq, S. and Akhlaque, S. 1983. Comparative response of Mixed Cultures of Bacteria and Virus to Ozonztion. Water Res., 17: 809-812.

Buck, J.D. and Bubucis, P.M. 1978. Membrane Filter Procedure for Enumeration of Candida albicans in Natural Waters. Appl. Environ. Microbiol. , 35:237-242.

Ahearn, D.G. 1978. Medically Important Yeast. Ann. Rev. Microbiol., 32: 59-68.

Niewolak, S. 1977. The Occurrence of Yeasts in Some of the Mass\urian Lakes. Acta Mycolog., 12: 241-256.

ARAB REPUBLIC OF EGYPT
German Technical Cooperation

ميكـــروبـــيولـــوجيا المـــياه

WATER MICROBIOLOGY

البرنامج الرابع

Module 4

الطرق والعناصر البكتريولوجية الخاصة

معايير مياه الشرب

Specific Bacteriological Methods Parameters

Standards for Drinking Water

الملحقات

Annexs

Prof. Helmy Tawfik El-Zanfaly
National Research Center

July 2008

Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit - GTZ
Water and Wastewater Management Programme
GTZ Project No. 06.2006.3

ANNEX 1

m-MTEC Method for *E. coli*

Water Resources--Office of Water Quality

This document is also available in pdf format:

Ch7_1.3.pdf 228K

7.1.3
IDENTIFICATION AND ENUMERATION METHODS

The membrane filtration (MF) and most probable number (MPN) methods are used for the presumptive identification, confirmation, and enumeration of indicator bacteria. For general use, the MF method is preferable to the MPN method. The MPN method is preferred if toxic substances are present in the sample or if, after filtration, a residue heavy enough to block the micropores of the membrane filter is visible. The MPN method is described in *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 18th edition (American Public Health Association and others, 1992, p. 9-45 to 9-53) and in Britton and Greeson (1989). Procedures for analyzing water samples by use of MF methods are described below.

Indicator bacteria for presumptive identification and enumeration are cultured on selective media after filtration of several different sample volumes onto gridded membrane filters. Detailed confirmation, identification, and enumeration of these bacteria require additional culturing and biochemical testing, the details of which are beyond the scope of this manual. However, additional confirmation procedures are needed under certain circumstances, such as use of the data in support of environmental regulation and enforcement.

The fecal indicator bacteria are operationally defined by the method employed for identification and enumeration, as follows:

- The total coliform bacteria are defined as the organisms that produce red colonies with a golden-green metallic sheen within 24 ± 2 hours when incubated at 35.0 ± 0.5°C on m-Endo medium.
- The fecal coliform bacteria are defined as the organisms that produce blue colonies in whole or part within 24 ± 2 hours when incubated at 44.5 ± 0.2°C on m-FC medium.
- *E. coli* are defined as the organisms that produce yellow or yellow-brown colonies that remain so when placed on a filter pad saturated with urea substrate broth for 15 minutes after rescusitation at 35.0 ± 0.5°C for 2 hours and incubation for 22 to 24 hours at 44.5 ± 0.2°C on m-TEC medium.
- *E. coli* are defined as the organisms that produce a blue fluorescent margin around a darker colony center within 4 hours when incubated at 35 ± 0.5°C on NA-MUG medium after primary culturing as total coliform bacteria on

m-Endo medium.

- The fecal streptococci are defined as the organisms that produce red or pink colonies within 48 ± 2 hours when incubated at 35.0 ± 0.5°C on KF medium.
- Enterococci are defined as the organisms that produce pink to red colonies with a black or reddish-brown precipitate after primary culture for 48 to 50 hours at 41.0 ± 0.5°C on m-E medium followed by incubation for 20 minutes at 41.0°C on EIA medium.

Analytical Methods

mTEC agar method for *Escherichia coli:* U.S. Environmental Protection Agency Method 1103.1.

Updated October 2007

The mTEC agar method is a two-step membrane-filtration method for detection of *Escherichia coli* (*E. coli*). This method can be done in the field or laboratory.

THEORY:
mTEC agar plates are incubated at 35°C for 2 hours followed by incubation at 44.5°C for 22-24 hours. The mTEC agar contains selective and differential agents. Sodium lauryl sulfate and sodium desoxycholate inhibit Gram + cocci and endospore-forming bacteria. Brom-cresol purple and brom-phenol red inhibit nontarget bacteria and cause a color change from purple to yellow when lactose is utilized. Lactose is utilized on mTEC by *E. coli* and other thermotolerant coliforms.

The mTEC method includes a second step—transfer of the membrane to another substrate for identification of *E. coli*. After incubation, filter membranes containing yellow colonies are transferred to pads saturated with urea-phenol solution. After 15-20 minutes of incubation on the urea substrate, colonies that are not *E. coli* turn from yellow to purple. This color change is caused by the breakdown of urea by the enzyme urease and a subsequent increase in pH. *E. coli* is urease negative, and colonies of *E. coli* remain yellow, yellow-brown, or yellow-green.

USE:
The mTEC method is recommended for use in monitoring fresh, estuarine, and marine surface waters. It was specifically developed to be used as a measure of recreational water quality.

MEDIA:
The mTEC medium is available commercially in the dehydrated form from Hardy Diagnostics (800/266-2222, Cat C7741 (500 g)). To prepare urea-phenol substrate, ingredients can be

purchased from Fisher Scientific (800/766-7000): phenol red (Cat AC41724-0050 (5 g)) and urea (Cat U15-500 (500 g)). (See preparation instructions (Appendix F)).

Pre-poured plates can be purchased in lots of 20 plates from Fisher Scientific (Cat BD215126) or VWR by special order. Other quantities and plate sizes are available from these manufacturers by special order.

Use phosphate buffered dilution water and 0.45 mm membrane filters. Buffer can be purchased from Hardy Diagnostics (Cat D699 (99mL) or Cat U193 (500mL)). (See buffer preparation (Appendix M)).

REFERENCES:

U.S. Environmental Protection Agency, 2000, Improved enumeration methods for the recreational water quality indicators: Enterococci and *Escherichia coli*: Washington, D.C., EPA 821-R-97-004, 53 p.

U.S. Environmental Protection Agency, 2006, Method 1103.1—*E. coli* in water by membrane filtration using membrane-thermotolerant *Escherichia coli* agar (mTEC): Washington, D.C., EPA 821-R-06-010, 45 p.

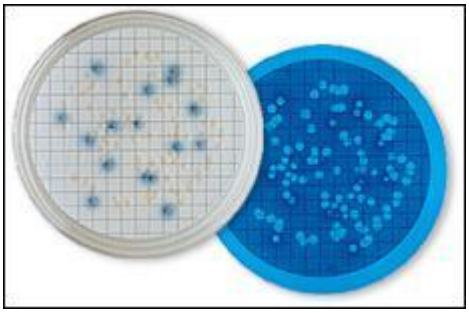
NWIS PARAMETER CODES:
31633 *E. coli* on mTEC agar, colonies per 100 mL

ANNEX 2

MI Agar - a New Chromogenic/Fluorogenic Medium

For Total Coliform and *E.coli*

MI Agar - a New Chromogenic/Fluorogenic Medium from BD



BD MI Agar

BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, has announced the release of BD MI Agar, a new chromogenic/fluorogenic medium formulated to simultaneously detect total coliforms and *Escherichia coli* in drinking water by membrane filtration.

BD MI Agar conforms to the USEPA 1604 approved procedure for monitoring drinking water under the Total Coliform Rule and source water under the Surface Water Treatment Rule. A significant enhancement to the membrane filtration (MF) test method, MI Agar increases the analytical quality, while reducing analysis time when compared to conventional techniques.

Final results are available in 24 hours or less.

The benefit for testing facilities is a more efficient, cost-effective, sensitive and specific tool for the detection of total coliforms and *E. coli* in drinking water. BD MI Agar offers precise, quantifiable results as compared to the most probable numbers method which provides only a statistical estimate that is more costly and time consuming.

While BD MI Agar is approved for use by certified drinking water laboratories for microbial analysis of potable water, it's also ideal for a wider range of applications.

BD MI Agar can be used to test recreational, surface or marine water, bottled water, groundwater, well water, treatment plant effluents, water from drinking water distribution lines, drinking water source water and possibly foods.1

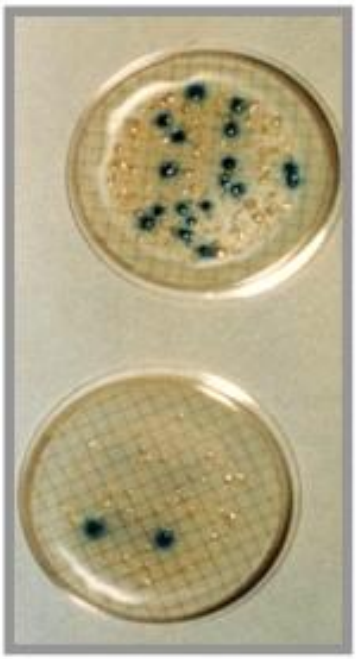
MI Agar was developed by the USEPA for testing drinking water as an enhancement to the MF technique. As a single-step MF technique, MI Agar can be used to simultaneously detect and enumerate both total coliforms and E. coli in water samples in 24 hours or less on the basis of their specific enzyme activities.MI Agar detects the presence of the bacterial enzymes ß- galactosidase and ß-glucuronidase produced by total coliforms and *E. coli*, respectively.

Typically found in fecally polluted water, coliform bacteria are species that inhabit the intestines of warm-blooded animals or occur naturally in soil, vegetation and water. They are often associated with disease outbreaks. Although these bacteria are not usually pathogenic themselves, their presence in drinking water indicates the possible presence of other pathogens. *E. coli* is one species in this group of coliform bacteria. Since it is always found in feces, it is a more direct indicator of fecal contamination and the possible presence of enteric pathogens.

For more information on BD MI Agar, please call 1-800-638-8663 in the US, or to send a request for more details

1. U.S. Environmental Protection Agency. 2002. Method 1604: Total coliforms and *Escherichia coli* in water by membrane filtration using a simultaneous detection technique (MI medium), September 2002, Publication EPA-821-R-02-024, USEPA Office of Water (4203T), Washington, DC

BD is a trademark of Becton, Dickinson and Company. ©2002 BD December 2002

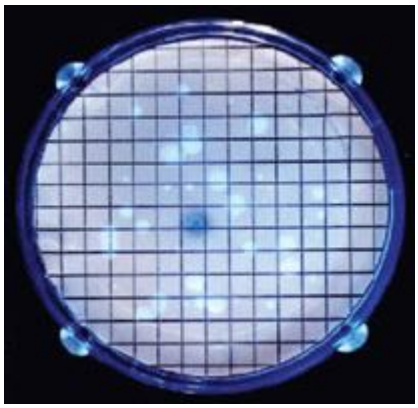


E. coli colonies are blue under normal light.

Total coliform colonies fluoresce under long-wave UV light.

MI Medium - U.S. EPA Method 1604

Science



Method 1604 (EPA 821-R-02-024) is a sensitive and differential membrane filter (MF) method that uses MI agar or MI broth for the simultaneous detection of both total coliforms (TC) and *Escherichia coli* (*E. coli*) in water samples in 24 hours or less. Identification of the two groups of bacteria is based on their specific enzyme activities. Two enzyme substrates are included in the medium to detect the enzymes that are produced by TC and *E. coli*.

Total coliforms include species that may inhabit the intestines of warm-blooded animals or occur naturally in soil, vegetation, and water. They usually are found in fecally-polluted water and often are associated with disease outbreaks. Although they usually are not pathogenic themselves, their presence in drinking water indicates the possible presence of pathogens. *E. coli*, one species of the coliform group, is always found in feces and is, therefore, a more direct indicator of fecal contamination and the possible presence of enteric pathogens. In addition, some strains of *E. coli* are pathogenic.

Applications

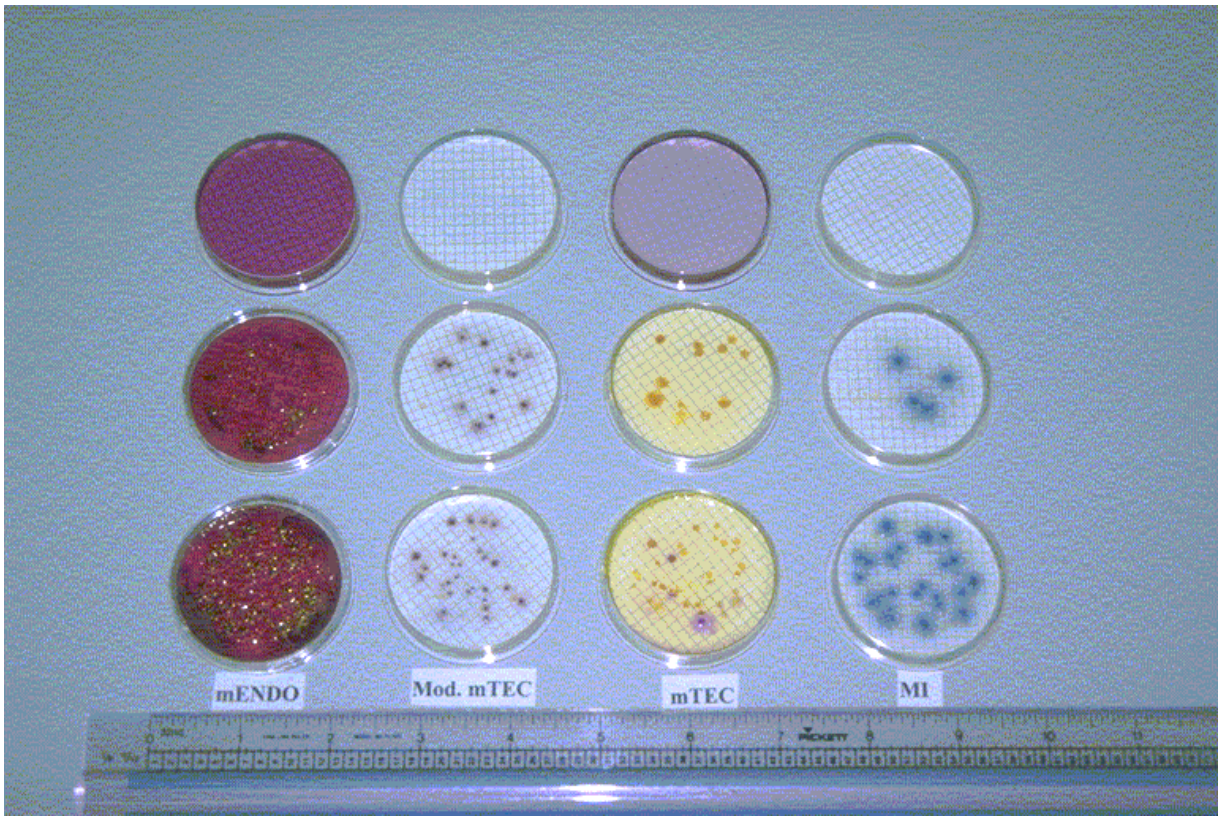
Method 1604 has been approved for use in monitoring drinking water, source water, and ambient water (including fresh recreational water). It also has been proposed for use with ground water, and may be useful for analyzing other types of samples, such as treatment plant effluents, foods, pharmaceuticals, and clinical specimens (human or veterinary). The method is sensitive, selective, and specific with low false-positive and false-negative rates. Use of this method simplifies compliance monitoring of drinking water by eliminating the additional time, labor, and expense of repeat or serial analyses that can delay the detection of contaminated water. The method can be found on the EPA NERL-Cincinnati Microbiology Home Page at www.epa.gov/microbes/ (click on "Method 1604" under "*E. coli*" or "Total Coliforms").

Current Licensees

Becton, Dickinson and Company
Whatman Inc.

EPA Contact Information

Kristen P. Brenner, Ph.D.
U.S. EPA
26 W. M.L. King Drive - ML 314
Cincinnati, OH 45268
Phone: (513) 569-7317
Fax: (513) 569-7170
E-mail: brenner.kristen@epa.gov



ANNEX 3

CHROMOCULT FOR COLIFORMS
ENZYMATIC METHODS
RAPID METHODS

Chromocult® Coliform Agar

Cat. No. 1.10426.0100/500
(100 g, 500 g)

Selective agar for the simultaneous detection of total coliforms and E. coli in drinking water and processed food samples.

The approval by US-EPA is pending.

Mode of Action
Typical Composition (g/litre)
Preparation
Experimental Procedure and Evaluation
Quality Control
Additives/Reagents
Picture/Image
Literature

ChemDAT®

Mode of Action

In the first instance, the interaction of selected peptones, pyruvate, sorbitol and phosphate buffer guarantees rapid colony growth, even for sublethally injured coliforms. The growth of Gram-positive bacteria as well as some Gram-negative bacteria is largely inhibited by the content of Tergitol® 7 which has no negative effect on the growth of the coliform bacteria.
For the second stage, Merck has developed a new combination of two chromogenic substrates which allow for the simultaneous detection of total coliforms and E. coli.

Coliform identification

The characteristic enzyme for coliforms, ÃŸ-D-galactosidase cleaves the Salmon-GAL substrate and causes a salmon to red colour of the coliform colonies.

E. coli identification

The substrate X-glucuronide is used for the identification of ÃŸ-D-glucuronidase, which is characteristic for E. coli
E. coli cleaves both Salmon-GAL and X-glucuronide, so that positive

colonies take on a dark-blue to violet colour. These are easily distinguished from other coliform colonies which have a salmon to red colour. As part of an additional confirmation of E. coli, the inclusion of tryptophane improves the indole reaction, thereby increasing detection reliability when it is used in combination with the Salmon-GAL and X-glucuronide reaction.

Typical Composition (g/litre)
Peptones 3.0; sodium chloride 5.0; sodium dihydrogen phosphate 2.2; di-sodium hydrogen phosphate 2.7; sodium pyruvate 1.0; tryptophane 1.0; agar-agar 10.0; Sorbitol 1.0; Tergitol® 7 0.15; chromogenic mixture 0.4.

Preparation
Suspend 26.5 g in 1 litre of demin. water by heating in a boiling water bath or in free flowing steam. Stir the content to assist dissolution (approx. 35 mn). Some turbidity may occur, but this does not effect the performance!

■ **Do not autoclave! Do not overheat!**
pH: 6.8 Â± 0.2 at 25 Â°C.
Note: After autoclaving add E. coli / Coliform Supplement to the medium cooled to 45-50 Â°C if the sample material contains high gram-positive bacteria resp. Pseudomonas and Aeromonas spp.
The plates are opalescent to turbid and yellowish. Store in a refrigerator and protect from light. To prevent plates from drying, seal in plastic pouches or bags.
Shelf-life under these conditions: 6 months.

Experimental Procedure and Evaluation
Inoculate the medium by the pour plate method or by spreading the sample material on the surface of the plates. In addition the membrane-filter-technique can also be used.
Incubation: 24 hours at 35-37 Â°C.

E. coli: dark-blue to violet colonies (Salmon-GAL and X-glucuronide reaction).
Total coliforms: salmon to red colonies (Salmon-GAL reaction) and dark-blue to violet colonies (E. coli).
Other Gram-negatives: colourless colonies, except for some organisms which possess ÃŸ-D-glucuronidase activity. These colonies appear light-blue to turquoise.
In order to confirm E. coli, coat the dark-blue to violet colonies with a drop of KOVACS' indole reagent. If the reagent turns to a cherry-red colour after some seconds, a positive indole formation confirms the presence of E. coli.

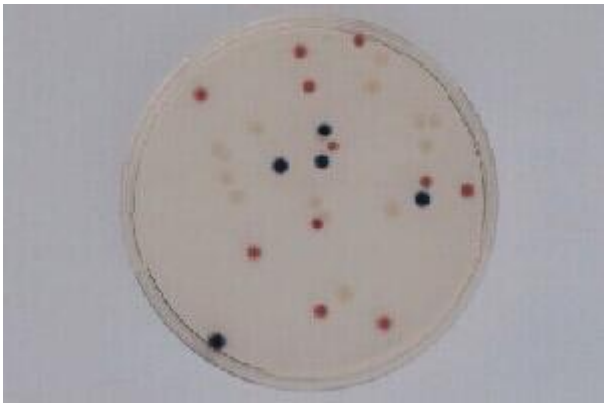
Membrane-filter method:
The simultaneous detection of total coliforms and E. coli using Chromocult® Coliform Agar (CCA) relies on the production of specific colony colours. OSSMER et. al (1999) reported on the effect of the type and brand of membrane filters on the growth and colour formation of coliforms and E. coli on CCA. The best performance was obtained when using filters of cellulose-mixed-ester material, s. a. Gelman GN6 or Schleicher and SchÃ¼ll ME25. For the validation of membrane filters it is advised to use one of these filters as reference.

Quality control

Test strains	*Growth*	*Colony colour*	*Salmon-GAL*	*X-Glucuronide*	*Indole*
Escherichia coli ATCC 11775	**good/very good**	**dark-blue to violet**	**+**	**+**	**+**
Citrobacter freundii ATCC 8090	**good/very good**	**salmon to red**	**+**	**-**	**-**
Escherichia coli DSM 502	**good/very good**	**blue to violet**	**+**	**-**	**+**
Salmonella enteritidis ATCC 13076	**fair/very good**	**colourless**	**-**	**-**	**-**
Enterococcus faecalis ATCC 19433	**none**				

Additives

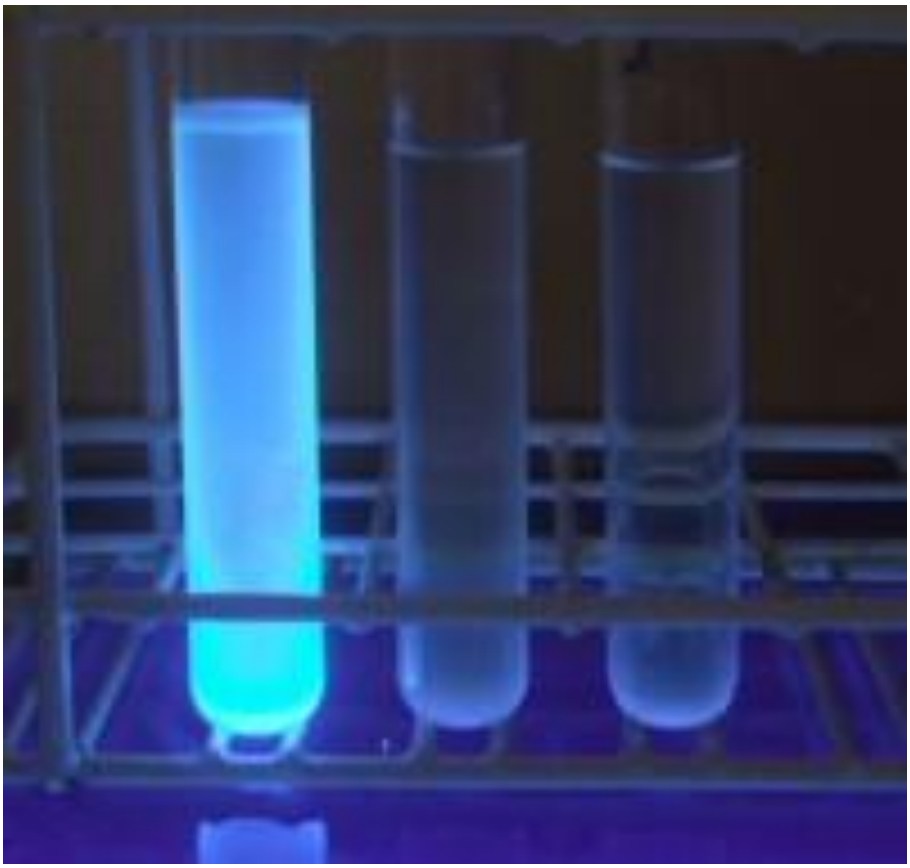
Merck Cat.No.	Product	Pack Size
1.00898.0001	E. Coli/Coliform Selective-Supplement	16 vials
1.09293.0100	KOVACS Indole Reagent	100 ml
1.10156.0001	Chromoplate® Coliform Agar	20 plates
1.11350.0001	Bactident® Indole (dropper bottle)	1 x 30 ml
SchÃ¼ll 406870	Cellulose-mixed-ester-ME 25/21	
Gelman 66278	Cellulose-mixed-ester-GNG membrane filters	



E.coli, Citrobacter freunii, Salmonella enteritidis

FRAMPTON, E.W., RESTAINO, L. a. BLASZKO, L.: Evaluation of ÃŸ-glucuronidase substrate 5-bromo-4-chloro-3-indol-ÃŸ-D-glucuronide (X-GLUC) in a 24 hour direct plating method for Escherichia coli. â€“ **J. Food Protection, 51**; 402-404 (1988).
KILIAN, M. a. BÃœLOW, P.: Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. I. Detection of bacterial glycosidases. â€“ **Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B 84;** 245-251 (1976).
LE MINOR, L. a. HAMIDA, F. BEN: Advantages de la recherche de la ÃŸâ€“galactosidase sur celle de la fermentation du lactose en milieu complexe dans le diagnostic bactÃ©riologique, en particulier des Enterobacteriaceae. â€“ **Ann. Inst. Pasteur (Paris), 102**; 267-277 (1962).
MANAFI, M. a. KNEIFEL, W.: A combined chromogenic-fluorogenic medium for the simultaneous detection of total coliforms and E. coli in water. â€“ **Zentralabl. Hyg. 189**; 225-234 (1989).
OSSMER, R., SCHMIDT, W., MENDE, U.: Chromocult® Coliform Agar â€“ Influence of Membrane Filter Quality on Performance. â€“ XVII Congresso de la Sociedad, Granada (1999).
New Zealand Dairy Industry: Microbiological Methods Manual, Section 48: Product Test Methods â€“ Enteric Indicator Organisms. â€“ NZTM 2; 48.5.1-48.5.10 (1998).

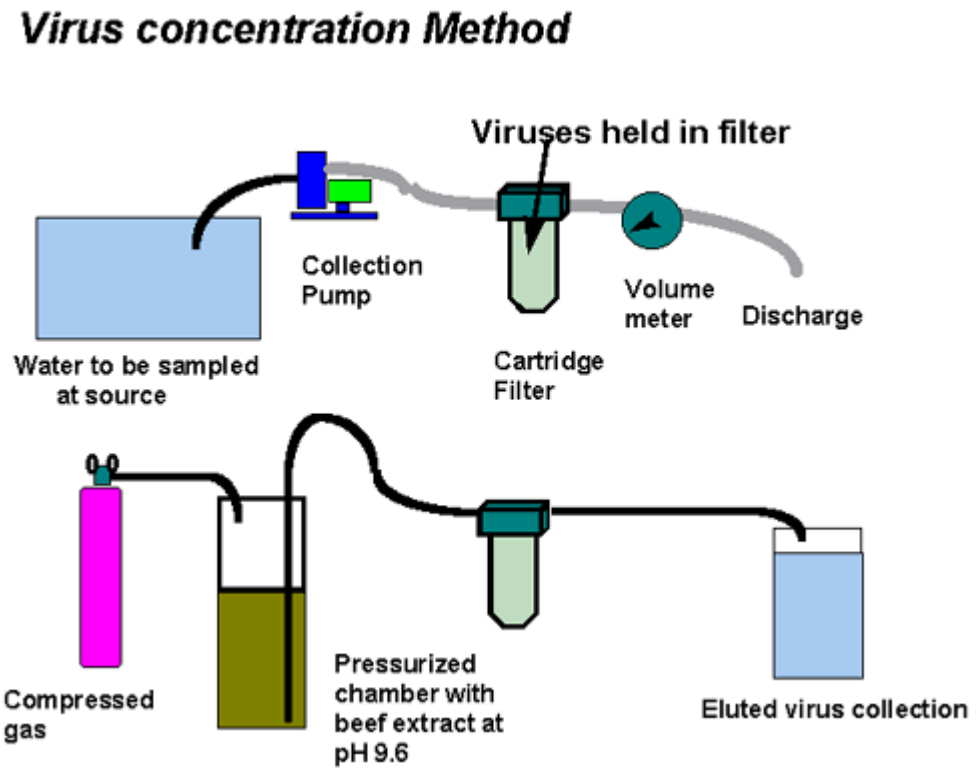
© 2002 Merck KGaA, Darmstadt, Germany



Methods for detecting pathogenic viruses and bacteria from water samples

Viruses

Concentration of viruses is an important facet of their detection and identification. The most common method involves passing very large volumes of water through filters that are electronegative or electropositive in nature. The virus particles are adsorbed to the surface of the filter by electrostatic charges and are then eluted by passing smaller volumes of a protein-containing liquid (e.g. beef extract).



Detection is often achieved through a tissue culture of the viruses in human or primate tissue samples. More recently, immunofluorescence (antibodies linked with fluorescent dyes such as FITC - see Biology 446, Chapter on Methodology) , enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA both direct and indirect), nucleic acid

probes, the Polymerase Chain Reaction (PCR) and radioimmunofocus assays (RIFA) have become more common.

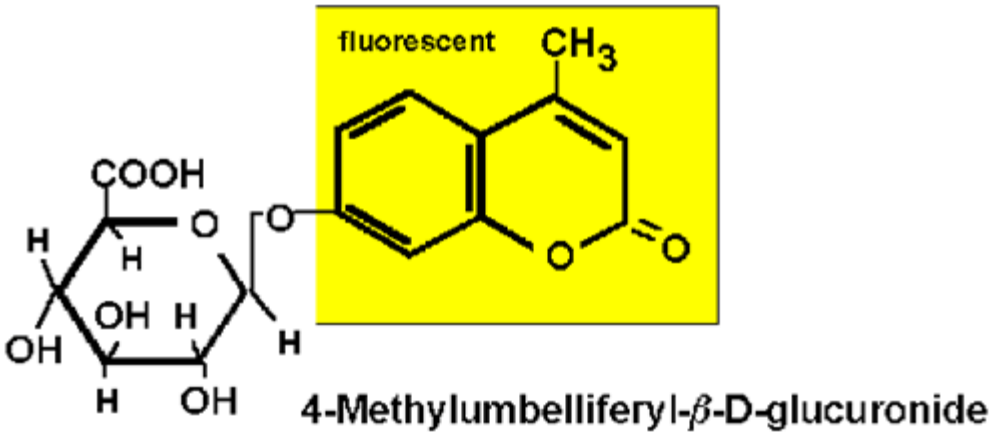
Bacteria

The most common indicator of potential pathogen contamination is still the coliform test in its various guises. The Total coliform test has many forms; the most common so far has been the membrane filter method in which a known volume of water is filtered through a 0.45 &muM or 0.22 &muM filter and the filter incubated on M-endo or LES-Endo agar. Red colonies with a metallic sheen are considered coliforms. A slower method, the Most Probable Number method is also used and involves serial decimal dilution of the water sample followed by adding 5 aliquots of the dilutions to 5 tubes of nutrient media. If the dilutions are chosen correctly, some of the serial decimal dilutions will have some tubes with growth and some without. A statistical procedure based on these sets gives the number of bacteria in the original sample. This test is sometimes referred to as "dilution to extinction" - an unfortunate phrase !

More recently, with changes in many countries drinking water regulations with regard to coliforms, no coliforms at all are allowed in 100 mL of sample. This permits a simple presence/absence test to be used where 100 mL of sample is placed in nutrient medium at suitable concentrations and incubated; any growth means the water has coliforms and so fails the regulations.

A remaining problem is the time taken to assay for coliform number or presence/absence; up to 3 days is required for some of the tests. The quickest tests (P/A and membrane filter) take 24 hours. Very often, quicker results reporting is essential or desirable. Rapid detection tests have been developed for these situations. They vary in their acceptance by the regulatory bodies, but at least one (Defined Substrate Systems) has achieved broad use and regulatory standing. In this test (various commercial versions are available), the water sample is filtered through 0.45 &muM membrane filters, removed and and incubated at 35C on a medium containing 4-methylumbelliferone-beta-D-galactoside. If coliforms are present, they break the bond between the methylumbelliferone and the galactoside, releasing the fluorescent umbelliferone derivative. The degree of fluorescence is

measured with a fluorimeter and shows the degree of contamination by coliforms.



4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronide

A variant of this test (the Colilert method) uses ortho-nitrophenyl-beta-D-galactosidase (ONPG) and 4-methyl umbelliferyl-beta-D-glucuronide (MUG) for detecting total coliforms and *Escherichia coli* in a single solution. The coliforms break down ONPG with their beta-galactosidase enzymes releasing the yellow coloured indicator portion of the molecule. If *E. coli* is also present, the enzyme glucuronidase hydrolyzes the MUG to glucuronide and the indicator portion 4-methyl-umbelliferone that fluoresces under ultraviolet light. This permits separate and independent estimates of total coliform and *E. coli* counts in the same sample. Levels as low as 1 **CFU**/100 mL have been reliably detected with this method. This test can also be used with the MPN or P/A tests to improve resolution and sensitivity.

For a complete assessment of the coliform bacteria and methodologies to determine their numbers, etc. see the **Canadian Water Quality Guidelines article.**

Gene probe and **PCR technology** could also be used to produce more sensitive and specific test for coliforms or *E. coli (from Kimball's Biology Pages)*

Animations from
http://www.iupui.edu/%7Ewellsctr/MMIA/htm/animations.htm
(Click on PCR in side menu) - From "Molecular Medicine in Action"

Bibliography on new Methodologies for Microbial Water Quality

Bernhard, A.E., and Field, K.G., 2000a, Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes: Applied and Environmental Microbiology, v. 66, no. 4, p. 1587-1594.

Bernhard, A.E., and Field, K.G., 2000b, A PCR assay to discriminate human and ruminate feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA: Applied and Environmental Microbiology, v. 66, no. 10, p. 4571-4574.

Carson, C.A., Shear, B.L., Ellersieck, M.R., and Asfaw, A., 2001, Identification of fecal *Escherichia coli* from humans and animals by ribotyping: Applied and Environmental Microbiology, v. 67, no. 4, p. 1503-1507.

Dombek, P.E., Johnson, L.K., Zimmerley, S.T., and Sadowsky, M.J., 2000, Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *E. coli* isolates from human and animal sources: Applied and Environmental Microbiology, v. 66, no. 6, p. 2572-2577.

Dunbar, J., Ticknor, L.O., and Kuske, C.R., 2001, Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities: Applied and Environmental Microbiology, v. 67, no. 1, p. 190-197.

Farag, A.M., Goldstein, J.N., Woodward, D.F., and Samadpour, M., 2001, Water quality in three creeks in the backcountry of Grand Teton National Park, USA: Journal of Freshwater Ecology, v. 16, no. 1, p. 135-143.

Farnleitner, A.H., Kreuzinger, N., Kavka, G.G., Grillenberger, S., Rath, J., and Mach, R.L., 2000, Simultaneous detection and

differentation of *Escherichia coli* populations from environmental freshwaters by means of sequence variations in a fragment of the beta-D-glucuronidase gene: Applied and Environmental Microbiology, v. 66, no. 4, p. 1340-1346.

Hagedorn, C., Robinson, S.L., Filtz, J.R., Grubbs, S.M., Angier, T.A., and Reneau, R.B., Jr., 1999, Determining sources of fecal pollution in a rural Virginia watershed with antibiotic resistance patterns in fecal streptococci: Applied and Environmental Microbiology, v. 65, no. 12, p. 5522-5531.

Hager, M.C., 2002, Detecting Bacteria in Coastal Waters (Part 1 of Feature article): Stormwater, accessed June 3, 2002, at http://216.55.25.242/sw_0105_detecting.html

Hager, M.C., 2002, Detecting Bacteria in Coastal Waters (Part 2 of Feature article): Stormwater, accessed June 3, 2002, at http://216.55.25.242/sw_0106_detecting.html

Harwood, V.J., Whitlock, J., and Withington, V., 2000, Classification of antibiotic resistance patterns of indicator bacteria by discriminant analysis--Use in predicting the source of fecal contamination in subtropical waters: Applied and Environmental Microbiology, v. 66, no. 9, p. 3698-3704.

Kariuki, S., Gilks, C., Kimari, J., Obanda, A., Muyodi, J., Waiyaki, P., and Hard, C.A., 1999, Genotype analysis of *Escherichia coli* strains isolated from children and chickens living in close contact: Applied and Environmental Microbiology, v. 65, no. 2, p. 472-476.

Kreader, C.A., 1995, Design and evaluation of *Bacteroides* DNA probes for the specific detection of human fecal pollution: Applied and Environmental Microbiology, v. 61, no. 4, p. 1171-1179.

Landry, Natalie, New Hampshire Department of Environmental Services, Microbial Source Tracking Survey, accessed May 31, 2002, at http://www.des.state.nh.us/wmb/was/microbial.htm

Long, Barry, National Park Service, Tracking Microbial Sources Using Genetic Analysis of Ribosome Patterns, accessed May 31, 2002, at http://www.nature.nps.gov/wrd/gaorp.htm

Luows, F.J., Rademaker, J.L.W., and de Bruijn, F.J., 1999, The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria--diversity, detection, and disease diagnosis: Annual Reviews of Phytopathology, v. 37, p. 81-125.

Malakoff, D., 2002, Microbiologists on the trail of polluting bacteria: Science, v. 295, p. 2352-2353.

Olive, D.M., and Bean, P., 1999, Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms: Journal of Clinical Microbiology, v. 37, no. 6, p. 1661-1669.

Parveen, S., Murphree, R.L., Edmiston, L., Kaspar, C.W., Portier, K.M., and Tamplin, M.L., 1997, Association of multiple-antibiotic-resistance profiles with point and nonpoint sources of *Escherichia coli* in Apalachicola Bay: Applied and Environmental Microbiology, v. 63, no. 7, p. 2607-2612.

Parveen, S., Portier, K.M., Robinson, K., Edmiston, L., and Tamplin, M.R., 1999, Discriminant analysis of ribotype profiles of *Escherichia coli* for differentiating human and nonhuman sources of fecal pollution: Applied and Environmental Microbiology, v. 65, no. 7, p. 3142-3147.

Parveen, S., Hodge, N.C., Stall, R.E., Farrah, S.R., and Tamplin, M.L., 2001, Phenotypic and genotypic characterization of hman and nonhuman *Escherichia coli*: Water Research, v. 35, no. 2, p. 379-386.

Rademaker, J.L.W., Luows, F.J., and de Bruijn, F.J., 1998, Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting: Molecular Microbial Ecology Manual, v. 3.4.3, p. 1-27.

Samadpour, Mansour, University of Washington, Identification and Tracking of the Sources of Microbial Pollution in Watersheds and Distribution Systems, accessed May 31, 2002, at http://www.ctic.purdue.edu/Core4/Nutrient/ManureMgmt/Paper22.html

Stewart, Jill, NOAA, Microbial Source Tracking in South Carolina Surface Waters, accessed May 31, 2002 at

http://www.chbr.noaa.gov/Newsletter/OctoberNews/sourcetracking.htm

Toivanen, P., Vaahtovuo, J., and Eerola, E., 2001, Influence of major histocompatibility complex on bacterial composition of fecal flora: Infection and Immunity, v. 69, no. 4, p. 2372-2377.

Wiggins, B.A., Andrews, R.W., Conway, R.A., Corr, C.L., Dobratz, E.J., Dougherty, D.P., Eppard, J.R., Knupp, S.R., Limjoco, M.C., Mettenburt, J.M., Rinehart, J.M., Sonsino, J., Torrijos, R.L., and Zimmerman, M.E., 1999, Use of antibiotic resistance analysis to identify nonpoint sources of fecal pollution: Applied and Environmental Microbiology, v. 65, no. 8, p. 3483-3486.

Wiggins, F.A., 1996, Discriminant analysis of antibiotic resistance patterns in fecal streptococci, a method to differentiate human and animal sources of fecal pollution in natural waters: Applied and Environmental Microbiology, v. 62, no. 11, p. 3997-4002.

Rapid Detection Kits For Coliform/E.coli

The IDEXX Colilert: Coliform/E.coli test kit simultaneously detects and confirms coliforms and E.coli in water samples in 24 hours or less. Simply add the Colilert reagent to the sample to incubate for 24 hours, and read results. Colilert is easy to read, as positive coliform samples turn yellow, and when E.coli is present, samples fluoresce under UV light. Colilert is easy to use, involving less than one minute hands-on time. Colilert is used by over 90% of state labs in the United States and it is the only USEPA-approved, 24-hour test for drinking and source waters.

Rapid Assessment Methodology for the Detection of Microbiological Indicators.

To assess beach water quality, the Department of Environmental Services (NHDES) monitors fecal indicator bacteria levels at coastal beaches on a routine basis.

Unfortunately, sample analysis can take anywhere from 24 to 48 hours. Because it takes at least 24 hours to receive results, beach managers and the public are not informed of water quality problems until after the public may have been exposed. This is an issue facing beach officials throughout the world, and is a top priority of the US Environmental Protection Agency (EPA). The EPA, universities and private entities are researching rapid assessment methods to enumerate bacteria and viruses. These methods will allow beach officials to post advisories on the same day water quality is impaired, thus, better protecting public health. There are three different rapid assessment method technologies available: **Molecular surface recognition, nucleic acid detection and enzyme/substrate based methods. All rapid assessment methods will take less than two hours to obtain results**.

Molecular surface recognition methods capture and/or label the target bacterium by binding to molecular structures on the exterior surface or in its genetic material. Analyses of coastal beach water samples currently employ culture-based methods for the detection of Enterococci bacteria, an indicator for fecal pollution in marine water. The quickest culture-based method takes

up to 24 hours to provide results. Now, a new method is being developed to enumerate Enterococci. This new method uses Transcription-Mediated Amplification (TMA) with a fluorescently-labeled probe to amplify a specific region of Enterococci ribosomal RNA (rRNA).

The TMA rapid assessment method is currently being tested in Southern California. Development of methods is moving quickly and will likely come to execution within five years. One reason why the new technology is not currently being used is that it is more expensive. Once this procedure is widely and routinely used, the expenses will lower.

This rapid assessment method is very beneficial because it will allow beach managers to take action towards protecting the public from exposure to waterborne pathogens on the same day that the water is sampled.

Another rapid assessment method that is being developed for the detection of fecal indicators is called Quantitative Polymerase Chain Reaction (QPCR). QPCR is a nucleic acid detection method that targets genetic material of bacteria, viruses or protozoan indicators. QPCR is being used to test for both E. coli and Enterococci. Results while using this method can be obtained on an average of two hours after sampled. These collections have demonstrated 85-90 percent agreement with existing routine methods. This method can be used to detect other water quality indicators such as Bacteroides thetaiotamicron and human enterovirus. Studies indicate that ratios of B. thetaiotamicron may provide useful information as to the source of fecal contamination in samples collected.

The final rapid assessment technology methods available are the enzyme/substrate based methods. These methods pair chromogenic or fluorogenic substrate methods already widely used with advanced optical or electrical detectors. These methods are directed at reducing the incubation periods of current membrane filtration methods. Some of these methods measure excitation and absorbance of the fluorescent metabolite of Enterococci

using a fluorometer which will speed up the rate of detection. A popular type of enzyme/substrate method is called the Dual-Wavelength Fluorimetry (DWF). These rapid assessments methods are currently being tested for its accuracy, sensitivity and efficiency. Research indicates that these new methods will be made available within the next five years. Once these technologies are made available and laboratories adopt the methods, beach management will be able to better protect public health. With assistance from EPA Beach Grants, New Hampshire is hoping to employ these methods once they become available.

ANNEX 4

BIORAD DETECTION METHOD FOR E. COLI

Bio-Rad Laboratories, S.A.

Email: mailto:Frederic_Martinez@bio-rad.com?Subject=Bio-Rad's RAPID'E.coli 2™ Agar Granted Performance Tested Method Status by AOAC RI [Ref: rapidmicrobiology news - 1027h13]

Tel : +[33] 1 47 95 60 00

Fax: +[33] 1 47 41 91 33

Bio-Rad's RAPID'E.coli 2™ Agar Granted Performance Tested Method Status by AOAC RI

RAPID'*E.coli* 2 agar, manufactured by Bio-Rad Laboratories, was granted Performance Tested Method status by the AOAC Research Institute (certificate # 050601).

RAPID'*E.coli* 2 is a chromogenic medium for detection and enumeration of *E. coli* and other coliform bacteria in food in 24 hours. It is a rapid method producing accurate and easy-to-read results. Current methods for enumeration of *E. coli* and coliform bacteria can be costly and laborious.

The use of chromogenic substrates in media has lead to development of faster and easier methods for detection, differentiation and enumeration of target bacteria.

RAPID'*E.coli* 2 is validated for enumeration of *E. coli* and other coliform bacteria in raw ground beef, raw boneless pork, fermented sausage, processed ham, processed turkey, frozen turkey breast, raw ground chicken, cottage cheese, processed ricotta cheese, unpasteurized raw milk, and dry infant formula. It is validated at two incubation temperatures, 37°C and 44°C (cottage cheese and processed ricotta cheese are only validated at 37°C only).

The principle of RAPID'*E.coli* 2 medium relies on simultaneous detection of two enzymatic activities, Beta-D-Glucuronidase (GLUC) and Beta-DGalactosidase (GAL). The medium contains two chromogenic substrates. One substrate is specific to GAL and results in blue green coloration of colonies positive for this enzyme and one substrate is specific to GLUC and results in violet coloration of colonies positive for this enzyme.

Coliforms, other than *E. coli*, (GAL+/GLUC-) form blue to green colonies while, specifically, *E. coli* (GAL+/GLUC+) form violet colonies. A count of total coliforms can be obtained by adding the number of blue colonies and the number of violet colonies. Differentiation of coliforms and specifically *E. coli* is carried out by observing a simple color change reaction. Observation of gas bubbles for differentiation is not necessary.

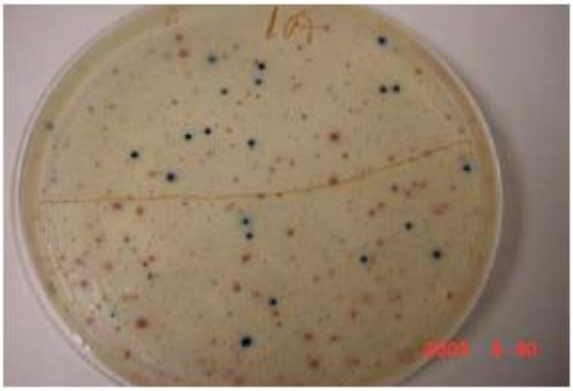
RAPID'*E.coli* 2 is available in two formats, dehydrated media (Item # 356- 4024) or ready-to-use bottled media (Item # 355-5299).

ANNEX 5

LOW COST BACTERIA MONITORING

COLISCAN EASYGEL

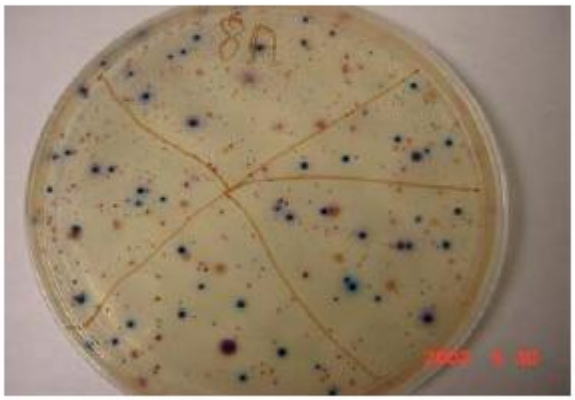
Low Cost Bacteria Monitoring: Coliscan Easygel



Basic Steps to Coliscan Method

- Collect Sample (Non-wadeable streams)
- Place known volume (0.5 – 5.0 ml) of water sample in Coliscan bottle
- Pour water + Coliscan on "special" Petri dish
- Incubate for 24 – 36 hours
- Score plates

Typical Coliscan Plate



Is Coliscan Accurate?

Comparison of DEQ/DCLS Results with Coliscan Method – Study Overview

- ❑ 116 sampling events during 2001-2002
- ❑ 69 "diverse" stations
- ❑ Duplicate "DCLS split" samples and/or "bucket split" samples

Sample Results from DEQ/DCLS Comparison Study

Station	DEQ/DCLS	Coliscan
North River	2,250	2,270
Willis River	460	400
Appomattox River	130	200
Spring Creek	70	30
Buffalo Creek	130	230
Saylers Creek	210	130
Big Guinea Creek	510	170

Summary from Comparison Study

1. Coliscan is a "conservative" method
   - **Very** few False Positives (1/63)
   - False Negatives are common near the standard of 235 (11/17)
2. Regression coefficient = 0.5--
3. Bottom line: DEQ has approved Coliscan for "screening" purposes

Data from "False Negatives"

DCLS	Coliscan		DCLS	Coliscan
513	170		299	100
243	130		460	100
2,400/380	70		520	180
790/260	100		243	190
490/330	80		243	30
353	20			

Scorecard for Coliscan as a Citizen Method

Criterion	Rating	Comments
Accuracy	+++	Approved by DEQ for screening purposes (Conservative)
Sensitivity	++++	Equivalent to standard DCLS method
Cost	+++1/2	Little to no capital investment $1.50 - $2.00 per test
User-friendly	++++	Less time/difficulty than SOS macroinvertebrates or DO tests
Citizen Training	++++	2 hour training to get started

Potential Uses of Coliscan by Citizens

1. Unmonitored/Under-monitored waters
2. Recreation Areas
3. Impaired waters/Fecal TMDLs
4. Other???

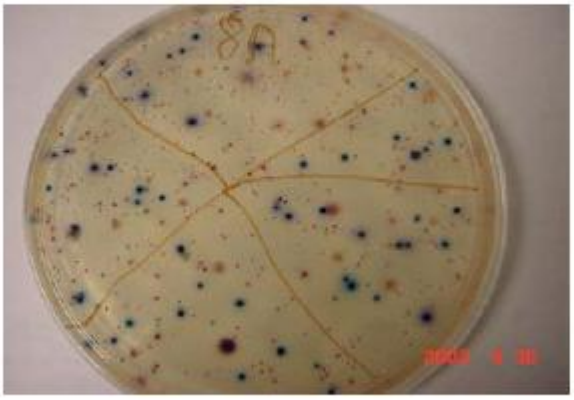
Coliscan can complement DEQ data collection for fecal TMDLs

- DEQ collects 12 months of BST (Bacterial Source Tracking) data for the "listing station"
- DEQ sometimes collects little or no spatial data in support of fecal TMDLs
- Coliscan is an ideal low-cost method to collect spatial data to localize the location of fecal inputs

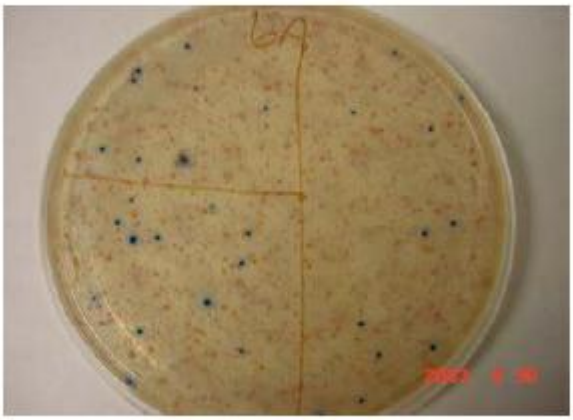
Data from the Reedy Creek Watershed

Station	06/28/03	07/19/03	08/16/03	11/15/03
8	1,350	1,510	1,780	425
6	730	1,230	920	40
5	5,000+	5,500	2,360	650
4 (Trib)	190	450	1,120	50
3	1,860	1,100	5,750	160
2	430	780	2,300	230
1	530	700	4,000	110

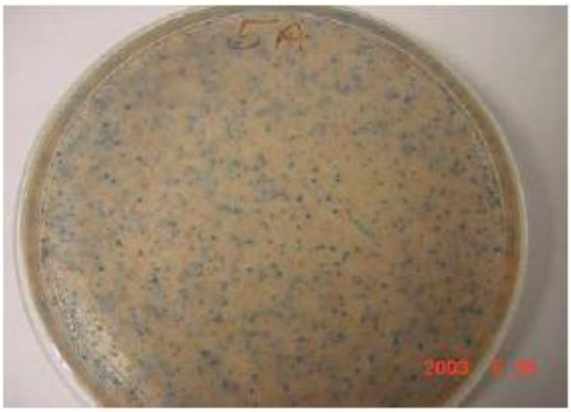
Station 8 - 6/28/03



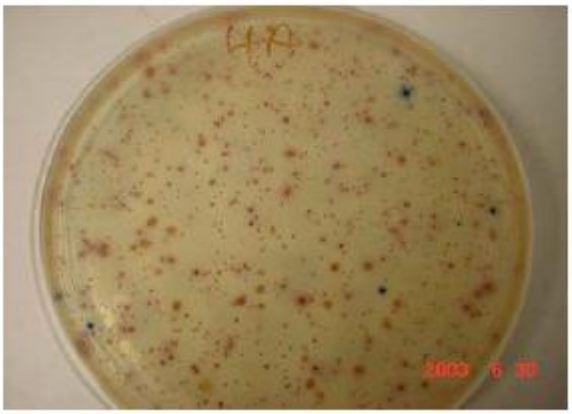
Station 6 - 06/28/03



Station 5- 06/28/03



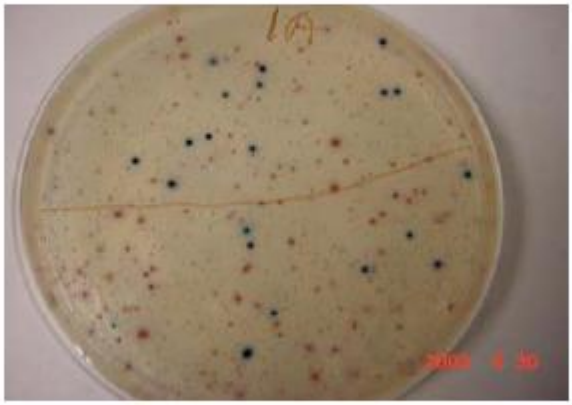
Station 4 - 06/28/03



Station 3 - 06/28/03

Station 2 - 06/28/03

Station 1- 06/28/03



Micrology Laboratories Contact Information

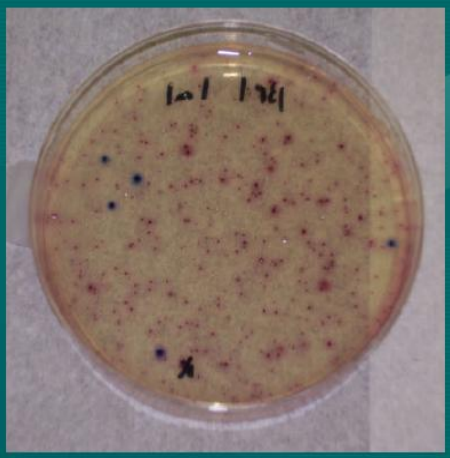
Micrology Laboratories, LLC.
PO Box 340
Goshen, IN 46526
1-888-EASYGEL
www.micrologylabs.com

Coliscan Easygel

How Volunteer Monitoring Can Help
The TMDL Process

What Is Coliscan

- An inexpensive and easy to use media to test for E. coli
- Testing does not require a laboratory environment
- No specialized skills or equipment necessary
- Nearly as accurate as traditional laboratory methods
- Approved by EPA Region 4 for surface water monitoring by Alabama Water Watch



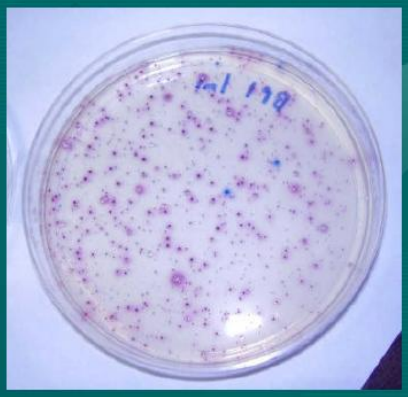
1 ml sample with 5 E. coli colonies

Steps For Using Coliscan

- Collection of samples using sterile sample bottles
- A known quantity of sample (0.5 – 5.0 ml) is placed into a bottle of thawed Coliscan media and mixed
- The prepared media goes into a pretreated Petri dish to turn the liquid media into a gel
- Incubation of the Petri Dishes occurs for 24 hours at 35 - 40º C
- Plates are removed from the incubator and scored

QA Of Coliscan Media

- Media contains inhibitors for non-coliform bacteria
- Two proprietary stains are present in the media
- Coliform bacteria turn red and E. coli stain blue
- E. coli colonies appear dark blue to purple



1 ml sample with 6 E. coli colonies

Sample Results From DEQ/DCLS Comparison Study

Station	DEQ/DCLS	Coliscan
North River	2250	2,270
Willis River	460	400
Appomattox River	130	200
Spring Creek	70	30
Buffalo Creek	130	230
Saylers Creek	210	130
Big Guinea Creek	510	170

The Project

- $5,000 provided by the DEQ TMDL program to pay for Coliscan monitoring by volunteer groups
- Volunteers monitor in TMDL watersheds that have a pending or approved IP
- Data will help track TMDL BMP performance and locate E. coli “hot spots” along tributaries
- Volunteers sample at 10 or more sites in the watershed at least once every month for a year
- Results reported to DEQ on a quarterly basis and forwarded to TMDL staff

What DEQ Provides To Each Volunteer Group

- 14 Coliscan kits (140 samples worth)
- Sampling equipment (Sterile bottles, pipettes, etc.)
- Incubator
- Coolers, markers, tape, disinfectant
- Hands on training

Typical equipment for volunteers

Current Coliscan Watersheds

- Blacks Run and Cooks Creek-Rockingham
- Christians Creek-Augusta
- Four Mile Run- City of Alexandria
- Hawksbill Run- Page
- Holman's Creek-Shenandoah
- Mechumps Creek-Hanover
- Opequon and Abrams Creek- Frederick
- Pamunkey River- King William
- Rattlesnake Creek*- City of Richmond
- Three Creeks TMDL-Washington
- Thumb Run- Fauquier
- Upper Powell River-Wise

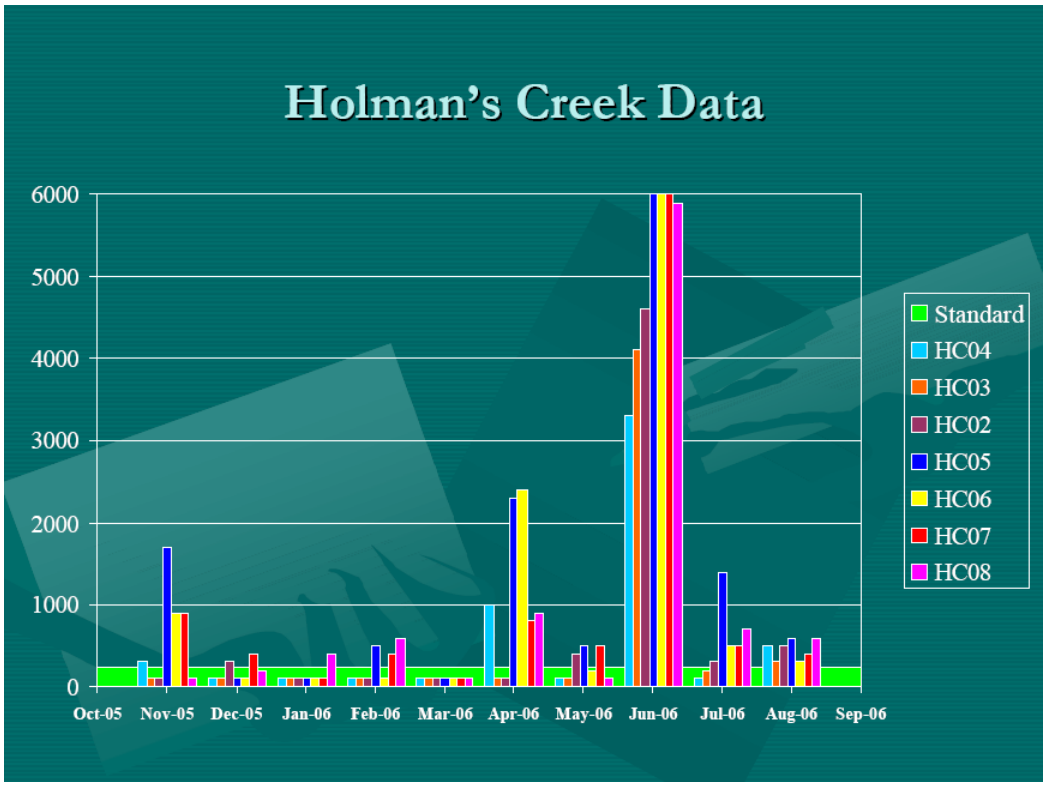
Current Coliscan Partners*

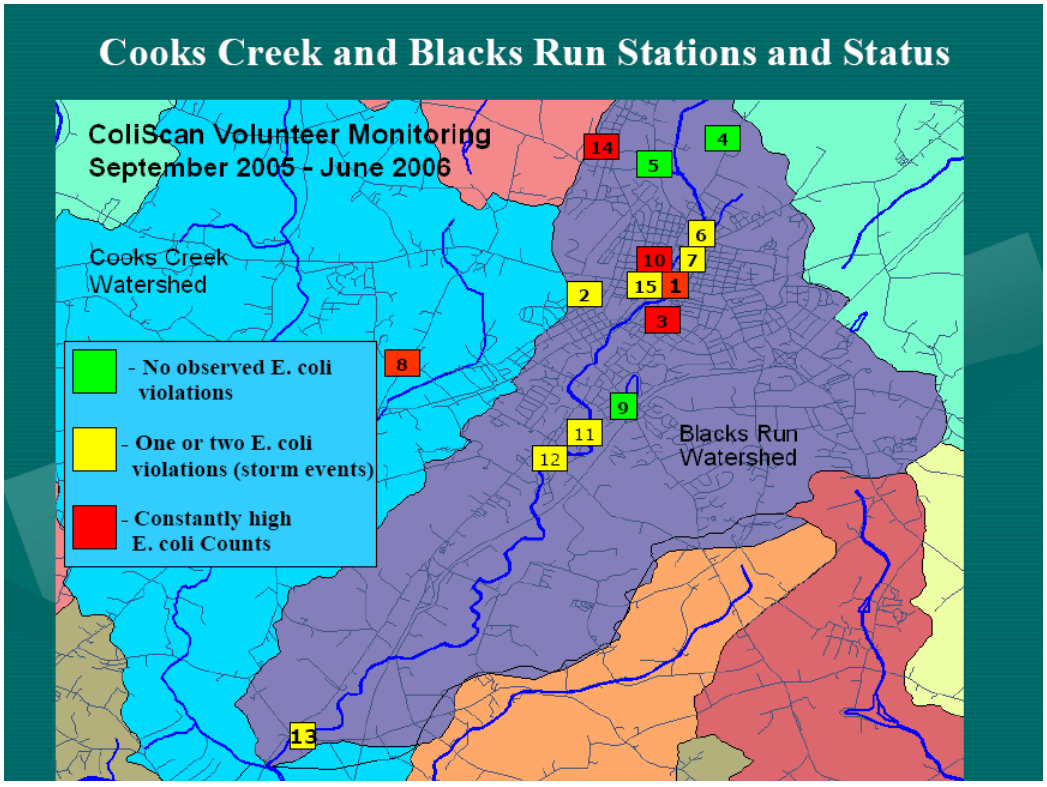
- Seven citizen volunteer groups
- Five high schools
- Two colleges
- Four SWCD
- Two TMDL IP committees
- One PDC

Volunteer learning about Coliscan

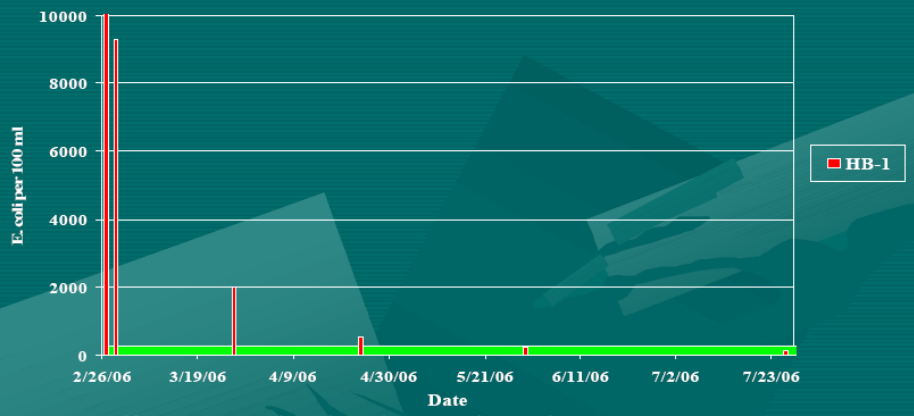
* Some TMDL watersheds have more than one partner who work as a team

Sample Results


Holman's Creek Data
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Oct-05
Nov-05
Dec-05
Jan-06
Feb-06
Mar-06
Apr-06
May-06
Jun-06
Jul-06
Aug-06
Sep-06
Standard
HC04
HC03
HC02
HC05
HC06
HC07
HC08


Cooks Creek and Blacks Run Stations and Status
ColiScan Volunteer Monitoring
September 2005 - June 2006
Cooks Creek
Watershed
Blacks Run
Watershed
- No observed E. coli violations
- One or two E. coli violations (storm events)
- Constantly high E. coli Counts
14
4
5
6
10
7
15
1
2
3
8
9
11
12
13

Three Creeks Watershed



- Coliscan monitoring began in February 2006
- Site HB-01 showed high bacteria counts (17600 CFU)
- A broken sewer line was identified as the source
- Line repaired in early April

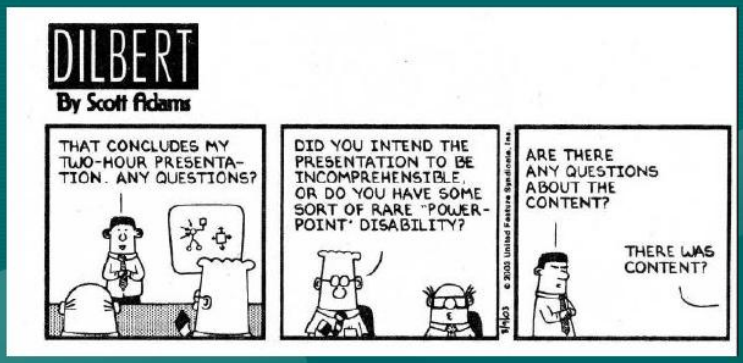
Year Two Plans

- $5,000 renewal from the DEQ TMDL program
- Continue work in current watersheds with a new round of media
- Approach four new groups to start Coliscan monitoring in TMDL IP watersheds
- New groups will be in WCRO and SCRO
- By end of year two we will receive data from 16 TMDL IP watersheds

For More Information

Contact

James Beckley
Water Quality Data Liaison
(804) 698-4025
jebeckley@deq.virginia.gov



Questions

During 2004 and 2005, volunteers in Indiana and Iowa were trained to assess *E. coli* using both field/home lab test methods and to collect samples that were analyzed in a state certified laboratory in Iowa. Six *E. coli* tests were assessed by these volunteer monitors. Following that sampling season, two test methods were recommended for use in all 6 participating states based on volunteer preference surveys, costs of the methods, and comparability of results between the methods and laboratory methods. In 2005 volunteers in MI, MN, OH, and WI initiated use of 3M Petrifilm and Coliscan Easgygel. Volunteers in all 6 participating states continue to test these two methods in 2006.

A brief description of each of the 6 test methods follows, with links to the distributors' websites and to the National Environmental Methods Index, so that users can find more detailed information about each method.

Coliscan Easygel (not incubated)

This test method, distributed by Micrology Laboratories, was assessed by volunteers in Indiana and Iowa. To use the kit for analysis, a small amount (0.5-5 mL) of water sample is poured into a bottle of Coliscan Easygel and mixed by swirling the bottle. The mixture is then poured into a labeled Petri dish/plate, covered, and swirled to uniformly distribute the sample. After sitting undisturbed for approximately 45 minutes, the Petri dishes are inverted. The dishes are then left at room temperature for 48 hours, at which time, purple/blue colonies (the *E. coli* colonies) on the plates are counted. *E. coli* numbers are represented in colony forming units (CFU) / 100 ml of water. For more information about this method visit the National Environmental Methods Index.

Coliscan Easygel (incubated)

This test method, distributed by Micrology Laboratories, is being assessed in all participating states. To use the kit for analysis, a small amount (0.5-5 mL) of water sample is poured into a bottle of Coliscan Easygel and mixed by swirling the bottle. Then, the mixture is poured into a labeled petri dish, covered, and swirled to uniformly distribute the sample. After sitting undisturbed for approximately 45 minutes, the Petri dishes are inverted and incubated at 35 degrees C for 48 hours. Then, like with the non-incubated Easygel method, purple/blue colonies (the *E. coli* colonies) on the plates are counted. *E. coli* numbers are represented in colony forming units (CFU) / 100

ml of water. For more information about this method visit the National Environmental Methods Index.

3M Petrifilm

This test method, distributed by 3M, is being assessed in all participating states. To use the kit for analysis, 1 mL of water sample is added to a Petrifilm petri plate. The petri plate is then incubated at 35 degrees C for 24 and 48 hours. Blue colonies are counted after both 24 and 48 hours to see how consistent the numbers are between incubation periods. *E. coli* numbers are represented in colony forming units (CFU) / 100 ml of water. This method is not included on the National Environmental Methods Index.

Coliscan MF Method

This test method was assessed only by volunteers in Indiana. Like the Easygel method, this method is distributed by Micrology Laboratories. To analyze for *E. coli* with this kit, a diluted sample of of water sample is poured through a filter. An agar-based medium is then added to a petri plate and the filter is placed on the plate. The petri plate is then covered and incubated at 35 degrees C for 24 hours. Blue/purple coloines are then counted and their presence indicates the presence of *E. coli*. *E. coli* numbers are represented in colony forming units (CFU) / 100 ml of water. For more information about this method visit the National Environmental Methods Index.

Colisure Method with the IDEXX Quanti-Tray/2000

This test method is being assessed only by Iowa volunteers and is distributed by IDEXX Laboratories. To analyze for *E. coli* with this kit, a packet of reagent is added to 100 mL of sample water or a diluted sample and mixed by shaking. The mixed sample is then poured into a Quanti-Tray and sealed. The Quanti-Tray is then incubated at 35 degrees C and read at 24 and 48 hours. A UV light is used to determine the number of positive fecal coliform wells in the tray that also exhibit flourescence. A conversion table comes with the kit to determine the most probable number (MPN) of *E. coli* per 100 mL of water. For more information about this method visit the National Environmental Methods Index.

Colilert Method with the IDEXX Quanti-Tray/2000

This test kit is being assessed only by Iowa volunteers and is distributed by

IDEXX Laboratories. To analyze for *E. coli* with this kit, a packet of reagent is added to 100 mL of sample water or a diluted sample and mixed by shaking. The mixed sample is then poured into a Quanti-Tray and sealed. The Quanti-Tray is then incubated at 35 degrees C and read after 24 hours. A UV light is used to determine the number of fecal coliform and *E. coli* colonies based on the number of wells in the tray that show yellow/flourescence. (The color change is different than with the Colisure Method.) A conversion table comes with the kit to determine the most probable number (MPN) of *E. coli* per 100 mL of water. For more information about this method visit the National Environmental Methods Index.

Page updated June 23, 2006

Detection of Waterborne Coliforms and *E. coli* with Coliscan Easygel

Introduction:

The **Coliscan Easygel** medium is a patented formulation for water testing. It contains a sugar linked to a dye which, when acted on by the enzyme ß-galactosidase (produced by coliforms including *E. coli*), turns the colony a pink color. Similarly, there is a second sugar linked to a different dye which produces a blue-green color when acted on by the enzyme ß-glucuronidase. Because *E. coli* produces both ß-galactosidase and ß-glucuronidase, *E. coli* colonies grow with a purple color (pink + blue). The combination of these two dyes makes possible the unique ability to use one test to differentiate and quantify coliforms and *E. coli*. (Because *E. coli* is a member of the coliform group, add the number of purple colonies to the number of pink colonies when counting total coliforms.)

Instructions:

Either collect your water sample in a sterile container and transport the water back to the test site, or take a measured water sample directly from the source and place directly into the bottle of **Coliscan Easygel**. *Water samples kept longer than one (1) hour prior to plating, or any **Coliscan Easygel** bottle that has had a sample placed into it for transport longer than ten (10) minutes, should be kept on ice or in a refrigerator until plated.*

1. Label the petri dishes with the appropriate sample information. A permanent marker or wax pencil will work.

2. Sterilely transfer water from the sample containers into the bottles of **Coliscan Easygel** (Consult the following table for rough guidelines for inoculum amount). Swirl the bottles to distribute the inoculum and then pour the medium/inoculum mixtures into the correctly labeled petri dishes. Place the lids back on to the petri dishes. Gently swirl the poured dish until the entire dish is covered with liquid (but be careful not to splash over the side or on the lid).

Inoculation of Coliscan Easygel	
Water Sources	**Inoculum Amount**
Environmental: river, lake, pond, stream, ditch	1.0 to 5.0 mL
Drinking water: well, municipal, bottled	5.0 ml

3. The dishes may be placed right-side-up directly into a level incubator or warm level spot in the room while still liquid. Solidification will occur in approximately 40 minutes.

4. Incubate at 35° C (95° F) for 24 hours, or at room temperature for 48 hours. (See comments on incubation)

5. Inspect the dishes

a. Count all the purple colonies on the **Coliscan** dish (disregard any light blue, blue-green or white colonies) , and report the results in terms of *E. coli* per ml of water. NOTE: To report in terms of *E. coli* per 100 ml of water, first find the number to multiply by. To do this: first, divide 100 by the number of ml that you used for your sample. Then, multiply the count in your plate by the result obtained from #1. For example, a 3 ml sample, 100 / 3 = 33.3. So, 4 *E. coli* colonies multiplied by 33.3 will equal 133.2 *E. coli* per 100 ml of water.

b. Count all the pink and purple colonies on the **Coliscan** dish (disregard any light blue, blue-green or white colonies) and report the results in terms of coliforms per ml of water.

6. Do one of the following prior to disposal in normal trash:

a. Place dishes and **Coliscan** bottles in a pressure cooker and cook at 15 lbs. for 15 minutes. This is the best method.

b. Place dishes and **Coliscan** bottles in an ovenproof bag, seal it, and heat in an oven at 300° F for 45 minutes.

c. Places dishes and **Coliscan** bottles in a large pan, cover with water and boil for 45 minutes.

d. Place 5 ml (about 1 teaspoon) of straight bleach onto the surface of the medium of each plate. Allow to sit at least 5 minutes. Place in a watertight bag and discard in trash.

Comments on Incubation:
Micrology Laboratories, LLC in-house studies indicate that **Coliscan** can effectively differentiate general coliforms from *E. coli* when incubated at either room temperatures or at elevated temperatures (such as 90-98° F). However, some further explanation may be helpful.

There is no one standard to define room temperature. Most would consider normal room temperature to vary from 68-74° F, but even within this range the growth of bacteria will be varied. Members of the bacterial family **Enterobacteriaceae** (which includes coliforms and *E. coli**) are generally hardy growers that prefer higher than room temperatures, but which will grow at those temperatures. They tend to grow at a faster rate than most other bacterial types when conditions are favorable. It is therefore logical to try to place inoculated dishes in a "warm" place in a room for incubation if a controlled temperature incubator is not available. It is a very easy task to make an adequate incubator from a box with a 40-60 watt bulb in it to provide heat at an even rate. One can also use a heat tape such as it is used to prevent the freezing of pipes in the winter as your heat source.

Our general instructions indicate that incubation times for coliforms (including *E. coli*) are generally 24-48 hours at elevated temperatures (90-98° F) and 48 or more hours at room temperatures. At elevated temperatures, no counts should be made after 48 hours as any coliforms present will be quite evident by that time and if new colonies form after 48 hours as any coliforms present will be quite evident by that time and if new colonies form after 48 hours they are most likely not coliforms, but some other type of slow growing organisms that should not be included in your data. At room temperatures, the best procedure is to watch the plates by checking them at 10-12 hour intervals until you observe some pink or purple colonies starting to form and then allowing another 24-30 hours for the maturation of those colonies. Since the coliforms (including *E. coli*) are generally the faster growing organisms, these will be the

first to grow and be counted. Colonies that may show up at a later time are likely to not be coliforms. As you can see, there are advantages to incubating your dishes at elevated temperatures. First, you can count the results earlier. At 95° F, it is often possible to do accurate counts at 18-20 hours of incubation. There is also less probability of variation from batch to batch when the incubation temperatures are kept at one uniform level. And a higher incubation temperature will tend to inhibit the growth of non-coliforms that may prefer lower temperatures.

**E. coli* is the primary fecal coliform, however, *Klebsiella* is sometimes of fecal origin. Other general coliform genera include *Enterobacter* and *Citrobacter*.

Interpretation of Results

This test method utilizes well established, widely accepted criteria for the recognition of coliforms and *E. coli* and proper application of the method will result in accurate results. Therefore, if you suspect that your water is dangerously contaminated based on the results you get using **Coliscan Easygel**, you should contact your local health department and ask for their help in performing an official assessment of water.

Non-fecal coliforms are widely distributed in nature, being found both as naturally occurring soil organisms, and in the intestines of warm-blooded animals and humans. Fecal coliforms are coliforms found naturally only in the intestines of warm-blooded animals and humans. Fecal coliform contamination is therefore the result of some form of fecal contamination. Sources may be either animal or human.

General Notes on Differentiating Coliforms and *E. coli*

Generally, water containing *E. coli* (the fecal contamination indicator organism) should not be used for drinking water unless it is sanitized in some manner. Contact your local health department for guidelines regarding *E. coli* and coliforms in recreational waters. Inform them if you suspect that contamination may be occurring from a specific source.

Colonies which have the blue-green color are not exhibited any ß-galactosidase activity (which is evidenced by the pink color). Because of this, they are not considered to be either coliforms or *E. coli* and therefore should be ignored when counting your coliform or *E. coli* colonies. Similarly, colonies which are white are exhibiting neither color-causing enzyme, and should also be ignored.

Colonies on the surface of the plate are exposed to the medium on only the underside of the colony. This causes these colonies to appear with much less of the indicator color. *E. coli* colonies may only have a slight purple tinge to them, and it may appear only in the center of the colony with the remainder of the colony being white. Similarly, coliforms on the surface may be light pink or white with a pink center.

Detection of Waterborne Coliforms and Fecal Coliforms with Coliscan® Easygel®

Introduction

The Coliscan Easygel medium is a patented formulation for water testing. It contains a sugar linked to a dye which, when acted on by the enzyme p-galactosidase (produced by coliforms including E. coli), turns the colony a pink color. Similarly, there is a second sugar linked to a different dye which produces a blue-green color when acted on by the enzyme p-glucuronidase. Because E. coli produces both p-galactosidase and p-glucuronidase, E.Coli colonies grow with a purple color (pink + blue). The combination of these two dyes makes possible the unique ability to use one test to differentiate and quantify coliforms and E. coli. (Because E. coli is a member of the coliform group, add the number of purple colonies to the number of pink colonies when counting total coliforms.)

® Coliscan and Easygel are registered trademarks of Micrology Laboratories, LLC.

To order, call Voigt Global Distribution Inc sales@VGDLLC.com
www.VGDLLC.com
In the USA, call Toll Free: 1-877-484-3552

Instructions

1. Either collect your water sample in a sterile container and transport the water back to the test site, or take a measured water sample directly from the source and place directly into the bottle of Coliscan Easygel. Water samples kept longer than 1 hour prior to plating, or any Coliscan Easygel bottle that has had sample placed into it for transport longer than 10 minutes, should be kept on ice or in a refrigerator until plated.
2. Label the petri dishes with the appropriate sample information. A permanent marker or wax pencil will work.
3. In a sterile manner, transfer water from the sample containers into the bottles of Coliscan Easygel (Consult the following table for rough guidelines for inoculum amount). Swirl the bottles to distribute the inoculum and then pour the medium/inoculum mixtures into the correctly labeled petri dishes. Place the lids back on to the Petri dishes. Gently swirl the poured dish until the entire dish is covered with liquid (but be careful not to splash over the side or on the lid).

Inoculation of Coliscan Easygel

Water Sources Inoculum Amount
Environmental: River, lake, pond, stream, ditch 1.0 ~ 5.0mL
Drinking water: Well, municipal, bottled 5.0mL
4. The dishes may be placed right-side-up directly into a level incubator or warm level spot in the room while still liquid. Solidification will occur in approximately 45 minutes.
5. Incubate at 35° C (95° F) for 24 hours, or at room temperature for 48 hours, (see Comments on incubation)
6. Inspect the dishes.
a. Count all the purple colonies on the Coliscan dish (disregard any light blue, blue-green or white colonies), and report the results in terms of E. coli or Fecal Coliform per mL of water.
Note: To report in terms of E. coli or Fecal Coliform per 100 mL of water, first find the number to multiply by:
1. Divide 100 by the number of mL that you used for your sample.
2. Multiply the count in your plate by the result obtained from #1.
e.g. For a 3 mL sample, 100/3 =33.3. So, 4 E. coli colonies multiplied by 33.3 will be equal to 133.2 E. coli per 100 mL of water.
b. Count all the pink and purple colonies on the Coliscan dish (disregard any light blue, blue- green or white colonies) and report the results in terms of coliforms per mL of water.

7. Do one of the following prior to disposal in normal trash:
a. Place dishes and Coliscan bottles in a pressure cooker and cook at 15 Lbs. for 15 minutes.(This is the best method.)
b. Place dishes and Coliscan bottles in an oven-proof bag, seal it, and heat in an oven at 300° F for 45 minutes.
c. Place dishes and Coliscan bottles in a large pan, cover with water and boil for 45 minutes.
d. Place 5 mL (about 1 teaspoon) of straight bleach onto the surface of the medium of each plate.
Allow to sit at least 5 minutes. Place in a water-tight bag and discard in trash.
Comments on Incubation
Micrology Laboratories, LLC. in-house studies indicate that Coliscan can effectively differentiate general coliforms from E. coli when incubated at

either room temperatures or at elevated temperatures (such as 90-98° F). However, some further explanation may be helpful.

There is no one standard to define room temperature. Most would consider normal room temperature to vary from 68-74° F, but even within this range the growth of bacteria will be varied. Members of the bacterial family Enterobacteriaceae (which includes coliforms and E. coli) are generally hardy growers that prefer higher than room temperatures, but which will grow at those temperatures. They tend to grow at a faster rate than most other bacterial types when conditions are favorable. It is therefore logical to try to place inoculated dishes in a "warm" place in a room for incubation if a controlled temperature incubator is not available. It is a very easy task to make an adequate incubator from a box with a 40-60 watt bulb in it to provide heat at an even rate. One can also use a heat tape such as is used to prevent the freezing of pipes in the winter-as your heat source.

Our general instructions indicate that incubation times for coliforms (including E. coli*) are generally 24-48 hours at elevated temperatures (90-98° F) and 48 or more hours at room temperatures. At elevated temperatures, no counts should be made after 48 hours as any coliforms present will be quite evident by that time and if new colonies form after 48 hours they are most likely not coliforms, but some other type of slow growing organism that should not be included in your data. At room temperatures, the best procedure is to watch the plates by checking them at 10-12 hour intervals until you observe some pink or purple colonies starting to form and then allowing another 24-30 hours for the maturation of those colonies. Since the coliforms (including £. coif) are generally the fastest growing organisms, these will be the first to grow and be counted. Colonies that may show up at a later time are likely to not be coliforms. As you can see, there are advantages to incubating your dishes at elevated temperatures. First, you can count the results earlier. At 95° F, it is often possible to do accurate counts at 18-20 hours of incubation. There is also less probability of variation from batch to batch when the incubation temperatures are kept at one uniform level. And a higher incubation temperature will tend to inhibit the growth of non-coliforms that may prefer lower temperatures.

*E.coli is the primary fecal coliform, however, Klebsiella is sometimes of fecal origin. Other general coliform genera include
Enterobacter and Citrobacter.

Interpretation of Results

This test method utilizes well established, widely accepted criteria for the recognition of coliforms and E. coli and proper application of the method will result in accurate results Therefore, if you suspect that your water is

dangerously contaminated based on the results you get using Coliscan Easygel, you should contact your local health department and ask for their help in performing an official assessment of the water.

Non-fecal coiiforms are widely distributed in nature, being found both as naturally occurring soil organisms, and in the intestines of warm-blooded animals and humans. Fecal coliforms are coliforms found naturally only in the intestines of warm-blooded animals and humans. Fecal coliform contamination is therefore the result of some form of fecal contamination. Sources may be either animal or human.

General Notes on Differentiating Coliforms and E.Coli

Generally, water containing E coli (the fecal contamination indicator organism) should not be used for drinking water unless it is sanitized in some manner. Contact your local health department for guidelines regarding E. coli and coliforms in recreational waters. Inform them if you suspect that contamination may be occurring from a specific source.

Colonies which have the blue-green color are not exhibiting any p-galactosidase activity (which is evidenced by the pink color). Because of this, they are not considered to be either coliforms or E. coli and therefore should be ignored when counting your coliform or E. coli colonies. Similarly, colonies which are white are exhibiting neither color-causing enzyme, and should also be ignored.

Colonies on the surface of the plate are exposed to the medium on only the underside of the colony. This causes these colonies to appear with much less of the indicator color. E. coli colonies may only have a slight purple tinge to them, and it may appear only in the center of the colony with the remainder of the colony being white. Similarly, coliforms on the surface may be light pink or white with a pink center.

Background information on Coliscan® Easygel®

Coliform bacteria are members of the family Enterobacteriaceae and are defined as gram negative, non-spore-forming rods
which ferment the sugar lactose with the evolution of gas and acids. Many coliforms are normally found in soil and water and
do not necessarily indicate the presence of fecal contamination, but Escherichia coli (E. coli) is a primary bacterium in the
human and animal intestinal tract and its presence in food or water indicates fecal contamination. Therefore, E. coli is the
coliform that is used as an indicator for fecal contamination. Other coliform genera include Citrobacter, Enterobacter and

Klebsiella. The US EPA acknowledges that E. coli is the best indicator of health risk in fresh water and is currently recommending testing for E. coli instead of fecal coliforms. The term "fecal coliform" indicates coliforms which will grow at a temperature of 44.5° C. This is not an accurate designation as there are coliforms of non-fecal origin that will grow at 44.5° C and there are strains of E. coli that will not grow at 44.5° C.
Traditional tests for coliforms and E. coli or fecal coliforms require the inoculation of media containing lactose, incubation under carefully controlled temperatures, and examination for the presence of gas from lactose fermentation. Additional special media must then be inoculated and incubated at elevated, carefully controlled temperatures to confirm the presence of E. coli or fecal coliforms. All these require extra equipment and careful regulation of time and temperature. This approach is not only expensive and time consuming, but can be less than precise in indicating the numbers of specific organisms present.

As a result of the difficulties and lack of precision inherent in the older technology, new approaches have been developed and are being used very successfully. One of the best approaches is based on the fact that in order for coliforms to ferment lactose, they must produce certain enzymes which can be identified and used to verify the presence of the coliforms. General coliforms produce the enzyme galactosidase in lactose fermentation and E. coli produces the enzyme glucuronidase in addition to galactosidase. Coliscan Easygel utilizes this information to produce a simple, accurate and quantitative method of identifying and differentiating coliforms and E. coli (true fecal coliform) from other bacteria in water and other types of samples. This patented method incorporates two special chromogenic substrates which are acted upon by the enzymes galactosidase and glucuronidase to produce pigments of different colors. To identify the presence and numbers of coliforms and E. coli, Just add a test sample to the medium, pour it into a pretreated petri dish and incubate it at room temperature or at a higher controlled temperature (35° C. is suggested). General coliforms will produce the enzyme galactosidase and the colonies that grow will be a pink color. E. coli will produce galactosidase and glucuronidase, and will grow as blue/purple colonies. It is a simple task to count the blue/purple colonies as E coli and the pink colonies as other coliforms. The sum of the E. coli and the other coliforms is the total coliform number.
Any non-colored colonies that grow in/on the medium are not coliforms or E. coli, but may be members of the family enterobacteriaceae such as Salmonella, Shigella, Proteus, etc. Likewise, it is possible that samples may

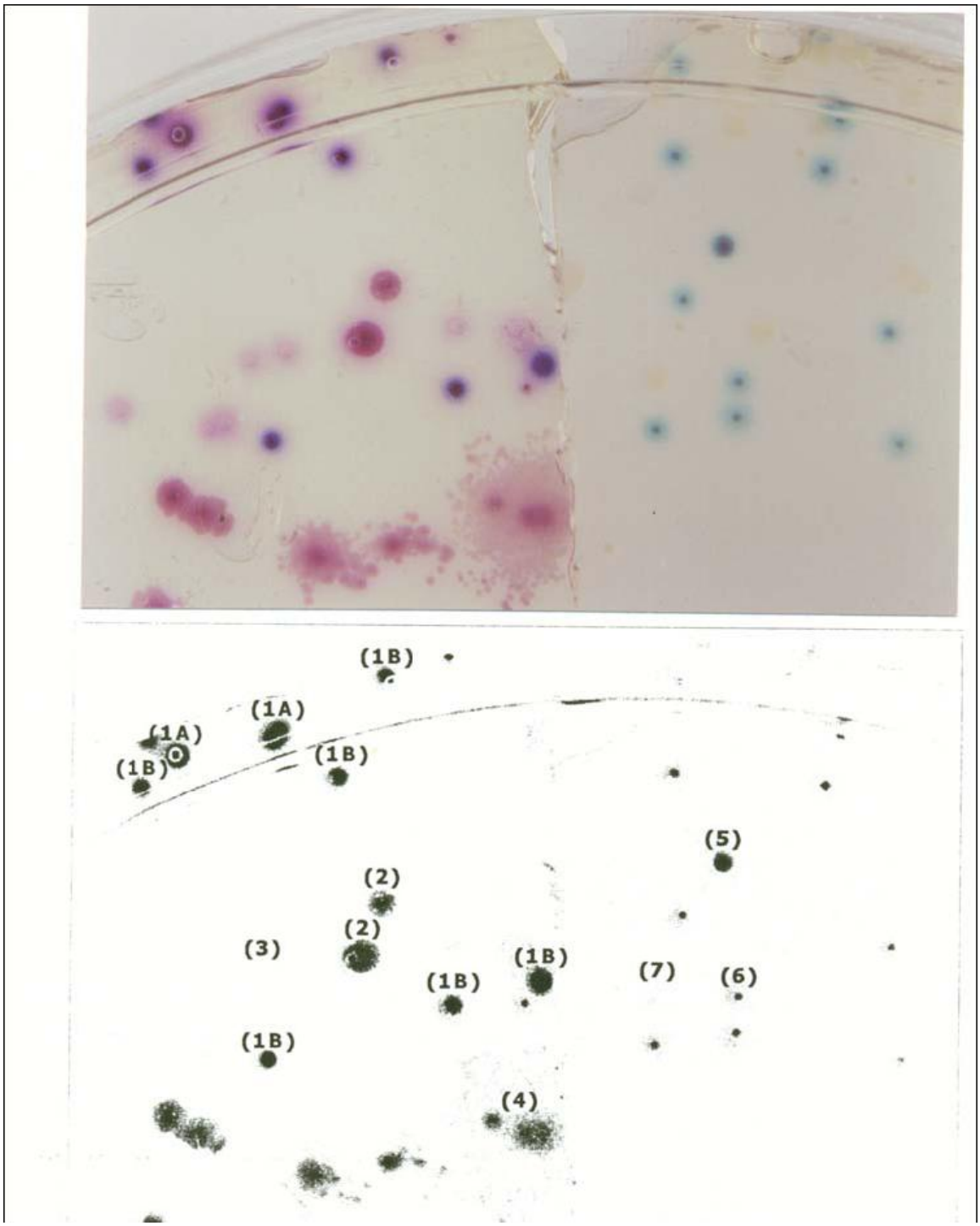
contain some unusual types or strains of related organisms which produce only the enzyme glucuronidase and not the enzyme galactosidase, and these will grow as teal green colonies. Any non-colored or teal green colonies that grow on/in Coliscan Easygel should not be counted as E. coli or coliforms without further biochemical testing. It is possible that they are very unusual forms of coliform or E coli, or significant other bacterial types which should not be ignored, especially if they occur in large numbers.

Since Coliscan contains inhibitors, most other bacterial types do not grow in/on it. Coliscan is best incubated at 30-37° C. (85-99° F) as coliforms grow faster at this temperature range than at lower room temperatures. At this range, counts can normally be made at 24 hours, while at lower room temperatures, counts may be best at 36-48 hours.

The beauty of the Coliscan method is that it uses proven and accepted technology to allow anyone to do effective coliform/E.

coli testing. For water testing, you can add up to a 5 ml_ sample of water to the bottle of medium that makes one petri plate. This will detect as small a number of coliforms or E. coli as one living bacterium in five milliliters of water. The method is also easily adapted for large samples with membrane filter use. Beware of copycat methods by other manufacturers who claim similar red and blue colors for coliforms and fecal coliforms, but whose results are unreliable due to inferior technology. They cannot legally copy the patented Coliscan technology.

Coliscan® Easygel® Colony Color Guide



The left half of the photo (#1-4) consists of colonies of E coli (#1A, 1B) and Enterobacter aerogenes (#2, 3, 4) growing in/on Coliscan® Easygel®

medium. The right half of the photo (#5, 6, 7) represents the appearance of organisms other than E. coli or coliforms.
1A- Two E. coli CFU (colony forming units) showing purple color with obvious pink diffused halos. Fecal coliform. (Glucuronidase +, Galactosidase +)
1B- E. coli CFUs blue/purple color with minimal pink halos. Fecal coliform. (Glucuronidase +, Galactosidase +)
2 - Enterobacter aerogenes CFUs as dark, solid pink color. Non-fecal coliform, (Contain no blue/purple) (Glucuronidase -, Galactosidase +)
3 - Enterobacter aerogenes CFUs as light pink color. Non-fecal coliform (Glucuronidase -, Galactosidase +)
4 - Enterobacter aerogenes CFUs spread on surface of medium.(2 original colonies) Non-fecal coliform. (Glucuronidase -, Galactosidase +)
5 - Teal green CFU growing on surface of medium. (Glucuronidase +) This colony type should not be counted as E. coli or coliform
6 - Teal green CFU growing in the medium. (Glucuronidase +) This colony type should not be counted as E. coli or coliform.
7 - Colorless CFU (indicates no Glucuronidase or Galactosidase activity). This colony tvpe should not be counted as E. coli or coliform.
® Coliscan and Easygel are registered trademarks of Micrology Laboratories, LLC.
To order, call Voigt Global Distribution Inc Tel: 877-484-3552
sales@VGDLLC.com www.VGDLLC.com

INTRODUCING THE NEW

Coliscan® Easygel ® Plus* & Coliscan ® MF Plus*

for the

Identification and Differentiation

of

E. coli and Other Coliforms

The new Coliscan® Easygel® Plus does everything that the original Coliscan® Easygel® does, plus it allows those who may be unsure of the difference in color of the colonies growing in the medium to very easily verify that the colony is or is not glucuronidase positive. (That is, does it have blue color verifying it as *E. coli* or is it just a deep magenta and therefore a general coliform?) All that is needed is a long wave UV light source (available from Micrology Labs or other sources) and a dark room for viewing.

Your Coliscan® Easygel dishes and colonies will look identical to the original Coliscan® Easygel dishes with Blue/purple *E. coli* and pink/magenta other coliforms visible in ambient day or room light, but when you turn off the lights and shine the long wave UV on the bottom of the dish, any *E. coli* will be surrounded by a bright bluish fluorescent zone.

This application of two enzyme substrates testing for the same enzyme means that you have double verification for the presence of *E. coli*. It also means that the presence of *E. coli* may be detected and quantified as early as 12 hours incubation time.

ANNEX 6

OTHER LOW COST METHODS

July 27, 2006

Purdue creates new low-cost system to detect bacteria

WEST LAFAYETTE, Ind. — Researchers at Purdue University have developed a new low-cost system that analyzes scattered laser light to quickly identify bacteria for applications in medicine, food processing and homeland security at one-tenth the cost of conventional technologies.

The technique — Bacteria Rapid Detection Using Optical Scattering Technology — works by shining a laser through a petri dish containing bacterial colonies growing in a nutrient medium.

"Unlike conventional methods, we don't have to do any biochemical staining, DNA analysis or other types of manipulation," said Bartek Rajwa, a staff scientist at the Bindley Bioscience Center in Purdue's Discovery Park, the university's hub for interdisciplinary research.

Particles of light, called photons, bounce off of the colony, and the pattern of scattered light is projected onto a screen behind the petri dish. This "light-scatter pattern" is recorded with a digital camera and analyzed with sophisticated software to identify the types of bacteria growing in colonies.

"There are potentially thousands of applications for this new technology, from identifying stem cells to drug-resistant staph infections to pathogens on the battlefield." said J. Paul Robinson, a researcher at the Bindley Center and a professor in the Weldon School of Biomedical Engineering and the School of Veterinary Medicine.

The work was initiated by Arun Bhunia, a professor of food microbiology in the Department of Food Science; and E. Daniel Hirleman, a professor and William E. and Florence E. Perry Head of Purdue's School of Mechanical Engineering. Findings are detailed in a research paper appearing this month in the Journal of Biomedical Optics.

Hirleman has specialized in research to develop new types of sensors that work by analyzing light scattering off objects for applications such as detecting impurities on silicon wafers in computer chip manufacturing and measuring the size and speed of fuel droplets in jet engines.

"We adapted some ideas from that research to build a scatterometer for food safety, and now we're using the second generation of that instrument," Hirleman said.

A major motivation for the research is to reduce the time it takes for industry to identify harmful organisms in food processing. Scientists in food-processing plants routinely grow cultures to test for dangerous pathogens.

"The dairy industry, for example, grows bacteria on petri dishes to make sure products are safe, but industry is trying to develop technologies that will very quickly identify organisms," Robinson said. "The same sort of thing holds true for clinical microbiology and other laboratories. With our light-scattering method, it takes less than five minutes to identify harmful organisms after they have grown in a petri dish. The analysis is faster than any other methods in existence, and it’s simple."

The technique might be used to identify staph infections that are resistant to antibiotics.

"This is an extremely dangerous infection, and you want to catch it as early as possible," Robinson said.

A mass-produced system based on the technology would consist of inexpensive, off-the-shelf hardware, such as red lasers and low-resolution digital cameras available at consumer electronics stores, and likely would cost less than $1,000, Hirleman said.

A critical part of the technique was made possible by adapting a mathematical method created in 1934 by Dutch physicist Fritz Zernike, who created a set of mathematical "descriptors" subsequently called radial Zernike polynomials. These descriptors can be used to analyze how light-wave patterns are distorted after passing through lenses having complex flaws or aberrations.

Individual bacterial colonies growing in a petri dish also distort light passing through them, just as a lens changes light-wave patterns.

"Therefore, we can treat the colonies as lenses and use Zernike polynomials," Rajwa said.

Factors such as the shape of bacteria, their refractive indexes — or how much they bend light — the types of substances secreted by a particular bacterium and the distance between individual bacteria in a colony, all contribute to how a colony distorts light. The procedure identifies a bacterial colony by comparing an image of its scatter pattern against a template that contains 120 features described by Zernike polynomials.

"A good analogy is the method used by law enforcement to identify a person's face using specialized recognition software," Rajwa said. "You could describe the face as being made up of a combination of geometric shapes, like ovals, squares and triangles, but each face has a unique blend of these shapes. We did something similar. We reduced complicated scatter patterns to 120 numbers

based on Zernike polynomials."

This reduced collection of numbers describes how well the colony fits the template, and then pattern recognition software is used to classify the bacteria.

"One of the most important developments is being able to convert images to numbers, which makes it possible to classify the patterns," Rajwa said. "We are able to take images and convert them to numbers that uniquely describe every picture."

The researchers used the new system to classify six species of listeria, only one of which is a dangerous food-borne pathogen for humans.

"If you have a mixture of different listeria, you would like to know which is the one that can kill you," Rajwa said. "We took pictures of the scatter patterns from different listeria, and we were able to classify all of them accurately."

The system also was able to accurately identify other types of bacterial colonies, including salmonella, vibrio, E. coli and bacillus**.**

"We were able to classify bacterial colonies with greater than a 90 percent probability of being correct, which is as good as you could do with equipment costing more than $100,000, " Rajwa said. "And, unlike conventional systems, our method is 100 percent non-invasive, which means we can carry out the procedure without staining, manipulating or killing the biological samples.

"The power of this technology is that it does not require complicated lab equipment, and it could be designed so that it wouldn't require someone with a doctoral degree to operate. The whole beauty of the system is you don't invade the biological environment that you want to

measure," Rajwa said. "If you are working with stem cells, you don't want to stain them to see if they are stem cells. You want to be able to look at colonies on a petri dish without touching the colonies, without staining or destroying the colonies."

The research has recently received funding from the U.S. Department of Agriculture through Purdue's Center for Food Safety Engineering.

Further work will include research to develop a graphical user interface.

"Now it requires a qualified, trained person to do all the recognition," Rajwa said. "We want a system where you can actually put a petri dish or some other container into the system, you press enter and the computer says, 'This is salmonella of this type and this strain, ' and it does this quickly in real time. There is absolutely no fundamental reason why we wouldn't be able to do this, and we are pretty close to having an actual prototype of a product that could be commercialized."

A provisional patent has been filed for the data-processing technique, and a full patent application has been filed on the underlying light-scattering technology.

The paper published in the Journal of Biomedical Optics was written by Bulent Bayraktar, a postdoctoral researcher working with Robinson; Padmapriya P. Banada, a postdoctoral researcher in the Department of Food Science; Hirleman, Bhunia, Robinson and Rajwa.

Writer: Emil Venere, (765) 494-4709, venere@purdue.edu

Sources: J. Paul Robinson, (765) 494-0757, jpr@flowcyt.cyto.purdue.edu

Bartek Rajwa, (765) 494 0757, rajwa@flowcyt.cyto.purdue.edu

Arun Bhunia, (765) 494-5443, bhunia@purdue.edu

E. Daniel Hirleman, (765) 494-5688, hirleman@ecn.purdue.edu

Purdue News Service: (765) 494-2096; purduenews@purdue.edu

Note to Journalists: An electronic or hard copy of the research paper is available from Emil Venere, (765) 494-4709, venere@purdue.edu.

PHOTO CAPTION:
Arun Bhunia (standing) and Padmapriya Banada use a laser and a computer monitor to observe scatter patterns in a petri dish in their Purdue University lab. The technique may provide cost-cutting applications for medicine, food processing and homeland security. Bhunia is a professor of food microbiology, and Banada is a postdoctoral researcher. (Purdue University photo/Tom Campbell.)

A publication-quality photo is available at http://news.uns.purdue.edu/images/+2006/bhunia-scatter.jpg

ABSTRACT

Feature extraction from light-scatter patterns of Listeria colonies for identification and classification

Bulent Bayraktar[1], Padmapriya P. Banada[2], E. Daniel Hirleman[3], Arun K. Bhunia[2], J. Paul Robinson[4], Bartek Rajwa[5]

[1]Purdue University, Bindley Bioscience Center, Purdue University Cytometry Laboratories, Department of Electrical and Computer Engineering, West Lafayette, Indiana 47907

[2]Purdue University, Molecular Food Microbiology Laboratory

[3]Purdue University, School of Mechanical Engineering

[4] Purdue University, Bindley Bioscience Center, Purdue University Cytometry Laboratories, Department of Basic Medical Sciences, School of Veterinary Medicine and Weldon School of Biomedical Engineering

[5] Bindley Bioscience Center, Purdue University Cytometry Laboratories, Department of Basic Medical Sciences

Bacterial contamination by *Listeria monocytogenes* not only puts the public at risk, but also is costly for the food-processing industry. Traditional biochemical methods for pathogen identification require complicated sample preparation for reliable results. Optical scattering technology has been used for identification of bacterial cells in suspension, but with only limited success. Therefore, to improve the efficacy of the identification process using our novel imaging approach, we analyze bacterial colonies grown on solid surfaces. The work presented here demonstrates an application of

computervision and pattern-recognition techniques to classify scatter patterns formed by *Listeria* colonies. Bacterial colonies are analyzed with a laser scatterometer. Features of circular scatter patterns formed by bacterial colonies illuminated by laser light are characterized using Zernike moment invariants. Principal component analysis and hierarchical clustering are performed on the results of feature extraction. Classification using linear discriminant analysis, partial least squares, and neural networks is capable of separating different strains of *Listeria* with a low error rate. The demonstrated system is also able to determine automatically the pathogenicity of bacteria on the basis of colony scatter patterns. We conclude that the obtained results are encouraging, and strongly suggest the feasibility of image-based biodetection systems.

ANNEX 7

PETRI FILM

OTAL COUNT – COLIFORM –E.COLI COLIFAST

WATER ANALYSIS

Water supplies have to be constantly monitored for a variety of materials----bacteria, nitrates, pesticides, metals, etc. In this lab, you will analyze water for bacteria, and, in particular, an indicator group of bacteria called the **coliforms**. Although you will be looking at the total counts of **aerobic** bacteria in the water sample that YOU BRING TO LAB, the coliform bacteria are the critical test organisms which are found in improperly treated water or water that has fecal contamination. They have been used as such for most of the 20th century and still today.

Coliforms are bacteria that are naturally occurring in animals and in the environment: they are indicators of other potentially harmful microorganisms in drinking water. They are all gram negative bacteria that ferment lactose, and are non-sporeforming. **FECAL coliforms**, exemplified by ***E. coli***, indicate water contaminated with animal or human waste, i.e. feces. Microbes in the fecal-contaminated water may cause food-borne illness that has short-term symptoms—nausea, diarrhea, vomiting—or if severe enough may cause death. This is a real problem in the immunocompromised, immunodepressed, and babies and children.

METHODS OF EVALUATING FOR BACTERIA

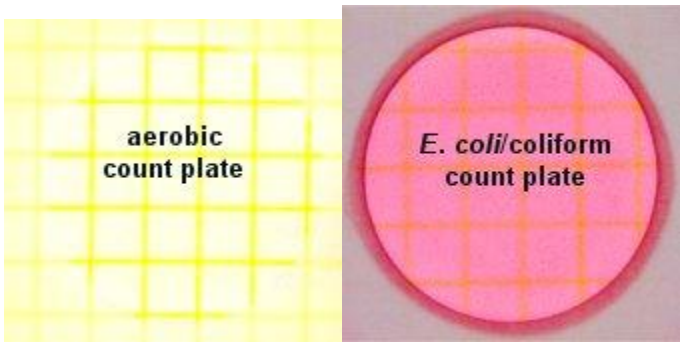
Membrane filter technique: Filtering 100 ml of water through a millipore filter with holes smaller than the bacteria causes the bacteria to be trapped on top of the filter. The filter pad is then placed on special coliform media which allows a colfirm count to be done.

Most probable number: The water sample is diluted and inoculated into a variety of specialized media tubes. The MPN is determined with the help of a standard chart, based on the number of tests that have turned positive.

The results are given as number of coliforms per 100 ml of water. If coliforms are present, the lab will generally recommend that a second sample be analyzed. If the number of coliforms was over 30, a second sample is essentially useless.

Possible results:
One or more coliform bacteria/100 ml = "does not meet the bacteriological standard purity"
specific counts
too numerous to count (TNTC)
confluent growth

This lab incorporates a newer method of performing counts on bacteria, called Petrifilms from 3M corporation. There is more information—-interpretation and photos—-on these materials at **the 3M website**. Since the aerobic counts include all coliforms, the water sample will be diluted out. When the water sample is added to the dehydrated med, the water-soluble gel will rehydrate, forming a thin media plate of sorts.



OBJECTIVES:
Identify coliform bacteria using 3M Petrifilms.
Differentiate between coliforms and fecal coliforms.
Analyze water samples for bacterial counts.

MATERIALS NEEDED: per table
water sample
1 coliform/E. coli count petrifilm
2 aerobic count petrifilms
1 ml pipettes
scissors
2-99 ml phosphate dilution containers
humidified container to incubate petrifilm plates

THE PROCEDURE:

1. Bring water sample to class, preferably a rather dirty sample—not tap water.
2. Prepare a dilution of the water sample by taking a 1ml aliquot and placing it into a 99ml phosphate buffer solution. This is the 1/100 dilution.
3. Using a fresh pipette, prepare a 1/10,000 dilution by taking a 1ml aliquot and placing it into another 99ml phosphate buffer solution.
4. Be sure the containers are shaken well.
5. Place the Petrifilm flat on the table. Lift top film.
6. THE AEROBIC COUNT PLATE:

Place 1 ml of each dilution in the center of 2 petrifilm plates (already labeled with 1/100 and 1/10,000).

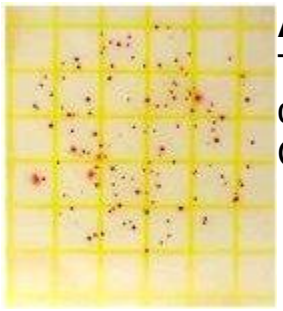
7. THE COLIFORM COUNT PLATE

Place 1 ml of the original water sample in the center of the petrifilm plate.

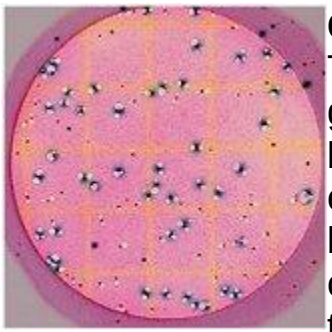
8. Release the top film and allow it to drop.
9. Using the small plastic spreader, ridge side DOWN, place it over the inoculum. Gently apply pressure on spreader to distribute the sample over the circular area. Do not rotate or twist the spreader.
10. Remove the spreader and wait at least 1 minute for the gel to form.
11. Incubate the plates with clear film side up in a humidifed container (1 for the entire class). You may stack the petrifilms.
12. Incubate the petrifilms at 30 degrees C for 48 hours.

INTERPRETATION:

1. Count the colonies on a Quebec colony counter or other magnified light source (with clear films down).
2. Refer to the INTERPRETATION GUIDE in print form or at the 3M website given above.
3. After counting the clear film covers can be lifted, and the colonies can be used for testing or staining.



AEROBIC COUNT PLATE:
There is a red indicator dye in the media gel that colors the colonies.
Count all red colonies of any size or intensity of red.



COLIFORM COUNT PLATE:
The pH indicator violet red is incorporated into the gel, along with bile which inhibits gram positive bacteria. In addition, there is an indicator of the enzyme glucuronidase which will turn blue if the bacterium makes the enzyme. You may also see carbon dioxide gas bubbles between the film and the bottom of the petrifilm. Most ***E. coli*** make both the glucuronidase and CO_2, and those colonies will be blue or blue-red. Non-fecal coliforms will be red colonies.

QUESTIONS:

1. What criteria are used to define the coliform group?

2. Why is there a dye added to the coliform petrifilms?

3. Why are coliforms used as indicator organisms for water impurity?

3M™ Petrifilm™ E. coli count

(Arrow Scientific)

The top film of the Petrifilm plate traps gas (seen as bubbles) produced by coliforms, providing "confirmed" counts. In addition, a glucoronidase indicator forms a blue precipitate around any E. coli colonies that may be present. Results in 24 hours. No extra confirmation steps required.

Fast, Accurate, Results in either 24 or 48 hours with three easy steps:

1) Inoculate - 3M™ Petrifilm™ Plates are easy to inoculate. Lift the top film and add sample

2) Incubate - The space saving design maximizes incubator space and

3) Enumerate - Confirmed coliforms are red and blue colonies with associated gas bubbles. Confirmed E. coli coliforms are blue colonies with associated gas bubbles. A built-in grid facilitates counting colonies, giving you fast, precise and accurate results.

This Petrifilm Plate can also be read in 4 seconds using the 3M™ Petrifilm™ Plate Reader.

Increased Productivity. Reduced Costs.

Quick & easy confirmed test results provide you with better information to make the right decisions. 3M™ Petrifilm™ E. coli/Coliform Count Plates provide the most cost-effective, convenient and reliable confirmation method for testing equipment, raw materials, food products and the manufacturing environment enabling you to monitor critical control points more frequently. A survey of 274 plants who converted to Petrifilm Plates from traditional agar methods found an average labor savings of 45% and

an average increased technician efficiency of 80%. The end result is higher quality product, better process control and an overall reduction in operational costs.

Note that E. coli O157:H7 is glucoronidase negative and will not produce a blue precipitate.

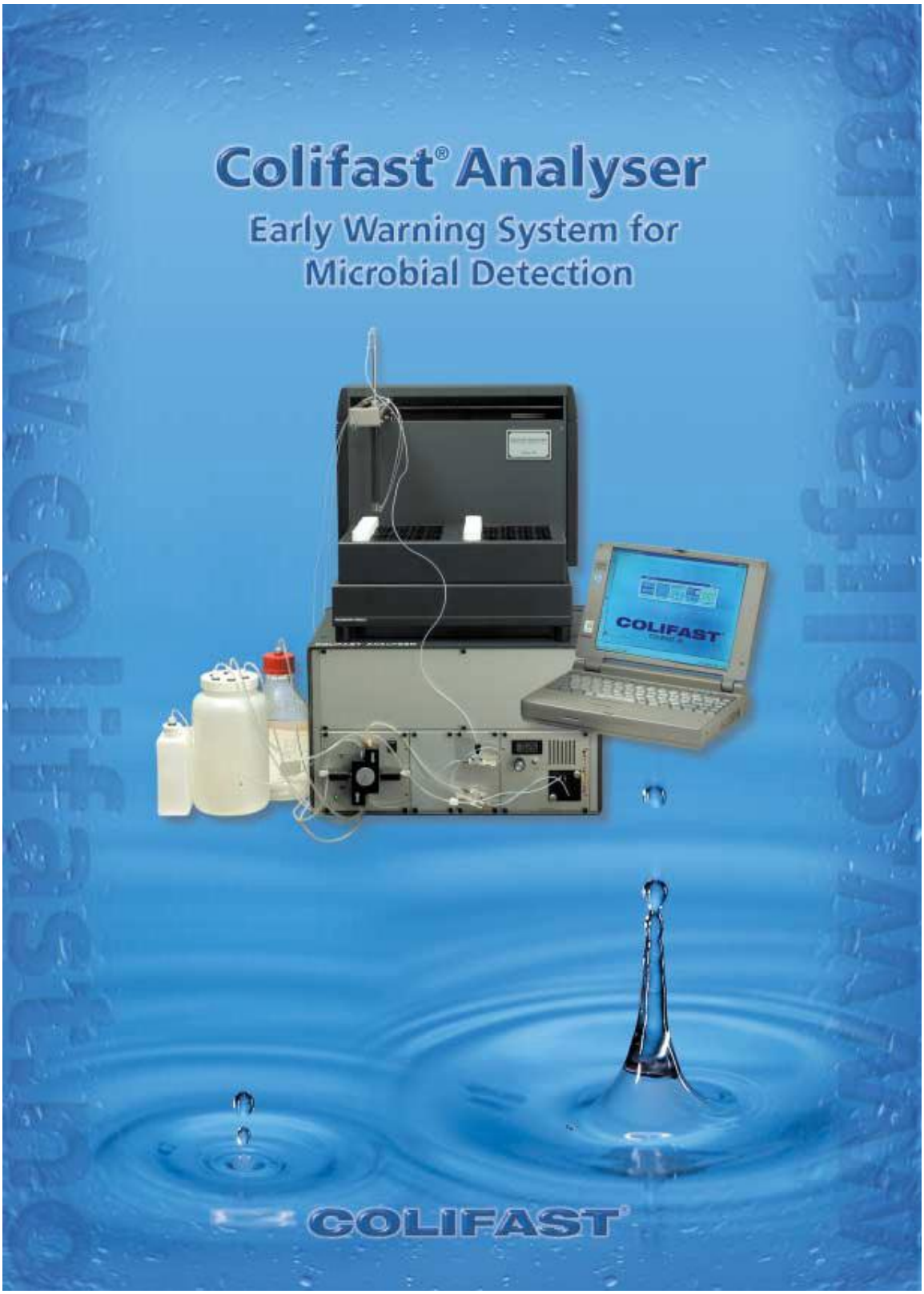
Note: Most E. coli (about 97%) produce beta-glucoronidase which produces a blue precipitate associated with the colony.

The top film of the Petrifilm plate traps gas produced by the lactose fermenting coliforms and E. coli. About 95% of E. coli produce gas, indicated by blue to red-blue colonies associated with entrapped gas on the Petrifilm EC plate (within approximately one colony diameter). AOAC international and U.S. FDA Bacteriological Analytical Manual (BAM) define coliforms as gram-negative rods which produce acid and gas from lactose during fermentation. Coliform colonies growing on the Petrifilm EC plate produce acid which causes the pH indicator to make the gel colour darker red. Gas trapped around red coliform colonies on the Petrifilm plate indicates confirmed coliforms.

Click here to download a brochure for more information.

Click here to download instructions & interpretation guide.

Video of Tips on how to use Petrifilm plates with a foam dam.


Colifast® Analyser
Early Warning System for
Microbial Detection
COLIFAST
COLIFAST

APPLICATIONS

Assessing microbial water quality is a central function in total water quality management.
The Colifast Analyser is a semi-automated early warning system for rapid and systematic water quality monitoring.
Tests for thermotolerant coliforms /*E.coli,* total coliforms, Total Viable Organisms and *P. aeruginosa*, are available. The Colifast Analyser can also be used for detecting coliforms in pasteurised milk.

• Emergency testing
- Flood water management
- Effluent line cross-contamination
- Mains breakages
• Water monitoring
- Source water quality
- Surface and groundwater
- Non-disinfected waters
- Marine and recreational waters
• Operational testing
- Systems maintenance testing
• Beverage and bottled water production
• Industrial process water in food and pharmaceutical industries
• Research application work
• Pasteurised milk

THE COLIFAST ANALYSER PROCEDURE

Photo 1. Add sample directly to Colifast medium, or Photo 2. Filter sample to concentrate and aseptically place membrane filter in vial containing liquid medium. Photo 3. Register samples, place vials in incubator blocks and press "Start". Photo 4. A result report is automatically generated.

BENEFITS & FEATURES

• Rapid results, e.g., Coliform results are obtained within 2-12 hours (18-24 h for traditional methods).

• Automated analysis ➟ Easy-to-use. After addition of the test sample to the Colifast medium and registration, only hit "Start", and the Colfast Analyser performs the analysis automatically.

• Remote warning system. The Colifast Analyser´s remote warning system gives automatic and early warning of positive sample status allowing earlier operational decisions by e-mail.

• More frequent sub-sampling = faster results. Automatic sub-sampling allows more frequent analyses without increasing labour. Faster results ensure better control of water and safety for the public.

• Time saving = cost saving. Rapid results for rapid decisions reduces release time of product.

• Multiple sample loading for all day testing. Multiple sample batches can be loaded and tested simultaneously throughout a work-shift according to the day’s testing requirements.

• Customised test runs for specific testing regimes. Test run parameters can be customised for specific testing matrices/requirements. Test confidence levels can be adjusted for

earlier reporting of positive results, according to experience with local water sources and test regimes.

Perfomance for detection of thermotolerant coliforms / *E.coli*

DETECTION PRINCIPLE

The patented Colifast technology combines a selective growth medium with an automated analyser. The growth medium for coliforms and thermotolerant coliforms includes the substrate 4-methylumbelliferyl-ß-D-galactoside, which fluoresces after hydrolysis by the ß-galactosidase enzyme present in coliform bacteria. The reaction is illustrated in the figure below.
Differential incubation temperatures of 44-44.5 °C and 35-37 °C are used to distinguish between thermotolerant coliforms and total coliforms respectively. Inhibitors suppress the growth of nontarget organisms. Media for TVO and P. aeruginosa, containing other fluorogenic substrates, are also available.
The fluorescence is monitored by the Colifast Analyser. Advanced software controls the testing process and subsequent data handling and reporting.

TECHNICAL SPECIFICATIONS

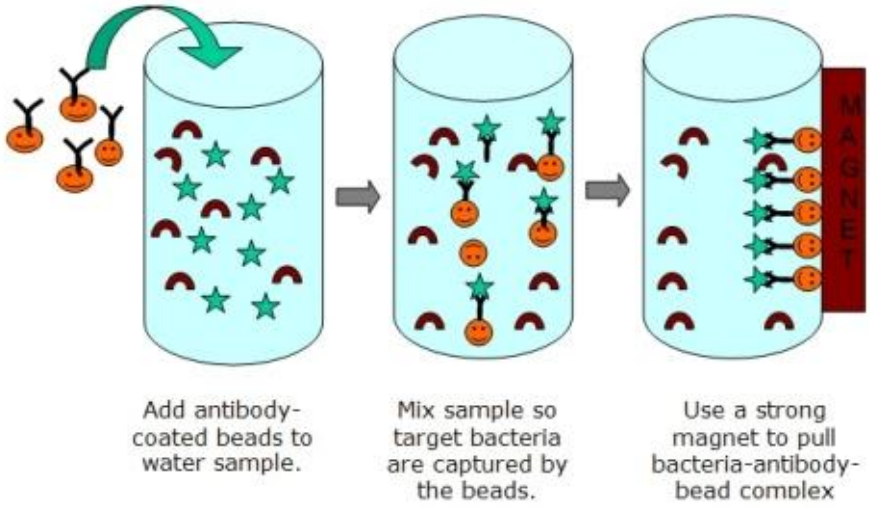
Power
• Electrical input: 110-240 VAC 50/60 Hz
Environmental
• Temperature: 10-30 °C
• Relative humidity: <90%
Computer requirements
• Type: IBM compatible
• Speed: Pentium 133 or greater
• Memory: 32 MB or greater
• Hard Drive Capacity: 1 GB Hard Drive
• Operating system: Windows 95/98 /NT
• Mouse: Bus Mouse
• Graphics: VGA graphic card 1 MB RAM on-board
• Com Port: 1 free high speed Com port
Please contact Colifast® for further information
and technical notes:
Design.

ANNEX 8

ATP RAPID METHOD

What is the IMS/ATP rapid method

The immunomagnetic separation/adenosine triphosphate (IMS/ATP) rapid method requires approximately 1 hour from sample collection to availability of results. Magnetic beads that are coated with antibodies for either *Escherichia coli* (*E. coli*) or enterococci are added to a water sample. This mixture is then subjected to IMS, in which the bacteria-antibody-bead complex is separated from extraneous materials in the sample by use of a strong magnet. Following several wash/concentration steps, the bacterial cells are ruptured by an enzymatic process, releasing ATP, which is the energy molecule found in living cells. The amount of ATP in the sample is measured with a microluminometer and results are reported in relative light units (RLUs).



Dr. Donald Wayne Salter

Department: *Biological and Environmental Sciences*

Title of Project: *Evaluation of a Polymerase Chain Reaction Method for Determining the Source of Fecal Contamination of Consumable and Environmental Alabama Waters*

Dates of Activity: *October 1, 2002 through September 30, 2003*

Project Summary

Review of the Literature

Fecal contamination of wells, ground waters, and recreational waters is generally measured by the presence of indicator microorganisms such as fecal coliforms (e.g. *Escherichia coli*) or fecal streptococci (*Streptococcus* or *Enterobacter faecalis*) and, perhaps, other fecal-specific microorganisms. These microbes are generally considered to be present exclusively in the feces of most warm-blooded animals. Fecal contamination can come from human sources such as defective septic systems or inadequate sewage treatment, or from non-human sources such as companion animals (dogs and cats), commercial animal operations (cattle, pig, poultry, horse, etc.), and wild animals (deer, birds, etc.) or from both sources. Until recently, there has not been much interest in determining the source of fecal contamination of waters; the presence of indicator microorganisms indicates that the waters are unfit for human consumption and other uses as well. However, it is clear that the increase in the world's population, a projected increase in intensive animal farming, and the failure of aging septic systems will likely increase the frequency of fecal contamination of waters. There is now considerable interest in determining the source of the fecal contamination of our waters. This would then allow more efficient management of the contamination sources, which should lessen the problem of fecal contamination of our consumable and environmental waters. A recent report from the American Society of Microbiology emphasized the importance of developing new and fast methods for the detection of fecal contamination of waters but stressed the importance of also determining the source of contamination for eliminating the source of contamination (Rose and Grimes, 2001).

Thus, there has been a lot of interest in developing an easy, inexpensive, and accurate method to determine the fecal source contamination. This interest has been accelerated with the purposeful contamination of the mail with the spores of *Bacillus anthracis*, the causative agent of anthrax in cattle, but a potential bioterrorism weapon against humans. Unfortunately, there is no

consensus in which one of the methods described below fit all of the above criteria. An earlier review of this subject (Sinton, et al., 1998) discusses the early attempts to develop such methods but it is a bit outdated regarding the newer molecular techniques. The many different methods for fecal source determination are listed and summarized below and a few do appear to be promising regarding the criteria sought as listed above. As described in Rose and Grimes (2001), other more sophisticated methods (not reviewed here) are being devised and could revolutionize the way that we eventually do microbial water quality as well as determine the source of fecal contamination. The following methods are summarized as to their utility, accuracy, and ease of performing:

1. Numbers, Kinds, and Strains of Bacterial Species Present in Human and Nonhuman Feces: It was thought at one time that the ratio of fecal coliform to fecal streptococci could be used to identify the probable source of fecal contamination of environmental waters. However, this has proven to be unreliable as a predictor of source contamination (reviewed in Sinton, et al., 1998). Other bacteria, such as *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, proposed to be found only in humans and not in other animals, and perhaps vice-versa, have not been field-tested as far as their ease and usefulness in determining the contamination source (reviewed in Sinton, et al.., 1998; Gabutti, et al., 2000). Standard microbiological methods have consistently failed to consistently differentiate isolates of the fecal-specific bacteria from different sources. Parveen, et al. (2001) used three techniques that have been used previously to differentiate between strains of the same species. Two of the techniques, determination of fatty acid composition and concentration and pulse-field gel electrophoresis of chromosomal DNA, fail to separate *E. coli* strains from different sources. However, the third technique, antibodies to cell wall antigens, could consistently separate these same isolates by source (see 6 below).

2. Resistance/Susceptibility of Fecal Isolates to Antimicrobials: Discriminate analysis of the patterns of resistance and susceptibility to several antimicrobials of both *Enterobacter faecalis* and *Escherichia coli* isolates can predict the source of fecal contamination of waters with reasonable accuracy (Wiggins, B.A. 1996; Hagedorn, et al., 1999; Harwood, et al., 2000). Basically, waters are tested for the presence of fecal streptococci and/or fecal coliforms using standard selection techniques. If positive for either or both, a representative number of isolates are picked from isolated colonies, purified by standard microbiological techniques, and

then tested against a battery of antimicrobials at several different concentrations to accurately determine their antimicrobial sensitivity and resistance patterns. The results are then compared to a large database of different isolates from different fecal sources. This method has had limited field-testing in the Virginia area where the database has been established and reliably predicted the contamination source in a watershed area (Hagedorn, et al., 1999). It was also used in the Tampa, FL area to show that the fecal contamination was primarily of human origin (Harwood, et al., 2000). Clearly, the method is labor and time intensive, and probably requires a database of the resistance and susceptibility to several antimicrobials at different concentrations of many different isolates from the particular area of the country to be tested.

3. Detection of Source-Specific Bacterial Viruses: The method is based on the observation that male-specific [F(+)] bacteriophages for *Escherichia coli* can be source specific. Four different genotypes have been typed to specific groups of animals (Chung,, et al., 1998; Ricca, and Cooney, 2000a; Ricca and Cooney, 2000b; Bahirathan, M., Puente, L., and Seyfried, P. 1998; Griffin, et al., 2000). Basically, 1 L of environmental water is enriched for bacteriphages by adding the host bacterium and concentrated nutrient broth, incubated 1 - 2 days at 35 C, and then perform a plaque assay against the host bacterium. Plaques were purified by standard procedures and then genotyped by using hybridizing to group specific genetic probes. Alternatively, 20 L samples were concentrated about 200-fold by vortex flow filtration and the retentate analyzed for coliphages. This technique was used successfully to prove that the source of pollution of a Florida river was due to the wildlife park with little contribution by human sources (Griffin, et al., 2000). Clearly, this technique is also time and labor intensive and potentially requiring large volumes of environmental water. In addition, this technique may not be useful for warm saline waters due to inviability of these phages (Griffin, et al., 1999).

4. Detection of Enteric Viruses Specific to Humans: This technique requires the filtration of a considerable volume of environmental water (about 100 L) to collect the viruses, and RT-PCR of samples of the trapped viruses using specific primers to the various human enteric viruses (not generally found in other animals) and analysis by gel electrophoresis. The sensitivity of the detection technique can be enhanced by probing the product of the RT-PCR using specific DNA probes to the PCR products (Griffin, et al., 1999; Lageay, et al., 2001). A commercial kit is available from Promega

(www.promega.com) and can be used on the above samples or tissues samples of shellfish (Lageay, et al., 2001). Although highly accurate for human fecal contamination, it does not indicate other animal contamination, except by the process of elimination. There may be enteric viruses that are specific for nonhumans. Clearly, this technique is also is labor and time intensive, and requires large volumes of environmental water to be filtered for testing.

5. Detection of Specific Chemicals Produced by Humans or Human Activities: Humans and human activities produce chemicals not associated with or at levels not found in other animal species (Leeming, et al., 1996; reviewed in Sinton, et al., 1998). Fecal sterols have been analyzed from feces of human and various domesticated and wild animals and the fingerprint profiles and concentrations are different enough to allow for source determination of fecal contamination of environmental waters (Leeming, et al., 1996). Compounds found in washing powders (fluorescent whitening agents, sodium tripolyphosphates, long-chain alkylbenzenes) are usually combined with sewage waters and are indicated of specific human activities. The sterols and long-chain alkylbenes are general extracted from samples with organic solvents, concentrated, and separated, detected, and quantified using gas chromatography. Fluorescent whitening agents from waters are extracted with organic solvents, concentrated and analyzed for identity and concentration using a fluorimeter. Sodium tripolyphosphates (most washing powders and cleaning compounds are probably phosphate free) can also be isolated using ion-exchange chromatography, hydrolyzed to orthophosphate, and concentration determined by standard phosphate techniques. Again, these methods are time and labor intensive and require large volumes of environmental waters and organic solvents. In addition, expensive equipment is needed for detection and quantification.

6. Using Strain-Specific Antibodies to Detect and Quantify Bacteria Found in Humans and Other Animal Feces: It is clear, based on the above techniques of measuring the difference in antimicrobial sensitivities and genotype of coliphages, and the DNA detection techniques discussed below, that there are protein differences between bacteria from the different sources. In fact, a recent report found that human and nonhuman *E. coli* isolates could be separated based on antigen differences (Parveen, et al., 2001). These data are significant in that there is a possibility that instruments can be used to easily identify differences in antigens found in bacterial species. This is an exciting, up-and-coming, and most promising technique that makes use of the

high specificity of antibodies to the different protein antigens found in and on the source microorganisms (Scientific American Exhibit on Biosensor, 1999; Seo, et al., 1999; Advanced Analytical Technologies, Inc., 2000; Smith and Rice, 2000; Parveen, et al., 2001; Hoyle, B. 2001). Antibodies, specific to the bacteria to be analyzed, are chemically modified to have attached enzymes or fluorescent dyes. These antibodies can be used to attach to the specific bacterium or used in an antibody-capture technique to pull out the microorganism from the contaminated source. The antibody-attached bacteria are then detect and quantified using an instrument containing a biosensor or laser-assisted flow cytometry. One instrument is already on the market and is being used to detect food and water contamination with pathogenic bacteria (Advanced Analytical Technologies, Inc., 2000; Smith and Rice, 2000). Another type of instrument, based on a similar technique to capture the microorganisms, has a different detection system and is being field-tested and compared to standard techniques for detection and quantifying food contamination with pathogenic bacteria (Scientific American Exhibit on Biosensor, 1999; Seo, et al., 1999). There would be a considerable expense in buying and maintaining the instrument and reagents for detection and capturing the bacteria. However, the technique would be fast, not requiring any culturing of the microorganisms, and the concentration protocols would be fairly simple.

7. Detection of DNA Differences in Bacteria from Different Sources: As stated above in 2, 3, and 4, researchers are finding differences in the kinds of bacteria, antimicrobial sensitivities within bacterial species, different male-specific bacteriophages, and bacterial species having different antigens that can be detected with antibodies. These detectable differences are due to nucleic acid sequence differences among the bacteria even within the same species. Detection of DNA and RNA sequence differences is relatively straightforward and various detection systems are available. I have already indicated in 3 and 4 above that this technology can be used to detect the different kinds of male-specific coliphages and enteric viruses found in fecal samples. If a DNA difference can be found between bacteria, then DNA primers can be designed to specifically detect that DNA difference using the Polymerase Chain Reaction (PCR) and other DNA and RNA based methods (Wang, et al., 1996; Wang, et al., 1996; Marchesi, et al., 1998; Kong, et al., 1999; Dombek, et al., 2000; Bernhard and Field, 2000a; Bernhard and Field, 2000b). A company, Paleoscience, Inc. uses RNA ribotyping to source determine *E. coli* isolates (at $65 – $95 per bacterial isolate) (www.paleoscience.com/bacterial.htm). In addition, recent real-time technology

can actually quantify the numbers of bacteria with that particular DNA sequence. DNA detection by PCR fits most of the criteria for accurately and specifically determining the source of fecal contamination. It is relatively fast, fairly inexpensive after an initial investment of moderately expensive equipment, and can be accurate. A PCR assay has been developed to type fecal bacteria from different sources (Bernhard and Field, 2000b). . It does not require isolation and purification of bacterial species. This PCR assay appears to be the most promising for identifying the source of fecal contamination in environmental waters. At the present time, it can only determine whether the fecal contamination is from human or ruminant feces, but new primers are being developed to cover all animal species, depending on the particular area of the world. This assay is based on previous research on finding host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from the fecal anaerobes, *Bifidobacterium* species and *Bacteroides-Prevotella* group, in cow and human feces (Bernhard and Field, 2000a). Members of these two groups make up a significant portion of the total bacteria in the feces of warm-blood animals and are only found in the intestines of these animals. Bernhard and Field (2000b) have designed a series of primers that are highly specific to host *Bacterioides-Prevotella* isolates from human and cow feces. The method has been recently field-tested but the publication is under review (Bernhard, et. al., 2002; Field, et al., 2002) and is not available until it has been accepted for publication. The original technique uses 1 L samples of environmental waters, which is filtered through 0.2 μm filters to collect the bacteria. The bacteria on the filter are then lysed using some standard, simple DNA preparation technique and the DNA tested with human-specific and cow-specific primers. The method has recently been improved such that less water is needed, the method is more sensitive, and additional primer sets are being investigated for other warm-blood animals (Field, personal communication). Further, the amount of target DNA can be quantified using a real-time PCR machine (http://www.osu.orst.edu/dept/micorbiology/fac/field2.html). We propose to adapt this PCR technique to be used to determine the fecal source of environmental contamination of West Alabama consumable and environmental waters

Methodology

DNA Extraction: Control (human and cow feces in water) and environmental waters will be filtered through a 0.2 μm filter, the collected bacteria lysed, and DNA purified using a DNAeasy extraction kit from Qiagen (Field, personal communication; Bernard and Field, 2000b).

Polymerase Chain Reaction (PCR): Appropriate samples of control and environmental waters DNA (100 ng) will be mixed with the reaction components of a standard PCR method in a 200 μL PCR tubes in 50 μL quantities using a Qiagen PCR kit containing TAQ polmerase, $MgCl_2$, dNTPs, bovine serum albumin, and forward and reverse human or cow specific DNA primers (made by Operon) . The complete reaction mixture will be run using a standard PCR cycling profile for these primers using a MJ research thermal minicycler (Field, personal communication; Bernard and Field, 2000b).

DNA Electrophoresis: An aliquot of the above mixture will be electrophoresed in 1 % agarose slab gels at 30-100 volts for 1-3 hours along with marker DNA fragments that will be used to estimate DNA fragment sizes. Ethidium bromide will be included in the gel to stain the DNA fragments and the position of DNA fragments in the gel visualized using UV light. The position of the DNA fragments in the gel will be recorded using a Polaroid camera or other recording devices. DNA fragment sizes will be determined by comparison with known marker DNA fragments.

Fecal Coliform Assay: One hundred mL of environmental and control samples will be filtered through a 0.45 μm filter unit and the filter placed on a pad saturated with mc-FC broth with Rosolic Acid medium, incubated at 44 C for 24 hours, to determine the presence and number of fecal coliforms as described by Hach Diagnostics.

Anticipated Results

We (myself and Alan Tartt) tried this technique using cow and human specific forward and reverse primers with control cow feces last December during the semester break, and after many tries, finally was able to detect a PCR DNA fragment of the expected size using the cow primers only. We have not tried the same primers with human sewage. Thus, with appropriate

control feces and the newer modification of the standard technique of DNA extraction and PCR cycling (Field, personal communication; Bernard and Field, 2000b), we feel that the technique should work in our hands for human and cow samples. After getting the technique to work with the appropriate control feces, environmental samples with known fecal contamination will be assayed by this method.

Anticipated Use of Research Results

We will use the established technique to survey for fecal source contamination of fecal coliform positive environmental and well waters in the Livingston Area. If the data proves to demonstrate fecal sources, then this technique could be adapted to be used throughout the state to easily determine the source of fecal contamination. This will allow the Alabama Department of Environmental Management (ADEM) to find the source of the contamination. Addition funding from ADEM will be sought if the technique appears to be feasible.

References

Advanced Analytical Technologies, Inc., 2000. Antibody Bead Capture Staining (ABCS) Method, Magnetic Capture, Enrichment, and Detection of Microbes. Application Note # 0280,

Bahirathan, M., Puente, L., and Seyfried, P. 1998. Use of Yellow-Pigmented Enterococci as a Specific Indicator of Human and Nonhuman Sources of Faecal Pollution. Can. J. Microbiol. 44: 1066-1071.

Bernhard, A.E. and Field, K.G. 2000a. Identification of Nonpoint Sources of Fecal Pollution in Coastal Waters by Using Host-specific 16S Ribosomal DNA Genetic Markers from fecal Anaerobes. Applied and Environmental Microbiology 66: 1597- 1594.

Bernhard, A.E. and Field, K.G. 2000b. A PCR Assay to Discriminate Human and Ruminant Feces on the Basis of Host Differences in Bacteroides-Prevotella Genes Encoding 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology 66: 4571 – 4574.

Bernhard, A. E., T. Goyard, M. T. Simonich, and K. G. Field 2002 (in review) Application of a rapid method for identifying fecal pollution sources in a multi-use estuary. Water Research.

Chung, H., Yakus, L.-A, Lovelace, G. and Sobsey, M.D. 1998. Bacteriophages and Bacteria as Indicators of Enteric Viruses in Oysters and Their Harvest Waters. Water Science and Technology 38: 37-44.

Dombek, P.E., Johnson, L.K., Zimmerley, S.T., and Sadowsky, M.J. 2000. Use of Repetitive DNA Sequences and the PCR to Differenetiate Escherichia coli Isolates from Human and Animal Sources. Applied Environmental Micobiology 66: 2572 - 2577.

Field, K. G., A. E. Bernhard, and T. J. Brodeur. 2002 (in press). Molecular approaches to microbiological monitoring: Fecal source detection. Proceedings of the EMAP Symposium 2001: Coastal Monitoring Through Partnerships. Environ. Monitor. Assess.

Field, K.G. 2001 and 2002. Personal Communication

Fode-Vaughn, K.A, Wimpee, C.F., Remsen, C.C., and Collins, M.L.P. 2001. Detection of Bacteria in Environmental Samples by Direct PCR Without PCR Extraction. Biotechniques 31 (3): 598-607.

Gabutti, G., De Donno, A., Bagordo, F., and Montagna, M.T. 2000. Comparative Survival of Faecal and Human Contaminants and Use of Staphylococcus aureus as an Effective Indicator of Human Pollution. Marine Pollution Bulletin 40: 697-700.

Griffin, D.W., Gibson, C.J. III, Lipp, E.K., Riley, K., Paul, J.H. III, and Rose, J,B. 1999. Detection of Viral Pathogens by Reverse Transcriptase PCR and of Microbial Indicators by Standard Methods in the Canals of the Florida Keys. Applied and Environmental Microbiology 65: 4118 -4125.

Griffin, D.W., Stokes, R., Rose, J.B., and Paul, J.H. III 2000. Bacterial Indicator Occurrence and the Use of an F^+ Specific RNA Coliphage Assay to Identify Fecal Sources in Homosassa Springs, Florida. Microbial Ecology 39: 56 - 64.

Hagedorn, C., Robinson, S.L., Filtz, J.R., Grubbs, S.M., Angier, T.A., and Reneau, R.B. Jr. 1999. Determining Sources of Fecal Pollution in a Rural Virginia Watershed with Antibiotic Resistance Patterns in Fecal Streptococci. Applied and Environmental Microbiology 65: 5522-5531.

Harwood, V.J., Whitlock, J., and Withington, V. 2000. Classification of Antibiotic Resistance Patterns of Indicator Bacteria by Discriminant Analysis: Use in Predicting the Source of Fecal Contamination in Subtropical Waters. Applied and Environmental Microbiology 66: 3698 - 3704.

Hoyle, B. 2001. High-Tech Biosensor Speeds Bacteria Detection. ASM News 67 (9): 434-435.

Kong, R.Y.C., So, C.L., Law, W.F. and Wu, R.S.S. 1999. A Sensitive and Versatile Multiplex PCR System for the Rapid Detection of Enterotoxigenic (ETEC), Enterohaemorrhagic (EHEC) and Enteropathogenic (EPEC) Strains of Escherichia coli. Marine Pollution Bulletin 38: 1207 - 1215.

Legaey, O., Caudrelier, Y., Cordevant, C., Rigottier-Gois, L., and Lange, M. 2001. Detection of Enteric Pathogenic Viruses in Shellfish by RT-PCR. Promega Notes Magazine 78: 13-16.

Leeming, R., Ball, A, Ashbolt, N. and Nichols, P. 1996. Using Fecal Sterols from Humans and Animals to Distinguish Faecal Pollution in Receiving Waters. Water Research 30: 2893-2900.

Marchesi, J.R., Takuichi, S., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., and Wade, W. G. 1998. Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers that Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology 64: 795-799.

Parveen, S., Hodge, N.C., Stall, R.E., Farrah, S.R, and Tamplin, M.L. 2001. Phenotypic and Genotypic Characterization of Human and Nonhuman Escherichia coli. Water Research 35: 379-386.

Ricca, D.M. and Cooney, J.J. 2000. Screening Environmental Samples for Source-specific Bacteriophage Hosts Using a Method for the Simultaneous Pouring of 12 Petri Plates. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 24: 124-126.

Rose, J.B. and Grimes, D.J. 2001. Reevaluation of Microbial Water Quality: Powerful New Tools for Detection and Risk Assessment. A Report from the American Academy of Microbiology.

Scientific American Exhibit on Biosensor. 1999. Arming the Food Police. http://www.sciam.com/exhibit/1999/10499biosensor/index.html.

Seo, K.H., Brackett, R.E., Hartman, N.F. and Campbell, D.P. 1999. Development of a Rapid Response Biosensor for Detection of Salmonella typhimurium. Journal of Food Protection 62:431-437.

Sinton, L.W, Finlay, R.K., and Hannah, D.J. 1998. Distinguishing Human from Animal Faecal Contamination in Water: A Review. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 32: 323-348.

Smith, B.G and Rice, E.W. 2000. Rapid Detection of *Escherichia coli* 0157:H7 in Drinking Water. 2000 American Water Works Association Water Quality Technology Conference Proceedings. B

Wang, K-F, Cao, W-W, and Cerniglia, C.E. 1996a. PCR Detection and Quantitation of Predominant Anaerobic Bacteria in Human and Animal Fecal Samples. Applied and Environmental Microbiology 65: 5522-5531.

Wang, R.-F., Cao, W.-W., and Cerniglia, C.E. 1996b. PCR Detection and Quantitation of Predominant Anaerobic Bacteria in Human and Animal Fecal Samples. Applied and Environmental Microbiology 62: 1242-1247.

Wiggins, B.A. 1996. Discriminant Analysis of Antibiotic Resistance Patterns in Fecal Streptococci, a Method to Differentiate Human and Animal Sources of Fecal Pollution in Natural Waters. Applied and Environmental Microbiology 62: 3997-4002

ANNEX 9

COLILIRT COLIFORM/E.COLI

Rapid Detection Kits For Coliform/E.coli

The IDEXX Colilert: Coliform/E.coli test kit simultaneously detects and confirms coliforms and E.coli in water samples in 24 hours or less. Simply add the Colilert reagent to the sample to incubate for 24 hours, and read results. Colilert is easy to read, as positive coliform samples turn yellow, and when E.coli is present, samples fluoresce under UV light. Colilert is easy to use, involving less than one minute hands-on time. Colilert is used by over 90% of state labs in the United States and it is the only USEPA-approved, 24-hour test for drinking and source waters.

ANNEX 10

ENTEROCOCCUS TESTS

ENTEROCOCCUS

SOIL MICROBIOLOGY

BIOL/CSES 4684

1. IDENTIFYING CHARACTERISTICS

- Gram positive
- Cocci shape
- Nonmotile
- Occur in pairs or short chains
- Cells are one micrometer in diameter
- Predominately inhabit human intestines
- Faculative anaerobes (prefer anaerobic)
- Complex and variable nutritional requirements
- Resistant to many Gram positive antibiotics
- Perform simple fermentation
- Mechanism of pathogenicity unknown
- Used as indicators of fecal pollution in the purification of water and dried and frozen foods
- Members of genus streptoccous
- Belong to Lancefield's serologic group D Streptococcus
- Catalase negative
- Can grow in 6.5% NaCl
- Can grow at a pH range of 9.6 to 4.6
- Can grow at temperatures ranging from 10 to 45°C
- Optimunm growth at 37°C
- Sensitive to chlorination

The above picture shows a Streptococcus. Cells that are oval in appearance are in the process of actively dividing.

2. TAXONOMIC DESCRIPTION

The enterococcus group is a subgroup of the fecal streptococci that includes at least five species: *S. faecalis, S. faecium, S. durans, S. gallinarum,* and *S. avium*. The enterococci are differentiated from other streptococci by their ability to grow at high pH (9.6 at 10), high temperature (45°C) and in high salt concentrations (6.5% sodium chloride). The enterococcus are generally resistant to many Gram positive antibiotics such as the tetracyclines,

aminoglycosides, sulfonamides, some penicillins, and lincosamides. *E. faecalis* and *E. faecium* are the most frequent species found in humans. *E. faecalis* is the only enterococcus species that has been genetically characterized. Its genome is 3 mb in length. The two genetic mechanisms first discovered in the enterococci were conjugative transposons and sex pheromone plasmids. Some strains require vitamin B and amino acids for growth.

Selected differential physiological characteristics for species of the enterococci.

	E.faecas	*E. faecium*	*E. durans*	*E. bovis*	*E.equins*
Hemolysis	-/+	-	+/-	-	-
Growth at10 °C	+	+	+	-	-
Growth at 45°C	+	+	+	+	+
Growth at 50°C	+	+	-	-	-
Growth at pH 9.6	+	+	+/-	-	-
Growth at 6.5% NaCl	+/-	+/-	+/-	-	-
Growth at 40% bile	+	+	+	+	+
Resists 60°C for 30 min	+	+	+/-	-	-
NH3 from arginine	+	+	+	-	-
Gelatin liquefied	-/+	-	-	-	-
Tolerates 0.04% Pot. tellurit	+	-	-	-	-
Acid from Glycerol	+	-	-	-	-
Acid from Mannitol	+	+	-	-/+	-
Acid from Sorbitol	+	-	-	-/+	-
Acid from L-arabinose	-	+	-	+/-	-
Acid from Lactose	+	+	+	+	-
Acid from Sucrose	+	+/-	-	+	+
Acid from Raffinose	-	-	-	+	-
Acid from Melibiose	-	+	-	+	-
Acid from Melezitose	+	-	-	-	-
Starch hydrolyzed	-	-	-	+	-

Tetrazolium reduced at pH 6.0	+	-	-	+/-	-

3. ISOLATION AND ECOLOGY

Most procedures employ presumptive media followed by confirmatory tests. Primary selective agents can be azide, tellurite, bile, neonycin, Tween 80, taurocholate, selenite, NaCl, alcohol, phenylethyl, and thallium. For isolation, the Association of Food and Drug Officials of the United States recommends KF agar medium. This is selective differential agar that contains sodium azide, that inhibits catalase positive organisms, and tetrazolium chloride which produces a red color in the colonies.

Ethyl violet azide (EVA) broth can be used as a confirmation. Fecal enterococci from water can be isolated, cultivated, and enumerated in this broth. Growth of fecal enterococci in EVA results in turbidity and a purple sediment in the bottom of liquid cultures. There is also a tyrosine decarboxylase activity procedure and a mentagan test that works well.

Enterococci are able to grow in the presence of bile and hydrolyze the esculin; the liberated diphydroxycourmarin complexes with ferric citrate present in the media to form a dark brown/black soluble compound. The picture on the left shows the differential reaction that identifies the enterococci on bile esculin agar.

Enterococci occur naturally in soil and can be readily isolated from most plant roots as well. They are also found routinely in frozen seafood, cheese, dried whole egg powder, raw and pasteurized milk, frozen fruits, fruit juices, and vegetables. Occasionally they are used as starter cultures for making hard cheese. Some strains produce high levels of the amines tyramine and histamine. Tyramine may be involved in causing migraines. They are capable of producing extracellular proteinases and peptidases to hydrolyse large peptides and transport them into the cell to convert them to amino acids. Due to diet, *E. faecalis* dominates the guts of humans in the United States and England. In India and Japan, *E. faecalis* and *E. faecium* are equally found in the intestines. They get into food through vegetation, processing equipment, processing environments, or fecal contamination. Symptoms are similar to *B. cereus* and *C. perfringens.* Symptoms include nausea, vomiting, and diarrhea, but are milder than those caused by other food borne illnesses. The picture at left shows hemolysis on blood agar by *S. pyogenes*, a group A streptococcus.

Blood agar is often used as a diagnostic test for the enterococcocci, especially when isolations are made from food or clinical samples. Two of the five enterococcal species (faecalis and durans) will usually produce hemolysis on blood agar (see above table).

4. PUBLIC HEALTH SIGNIFICANCE

The enterococci are used as a bacterial indicator for determining the extent of fecal contamination in foods and in recreational surface waters. Water quality guidelines based on enterococcal density have been proposed for recreational waters. The guideline is 33 enterococci/100 mL for recreational fresh waters. For marine waters, the guideline is 35 enterococci/100 mL. The guidelines are based on the geometric mean of at least five samples per 30-d period during the swimming season. There are two types of selection methods. The membrane filter technique is used for samples of fresh and saline waters; however, it is unsuitable for highly turbid waters. The multiple-tube technique is also applicable to fresh and marine waters, but is primarily used for raw and chlorinated wastewater.

For the presumptive test procedure of the multiple-tube technique, a series of azide dextrose broth tubes are inoculated and incubated. If not turbid, tubes are reincubated. Tubes showing turbidity are streaked onto Pfizer selective enterococcus (PSE) agar. Brownish-black colonies with brown halos confirm the presence of fecal streptococci. These colonies are transferred to a tube of brain-heart infusion broth containing 6.5% NaCl. Growth indicates colonies of the enterococcus group.

In the membrane filter technique, the sample is filtered, the filter containing the colonies are transferred to an agar medium which is incubated. The filter is transferred to EIA medium containing esculin and ferric acid as selective agents. Pink to red enterococci colonies develop a black or reddish-brown precipitate. A well isolated colony from brain-heart infusion agar is then transferred onto a brain-heart infusion broth tube and incubated. After growth, a sample of the culture is transferred to bile esculin agar, brain-heart infusion broth, and brain-heart infusion broth with 6.5% NaCl. Growth at 45°C in 6.5% NaCl indicates presence of enterococcus group.

For clinical or food samples, additional tests that may be conducted include bile solubility (above left picture; the tube on the far left is positive), and

antibiotic sensitivity (the above right picture shows the antibiotic disk assay for bacitracin).

---

5. ADDITIONAL SOURCES OF INFORMATION

Rose, A.H., ed. 1983. *Economic Microbiology: Food Microbiology.* Academic Press. New York. Volume 8. 207 pp.

Defigueiredo, Mario and Don Splittstoesser, ed. 1976. Food Microbiology: *Public Health and Spoilage Aspects.* AVI Publishing Company. Connecticut. 276-281 pp.

Ray, Bibek. 1996. *Fundamental Food Microbiology*. CRC Press. New York. 363-364 pp.

Banwart, George. 1979. *Basic Food Microbiology.* AVI Publishing Company. Connecticut. 400-404 pp.

---

5. LINKS TO SITES ON THE ENTEROCOCCI

Gram Positive Facultative_Cocci

Detection of Enterococci in Recreational Waters

Cancer Control Journal

Taxonomy - Enterococcus

IDEXX
Literature Cover Sheet

IDEXX #: 12E

Title: Enterolert™ - A Rapid Method for the Detection of Enterococcus spp.

Author: C.-M. Chen, K. Doherty, H. Gu, G. Dichter and A. Naqui

Source: IDEXX Laboratories

Topic: Enterolert

Highlights:

- Enterolert was evaluated in parallel with the MF method to determine the level of agreement. 821water samples from different geographic areas were tested. The correlation coefficient between these two methods was 0.91.

	MF	MPN	Enterolert
Time to Result	48 - 72 hours	48 - 72 hours	24 hours

	False Positives	False Negatives
Enterolert	5%	1%
MF	10%	12%

* see the following pages for more highlights

09-63294-00

Enterolert™ - A Rapid Method for the Detection of Enterococcus spp.

C. -M. Chen*, K. Doherty, H. Gu, G. Dichter, and A. Naqui

IDEXX Laboratories, Inc. Westbrook, ME

ABSTRACT

Enterolert™ - A Rapid Method for the Detection of Enterococcus spp.

C.-M. Chen*, K. Doherty, H. Gu, G. Dichter, and A. Naqui.
IDEXX Laboratories, Inc. Westbrook, ME.

Enterolert defined substrate system is a rapid 24-hr test that detects enterococci in water. Enterolert uses 4-methylumbelliferyl-ß-D-glucoside as the defined substrate nutrient-indicator. This compound, when hydrolyzed by enterococcus ß-glucosidase, releases 4-methylumbelliferone which exhibits fluorescence under a UV_{365nm} lamp. The sensitivity of Enterolert presence/absence test was evaluated with 25 enterococcus strains; ~ 96% (24/25) at 1 - 3 cfu/100 ml were detected within 24 hrs of incubation at 41 °C. In the Quanti-Tray™ format, Enterolert detected ~ 95% (121/127) enterococci in 24 hrs. The specificity of the test was examined using 17 non-enterococci bacteria; these bacteria did not show cross reactivity at levels above 10^5 cfu/100 ml within 48 hrs.

Evaluation on 821 water samples from different geographic areas showed good agreement between the Enterolert-MPN and the membrane filtration method. The correlation coefficient between these two methods was 0.91 (N = 766, Range = 0 - 200). About 95 % (1576/1658) Enterolert-positive isolates were confirmed to be enterococci. The recovery rate for Enterolert at 24 hrs was 99 % (849/854). Enterolert is rapid, accurate, easy-to-use, and requires minimal hands-on time.

INTRODUCTION

Enterococcus is a valuable bacterial indicator for monitoring fecal pollution in water. Enterococcus density in recreational waters has been shown to be related to the risks of swimming-associated gastroenteritis. The United States Environmental Protection Agency recommended that enterococci be the bacterial indicator for fresh and marine waters (*Federal Register*, 1986). Current guidelines for enterococci density are 33 enterococci/100 ml for fresh water and 35 enterococci/100 ml for marine water.

Current methods for the analysis of enterococcus density include the multiple-tube technique for most probable number (MPN) and the membrane filter technique (MF). Both techniques are labor-intensive, tedious, and require a minimum of 48 - 72 hours before results can be obtained.

We developed a defined substrate-Enterolert system which detects enterococci in water within 24 hours. Enterolert uses 4-methylumbelliferyl-ß-D-glucoside as the nutrient-indicator. This compound, when metabolized by enterococci, releases 4-methylumbelliferone and glucose. 4-Methylumbelliferone exhibits blue fluorescence when viewed under a long-wavelength ultraviolet lamp. The glucose moiety is further metabolized by enterococci to promote their growth. Non-enterococci are suppressed by the incorporated antimicrobial agents and cannot metabolize this nutrient-indicator.

The Quanti-Tray system, previously shown to effectively quantify coliform bacteria and *Escherichia coli* using Colilert®, was used in conjunction with Enterolert to enumerate enterococci in water.

In this study, a total of 127 enterococci and 17 non-enterococci were tested to evaluate the sensitivity and specificity of Enterolert. The Enterolert system was also evaluated in parallel with the MF method to determine the level of agreement between these two methods. A total of 821 water samples including drinking water, bottle spring water, river and lake water, sewage effluent, and marine water from different geographic areas were evaluated. Enterolert results were confirmed by selective isolation and biochemical identification by the Vitek™ bacterial identification system.

ENTEROLERT PROTOCOL

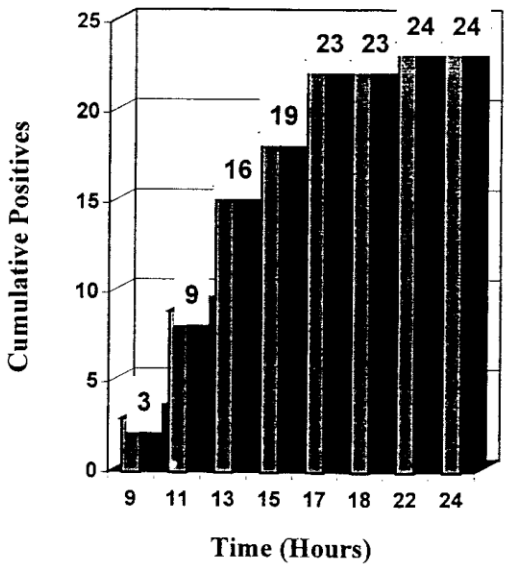
Presence/Absence Assay Protocol

- Collect 100 ml water sample.
- Add Enterolert reagent, Mix.
- Incubate at 41 °C for 24 hours.
- Read (UV-365nm lamp).

Quantification Assay Protocol

- Collect 100 ml water sample.
- Add Enterolert reagent, Mix.
- Pour the solution in a Quanti-Tray.
- Seal the tray with the Quanti-Tray sealer.
- Incubate at 41 °C for 24 hours.
- Count the number of fluorescent wells.
- Refer to the 51-well Quanti-Tray MPN table.

Enterolert Evaluation with 25 Enterococci Strains



Enterolert sensitivity was evaluated using 25 enterococci in deionized water. The inoculum was 1 - 3 cfu/100 ml. The samples were incubated at 41 °C and monitored for fluorescence development at the indicated time. Twenty three strains were positive within 17 hours. Twenty four strains were positive before 22 hours. Only *Enterococcus hirae* ATCC 8043 was not detected within 24 hours.

Enterolert Sensitivity in Quanti-Tray Format[1]

Strains	20 hr	22 hr	24 hr	≥ 24 hr	ND[2]	# Tested
E. faecalis	10	3				32
E. faecium	10	3	2	2	2	67
E. casseliflavus	2	3	3			16
E. durans	1	2	1	1		10
E. gallinarum			1			1
E. hirae				1		1
# positives	24	11	7	4	2	
# cumulative positives	103	114	121	125		127
% cumulative positives	81 %	90 %	95 %			100 %

[1.] The sensitivity of Enterolert in the Quanti-Tray format was evaluated using 127 environmental enterococcus isolates in deionized water. The inoculum was 0 - 30 cfu in 100 ml water. The 100 ml water was equally distributed into 51 Quanti-Tray wells to achieve a theoretical 1 cfu/well. The sample tray was incubated at 41 °C and monitored for fluorescence development at the indicated time. 114 strains (90%) were positive at 22 hours and 121 strains (95%) were positive at 24 hours. These environmental isolates were identified by API® 20 Strep system. The identities of these strains included 32 *E. faecalis*, 67 *E. faecium*, 16 *E. casseliflavus*, 10 *E. durans*, 1 *E. gallinarum*, and 1 *E. hirae*.

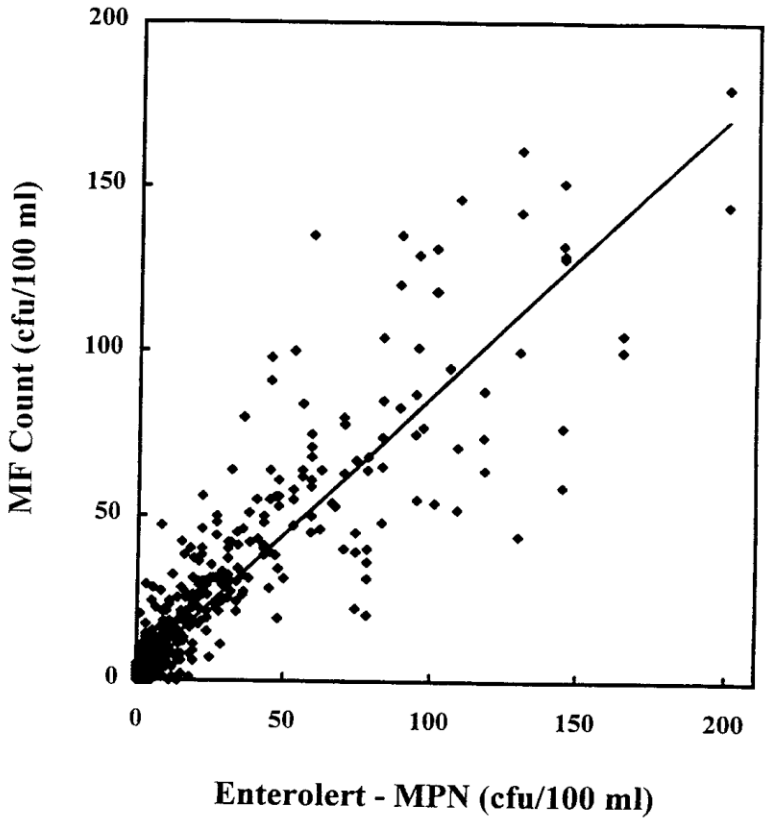
[2.] not detectable.

Comparison of Enterolert-MPN *vs.* MF[1]

Range	# Samples	
MF > 200; Enterolert > 200	51	
MF > 200; Enterolert < 200	1	
MF < 200; Enterolert > 200	3	
MF < 200; Enterolert < 200	766	r = 0.91
Total	821	

[1.] Defined substrate Enterolert system in the Quanti-Tray format was performed in parallel with the membrane filtration technique.

[2.] Water samples used in this evaluation included 21 bottled spring water, 110 treated (chlorinated) drinking water, 76 untreated raw water (river and lake water), 247 sewage effluents, and 367 marine water. Fresh water samples were tested without dilution. Marine water samples were tested using a 10 X dilution procedure (i.e. 10 ml marine water in 90 ml sterile deionized water).



Correlation between Enterolert - Quanti-Tray MPN values and membrane filtration counts for 766 water samples within the counting range of 0 - 200 (Enterolert < 200; MF < 200). The correlation coefficient between these two methods was 0.91 (Y = 0.43 + 0.98 X).

Accuracy of Enterolert

	Enterolert	
Confirmation	**# Positive Wells**	**# Negative Wells**
enterococci	1576	5
non - enterococci	82	849
% false positive rate	4.9 %	
% false negative rate	0.6 %	
% Accuracy	96.4 %	

Enterolert results (positive and negative wells) were confirmed by steps of selective isolation and biochemical identification using a combination of bile-esculin agar (35 °C), brain heart infusion 6.5% NaCl broth at 45 °C and/or 35 °C, and Vitek bacterial identification system. About 95 % (1576/1658) Enterolert-positive isolates were confirmed to be enterococci (false positive rate ~ 5 %). The false negative rate for Enterolert at 24 hrs was ~ 1 % (about 99 % recovery rate).

SUMMARY

- Enterolert detects ~ 95 - 96% of enterococci within 24 hours of incubation at 41 °C
- No cross reactivity was observed when Enterolert was challenged with 17 non-enterococcus bacteria
- Evaluation on 821 water samples showed good agreement between Enterolert Quanti-Tray MPN values and MF counts (N = 766; range = 0 - 200; r = 0.91)
- Enterolert is accurate (~ 96 % accuracy) with a false positive rate of ~ 5 % and a false negative rate of ~ 1 % as compared to the 10 % false positive and 12 % false negative rates for the MF method (Levin, M.A. et. al, 1975).
- Enterolert, coupled with Quanti-Tray system, allows rapid detection and quantification of enterococci in water (bottle water, drinking water, river water, lake water, sewage effluents, and marine water).
- Benefits of Enterolert:

  Rapid (24 hrs results)
  Accurate
  Less than 45 seconds hands-on time
  Ready-To Use Reagent (No media preparation)
  Easy interpretation

Testing Protocol for Enterococcus and Total Coliform

1. Turn on the Quanti-tray sealer.
   -Green light must be lit prior to use.
2. Add 1 packet of Enterolert (for Enterococcus) or Colilert (for Total Coliform) reagent into a small, sterile plastic bottle.
3. Measure 10 ml of ocean water sample and add to the reagent.
4. Measure 90 ml of distilled water and add to the reagent/sample mixture.
5. Shake the 100 ml mixture well to completely dissolve reagent
6. Label the paper side of the empty Quanti-tray with Date, Location of Collection, and Time.
7. Pour the reagent-sample mixture from the plastic bottle into the tray, avoiding contact with the foil side of the tray. Allow foam to settle.
8. Place the Quanti-tray upside-down on a rubber insert and run through the sealer to distribute the reagent-solution mixture into the wells and to seal the tray.
9. Place the Quanti-tray in an incubator at 41 degrees Celcius for Enterococcus and at 35 degrees Celcius for Total Coliform.
10. Incubate sample for 24 hours for Enterococcus testing
11. Incubate sample for 18 hours for Total Coliform testing.
12. Repeat procedure for each sample.

California Standards

Enterolert, the testing method we use, is a rapid method used for detection and quantification of enterococci and indicator bacteria in water. It is sensitive to 1 enterococci/100ml. The results for Enterococcus take 24 hours to incubate. The MPN number (Most Probable Number), which is used to determine the density of bacteria in water samples, should be below 104 in order to conform to the CA standard.

Colilert is a method used for detection and quantification of Total Coliform and E. Coli. The results for Total Coliform take 18 hours to incubate. The MPN number, which is used to determine the density of bacteria in water samples, should not exceed 400 in order to conform to the CA standard.

Results: Enterococcus

To read the results, the Quanti-trays are removed from the incubator after 24 hours, and a 6 watt UV lamp is held 5 inches above the wells. Any fluorescence within a well indicates the presence of contamination. The number of contaminated wells is counted and is read against the Most Probable Number (MPN) Table to determine the level of contamination for the area where the sample was collected. The value from the Table is multiplied by 10 to get the true MPN number. If fluorescence is not detectable after 24 hours of incubation, the sample is considered negative for contamination. After more than 28 hours of incubation, positives are not valid due to heterotrophs in the water, which can render a false positive. Results are then recorded and posted on the San Diego Chapter and National Surfrider Foundation websites.

Results: Total Coliform

To read the results, the Quanti-trays are removed from the incubator after 18 hours. Contamination is indicated by a yellow coloration in the wells. A comparator shows what the yellow should look like. The number of positive yellow wells is counted and the level of Total Coliform is determined by the Most Probable Number (MPN) Table. The value from the Table is multiplied by 10 to get the true MPN number.

The results for **E. Coli** are determined with the presence of fluorescence in the positive wells of the samples for Total Coliform. A 6 watt UV lamp is used and the MPN is calculated by the same method.

Experiment 7: Detection of Coliforms, Fecal Coliform and Enterococcus Bacteria in Environmental Samples

Introduction

Microorganisms pathogenic to humans that are transmitted by water include bacteria (including blue-green algal toxins), viruses and protozoa. Most of the microorganisms transmitted by water usually grow in the intestinal tract of people and leave the body in feces. Fecal pollution of water used for swimming and drinking can then occur resulting in transmission of infectious microbes. The significance was recognized at the turn of the century when filtration and disinfection of drinking water was begun in the USA. This resulted in nearly complete elimination of waterborne cholera and typhoid in this country.

Routine examination of water for the presence of intestinal pathogens would be tedious and difficult. It is also nearly impossible because of the "viable but non culturable" phenomenon. It is easier to infer the presence of human waste from some nonpathogenic intestinal bacteria such as *Escherichia coli* and *Streptococcus faecalis*. These organisms are always found in the intestines. When they are found in water, it is assumed that the water is contaminated with fecal material.

Coliform bacteria (of which *E. coli* is a member) occur normally in the intestines of warm-blooded animals and are discharged in great numbers. In polluted water, their numbers are assumed to be roughly proportional to the degree of fecal pollution. Traditional methods for their enumeration involve multiple sequential steps. More rapid and simple methods have long been sought. Thus, the defined substrate technology (DST) provides the possibility for detection and confirmation of total coliforms and *E. coli* in samples. Additionally, the enterococci bacteria are also quantifiable.

The Colilert was the first commercial DST test to receive USEPA approval for drinking water analysis. This test uses specific indicator nutrients: ortho-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG) and 4-methyl-umbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG). A water sample is incubated with Colilert reagent for 24 hours. If a coliform is present, indicator nutrient is hydrolyzed by the enzyme β-galactosidase of the organism, thereby releasing the indicator portion, ortho-nitrophenyl, from ONPG. The free indicator imparts a yellow color to the solution. *E. coli* posses an additional constituitive enzyme, glucuronidase, that hydrolyzes the second indicator

nutrient, MUG. As a result of this hydrolysis, MUG is cleaved into a nutrient portion (glucuronide), which is metabolized, and an indicator portion, methylumbelliferone, which fluoresces under ultraviolet light. Thus two separate and specific microbial assays are carried out simultaneously in the same sample.
The Enterolert is used to indicate enteroccus bacteria. This test uses β-D-glucoside attached to MUG. When β-glucosidase of the organism attacks the β-D-glucoside part of the defined substrate, the fluorescent methylumbelliferone is released and can be visualized in UV light.
The IDEXX Quanti-Tray and Quanti-Tray/2000 provide easy, rapid and accurate counts of coliforms, *E.coli* and enterococci. The IDEXX Quanti-Tray and Quanti-Tray/2000 are semi-automated quantification methods based on the Standard Methods Most Probable Number (MPN) model. The Quanti-Tray® Sealer automatically distributes the sample/reagent mixture into separate wells. After incubation, the number of positive wells is converted to a most probable number (MPN) using a table provided. Quanti-Tray provides counts from one to 200/100 ml. Quanti-Tray/2000 counts from one to 2,419/100 ml.

Materials

Medium (250 to 500 mL) plastic collection bottles
Bottles for mixing reagents with appropriate water volume (containing sodium thiosulfate)
Plastic beakers
Water samples from the environment; soil or sediment samples
Tap water
quantitrays
quantitray plate sealer
Colilert and Enterolert media
Fluorescent hand held lamp
MPN table (with media)
Sterile physiological saline water

Methods

1. Collect water samples in collection bottles (can scoop with clean beaker) from near Goleta Beach: the surf zone at a few places (ankle deep, 4 samples spaced 5 minutes apart in a given location, plus several locations),

the lagoon, and water in the beach sand (dig a hole and allow to fill up). Sediment can also be collected, but must be washed and the washwater used for conducting the assay.

2. Depending on the sample, prepare 1:10, 1:100, 1:1000 dilutions of the original sample by adding 10 mLs of sample to a mixing bottle (for the :10) then filling to the 100 mL mark with sterile saline water. For the 1:100 dilution, transfer 1 mL and bring to the mark; for the 1:1000 dilution, transfer 100 μL and bring to the 100 mL mark. Make sure to prepare a control (sterile saline only).

3. Following the instructions for Colilert and Enterolert, partition the samples into the mixing bottles (marked with 100 mL mark, so add to mark). Add the defined substrates to the mixing bottles. NOTE: separate samples are poured from the collection bottles into separate mixing bottles, each for Colilert and Enterolert.

4. Following the instructions for the Quantitray, pour the mixtures in separate Quantitrays and seal according to the manufacturer's instructions.

5. Incubate the Enterolert at 41° C for 24 hours, then count fluorescent wells (shine the lamp on the tray to observe fluorescence). Incubate the Colilert at 35° C for 24 hours. Count yellow and also count fluorescent wells, insuring to note the two separately.

Analysis and Write up

Using the MPN tables provided by IDEXX, estimate the numbers of coliform, *E. coli* and enterococci bacteria in the samples. Why is this an estimate?

Where were the numbers highest? Comment on why your results and relate them back to where you sampled. Also, how did the samples taken at 5 minute intervals at one location vary? Comment on why your results appeared as they did.

This test is generally described as “culture-dependent”. Comment on this statement and contrast with other methods for detecting indicator bacteria that are “culture independent”.

Public agencies may not perform these tests on turbid stormwater. Comment on this.

Merck KGaA
Contact: Sales Enquiry
Email: mailto:mibio@merck.de?Subject=New ChromoCult® Enterococci Agar for Detection of Enterococci in Water [Ref: rapidmicrobiology news - 1054h5]
Tel : +[49] 6151 72-0
Fax: +[49] 6151 72 6080

New ChromoCult® Enterococci Agar for Detection of Enterococci in Water

ChromoCult® Enterococci Agar is an approved, excellent value medium for the detection of Enterococci in water
Do you want to save money? Merck offers an excellent value chromogenic medium for reliable, fast and safe detection of Enterococci.
Do you want to simplify your analysis? Then you should use this unique chromogenic technique for the detection of Enterococci.
Do you want to save time? Benefit from the speed of this new method . in just 24 hours you can clearly and safely detect the absence or presence of Enterococci.

The examination of water is strictly regulated by the European Union Directive on Drinking Water, but to enable the use of alternative methods, especially for the bacteriological examination of water, the ISO 17994 was created, which describes procedures how to prove alternative against reference methods.

Merck.s ChromoCult® Enterococci Agar was successfully

approved according to ISO 17994 and is now licensed by the German Federal Environmental Protection Agency as an alternative medium for the detection of Enterococci in water.

The Enterococci family is one of the indicator groups of faecal contamination of water. This group of organisms can survive longer in the environment than the classical faecal marker organism *E. coli*. Because of this longer survival, the detection of Enterococci serves as a sensitive indicator for possible faecal contamination that has occurred in the past.

This parameter is very helpful for customers using near-shore sea water as a raw material for production of bottled or drinking water and sewage treatment plants are in the neighbourhood and these organisms can also be used as a marker for successful sanitation after accidents in water systems.

On ChromoCult® Enterococci Agar the Enterococci are clearly detectable by the red coloured colonies, thus meeting the requirements for fast detection of faecal contamination in water and indicating any action needed for public health and safety.

Only one medium is necessary, instead of two, as a confirmation test is not required. With this method the results are available one day earlier without compromising safety. The ChromoCult® Enterococci Agar can be used for examination of nearly all types of water samples, e.g. drinking water or pool water.

Available products:

ChromoCult® Enterococci Agar	cat no. 1.0950.0500
Cellulose mixed-ester GNG membrane filters	Gelman 66278

Source: Merck KGaA
Posted: December 15, 2006

ANNEX 11

DETECTION OF CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

Oxoid Ltd.
Contact: Val Kane
Email:
mailto:val.kane@thermofisher.com?Subject=
Improved detection of Clostridium perfringens in
water samples [Ref: rapidmicrobiology news -
603h15]
Tel : +[44] 1256 841144
Fax: +[44] 1256 329728

Improved detection of Clostridium perfringens in water samples

Oxoid Limited has extended their range of products for testing the microbiological quality of water with the addition of new m-CP Medium - a selective, chromogenic medium for the rapid identification and enumeration of *Clostridium perfringens* in water samples. Compared to traditional methods, m-CP Medium provides faster results with increased selectivity and specificity.

Clostridium perfringens spores are resistant to environmental stress and can survive in water for longer than vegetative bacteria, including *E. coli*. This makes *Cl. perfringens* an important indicator of water pollution and a useful marker to alert water companies to the possible presence of other stress-resistant pathogens, such as viruses and protozoal cysts. In addition, its resistance to chlorination is useful in testing the effectiveness of water treatment processes.

Levels of *Cl. perfringens* in raw water are monitored to detect increases in contamination. Furthermore, the presence of *Cl. perfringens* in drinking water is considered significant and warrants immediate investigation.

The new Oxoid m-CP Medium is designed to improve the differentiation of *Cl. perfringens* from other clostridial species and background flora.

Chromogenic compounds within m-CP Medium cause *Cl. perfringens colonies* to turn yellow (based on their ability to ferment sucrose), thus differentiating them from other *Clostridium* species, whilst colonies of contaminating organisms turn purple (based on their ability, unlike *Cl. perfringens*, to hydrolyse indoxyl-b-D-glucoside). Additional confirmation is provided by exposing the culture plate to ammonium hydroxide. This highly specific reaction causes acid phosphatase-producing *Cl. perfringens* colonies to turn a distinctive dark pink.

The addition of D-cycloserine and polymixin B, and an incubation temperature of 44°C, improve selectivity by inhibiting the growth of Gram-negative bacteria and staphylococci.

The chromogenic agar substrates in m-CP Medium are so specific that further verification steps are not required. This allows results to be obtained in a day instead of the 3-4 days required by traditional methods. In a comparative evaluation, m-CP Medium demonstrated increased sensitivity and specificity compared to TSC Agar, with a decrease of 48 hours in the time taken to obtain a result[1].

The European Council Directive 98/83/EC recommends m-CP Medium for testing water intended for human consumption[2].

References:

1: Oxoid Limited, data on file.
2: E.U. (1998) 98/83/EC of Council of 3rd November 1998 on the quality of water intended for human consumption. Off. J. Eur. Commun., L330, 32-54.

For further information about Oxoid m-CP Medium and other Oxoid products for water and environmental testing contact details are listed above or click on the link below.

Source: Oxoid Ltd.
Posted: September 9, 2002

ARAB REPUBLIC OF EGYPT
German Technical Cooperation

ميكـــروبـــيولـــوجيا المـــياه

WATER MICROBIOLOGY

البرنامج الرابع

Module 4

الطرق والعناصر البكتريولوجية الخاصة

معايير مياه الشرب

خطة الدرس

Lesson Plan

Prof. Helmy Tawfik El-Zanfaly
National Research Center

June 2008

Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit - GTZ
Water and Wastewater Management Programme
GTZ Project No. 06.2006.3

خطة التدريس للدورة التدريبية

الطرق والعناصرالبكتريولوجية الخاصة والمواصفات القياسية لمياه الشرب (البرنامج الرابع)

Specific Bacteriological Methods and Parameters Standards for Drinking Water

مقدمة إلى

الشركة القابضة لمياه الشرب و الصرف الصحى

Holding Company for Water and Wastewater

Central Laboratories Training Program
Water Microbiology
gtz

يوليو 2008

المحتويات

أولا: نظرة عامة على البرنامج التدريبى ميكروبيولوجيا المياه (التحكم فى الجودة – أجهزة المعمل – العينات)

1. الهدف العام للدورة التدريبية
2. المجموعة المستهدفة
3. عدد المتدربين
4. منهجية التدريب
5. مساعدات التدريب
6. قائمة الدورات التدريبية
7. مكان التدريب و طريقة الجلوس بجلسات التدريب

ثانيا: خطة التدريس بالدورة التدريبية ميكروبيولوجيا المياه

أ. دورة التحكم فى الجودة – أجهزة المعمل – العينات.

أ–1 أهداف الدورة
أ–2 موضوعات الدورة
أ–3 مدة الدورة
أ–4 البرنامج الزمنى للدورة

أولا: نظرة عامة على البرنامج التدريبى ميكروبيولوجيا المياه (الجودة – الأجهزة– العينات)

1. الهدف العام للدورة التدريبية

تعريف العاملين بمعامل الميكلاوبيولوجى الملحقة بالمعامل المركزية بأحدث الطرق التى تتبع فى حالات خاصة مثل الطرق المتبعة فى الكشف عن البكتريا المضارة من تأثير المعالجة Injured or Stressed Cells مثل المعالجة بالكلور وأثير المتبقى منه فى الشبكات واستنفاذه بشكل أو بآخر الأمر الذى يؤدى الى عدم حماية الشبكات من التلوث وحدوث Regrowth للبكتريا الأمر الذى قد يؤدى الى مشاكل صحية. لذلك يجب التعامل

مع عينات الشبكات بطرق خاصة للكشف عن مؤشرات التلوث حتى لا يحصل على نتيجة سلبية غير حقيقية.

كذلك تهدف الدورة الى العناية بالكشف عن الحالة الميكروبيولوجية للشبكات ويهمنا هنا تلك المجموعة من البكتريا التى تسبب مشاكل الطعم والرائحة كما تشترك فى مهاجمة المادة المصتع منها المواسير فتؤدى الى التآكل وتلك المجموعة من البكتريا يطلق عليها Nuisance bacteria وتشمل بكتريا الحديد والكبريت بأقسامها المختلفة.

كذلك تشمل الدورة التعريف بالطرق السريعة للكشف عن التلوث فى حالات الطوارىء Enzymatic methodsوالطرق التى تعتمد على التلوين Chromogenic media والطرق التى تعتمد على تقدير ATP والطرق المباشرة وطرق البلمرة PCR, وبالاضافة الى ما سبق سيتعرف المتدربون على طرق الكشف عن الفطر والخميرة فى المياه لما لهم من أهمية بالنواحى الصحية.

وفى ضوء ما ذكر سيتم مناقشة المواصفات القياسية المصرية لمياه الشرب.

2. المجموعة المستهدفة

الميكروبيولوجيين العاملين بالمعامل المركزية لشركات المياه التابعة للشركة القابضة لمياه الشرب والصرف الصحى.

3. عدد المتدربين

يبلغ عدد المتدربين المقدر لحضور دورة ميكروبيولوجيا المياه (التحكم فى الجودة – أجهزة المعمل – العينات) ما بين 20 – 22 متدرب من المعامل المركزية مجزئين على مجموعتان.

4. منهجية التدريب

تعتمد منهجية التدريب بالدورة على عدة اسس يكون الهدف الرئيسى منها توصيل المعلومة بسهولة ويسر للمتدرب وكذلك ضمان المشاركة الفعالة من المتدربين أثناء جلسات التدريب والتأكد من الفهم الكامل لمحتويات وموضوعات الدورة والتدريب العملى والشخصى على الموضوعات التى ستتناولها الدورة.

هذا ويمكن تلخيص المنهجية المتبعة فيما يلى:

- المحاضرات: التى يلقيها المدرب ذا الخبرة بهدف توصيل أحدث المعلومات على صورة نظرية وعملية والتأكد من التطبيق العملى بطريقة صحيحة وعلى أساس من الفهم مما يمكنه من تلاشى الأخطاء التى من الممكن أن تلعب دورا فى صحة النتائج التى يتحصل عليها والتى تهتم بجودة مياه الشرب.
- الشرائح Power point: التى تعرض أثناء الشرح لإبراز النقاط الرئيسية لكل موضوع فى تسلسل منطقى ولضمان وتثبيت المعلومة لدى المتدرب.
- المناقشات المفتوحة: ويديرها المدرب أو المحاضر وتتيح هذة المناقشات الفرصة لتبادل الأراء وتوجبه الأسئلة و الحصول على معلومات جديدة كما إنه يتم من خلالها نقل المعارف والخبرة العملية والنظرية من المدرب إلى المتدربين واصلاح لمفاهيم الغير صحيحة أو غير حديثة لدى المتدربين.
- دراسة الحالات الواقعية: وهى تفيد فى عرض المشاكل العملية التى يواجهها المتدربون أو التى سوف يواجهونها فى عملهم و أساليب التغلب عليها بالاسلوب العلمى الصحيح.
- التدريب العملى: والذى سيتاح بصورة فردية لكل متدرب باستخدام الطرق القياسية الحديثة لضمان الفهم التام والتطبيق الصحيح من المتدرب للمعلومات والطرق العملية التى تم تدريسها.
- المراجع العلمية و الكودات و المواصفات: يتم إعطاء المتدرب المراجع العلمية التى أعتمد عليها والتى يمكن الرجوع إليها لزيادة التعمق فى المجال وكذلك الإشارة ومناقشة الكود الخاص بتشغيل محطات معالجة مياه الشرب والمواصفات الحديثة الحاكمة والمعمول بها فى مصر وعلى المستوى الدولى فى مجال مياه الشرب.
- فى نهاية الدورة يتم تقييم الحاضرين من خلال اختبار تحريرى فى مواد الدورة.

5. مساعدات التدريب
   - جهاز عرض الشرائح (Power Point Projector)
   - سبورة بيضاء أو سبورة ورقية
   - شاشات عرض.

6. قائمة الدورات التدريبية

سيتم عمل عدد 4 دورات فى مجال ميكروبيولوجيا المياه ويتم إعادة كل دورة مرتان.
وعنوانين الدورات كالتالى:

- دورة التحكم فى الجودة – أجهزة المعمل – العينات.
- دورة ميكروبيولوجيا المياه السطحية والجوفية.
- دورة أسس التحليلات الميكروبيولوجية وتقدير البنود الأساسية.
- دورة الطرق والبنود الخاصة فى التحليل والمواصفات القياسية لمياه الشرب.

7. مكان التدريب و طريقة الجلوس بجلسات التدريب

ستتم هدة الدورة بالمعامل المركزية بالبحيرة.
يجلس المتدربون وفى مواجهتهم المحاضر فى المنتصف وعلى يمينه جهاز الكمبيوتر لعرض الشرائح Power Point وشاشة العرض وعلى يساره السبورة البيضاء أو السبورة الورقية ويكون وضع كل من شاشة العرض والسبورة بحيث يسمح بسهولة الرؤية لجميع المتدربين.
وتقدر المساحة المطلوبة لقاعة التدريب بما لا يقل عن 5 × 7 مترا لتستوعب المتدربين والمدرب لتسمح بسهولة حركة المدرب وإمكانية وصولة لأماكن جلوس المتدربين.
ويلزم أن تتوفر بالقاعة الإضاءة اللازمة والتهوية الكافية والأجهزة الصوتية المناسبة.
كما يلزم توفير معمل يتسع لعدد 10 – 12 متدرب (يمكن عمل 5 – 6 مجموعة من شخصين على الأكثر) والمعمل يكون مجهز بالامكانيات من أجهزة وأدوات، أما البيئات والكيماويات وبعض المستلزمات فسيقوم بتوفيرها هيئة gtz. تتم دورتان بتكرارها فى المعمل المركزى بمحطة الفسطاط بالقاهرة ودورتان بمكررها بالمعمل المركزى بشركة مياه البحيرة بدمنهور.

ثانيا: خطة التدريس بالدورة التدريبية

دورة الطرق والعناصرالبكتريولوجية الخاصة والمواصفات القياسية لمياه الشرب

محاضر: أ.د. حلمى توفيق الزنفلى

تدريبات عملية: مساعد من هيئة العاملين بالمعمل الذى تتم فيه الدورة وذلك بالتناوب.

أهداف الدورة

- تنمية وتقدير البكتريا الغير مرغوب فى تواجدها Nuisance bacteria وتشمل:
- مجموعة بكتريا الحديد بأقسامها.
- بكتريا الكبريت بأقسامها
- الطرق السريعة للكشف عن دلائل التلوث فى حالات الطوارىء
- الطرق الغير تقليدية الحديثة فى الكشف عن دلائل التلوث
- تقدير ATP وطرق البلمرة PCR للكشف والتعرف على البكتريا
- طرق الكشف عن البكتريا المضارة Injured or Stressed Cells
- الطرق اللونية للكشف عن أدلة التلوث البكتيرية Chromogenic media
- تنمية وعد الفطريات والخميرة فى مياه الشرب
- أهمية الكشف عن البكتريا المختزلة للكبريتات وبكتريا الكلوستريديم فى حالة امياه الجوفية
- مناقشة المواصفات القياسية المصرية

موضوعات الدورة

- البكتريا المقززة والتى ينتج عنها تغير فى خواص المياه (الطعم والرائحة) وكذلك التى تسبب تآكل المواسير
  - **مجموعة بكتريا الحديد**
  - **مجموعة بكتريا الكبريت**
- الحاجة الى طرق سريعة لاكتشاف التلوث فى حالة الطوارىء

- الطرق اللونية باستخدام Chromogenic media
- الطرق الغير تقليدية والتى أقرتها وكالة حماية البيئة الأمريكية
- تقدير الأحماض النووية ATP وطرق البلمرة PCR للتعرف على البكتريا.
- طرق الكشف عن الفطر والخميرة فى مياه الشرب
- الكشف عن تلوث المياه الجوفية
- مناقشة المواصفات القياسية المصرية لمياه الشرب فى ضوء ما سبق ذكره

مدة الدورة

تستغرق الدورة مدة ستة أيام متواصلة و يبدأ العمل يوميا من الساعة الثامنة والنصف صباحا حتى الساعة الخامسة والنصف بعد الظهر، أى مدة تسع ساعات (بواقع خمسة ساعات نظرى وثلاث ساعات عملى) يوميا يتخللها ساعة لتناول المشروبات والغداء.

أ.4 البرنامج الزمنى للدورة

اليوم	الجلسة	التوقيت	الموضوع	المحتوى
اليوم الأول	**التسجيل**	9 – 9.30	**إستقبال و تسجيل المشاركين فى الدورة**	
	جلسة الإفتتاح	9.30 – 11.00	**المقدمة والهدف**	• **مقدمة عامة** • **توزيع استمارات التعارف** • **أهداف الدورة** • **النتيجة المرجوة** • **علاقة الدورة بخطط الشركة القابضة**
	الجلسة الأولى	11.30 – 1.30	**البكتريا المقززة ودورها فى تدهور خواص مياه الشرب**	***تعريفها** ***مدلولها واستخداماتها**
	الجلسة الثانية	2.30 – 4.30	**عملى (بكتريا الكبريت)**	• **تحضير بيئلت الكشف عن البكتريا المختزلة للكبريتات وتقديرها بطرق الأنابيب المتعددة – الأغشية الفارزة- الأطباق المصبوبة.**
اليوم الثانى	**الجلسة الثالثة**	9 - 11.00	**بكتريا الحديد**	• **أقسام بكتريا الحديد والكشف عنها**
	الجلسة الرابعة	11.30 – 1.30	تابع بكتريا الحديد	* **الكشف عن أقسام بكتريا الحديد**
	الجلسة الخامسة	2.30 – 5.30	**عملى البكتريا المضارة**	• **تحضير البيئات اللازمة لتقدير البكتريا المضارة** • **تقديرها من مياه الشبكات**
اليوم الثالث	**الجلسة السادسة**	9 - 11.00	**بكتريا الكبريت**	• **بكتريا الكبريت بأقسامها والكشف عنها**
	الجلسة السابعة	11.30 – 1.30	**البكتريا المضارة فى مياه الشبكات**	• **الكشف عن البكتريا المضارة فى مياه الشبكات**

اليوم	الجلسة	التوقيت	الموضوع	المحتوى
	الجلسة الثامنة	4.30 – 2.30	**الطرق السريعة للكشف عن دلائل التلوث**	• **تحضير البيئات** • **نطبيقات عملية على الطرق المختلفة للكشف عن الدلائل**
اليوم الرابع	**الجلسة التاسعة**	11.00 - 9	**الفطر يات فى مياه الشرب**	• **تعريفها** • **مدلولها** • **الكشف عنها بالطرق المختلفة**
	الجلسة العاشرة	2.00 – 11.30	**تابع الفطريات والكشف عنها**	* **تابع طرق الكشف عن الفطريات**
	الجلسة الحادية عشر	5.30- 2.30	**عملى (الفطريات)**	• **تحضير بيئات الكشف عن الفطريات** • **التطبيق على عينات مياه**
اليوم الخامس	***الجلسة الثانية عشر***	**8, 30** - 10.30	**تقدير الخميرة**	• **طرق الكشف عنها**
	الجلسةالثالثة عشر	**2.00 – 11.00**	**تابع تقدير الخمائر**	• **تابع الكشف عن الخميرة**
	الجلسة الرابعة عشر	5.30 – 3.00	**عملى**	• **تحضير بيئة الخمائر العامة والمرضية** • **التطبيق العملى على عينات مياه**

اليوم	الجلسة	التوقيت	الموضوع	المحتوى
اليوم السادس	**الجلسة الخامسة عشر**	11 – 8,30	**اختبار المياه الجوفية**	*** البكتريا المختزلة للكبريتات** *** بكتريا الكلوستريديم**
	الجلسة السادسة عشر	1,30 – 11.30	**مناقشة المواصفات القياسية لمياه الشرب**	**• المواصفات**
	الجلسة السابعة عشر	5.30 – 2.30	**عملى- التقييم للدورة- تقييم الدارسين**	**▪ قراءة نتائج الاختبارات السابقة**

WATER MICROBIOLOGY
Module 4

Specific Bacteriological Methods & Parameters

Standards for Drinking Water

Prof. Dr. Helmy El-Zanfaly
National Research Center

مقدمة عامة

- حوالى ٢.٢ مليون من البشر يموتون كل عام من أمراض مرتبطة بأساسيات صحية
  - مثل الاسهال معظم هؤلاء من الاطفال من ابناء الدول النامية.
  - تداخل الصحة
  - النظافة
  - الامداد بالمياه

  ثبت أن لها دورها فى التحكم فى هذه الأمراض.
- اتضح أن الامداد بالمياه الآمنة والوسائل الصحية خطوة أساسية لخفض الاصابة بهذه الأمراض.

* ظل خفض نسبة الذين لا تصل اليهم مياه الى النصف هدف مخطط له أن يتحقق عام ٢٠١٥.

- الامداد بمياه شرب مقبولة من حيث الصفات الميكروبيولوجية مع خفض مخاطر الاصابة بالأمراض المعدية يحتاج الى خطة المياه الآمنة.

- وفى أى خطة مياه آمنه التحكم والكشف عن التلوث البرازى لمياه الشرب وكذلك مصادره.

خطة المياه الآمنة تشمل :

- تقييم المخاطر
- تقييم النظام المائى
- عملية التحكم التى تختبر كل خصائص مياه الشرب من مصدره، خلال المعالجة والتوزيع (أو التجنيع والتخزين) الى المستهلك.
- يستعمل خلال ذلك خطة اداره والتى تشتمل على تحليل الخطر- نقط التحكم الحرجة

Hazard Analysis-Critical Control Points

gtz Partner for the Future. Worldwide.

- **الطرق المعتادة فى قياس التلوث البرازى**

تعتمد على بكتريا أو مجموعة من البكتريا يعتد بها كدليل على التلوث البرازى.

- **قياس أى مؤشر بكتيرى للتلوث البرازى يحتاج الى:**
  - شخص متدرب
  - بيئات ومواد أخرى مدعمة
  - وكذلك امكانيات تتوافر فقط فى معمل الميكروبيولوجى
  - استعمال وسائل للتحليل الميكروبيولوجى فى الحقل.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

- عدم توافر معمل أو وسائل التحليل الحقلى يعتبر عائقا أمام امداد العديد من المجتمعات والشعوب فى انحاء العالم بمياه الشرب الآمنه ميكروبيولوجيا.

- من الجهود لحل تلك المشكلة، اقترحت وطورت عدد من بدائل الكشافات والاختبارات للكشف عن التلوث البرازى فى مياه الشرب
  - H_2S PRODUCTION.
  - عوامل السرعة، السهولة والقدرة على الكشف عن التلوث

البرازى فى مياه الشرب ما زال هدف مرغوب ونهاية لكل الجهود للامداد بمياه شرب آمنة (منخفضة المخاطر) ميكروبيولوجيا.

- تقدير النوعية الميكروبية لمياه الشرب عن طريق الكشف عن التواجد، الغياب أو بقياس تركيز الأدلة البكتيرية طبقت عالميا

بهدف:

1. المطابقة مع المواصفات القياسية والخطوط الاسترشادية .
2. لتقدير نوعية مصدر المياه ، كفاءة نظام المعالجة وسلامة نظام التوزيع ،

3. للاعلان عن خطط أمان المياه، تقييم المخاطر ونظم الادارة. هذا وفى بعض الدول والمناطق وللتجارة الدولية (المياه المعبأة التجارية) والنقل (الطائرات، القطارات ووسائل السفر الأخرى) تحليل مياه الشرب ربما يكون مطلوبا بالقانون أو حكوميا.

4. اشراك المجتمع فى تدبير ، ادارة، مراقبة مياه الشرب، ويشمل ذلك المصدر والمعالجة

- يلزم توفير اختبارات للتلوث البرازى لمياه الشرب تتصف :
  - بالبساطة
  - السهوله
  - عمليه
- فى بعض المواقف أحسن الاختبارات لتحقيق تلك الأهداف هى الأبسط فى التطبيق، المفهومة، الواضحة، والممكن تفسير نتائجها.
- وعلى ذلك فان تحقيق هذه الاحتياجات والأغراض من الممكن أن يخدم فقط اذا كانت الاختبارات **حقيقية** وتعطى **النتائج الصحيحة** .

- المعايير السائدة للدليل المثالى أو المفضل للتلوث البرازى حددت بواسطة منظمة الصحة العالمية وغيرها من الجهات الرسمية عام ٢٠٠٢ على أنها:
- الدليل يجب أن يكون غائب فى المياه الغير ملوثة ويتواجد عندما يكون مصدر الميكروبات الممرضه من التلوث البرازى متواجده.
- الدليل يلزم أن يتواجد باعداد كبيرة عن الميكروبات المرضية
- الدليل يكون من السهل عزله، تنميته وتصنيفه.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

- الدليل يلزم أن يتجاوب مع الظروف البيئية الطبيعية ومع عمليات معالجة المياه بشكل مشابه للميكروبات المرضية
- الاختبار يجب أن يكون غير مرتفع التكاليف (اقتصادى) وعلى ذلك يكون من السهل اجراء تحليلات متعددة
- الدليل يجب أن لا يكون ميكروب مرضى للحد من المخاطر الصحية بالنسبة للقائم بالتحليل
- الدليل يجب أن لا يتكاثر فى البيئة.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

- MPN
- H_2S
- MF
- المقارنة بين الطرق فى اكتشاف المستويات المنخفضة من التلوث.
- Nuisance bacteria (الحديد – الكبريت)
- الطعم، اللون، الرائحة (مشاكل)
- التآكل (مشاكل)
- Stressed or Injured cells
- Rapid Methods
- Non-traditional Methods

- Chromogenic Media
- ATP Determination
- Fungi
- Pathogenic Fungi
- Rapid Methods
- SRB and Clostridium perfringens
- Pseudomonas aeruginosa

NUISANCE BACTERIA
البكتريا البغيضة

- هناك مجموعة من الكائنات التى تظهر فى مصدر المياه والتى **ليس لها مغزى من حيث التأثير على الصحة العامة** ولكنها مسئولة عن مشاكل متنوعة تشمل **التآكل، الطعم، الرائحة، اللون الأحمر للمياه، اللزوجة**.

هذه البكتريا البغيضة وجد أنها المسبب **لصعوبات فى التشغيل لعمليات نقل المياه الجوفية** أو لها صلة بشكاوى المستهلكين.

- النواتج الثانوية لعمليات التمثيل الغذائى

- هذه الكائنات تحصل على الطاقة اللازمة لها من أكسدة المواد الغير عضوية (الأمونيا، الكبريت، واختزال الحديد و/أو المنجنيز).

بينما نجد أن البعض الآخر ينشط بواسطة النيتروجين الغير عضوى (N)، الفوسفور الغير عضوى (P)، أشعة الشمس والتمثيل الضوئى.

- السيادة فى المجموعة تتحقق فى بعض البيئات من مصادر المياه بسبب الخواص الكيميائية لمصدر المياه أو البيئة المحيطة.

- هذه المجموعة من الكائنات الدقيقة ربما تتواجد طبيعيا فى مصدر المياه ولكن غالبا تدخل على المصدر من **مياه الأمطار الشديدة** والمندفعة والتى تأتى بالمخصبات الزراعية وجزيئات التربة الى مصدر المياه بينما **المخلفات الصناعية** تضيف الكبريتيدات ، الفوسفات، وغيرها من المواد الغير عضوية .

- يتعاظم النشاط الميكروبى لبعض هذه الكائنات فى قاع المياه للبحيرات الطباقية Stratified lakes مع تحول الكبريتيدات ومركبات المنجنيز Manganous compounds، والحديدوز المتواجدة فى قاع البحيرات الطباقية المستنزف أكسيجينه Oxygen-depleted

نيتروجين (٠.٨مجم / اللتر) + فوسفور (٠.٤ مجم/اللتر) =

ازدهار الطحالب Massive bloom

أكثر من ٥٠٠ خلية/ملل

- تسد المرشحات فى عملية المعالجة، والتجمعات من الطحالب توفر الحماية بالنسبة للبكتريا من التعرض الى المطهر ، ويزداد الاحتياج الى المطهرDisinfecant demand. بعض الطحالب الزرقاء-المخضرة (Cyanobacteria) يمكن أن تنتج التوكسينات.
- الطعم والرائحة من الجوسامينز

Sulfur-oxidizing bacteria **البكتريا المؤكسدة للكبريت**
(*Beggiatoa* and *Thiobacillus*)

- فعالة ونشيطة خاصة فى المياه السطحية التى تستقبل كميات كبيرة من المخلفات السائلة التى تحتوى على **كبريت معدنى** Elemental sulfur، **ثيو سلفات أو كبريتيدات**.

النمو الزائد من الأجناس الخيطية Filamentous species تتسبب فى مشاكل اتلاف لعمليات المعالجة ، بينما سلالات أخرى تتسبب فى مشاكل التآكل Corrosion بالنسبة للانشاءات الخرسانية المستخدمة فى عمليات التخزين والتوزيع. ومن دواعى الاهتمام اللحظى تكون المركبات الكبريتية والتى تؤدى الى مشاكل الطعم والرائحة.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

البكتريا المختزلة للكبريتات Sulfate-reducing bacteria (*Desulfovibrio*)

- شائعة فى مياه قاع الخزان والمياه الحتجزة المستنزفة الأكسجين Oxygen depleted.

هذه الكائنات لاهوائية حتما Strict anaerobes مع احلال الكبريتات محل الأكسجين فى عمليات أكسدة الرواسب النباتية والمتجمعة فى رواسب القاع.

كبريتيد الأيدروجين الناتج عن هذا النشاط الميكروبى (اختزال الكبريتات الى H_2S) يمكن أن يتسبب فى مشاكل الرائحة ،

gtz Partner for the Future. Worldwide.

- تنتج مواد معلقة سوداء، ويمكن أن يكون عامل تآكل بالنسبة للصلب والمعادن الأخرى المعرضة للماء فى شبكة التوزيع.

مجموعة Desulfonema عديدة الخلايا ولديها خاصية الحركة الانزلاقية Gliding motility.

ومجموعة أخرى هى المجموعة الخضراء التى تقوم بالتمثيل الضوئى ومجموعة بكتريا الكبريت.

- استعمال الأمونيا فى المياه المحتوية على كلور لانتاج الكلورامين أو الاستعمال للتحكم فى تكون التراى هالوميثان Trihalomethanes ربما ينشط بعض بكتريا النترته Nitrifying bacteriaفى المياه لأكسدة الزيادة من الأمونيا الى نيتريت.

- نتيجة لعمل هذه البكتريا، فانها تكون لزوجة على حوائط المواسير والتى تسقط Slough على فترات وتظهر فى مياه الصنبور بالمنزل.

سلالات من النيتروزوموناس *Nitrosomonas* هى الشائعة من بكتريا النترته ومشاركة فى تكون المادة اللزجة ، ولكنها قد تكون مصحوبة بكائنات أخرى مثل البكتريا العصوية *Bacillus*، الكروية *Micrococcus* ،سيدوموناس *Pseudomonas* , و أكروموباكتر *Achromobacter*تكون مسئولة عن نمو الطيقة اللزجة فى نهايات شبكة التوزيع.

* **البكتريا البغيضة تتسبب فى مشكلة خاصة حادة فى مصادرالمياه الجوفية**، وتؤثر ليس فقط على الناحية الجمالية(الطعم، اللون، و الرائحة) ولكن تنتج أيضا الفيلم الحيوى Biofilm والذى يحد من حركة المياه خلال المواسير المبطنة للبئر أو فى مواسير التوزيع.

* من العوامل المشاركة فى تآكل خطوط المواسير أو تتداخل مع عمليات استخراج المياه الجوفية.

Fouling bacteria
Sphaerotilus, Leptothrix, Crenothrix, Gallionella)
ترسب الحديدوز. هذه الرواسب من أكسيد الحديد أو أيدروكسيد الحديد على سطح خلايا البكتريا يكون طبقة حماية والتى نضعف من فعالية عملية التطهير.

* من المشاكل الأخرى الغير مرغوبة تشمل اكساب المياه مظهر الصدأ البنى أو الأسود ونشوء طعم يجعل مصدر المياه غير مستساغ.

Iron Bacteriaبكتريا الحديد

جمع العينات والتصنيف Collection of Samples and Identification

- تصنيف بكتريا الحديد البغيضة يعتمد عادة على الفحص الميكروسكوبى للمادة المشتبه فيها.
  اختبر الحماة المنشطة، النمو الميكروبى الكثيف فى البحيرات، الأنهار، النهيرات، والنمو اللزج فى مياه أبراج التبريد .

- رسب أو اجر طرد مركزى على العينات المسحوبة مباشرة من آبار واختبرالرواسب ميكروسكوبيا.

الميكروسكوب العاكس Phase contrast microscopeجعل من السهل اجراء عملية الفحص دون صبغ.

استعمل الحبر الهندى India inkأو لاكتوفينول الأزرق للصبغ فى حالة استعمال الميكروسكوب العادى بالاضاءة.

ويمكن ايضا ملاحظة بكتريا الحديد باستخدام Epifluorescence microscope

- الرواسب الكثيفة من الحديد التى تنشأ بأكسدة الحديدوز بالهواء أو بالتغيرات البيئية الأخرى غلبا ما تحجب الأغماد أو السويقات من بكتريا الحديد.

- لاذابة رواسب الحديد يمكن استخدام حامض الهيدروكلوريك قوة ١ نورمال أو مركبات مختزلة مثل صوديوم اسكوربيت Sodium ascorbateوبالتالى يمكن رؤية التركيب الخلوى.

- ولتفرقة المادة الحديدة، أضف محلول من Potassium ferrocyanide الى عينة على غطاء شريحة فى وجود حامض الهيدروكلوريك فيتكون لون أزرق بروسيا فى الحديد حول الخلايا أو يذيب الخيوط.

طريقة الشريحة العائمة أوالمعلقة ربما تستعمل لتقدير وجود الخيوط أو بكتريا الحديد الأخرى.

- فى طريقة التعويم ثبت شريحة ميكروسكوب زجاجية فى قطعة فلين ودعها تعوم لمدة يوم الى يومين على سطح مياه مأخوذة من المصدر. الشرائح ربما تعلق بسلك أو خيط على أعماق مختلفة فى المياه لفترات مختلفة قبل ازالتها وفحصها ميكروسكوبيا لوجود بكتريا الحديد.
- يمكن أن تصنف الكائنات بمقارنتها بأشكال بكتريا الحديد الفوتوغرافية

gtz Partner for the Future. Worldwide.

ثانيا: بكتريا الكبريت Sulfur Bacteria

١ . الخواص العامة General Characteristics

- تؤكسد أو تختزل كميات محسوسة من مركبات الكبريت الغير عضوية
- لها اشكال وخواص كيماوية حيوية مختلفة.

مجموعة البكتريا المختزلة للكبريتات تتركب أساسا من خلية واحدة تنمو لاهوائيا وتختزل الكبريتات الى كبريتيد الأيدروجين H_2S.

- عضو من هذه المجموعة، *Desulfonema* عديد الخلايا وله حركة انزلاقية gliding motility.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

***مجموعة ثانية** من بكتريا الكبريت، هى مجموعة بكتريا التمثيل الضوئى Photosynthetic الخضراء والارجوانية، تنمو لاهوائيا فى وجود الضوء وتستعمل كبريتيد الأيدروجين كمعطى للأيدروجين Hydrogen donor للتمثيل الضوئى.

***أعضاء مجموعة ثالثة** عديمة اللون خيطية Myxotrophic تستعمل مصادر عضوية من الكربون ولكن ربما تحصل على الطاقة اللازمة من أكسدة مركبات الكبريت المختزلة. الكبريتيدات تأكسدت الى كبريت أو كبريتات.

*__المجموعة الرابعة__ ، هى المجموعة المؤكسدة هوائيا للكبريت ، وهى تؤكسد مركبات الكبريت المختزلة هوائيا للحصول على الطاقة للنمو من خلال الأكسدة الكيميائية للمواد البسيطة الغير عضوية Chemoautotrophic.

*من بكتريا الكبريت الهامة فى مجال المياه والمخلفات السائلة هى البكتريا المختزلة للكبريتات Sulfate-reducing bacteria والتى تشمل:
Desulfovibrio ، والبكتريا وحيدة الخلية الهوائيه المؤكسدة للكبريت من جنس *Thiobacillus*.

البكتريا المختزلة للكبريتات تساهم بدرجة كبيرة عمليات التآكل فى خطوط المياه وكذلك تسبب مشاكل الطعم والرائحة فى المياه. الثيوباسيلس من خلال انتاجها لحامض الكبريتيك، تساهم فى تكسير خطوط الصرف الخرسانية وكذلك التآكل الحامضى للمعادن.

جمع العينات والتصنيف Collection of Samples and Identification

- تصنيف بكتريا الكبريت البغيضة عادة يجرى على أساس **الفحص الميكروسكوبى** للمواد المشكوك فيها.
- اختبر عينات من المواد اللزجة المعلقة فى المياه، مسحات من السطوح المعرضة لهذه المواد اللزجة، أو الرواسب مباشرة.

ثلاثة مجاميع من بكتريا الكبريت ربما تلاحظ ميكروسكوبياك بكتريا الكبريت الخضراء والارجوانيه، وبكتريا الكبريت عديمة اللون الغير خيطية، الكبيرة.

- المجموعة الرابعة، تتركب من البكتريا المختزلة للكبريتات والبكتريا المؤكسدة للكبريت من جنس ثيوباسيلس لا يمكن تصنيفها من المظهر فقط.

بكتريا الكبريت الخضراء Green sulfur bacteria

تتواجد غالبا فى المياه المحتوية على كبريتيد الأيدروجين.

صغيرة، بيضية Ovoid الى عصوية فى الشكل، غير متحركة ، عامة أقل من ١ ميكرون فى القطروتكون كتل صفراء مخضرة فى اللون.

جسيمات الكبريت نادرا ان لم يكن لا تترسب فى الخلايا.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

بكتريا الكبريت الارجوانيه

Purple sulfur bacteria

- تتواجد فى المياه المحتوية على كبريتيد الأيدروجين.
- كبيرة، بها حبيبات الكبريت وغالبا صبغات كثيفه تجعل الخلايا تبدو حمراء.
- كتل كبيره كثيفة وملونة ترى بالعين المجردة بسهولة.
- وجود البكتريا التى تقوم بالبناء الضوئى فى تركيزات متكتلة
- يمكن أن تؤكد باستخلاص الكتلة ويمسح Scanning المستخلص فى منطقة الانفرا ريد Infrared. الكلوروفيل البكتيرى سيمتص بقوة فى مجال ٦٦٠ – ٨٧٠ نانومتر.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

بكتريا الكبريت الخيطية عديمة اللون

Colorless filamentous sulfur bacteria

- بكتريا الكبريت الخيطية عديمة اللون
- تتواجد فى المياه عند تواجد كلا من الأكسجين وكبريتيد الأيدروجين
- ربما تكون جدائل أو بساط لها مظهر أبيض مصفر قليلا راجع الى ترسيب حبيبات الكبريتالداخلية.
- عموما كبيرة
- ربما تكون متحركة بالحركة الانزلاقية Gliding movement.
- تصنف بالمقارنه بالصور المتاحة.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

بكتريا الكبريت عديمة اللون الغير متشعبة

Colorless nonfilamentous sulfur bacteria

- عادة تكن مرتبطة بالطحالب المتحللة.
- متحركة .
- بيضية الى عصوية الشكل .
- توجود حبيبات الكبريت وكربونات الكالسيوم كرواسب.
- وهى عامة كبيرة جدا.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

بكتريا الكبريت عديمة اللون الصغيرة والبكتريا المختزلة للكبريتات

Colorless small sulfur bacteria and sulfate-reducing bacteria

Thiobacillus spp.* خلاياها صغيرة مفردة

*البكتريا المختزلة للكبريتات مثل *Desulfovibrio* لا يمكن تصنيفها بالفحص الميكروسكوبى.
*أنواع الثيوباسيلس صغيرة، عديمة اللون، متحركة، عصوية الشكل وتتواجد فى البيئة المحتوية على كبريتيد الأيدروجين.
جسيمات الكبريت غائبة. وتصنيف أنواع الثيوباسيلس *Thiobacills* ، ديسلفوفبريو *Desulfovibrio* وغيرها من البكتريا المختزلة للكبريتات يتم فسيولوجيا .

gtz Partner for the Future. Worldwide.

عد، تخصيب، وعزل بكتريا الحديد والكبريت

Enumeration, enrichment, and Isolation of Iron and Sulfur Bacteria

لا توجد وسيلة جيدة لعد بكتريا الحديد والكبريت بخلاف البكتريا المختزلة للكبريتات و Thiobacilli.

1. الزراعة والعزل المعملى لمزارع نقية صعب والنجاح فى العزل غير مؤكد. هذا صحيح على وجه خاص بالنسبة لمحاولات عزل البكتريا الخيطية من الحمأة المنشطة أو مصادر أخرى حيث يتواجد العديد من أنواع البكتريا المختلفة.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

١. البيئة Media

١ . ١ . Casitone-glycerol-yeast autolysate broth (CGY) for the **Sphaerotilus group**

١ . ٢ . بيئة عزل (بكتريا الحديد) **(iron bacteria)** Isolation medium

١ . ٣ . بيئة الابقاء لبكتريا الحديد **(SCY)** Maintenance **medium (iron bacteria)**

gtz Partner for the Future. Worldwide.

١ . ٤ . Mn agar no.1

١ . ٥ . Mn agar No. 2

١ . ٦ . بيئة الحديد المؤكسد Iron Oxidizing medium (Thiobacillus ferroxidants) Basil salts

١ . ٧ . آجار كبريتيد الحديدوز Ferrous sulfide agar (Gallionella ferruginea) Agar layer

١ . ٨ . بيئة اختزال الكبريتات Sulfate-reducing medium

Seite ٤٣

gtz Partner for the Future. Worldwide.

بكتريا الحديد Iron Bacteria

١ . *Sphaerotilus-Leptothrix*

١ . ١ . بكتريا الحديد، خاصة تلك التى تنتمى الى مجموعة *Sphaerotilus-Leptothrix*، تزدهر فى البيئة شديدة التخفيف والتى تدعم تكاثر الكائنات سريعة النمو. وأحد البيئات الانتخابية جزئيا Partially selective لبكتريا *Sphaerotilus* (BOD dilution water مدعمة بصوديوم لاكتات ١٠٠ مجم / اللتر). توزع البيئة فى زجاجات مربعة French square bottles وتعقم عند ضغط 60 kPa لمدة ١٥ دقيقة.

Seite ٤٤

- لحقن العينة أضف ٢٥ ملل من مياه المجرى أو ١ ، ٥ ، ١٠ ملل من مياه المخلفات السائلة الساكنة الى زجاجات مزدوجة من البيئة. حضن عند ٢٢ الى ٢٥ درجة مئوية لمدة ٥ أيام ولاحظ النمو الخيطى .

- اعزل مزرعة نقية عن طريق التقاط خيط من بيئة BOD lactose broth والتخطيط على ٠٫٠٥% Meat extract agar. بعد التحضين لمدة ٢٤ ساعة على ٢٥ درجة مئوية، التقط خيط نموذجى متجعد بمساعدة ميكروسكوب تشريحى Dissecting microscope وانقل الى Casitone-glycerol-yeast autolysate broth.

- اذا تكون غشاء رقيق Pellicle دون عكارة أسفله خلال ٢ – ٣ أيام، انقل خيط الى Casitone –glycerol-yeast autolysate agar على صورة مائلة Slant، حضن عند ٢٥ درجة مئوية حتى يرى نمو، وخزن فى الثلاجة. وربما يضاف مستخلص قش نبات ألفا ألفا أو البسلة للتخصيب.

١ . ٢ . بيئة العزل والحفظ طورت بنجاح لتصنيف المجاميع المختلفة من الكائنات الخيطية وتشمل بكتريا الحديد. حضر آجار مائل من هذه البيئة وبطريقة معقمة قطر ٣ ملل من مياه الصنبور المعقمة والمزال منها الكلور Dechlorinated على سطح الآجار المائل. لقح أنابيب وحضن عند درجة حرارة الغرفة حتى ملاحظة العكارة الناتجة عن النمو فى الطبقة السائلة. والخلايا تظل حية لمدة ٣ شهور فى الثلاجة.

١ . ٣ . بيئة حفظ أخرى لزراعة مجموعة Sphaerotilus هى بيئة Casitone-glycerol-yeast autolysate (CGY).

١ . ٤ . *Leptothrix (Sphaerotilus discophorous)* يمكن أن تفرق عن *Sphaerotilus natans* بالقدرة على أكسدة أيونات المنجنيز. استعمل Mn agar No. 1 كبيئة تفرقة. كبديل،فان *Leptothrix* ربما تنو عن طريق الزرع المباشر على MN agar No. 2.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

٢ . Thiobacillus ferrooxidans :

* على الرغم من أن هذا الكائن هو أيضا بكتريا مؤكسدة للكبريت، فان أهميته الأساسية فى مخلفات المناجم الحامضية.
والبيئة المناسبة لتقدير الأعداد الاحتمالية MPN فى المتناول. بعض أكسدة للحديد تحدث خلال التعقيم ولكن الفقد فى أيونات الحديدوز لا يمكن تقديره.

* البيئة يكون بها راسب (من المحتمل أن يكون فوسفات الحديدوز والحديديك) براق وأخضر، ذا pH ٣ – ٣,٦ ويحتوى ٩جرام/ اللتر أيونات الحديدوز.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

*نمو الكائن يظهر بالاخفاض فى pH وزيادة تركيز الحديد المؤكسد.
وباستعمال مرجعيات غير ملقحة، فان زيادة فى اللون البرتقالى – البنى يمكن أن يرى فى الأنابيب او الدوارق المخصبة الموجبة مقارنة بالسلبة. هز أنابيب اختبار التخفيفات يوميا لأن هذا الكائن هوائى.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

٣ . Gallionella ferruginea :

لزرع هذا الكائن استعمل Ferrous sulfide agar.
احقن أنابيب بقطرة من معلق الرواسب المشكوك فى أنها تحتوى على جاليونيلا.
النمو على درجة حرارة الغرفة يحتاج الى ١٨ – ٣٦ ساعة ويظهر كرواسب بيضاء على جوانب انبوبة الاختبار.
حلقة المستعمرات تتواجد على مستوى معين يعكس التوازن ما بين الانتشار الى أعلى upward diffusion لأيونات الحديدوز والانتشار الى أسفل لجزيئات الأكسجين. وربما ينجح عزل مزرعة نقية من خلال اضافة الفورمالين الى Ferrous sulfide agar.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

٤ . بكتريا الحديد الأخرى Other iron bacteria:

عزلت *Metallogenium* المؤكسدة للحديد والقادرة على تحمل الحموضة (pH 3.5 – 5.0) باستعمال بيئة تحتوى على :

(NH4)2 SO4 , 0.1% ,
CaCO3, 0.01%,
MgSO4 , 0.02%,
K2 HPO4 , 0.001%,
Potassium acid phthalate, o.4%,

and 250 mg/L ferrous iron from acidified FeSO4 .7 H2 O,solution.

أضف ٤, . % فورمالين الى ١٠٠ ملل من البيئة فى دورق ٢٥٠ ملل.

- فى حالة بكتريا الحديد الهتيروتروفية المرسبه استعمل بيئة Ferric ammonium citrate تتركب من: NaNO3, 0.5 g/L; K2HPO4 0.5 g/L (NH4)2 SO4 , 0.5 g/L MgSO2 .7H2O,0.5 g/L; and ferrous ammonium citrate 10 g/L

- أضبط pH عند ٦,٦ الى ٦,٨ وعقم. ولجعل البيئة صلبة أضف ١٥ جرام آجار/ اللتر.

- كبديل تنمى بكتريا الحديد بخلط ٢٠ ملل بيئة مرق، ١٠ ملل ماء خام أو عينه، ٣ جرام أكسيد حديد Iron oxide. حضن لمدة ٤٨ – ٧٢ ساعة على ٢٥ درجة مئوية على هزاز لانتاج نمو مرئى.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

بكتريا الكبريت
Sulfur Bacteria

١ . البكتريا المختزلة للكبريتات Sulfate-reducing bacteria

gtz Partner for the Future. Worldwide.

١ . ١ . لتنمية البكتريا المختزلة للكبريتات مثل *Desulfovibrio* ، استعمل بيئة اختزال الكبريتات sulfate-reducing medium (Lewis, 1965).

احقن الأنابيب واملأها تماما بالبيئة المعقمة لايجاد ظروف لاهوائية. للمقارنة، حضن مرجعيات غير محقونة.

بالنسبة للعينات ذات الحجم أكبر من ١٠ ملل، مرر العينة خلال غشاء مرشح Membrane Filter ٠,٤٥ ميكرون وانقل الفلتر الى بيئة فى انبوبة ذات غطاء قلاووظ.

اذا تواجدت البكتريا المختزلة للكبريتات، سوف تظهر الأنابيب لون اسود خلال ٤ – ٢١ يوم من التحضين عند ٢٠ – ٢٥ درجة مئوية.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

١ . ٢. هناك بيئة محتوية على الآجار مناسبة لتنمية (Iverson, 1966) وعد البكتريا المختزلة للكبريتات. البيئة تتركب من:

Trypticase soy agar, 4% , agar 0.5%, 60% sodium lactate (0.4 % v/v); hydrated magnesium sulfate, 0.2%. and ferrous ammonium sulfate, 0.2%.

أضبط pH عند ٧,٢ الى ٧,٤ وعقم. من الازم أن تكون البيئة رائقة تماما وخالية من أي رواسب.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

- احقن الأطباق خلال ١-٤ ساعة من تصلب الأطباق المصبوبة بالبيئة لمنع التشبع بالأكسجين. ولمنع تكثف الرطوبة على أغطية الأطباق البترى، استبدل الأغطية بأغطية امتصاص خلال ١٠ – ١٥ دقيقة من بعد تصلب الآجار.

- ضع الأطباق الغير مقلوبة فى حوض زجاجى أو مجفف واستبدل الهواء بنيتروجين أو هيدروجين بالتفريغ واحلال الغاز. وكبديل، استعمل نظام للتخلص من الأكسوجين (GasPak, BBL).

- حضن على درجة حرارة الغرفة (٢١-٢٤ درجة مئوية) أو (٢٨-٣٠ مئوية) وهى الدرجة المثلى لتلك الكائنات.

- النمو وظهور اللون الأسود حول المستعمرات هو الصفة الخاصة بالبكتريا المختزلة للكبريتات وربما يتواجد فى أى وقت بين ٢ الى ٢١ يوم على الرغم من أن الوقت المعتاد هو ٢ – ٧ أيام.

٢ . Photosynthetic purple and green sulfur bacteria

لأن تلك الكائنات متخصصة ونادرا ما تسبب مشاكل فى عمليات معالجة المياه والمخلفات السائلة، فطرق عزلها وعدها لم نشملها هنا. فى بعض الحالات يمكن أن تكون نافعة لقدرتها على اكسدة كبريتيد الأيدروجين وبالتالى تخفض الروائح. وتركيب البيئات وطرق الزرع لأى من المجموعة يمكن الحصول عليه من المرجع (Pfennig, 1967).

gtz Partner for the Future. Worldwide.

٣ . *Thiobacillus* spp. :

البيئة المناسبة لعد بكتريا Thiobacillus thiooxidans & Thiobacillus thiopurus بطريقة العد الاحتمالى يتم فيها حقن البيئة والتحضين لمدة ٤ – ٥ أيام على ٢٥ – ٣٠ درجة مئوية.

- نمو الثيوباسيلس ينتج كبريت معدنى، الذى يترسب فى القاع مع انخفاض فى pH وعكارة البيئة. والاختبار الكيميائى لتكون الكبريتات يلزم اجراؤه لتأكيد وجود Thiobacillus.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

٤ . البكتريا الخيطية المؤكسدة للكبريت Filamentous sulfur-oxidizing bacteria

١ . بيجياتا *Beggiatoa*

- تتواجد البجياتا فى معظم البيئات المائية وتشمل نظم المياه العذبة ومياه البحار، الرواسب والمخلفات السائلة عند تواجد الكبريتيد والأكسوجين.
- لأن البجياتا بكتريا عديدة الخلايا Multicellular bacterium فلا توجد طريقة دقيقة لتقدير أعداد الخلايا الحية فى عينة ما.
- تقديرها يتم من خلال العد الميكروسكوبى المباشر للخيوط.

- البجياتا البحرية ربما تكون كبيرة نوعا ما، تصل الى ١٠٠ ميكرون أو أكثر فى القطر.
- لم يمكن تنميتها فى المعمل.
- الأجناس البحرية الصغيرة (حتى ٥ ميكرون فى القطر) هى التى تم عزلها. والبيئة اللازمة فى حالة المياه العذبة تختلف قليلا عن تلك الخاصة بالمياه المالحة.

Enrichment التخصيب

- احقن انبوبة لمستخلص القش (التبن) بكمية كافية من الماء وقليل من الطين من موقع العينة لملأ الأنبوبة الى عمق ٨ سم على الأقل. تحضن لمدة أسبوع على الأقل.

- تختبر لتواجد "خصل شعرية Tufts" أو كرات منتفخة Puff-balls" تتكون من خيوط متشابكة Tangled filamentsمن البجياتا.
- تختبر بواسطة Phase contrast microscopeلوجود الخيوط الفردية.
- اذا لم تتواجد الكرات المنتفخة، يستكمل التحضين لأسبوع آخر ويعاد الاختبار.
- يستمر اختبار المخصب حتى ٤ أسابيع قبل التخلص منه.

العزل Isolation

- باستعمال ملقط دقيق الطرف معقم مع ميكروميكروسكوب Dissecting microscope، انقل الخصل الشعرية من البجياتا من بيئة التخصيب الى طبق بترى صغير يحتوى على البيئة الأساسية Basal medium معقمة.
- رج الخصل الشعرية بالملقط لازالة البكتريا المصاحبة
- تنقل الخصل الشعرية الى طبق بترى جديد مع البيئة الأساسية المعقمة. استمر حتى يتم غسل الخصل على الأقل ٥ مرات.

- انقل الخصل الى طبق جاف يحتوى على البيئة الأساسية مع ١.٦% آجار لمدة حوالى دقيقة ويزال المحلول الزائد،
- انقل الخصل الى منتصف أطباق منفردة من بيئة MY أو MP
- حضن الأطباق عند درجة حرارة الغرفة أو أقل
- اختبر بميكروسكوب Dissecting microscope كل ٥ – ١٠ ساعات لوجود البجياتا الخيطية.

- اختار الخيوط الغير ملوثة وانقلها الى أطباق من نفس البيئة باستعمال ابرة تلقيح معقمة ومفلطحة أو باستعمال خلة الأسنان المعقمة Toothpick.
- خذ مع نقل الخيط القليل من الآجار لمنع الجفاف.
- اختبرأطباق النقل الأول كل ٥ – ١٠ ساعات كما سبق,
- انقل الخيط النقى الى بيئة جديدة.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

البيئة الأساسية Basal medium:

Ammonium chloride,4% solution ……...… 5 mL
K2HPO4 , 1% solution..... ……...…… 1 mL
MgSO4 .7H2O, 1% solution ……...…. 1 mL
CaSO4 .2H2O , saturated solution ……...….20 mL
Trace elements (see below) ……5 mL
Reagent-grade water ……968 mL

gtz Partner for the Future. Worldwide.

العناصر النادرة Trace elements:

Reagent-grade water ……...920 mL
ZnSO4 .7H2O, 0.1 % solution ……..... 10 mL
Mn SO4 .4 H2O. 0.02% solution ……10 mL
CuSO4 .5H2O.0.00005% solution …….. 10 mL
Boric acid, 0.1% solution ……10 mL
Cobalt nitrate , 0.01% solution ……... 10 mL
Sodium molybdate 2H2O, 0.01% solution.....10 mL
EDTA solution 2% EDTA with 7% ferrous sulfate
with 1 mL conc. HCl/100 mL …… 20 mL

gtz Partner for the Future. Worldwide.

MP agar

Basal medium ……..…….. 1 L

Sodium acetate …… 0.1 g

Sodium sulfide solution (make up and separately autoclave a 10% solution of Na2 S.9H2O ……3 mL

Agar…….……...15 g

gtz Partner for the Future. Worldwide.

MY agar

Basal medium ……..…… 1 L
Sodium acetate …… 0.1 g
Nutrient broth powder …… 0.1 g
Yeast extract …… 0.1 g
Sodium sulfide solution (see above) ……...3 mL
Agar ……..…..15 g

- أضبط pH بين ٧ – ٧,٥
- سخن لاذابة الآجار
- عقم فى الأوتوكلاف لمدة لاتزيد عن ١٥ دقيقة
- برد فى حمام مائى الى ٤٥ – ٥٠ درجة مئوية
- أضف محلول كبريتيد الصوديوم فورا قبل صب الأطباق.
- اذا كانت البيئة تستعمل فى أنابيب ذات قلاووظ فان الكبريتيد ربما يضاف قبل التعقيم.

ثيوثريكس Thiothrix

مكسوتروفيك حتما Obligately myxotrophic.

- عزلت وعرفت خصائصها من ينابيع كبريتية ومياه أخرى متدفقة تحتوى على الكبريتيد.
- عزلت سلالات هتيروتروفية من الحمأة المنشطة من محطات معالجة المخلفات السائلة وعرفت خصائصها .
- بينما أن طريقة عزل كلا من السلالات المكسوتروفيك والهتيروتروفيك متماثلتان نجد أن بيئات العزل تختلف.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

عزل المكسوتروفيك ثيوثريكس Isolation of myxotrophic Thiothrix

* اجمع خصل شعرية بكتيرية من الصخور، مواسير المياه، أو مصادر أخرى.
* باستعمال ميكروسكوب Dissecting microscope التقط خيوط بملقط دقيق الطرف
* رج لازالة البكتريا الملوثة
* انقل الى بيئة أساسية Basal medium معقمة
* كرر ٥ مرات على الأقل لمحاولة الحصول على خيوط قليلة أو عديمة التلوث.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

* باستعمال Pasteur pipet انقل نقطة الى حافة اطباق MP or MY agar
* حرك الأطبق بحيث تجرى النقط من جانب الى الآخر للطبق
* اسحب الرطوبة الزائدة بماصة
* حضن الأطباق على درجة حرارة الغرفة أو أقل لحوالى ٤٨ ساعة.

- اختبر الأطباق تحت Dissecting microscope لظهور مستعمرات خيطية نموذجية
- باستعمال خلة أسنان معقمة ، التقط المستعمرات المنعزلة وانقلها منفردة الى أطباق جديدة من نفس البيئة
- خطط المادة المنقولة باستعمال Loop
- بعد حوالى ٤٨ ساعة تحضين ، اختبر الأطباق وأعد تخطيط المستعمرات التى تبدوا نقية.

عزل الثيوثركس الهتيروتروفية

Isolation of heterotrophic Thiothrix

هناك طريقتان مختلفتان للاستعمال، تعتمد على تركيز وحجم خيوط الثيوثركس فى العينة.

❖فى احدى الطريقتين :

- اغسل الخيوط المفردة أو السلالات الكبيرة الوردية من الثيوثركس العديد من المرات فى مرق MSV، بالنقل باستعمال Pasteur pipet مع الملاحظة باستخدام ميكروسكوب . Dissecting microscope

- بعد الغسيل المتكرر انقل خيوط الى كمية صغيرة من MSV (١ – ٣ ملل)
- ازرع على بيئة أو أكثر من البيئات التالية AcS, SS, GS, SUC, J, S, or LT ،
- اضبط pH عند ٧,٢ – ٧,٥.
- يمكن عمل البيئة على صورة صلبة باضافة ١٢ جرام آجار

MSV:

(NH4)2 SO4 ……..	0.5	g
K2 HPO4 ……	..0.11	g
KH2 PO4	0.085	g
MgSO4 .7H2O	0.1	g
CaCl2 .2H2O …….	0.05	g
FeCl2 .H2O …….....	0.002	g
EDTA ……..	0.003	g
Vitamin mix ……..…….	1	mL
Reagent-grade water ……..…….	1	L

Vitamin mix:

Calcium pantothenate ……	0.01	g
Niacin ……	0.01	g
Biotin ……	0.0005	g
Cyanocobalamin ……	0.0005	g
Folic acid ……	0.0005	g
Pyridoxine ……..	0.01	g
p-aminobenzoic acid ……..	0.01	g
Cocarboxylase ……..	0.01	g
Inositol ……..……..	0.01	g
Thiamine ……..……..	0.01	g
Riboflavin ……..….	0.01	g
Reagent-grade water …….	100	mL

AcS:

Sodium acetate ……	0.15	g
Sodium sulfide 9H2O ……..……	0.187	g
MSV ……	1	L

SS:

Sucrose ……	0.15	g
Sodium sulfide, 9H2O …….	0.187	g
MSV ……	1	L

GS:

Glucose …… 0.15 g

Sodium sulfide 9 H2 O …… 0.187 g

MSV …… 1 L

SUC:

Sodium succinate …… 0.15 g

MSV …… 1 L

I :

Glucose ……...0.15 g

MSV …… 1 L

S :

Sodium sulfide 9H2O ……0.15 g

MSV ……1 L

LT :

Sodium lactate ……..0.5 g

Sodium thiosulfate ……..……0.5 g

MSV …… …….1 L

اذا كانت الخيوط صغيرة أو نادرة:

- ركز العينة بالطرد المركزى
- خفف ١ : ٥ فى MSV ،
- عامل بالموجات فوق المغنطيسية Sonicate عند ٣٠ وات لمدة ١٥ ثانية،
- اغسل ٣ مرات بالطرد المركزى عند ١٩٠٠ Xg لمدة ٢ ـ ٥ دقائق.
- الجزء العلوى Supernatant يحتوى على خيوط حرة والتى تستعمل لتلقيح واحدة أو أكثر من البيئات الصلبة سابقة الذكر.

سيدوموناس ايريوجينوزا
Pseudomonas aeruginosa
(المياه الجوفية)

- سيدوموناس ايريوجينوزا هى اكثر Pseudomonad شيوعا فى مياه الشرب.
- قادرة على الانتشار فى نوعيات واسعة من البيئات (المياه السطحية، المياه الجوفية، مياه البحر، التربة، والنباتات).
- بعض منها من ضمن مزيلات اليتروجين الشهيرة Denitrifiers
- البعض الآخر ينمو بدرجة مذهلة فى وعلى وسائل المعالجة الثلاثية Tertiary treatment devices مثل أغشية التناضح العكسى Reverse-osmosis والتحليل الكهربى Electrodialysis وفى مرشحات الرمل والكربون.

- وجدت فى بعض مصادر مياه الشرب وتشمل

P. aeruginoas, P. cepacia, P. fluoresens,

P. mallei, P. malttophila, P. putida, and

P. testosteroni

- يمكن اضافة

P.stutzeri, P. diminuta, and P. acidovarans

الى القائمة السابقة والتى وجدت فى المياه المعبأة بكثافة تتراوح مابين ١ X٣١٠ الى ١ X٥١٠ / ملل.

- تأقلمت من حيث التمثيل الغذائى لكى تبقى على الحدود الدنيا من المغذيات والتى هى من خواص مياه الشرب والمياه الجوفية المحمية.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

- قدرة P. aeruginosa على أن تستعمر بسرعة بيئات مختلفة تشمل الانسان الحساس، يجعلها من أعظم الممرضات الانتهازية وخاصة P. aeruginosa serogroup 11, 9
- تتواجد السيدوموناس فى الدم فى : حالات الجروح Trauma
  - الحروق
  - الجراحات المركزة
  - المتعرضين للعلاج من السرطان
  - العين
  - الأنف
  - وأحيانا القناة الهضمية.

Seite ٣٥

gtz Partner for the Future. Worldwide.

- تواجد السيدوموناس النادر فى القناة الهضمية (٣ – ١٩%) يدل على أن استعمار النظام المعوى نادرا ما يحدث فى الأشخاص الأصحاء
- هناك جهاز دفاعى قوى فى العائل ضد هذه المجموعة من البكتريا السالبة لجرام.
- لأن مخلفات الصرف الصحى تحتوى على خليط من المخلفات الآدمية، مخلفات الصناعة و ناتج الأمطار الغزيرة فانه لا يكون مستبعد وجود سيدوموناس ايريوجينوزا فى ٩٠% من عينات الصرف الصحى.

Seite ٣٦

- كثافة سيدوموناس ايريوجينوزا فى المياه السطحية والتى تتلقى مخلفات ربما تتراوح ما بين ١ اى ١٠٠٠٠ خلية / ملل يتوقف على:

المغذيات المتوافرة

درجة حرارة المياه الموسمية.

- تواجدت سيدوموناس ايريوجينوزا فى مصادر المياه الملوثة وارتبطت بحالة تفشى outbreakمتولدة عن المياه حدثت فى دار حضانة لحديثى الولادة. وفى هذه الحالة كان مصدر المياه الجوفية ملوث من سيب من الصرف الصحى وكذلك رشح من مياه سطحية ملوثة.

* لأن سيدوموناس ايريوجينوزا هى السيدوموناس الشائعة فى مرض الانسان، فان تواجدها حدد فى المجتمع الأوروبى بأقل من ١ كائن فى كل ٢٥٠ ملل من مياه الشرب المعباة.

* اجناس السيدوموناس الأخرى التى تتواجد أحيانا فى الماء (P. fluoresens, P. putida, P. multivorans, P. maltophilia, and P. stutzeri)

* لم تترتبط بعد بالمتفشيات المتولدة عن المياه، وهذا يعنى أنها من بكتريا المياه الطبيعية وتتواجد فى أى بيئة مائية.

- مياه التنزه Recreational water سواء كانت مياه عذبة أو مالحة من الممكن أن تكون ملوثة بالسيديموناس علاوة على تلوثها بغيرها من البكتريا مثل ستافيلوكوكى والتى مصدرها الجلد، الأنف وفم مرتادى تلك الأماكن.

وكذلك هناك امكانية تواجد الممرضات مثل السالمونيلا والشيجيلا والانتيروفيرس والبروتوزوا والطفيليات عديدة الخلايا. على أن ذلك كله لا ينفى ضرورة اختبار مياه المتنزهات لايشيرشيا كولاى (mTEC agar + urea substrate test)

ومجموعة الانتيروكوكى لأنهم أكثر ارتباطا بالحالات المرضية الناشئة عن تلوث مياه المتنزهات.

والاختبار للسيدوموناس ايريوجينوزا Pseudomonas aeruginosa من الممكن أن يتم بالنسبة للمياه، (ما ينطبق على المياه المعبأة يطبق على المياه الجوفية)، باستخدام طريقة المرشحات الغشائية Membrane filtration أو طريقة العد الاحتمالى بالأنابيب المتعددة MPN كالتالى:

طريقة أغشية الترشيح لتقدير السيدوموناس ايريوجينوزا
Membrane Filter Technique for Pseudomonas aeruginosa

١ . البيئة

1.1.1. M-PA agar

L-Lysine HCl	5 g
Sodium chloride	5 g
Yeast extract	2 g
Xylose	2.5 g
Sucrose	1.25 g
Lactose	1.25 g
Phenol red	0.08 g
Ferric ammonium citrate	0.8 g
Sodium thiosulfate	6.8 g
Agar	15 g
Reagent grade water	1 L

- يضبط pH البيئة عند ٦,٥ +/- ٠,١
- عقم فى الأوتوكلاف.
- برد الى ٥٥ الى ٦٠ مئوية؛
- أعد ضبط pH عند ٧,١ +/- ٠,٢
- أضف المضادات الحيوية التالية /اللتر : سلفابيريدين ١٧٦ مجم؛ كناميسين ٨،٥ مجم ؛ نلاديكسيك أسيد ٣٧ مجم وسيكلوهكساميد ١٥٠ مجم.
- بعد الخلط وزع بكميات ٣ ملل فى أطباق بترى ٥٠ X ١٢ مم.
- خزن الأطباق المصبوبة عند ٢ ــ ٨ درجة مئوية.
- تخلص من البيئة الغير مستعملة بعد شهر.

Modified M-PA agar

مثل البيئة السابقة (جاهزة) مضاف اليها كبريتات مغنسيوم ، كناميسين ونلادكسيك أسيد.

Milk agar (Brown and Scott Foster Modification):

Mixture A:

Instant nonfat milk ..... 100 g
Reagent-grade water ..... 500 mL

Mixture B:

Nutrient broth ..... 12.5 g
Sodium chloride ..... 2.5 g
Agar ..... 15 g
Reagent-grade water ..... 500 mL

- حضر كلا من الخليط أ ،ب كلا على انفراد
- عقم، برد بسرعة الى ٥٥ مئوية
- بطريقة معقمة امزج الخليطين ووزع بكميات ٢٠ _ ٢٥ ملل فى كل طبق بترى.

Procedures الطرق

•الاختبارات المبدئية Presumptive tests

رشح ٢٠٠ ملل أو أقل من العينة من المياه الطبيعية أو حتى ٥٠٠ ملل فى حالة حمامات السباحة خلال أغشية الترشيح المعقمة. ضع كل غشاء على طبق من البيئة (M-PA). اقلب الأطباق وحضن عند ٤١,٥ -/+ ٥,. درجة مئوية لمدة ٧٢ ساعة.

- مستعمرات P. aeruginosa المثالية قطرها يتراوح ما بين ٨,. – ٢,٢ مم مستوية Flat فى مظهرها ذات حواف لامعة ومركز بنى الى أخضر مسود .
- عد المستعمرات النموذجية (يفضل الغشاء المحتوى على ٢٠ – ٨٠ مستعمرة). استعمل قوة تكبير ١٠ – ١٥ كمساعد فى العد.

الاختبارات التأكيدية Confirmation tests

- استعمل بيئة آجار اللبن لتأكيد المستعمرات النموذجية والغير نموذجية (Typical and atypical)

- اعمل خط واحد بطول ٢ الى ٤ سم من مستعمرة منعزلة على طبق من آجار اللبن وحضن عند ٣٥ - /+ ١,. درجة مئوية لمدة ٢٤ ساعة.

- P. aeruginosa تحلل الكازين وتنتج صبغة منتشرة ذات لون أصفر الى أخضر.

- الاختبار التأكيدى غير مطلوب روتينيا وفى هذه الحالة تسجل النتيجة على أنها عدد السيدوموناس ايريوجينوزا المبدئى / ١٠٠ ملل.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

. تقدير سيدوموناس ايريوجينوزا بطريقة الأنابيب المتعددة

Multiple-Tube Technique for Pseudomonas aeruginosa

البيئات

Asparagine broth مرق الاسباراجين

Asparagine, DL	3	g
K2 HPO4	1	g
MgSO4 ,7H2O	0.5	g
Reagent-grade water	1	L

اضبط pH البيئة عند ٦،٩ – ٧,٢ قبل التعقيم.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

Acetamide broth مرق الأسيتاميد

Acetamide	10	g
Sodium chloride	5	g
K2 HPO4	1.39	g
KH2 PO4	0.73	g
MgSO4 ,7H2O	0.5	g

أذب ١,٢ جرام أحمر الفينول Phenol red فى ١.,. نورمال صودا كاوية ، ١ ملل / اللتر مرق الاسيتاميد. استعمل محلول أحمر الفينول خلال عام. أضبط pH عند ٧,١ الى ٧,٣ قبل التعقيم.

- pH النهائى يلزم أن يكون ٧ -/+ ٢،.

حضر مرق الأسيتاميد كما شرح أعلاه.

اذا فضل عمل Slant أضف ١٥ جرام آجار / اللتر وسخن لاذابة الآجار ووزع بكميات حوالى ٨ ملل فى الأنابيب. بعد التعقيم أمل الأنابيب لتوفير سطح مائل كبير.

Procedures الطرق

Presumptive test الاختبار المبدئى

- اجر اختبار الخمس أنابيب. استعمل ١٠ ملل من بيئة الأسباراجين مفرد التركيز لحقن ١ ملل أو أقل من العينة و١٠ ملل من البيئة مضاعفة التركيز فى حالة استخدام ١٠ ملل من العينة.

*حضن الأنابيب على ٣٥ – ٣٧ مئوية

*بعد ٢٤ ساعة ، ٤٨ ساعة من التحضين، اختبر الأنابيب تحت أشعة فوق بنفسجية طويلة الموجة فى غرفة مظلمة

*انتاج صبغةخضراء مشعة Fluorescent هى علامة الاختبار المبدئى الموجب .

الاختبار التأكيدى Confirmed test

- أكد الأنابيب الموجبة للاختبار المبدئى بحقن ١,. ملل من المزرعة فى مرق الأسيتاميد أو على سطح الأسيتاميد آجار المائل فى الأنابيب.

- ظهور لون ارجوانى (دليل على الوسط القاعدى) خلال ٢٤ – ٣٦ ساعة من التحضين على درجة ٣٥ – ٣٧ مئوية دليل على تأكيد الايجابية لتواجد سيدوموناس ايريوجينوزا

gtz Partner for the Future. Worldwide.

الاضرار الخلوى لبكتريا القولون
Coliform Cellular Stress (Injury)

أولا: نظرة عامة

gtz Partner for the Future. Worldwide.

الاضرار ببكتريا القولون ينتج عن أى تغير فى:

- عمليات التمثيل الغذائى العادية، خاصة من خلال فقد فى النشاط الانزيمى
- تحلل فى أحماض الريبونيوكليك RNA ،
- كسر فى الجديلة الأحادية والثنائية لحامض الديسوكسى ريبونيوكليكٍ Single and double strand breakage in DNA
- أو تسرب فى مكونات السيتوبلازم Leakage of cytoplasmic constituents.

- أى من هذه التغيرات فى تركيب الخلية، النفاذية Permeability ، وخصائص البناء الحيوى ليس من الضرورى أن تقتل الكائنات، ولكن **تتطلب اطالة الوقت للاصلاح الخلوى Cellular repair قبل امكانية حدوث النمو والتكاثرمرة أخرى.**

- الكشف عن تواجد بكتريا القولون المضارة يجب أن يحظى بالاهتمام فى عمليات معالجة المياه لأنها تكشف عن عدم مناسبة عمليات المعالجة كمانع أو حاجز أمام التلوث البكتيرى وبالتالى امكانية مرور العوامل الممرضةلى المستهلك.

الاضرار الغير مميت ربما ينشأ فى مصدر المياه عن :

* التلوث بالمعادن الثقيلة
* الفينولات
* المياه الحامضية
* المعالجة بالأشعة الفوق بنفسجية
* عدم مناسبة التعرض للمطهرمن حيث التركيز أو زمن التعرض CT values
* خطوط الخدمة من النحاس
* التضاد Antagonistic responses من خلال انتخاب البكتريا الهتيروتروفية بكثافات عالية.

- هذه البكتريا تتعرض لتثبيط غير قاتل Sublethal inactivation فتصبح مفرطة الحساسية Hypersensitive.

- **الاضرارات ثانوية Secondary stresses** تنشأ عن:

استخدام عوامل الانتخاب Selective agents فى بيئات الزراعة المستخدمة فى المعمل.

وكنتيجة، فان وقت التجهيز أو الاعداد Lag time فى منحنى النمو يمتد الى ٢ ــ ٥ ساعات اعتمادا على قوة الاضرار

الاضرار الثانوى المتسبب عن تشغيل العينة فى المعمل Laboratory processing يجب أن يحد منه من خلال:

- الاهتمام يبدأ بجمع العينة فيجب أن يتم فى وجود مقدار كاف من عامل ازالة الكلور Dechlorinating agent فى زجاجة جمع العينةلايقاف فعل الكلور بسرعة.
- العينة يجب ان تبقى باردة خلال النقل لمنع النمو المضطرد للكائنات التى تتداخل فى الاختبار Interfering أو يكون لها فعل مضاد Antagonistic.
- العينات التى لا تختبر فور استلامها فى المعمل تتعرض للتغير المحسوس فى سيادة الكائن وربما تحجب النشاط التمثيلى لبكتريا القولون المضارة.

- المعمل يجب أن يأخذ فى الاعتبار البحث فى ناتج المعالجة خلال الشتاء وتوزيع مناطق سكون المياه خلال الصيف وعندما تزيد اعداد البكتريا الهتيروتروفية عن ١٠٠٠ كائن/ملل. وفى أى من الوضعين فان الكشف عن بكتريا القولون ربما يعاق.

- **عوامل الانتخاب Selective agents**

المستعملة فى البيئات الروتينية ربما تشارك فى الاضرار الثانوى والذى يضعف من الكشف على بكتريا القولون المضارة الا اذا امتدت فترة التحضين القياسية ٢ – ٤ ساعات او استعمال خطوة انعاش Resuscitation فى زراعة أولية قبل النقل الى البيئة المتخصصة Selective medium والمحتوية على المكونات ذات النشاط السطحى مثل الديسوكسى كوليت Deoxycholate.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

- باستخدام البيئات المعتاد استعمالها فى الكشف كميا عن بكتريا القولون فى مياه الشرب، مثل الاندو آجار m-Endo agar ، تكون مصحوبة بمعدلات منخفضة من أعداد البكتريا المضارة مع انخفاض امكانية التفرقة ما بين بكتريا القولون والبكتريا الأخرى. وهناك اتجاه واعد وعن طريق استخدام بيئة **m-T7** لتحسين استخلاص بكتريا القولون الكلية المضارة فى مياه الشرب.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

- وعلى ذلك، فان الاضرار Injury يمكن أن يؤدى الى تقديرات غير حقيقية للدلائل البكتيرية طالما أن من ١٠الى أكثر من ٩٠% من البكتريا المتواجدة فى مياه الشرب ربما تكون مضارة وبالتالى لا يمكن اكتشاف وجودها وربما يؤدى ذلك الى الحصول على نتيجة سالبة غير حقيقية False negative results وبالتالى يكون تحديد نوعية مياه الشرب غير صحيح مما يدع فرصة لامكانية حدوث أضرار صحية لاحتمال وجود ممرضات أو قد يؤدى الى تخلل الدلائل خلال مراحل المعالجة. هذا ولقد تم الربط ما بين تواجد البكتريا المضارة وعملية التطهير الجزئية أو الغير مناسبة .

- البكتريا المعوية المرضية أقل حساسية من بكتريا القولون للاضرار Injury تحت ظروف مشابهة لتلك فى المياه والمخلفات السائلة المعالجة، وبالتالى فان الممرضات المضارة تحتفظ بقوة الشراسة Virulence وتشفى بعد ابتلاعها. وبناء على ذلك، فان الطرق التى تسمح بتنمية وعد بكتريا القولون المضارة تنتج تقدير أكثر حساسية لقوة المخاطر الصحية. هذا الاستنتاج أيد أكثر بالملاحظة أن الفيروسات والممرضات المتولدة عن المياه والتى تكون حويصلات Cysts هى الأخرى أكثر مقاومة عن الدلائل البكتيرية لضغوط البيئية .

بعض المعامل تتبع طريقة فى جمع العينات ربما ينتج عنها اضرار أو تعمل ضغط ثانوى على الكائن هذا يشمل:

- التخزين لمدة طويلة
- الاحتفاظ بالعينة المخففة أكثر من ٣٠ دقيقة قبل حقنها فى بيئة التنمية
- الاحتفاظ بالعينات الملقحة قبل التحضين على الحرارة المناسبة
- تركيب البيئة الغير صحيح
- عدم خلط العينة جيدا بالبيئة المركزة
- التعرض للبيئة المسالة والغير ملطفة Tempered
- العدد المرتفع من البكتريا الأخرى غير الدلائل

gtz Partner for the Future. Worldwide.

الاضرار الخلوى
ثانيا: زيادة الاستخلاص
Recovery Enhancement

gtz Partner for the Future. Worldwide.

بالنسبة للعينات المعالجة بالكلور يجب التأكد من:

- وجود كمية كافية من عامل ازالة الكلور فى زجاجة العينة (راجع مذكرة QC/QA)،
- مع تواجد تركيزات عالية من أيونات العناصر الثقيلة فى العينة احرص على اضافة Chelating agent (راجع مذكرة QC/QA)
- حد من زمن التخزين (راجع مذكرة QC/QA)
- عند تخفيف العينة فى وجود أيونات المعادن الثقيلة استخدم محلول منظم من ماء الببتون Buffered peptone water وحد من استخدام الماء المنظم Buffered water.
- بعد عمل التخيف احقن البيئة خلال ٣٠ دقيقة.

- انعاش الكائنات المضارة أو المضغوطة Stressed or injured organisms يزيد بحقن العينات فى بيئة تخصيب Enriched، غير قاتلة عند درجة حرارة متوسطة.

- عندمما تكون نتائج اختبار أنابيب التخمر المتعددة Multiple tube fermentation test عاليةعن نتائج أغشية الترشيح Membrane filter أو يكون هناك علامة على ان استخلاص الأخيرللبكتريا ليس كامل فانه يكون هناك احتمال الاضرار Injury واستعمل واحدة أو أكثر من الطرق التالية فى الكشف عن البكتريا المضارة

١.البكتريا المضارة من خلال التأثير على المثيل الغذائى لها
Metabolically injured:

يمكن تدارك وجودها من خلال الفرق بين الاعداد الناتجة بالزراعة على Minimal media بتلك الأعداد التى تظهر على بيئة كاملة Complete media.

٢.استخلاص بكتريا القولون الكلية باستخدام أغشية الترشيح

Recovery of Injured Total Coliform Bacteria Using Membrane Filtration

.m-T7 agar

استخدم بيئة m-T7 مع طريقة أغشية الترشيح السلبق ذكرها. وتركيب البيئة كما يلى:

Proteose peptone No. 3 ……..	5 g.
Yeast extract ……	3 g.
Lactose ……	20 g.
Tergitol 7 ……..	0.4 ml
Polyoxyethylene ether W1 ……..	5 g.
Bromothymol blue ……	0.1 g.
Bromocresol purple ……	0.1 g.
Agar ……..	15 g.
Reagent grade water ……	1 L.

- أضبط الى pH ٧,٤ باستعمال ٠,١ نورمال صودا كاوية بعد التعقيم عند ١٢١ درجة مئوية لمدة ١٥ دقيقة.
- بطريقة معقمة أضف ١ ميكروجرام بنسيلين ج / ملل عندما تكون البيئة قد بردت الى حوالى ٤٥ درجة مئوية.

- بعد ترشيح العينة من خلال غشاء الترشيح ضع الغشاء على بيئة m-T7 وحضن على ٣٥ مئوية لمدة ٢٢ -٢٤ ساعة. مستعمرات بكتريا القولون تكون صفراء.

تحقق منVerify مالا يقل عن ١٠% من مستعمرات بكتريا القولون بالطريقة السابق ذكرها3 Module)).

ويجب التمييز الجيد ما بين المستعمرات الصفراء والخلفية التى تظهر من البكتريا التى لا تتبع بكتريا القولون .

- اضافة كبريتيت الصوديوم الى بعض البيئة (٠,٠٥ – ٠,١ %) يمكن أن يحسن من الكشف عن بكتريا القولون بعد التعرض للكلورامين وليس الكلور.

٣ . استخلاص بكتريا القولون البرازية المضارة باستخدام أغشية الترشيح
Recovery of Injured Fecal Coliform Bacteria Using Membranr Filtration

٣ . ١ . التعجيل بالتخصيب - الحرارة
Enrichment-temperature acceleration

- استعمل طبقتان من الآجار M-FC عليها طبقة من بيئة غير متخصصة Nonselective لا تحتوى على جلوكوز مثل Tryptic soy agar مع التحضين ساعتين على ٣٥ مئوية متبوعة بالتحضين على ٤٤,٥ مئوية لمدة ٢٢ ساعة.

تحضر الأطباق بها طبقة بيئة M-FC ولكن لا تضاف الطبقة العليا من البيئة الغير متخصصة الا قبل الاستعمال بساعة على الأكثر.

* وكبديل استعمل التخصيب المسبق Pre-enrichment فى بيئة مرق فينول ريد لاكتوز والتحضين عند ٣٥ مئوية لمدة ٤ ساعات متبوعة بالتحضين على بيئة M-FC على ٤٤,٥ مئوية لمدة ٢٢ ساعة.
* كبديل آخر ، حضر الطبقتان من البيئة الغير متخصصة والمتخصصة وحضن ١,٥ على درجة حرارة الغرفة (٢٢-٢٦ مئوية) متبوعة بالتحضين على ٣٥ مئوية لمدة ٤,٥ ساعة ثم على ٤٤,٥ لمدة ١٨ ساعة (Stuart et al., 1977).

٣ . ٢ . التأقلم الحرارى Temperature acclimation Green

هذه الطريقة هى تطوير لطريقة الحرارة المرتفعة Elevated temperature procedure من خلال التحضين المسبق Preincubation للمزارع على بيئة M-FC لمدة ٥ ساعات على ٣٥ مئوية، متبوعة بالتحضين على ٤٤,٥ مئوية لمدة ١٨ +/- ١ ساعة . استعمل حضانة مبرمجة بحيث يتم رفع الحرارة أوتوماتيكيا بعد الفترة الأولى لكى تكون الطريقة عملية وتكون مناسبة للتطبيق.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

٣. ٣ . **حذف المادة المثبطه** Deletion of suppressive agent

حذف حامض الروزوليك Rosolic acidمن بيئة M-FC والتحضين للمزارع على ٤٤,٥ +/- ٢, درجة مئوية لمدة ٢٤ ساعة. مستعمرات بكتريا القولون البرازية تكون زرقاء على البيئة المعدلة وتفرق عن المستعمرات الكريم، الرمادية، والخضراء الباهتة والتى تنتج من البكتريا الأخرى والتى لا تتبع بكتريا القولون البرازية.

Seite ٢٥

gtz Partner for the Future. Worldwide.

٣ . ٤ . **بيئة بديلة - التأقلم الحرارى** Alternative medium-temperature acclimation

استخدم بيئة m-T7 مع التحضين ٨ ساعات على ٣٧ مئوية متبوعة بالتحضين على ٤٤,٥ لمدة ١٢ ساعة

Seite ٢٦

gtz Partner for the Future. Worldwide.

٣. ٥ . التحقق من بكتريا القولون البرازية المضارة
Verification of stressed fecal coliform bacteria

تعديل البيئات والطرق ربما يقلل من انتقاء selectivity وتفريق مستعمرات بكتريا القولون البرازية. وعلى ذلك، فاذا أستعملت أى طريقة معدلة ، تحقق من مالا يقل عن ١٠ % من المستعمرات الزرقاء من عينات مختلفة.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

٤ . استخلاص البكتريا السبحية البرازية المضارة باستخدام أغشية الترشيح
Recovery of Stressed Fecal Streptococci Using Membrane Filtration

باستعمال بيئة مرق الصفراء Bile broth ينتج استخلاص مقارن بلاختبارات أنابيب التخمر المتعددة Multiple tube fermentation(Lin, 1974).
التحضين المسبق لأغشية الترشيح على بيئة تخصيب لمدة ساعتين على ٣٥ درجة مئوية متبوعة بالزرع على بيئة m-enterococcus agar لمدة ٤٨ +/- ٢ ساعة على درجة ٣٥ مئوية.
التحقق من البكتريا السبحية البرازية المضارة يتم على ١٠% على الأقل من المستعمرات من عينات مختلفة باستعمال الاختبارات التأكيدية (Module 3).

gtz Partner for the Future. Worldwide.

طرق الكشف السريعة

Rapid Detection Methods

gtz Partner for the Future. Worldwide.

- هناك حاجة واضحة الى الطرق التى تسمح بتقدير النوعية البكتريولوجية للمياه سريعا.
- خلال الحالات الطارئة والتى تشمل عدم نجاح عملية المعالجة، كسر فى خطوط توزيع المياه، أو اى تلف ف مصدر المياه ناتج عن كارثة يكون هناك حاجة ماسة الى التقييم السريع للحالة الصحية للمياه.
- مثاليا، فالطرق السريعة يجب أن تكون نتائجها حقيقية وذات مستوى حساسية مساوية للاختبارات القياسية والتى تستخدم روتنيا.
- الاختبارات السريعة تقع فى نوعيتين، تلك التى تشمل تعديل فى الطرق التقليدية Conventional procedures وتلك التى تحتاج الى اجهزة ومواد خاصة.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

١ . اختبار السبع ساعات لبكتريا القولون البرازية

Seven- HourFecal Coliform Test

هذه الطريقة مشابهة لطريقة أغشية الترشيح ولكن مع استعمال بيئة وحرارة تحضين مختلفتين لاعطاء نتائج فى ٧ ساعات والتى هى مشابهة للطريقة القياسية لبكتريا القولون البرازية:

gtz Partner for the Future. Worldwide.

البيئة

هذه البيئة ربما لا تكون متاحة على صورة جاهزة لذا يلزم تحضيرها من M-7 h FC agar مكوناتها وهى:

Proteose peptone No. 3 or polypeptone ……	5	g.
Yeast extract ……..	3	g.
Lactose ……..	10	g.
d-Mannitol ……	5	g.
Sodium chloride ……..	7.5	g.
Sodium lauryl sulfate ……..	0.2	g.
Sodium desoxycholate ……..	0.1	g.
Bromocresol purple ……..	0.35	g.
Phenol red …… .	0.3	g.
Agar ……	.15	g.
Reagent-grade water …… ……	1	L

- رشح حجم مناسب من العينة خلال مرشح غشائى وضع الفلتر على سطح طبق يحتوى على بيئة M-7 h FC agar وحضن عند ٤١,٥ درجة مئوية لمدة ٧ ساعات . مستعمرات بكتريا القولون البرازية تظهر بلون **أصفر** (وهذا يدل على تخمر سكر اللاكتوز).

طرق خاصة Special Techniques

هناك العديد الطرق الخاصة السريعة معظمها ليس حساس بالدرجة اكافية لقياس نوعية مياه الشرب أو انها غير متخصصة. ربما تكون نافعة فى عمليات المراقبة Monitoring للمخلفات السائلة والمياه الطبيعية ولكنها تحتاج الى دلائل Reagents ليست متوافرة بصفة عامة، تحتاج الى تداول خاص أو نظام تحضين غير مناسب مع برامج معظم المعامل.

- فيما عدا الطرق اللونية Cholorimetric test، فلا يوجد ما هو مناسب للاستعمال الروتينى وربما تستعمل كوسائل بحثية.

- يجب أن يشير المستعمل الى المراجع عن الطريقة والمذكورة فى الجدول عن التفاصيل ، ظروف الاستعمال، وحدود الطريقة.

- الطرق الموافق عليها هى طريقة الأدينوسين تراى فوسفات ATP، الاختبار اللونى لتقدير العدد الكلى، وطريقة Radiometric لتقدير بكتريا القولون البرازية والتى يستخدم فيها الكربون المشع.

١ . اختبار بيوليومينيسنس (تقدير العدد الكلى للميكروبات الحية)

Bioluminescence Test (Total Viable Microbial Measurement)

اختبار Firefly luciferase test لتقدير ATP فى الخلايا الحية يعتمد على التفاعل مابين انزيم ليوسيفيريز، ليوسيفرين الذى يعمل عليه الانزيم، أيونات المغنسيوم، و ATP. يشع الضوء خلال التفاعل ويمكن قياسه كميا ويربط Correlate مع كمية ATP المستخلصة من عدد معين من البكتريا. وعندما تكون كل مواد التفاعل عدا ATP بكمية زائدة، فان ATP يكون هو العامل المحد Limiting factor

* اضافة ATP يقود التفاعل ، ينتج نبضات من الضوء طبقا لتركيز ATP.

- التقدير لا يستغرق أكثر من ساعة . ولمراقبة المجتمعات الميكروبيه فى المياه، فان تقدير ATP يحدده الحاجة الى تركيز البكتريا من العينة لتحقيق أقل مستوى من الحساسية لقياس ATP، والذى هو ٥١٠ خلية/ملل. وعند ترشيح ١ لتر على أغشية الترشيح فان الطريقة تعطى مستوى الحساسية المطلوب.

٢ . الكشف بالقياس الاشعاعى Radiometric Detection (Fecal Coliforms)

- فى هذا الاختبار ، ينطلق ثانى أكسيد الكربون المشع 14CO2 من استعمال 14C . الطريقة تسمح بتقدير مبدئى Presumptive detection لما بين ٢ -٢٠ من بكتريا القولون البرازية فى ٤,٥ ساعة.
- الاختبار يستعمل مرق M-FC، مانيتول مشعع 14C-mannitol، ودرجتى حرارة تحضين؛ ٢٤ ساعة عند ٣٥ مئوية متبوعة بساعتين ونصف الساعة عند ٤٤,٥ مئوية وذلك بالنسبة لبكتريا القولون البرازية. ويضاف اللاكتوز المشعع عند بداية التحضين عند ٤٤,٥ مئوية.

- تستعمل اغشية الترشيح لتركيز الكائنات من العينة ويوضع الفلتر على مرق M-FC broth فى وعاء محكم.

الناتج من 14CO يجمع بالتعرض لأقراص ورق ترشيح مشبعة بأيدروكسيد الباريوم ٢ Ba(OH).

- يقدر النشاط الاشعاعى للكربون بطريقة

Liquid scintillation spectrometry.

الاختبار الانزيمى لبكتريا القولون

Enzyme Substrate Coliform Test

- **مقدمة**

الاختبار الانزيمى يستخدم مادة قابل للتحلل المائى للكشف المتزامن عن انزيمات بكتريا القولون الكلية وايشيريشيا كولاى.

عند استعمال الطريقة الانزيمية، فان مجموعة القولون الكلية تحدد بأنها كل البكتريا التى لديها انزيم بيتا-دلتا- جالاكتوسيديز B-D-galactosidase، الذى يكسر المادة الملونة Cleaves the chromogenic substrate، ويؤدى الى انفصال المادة الملونه Chromogen.

- ايشيريشيا كولاى تحدد على أنها البكتريا التى تعطى استجابة لبكتربا القولون الكلية ولديها انزيم بيتا-جليكيرونيديز B glucuronidase والذى يكسر المادة الملونه وتنفصل مادة تتوهج Fluorogen.

- يمكن استعمال الاختبار فى صورة الأنابيب المتعددة-Multiple tube، الحفر المتعددةMuti-well ، أو التواجد-الغياب-Presence absence(عينة واحدة ١٠٠ ملل) .

بكتريا القولون الكلية

- المواد مولدة الصبغات Chromogenic substrates مثل ارثو-نيتروفينيل- بيتا- دلتا- جالاكتوبيرانوسيد Ortho-nitrophenyl-B-D- galactopyranoside (ONPG) أو كلورو-فينول ريد – بيتا – دلتا- جالاكتوبيرانوسيد Chloro- phenol red-B-D-galactpyranoside (CPRG)

- استعملت للكشف عن انزيم بيتا-دلتا-جالاكتوسيديز B-D-galactosidase والذى ينتج بواسطة بكتريا القولون الكلية.

- انزيم بيتا-دلتا-جالاكتوسيديز B-D-galactosidase يحلل مائيا المادة التى يعمل عليها Substrate وينتج تغير فى اللون، والذى يدل على ان الاختبار موجبلبكتريا القولون الكلية بعد ٢٤ ساعة (ONPG) أو ٢٨ ساعة (CPRG) بدون طرق أخرى.

- البكتريا التى لا تتبع بكتريا القولون مثل أجناس ايروموناس Aeromonas وسيدوموناس Pseudomonas، ربما تنتج كميات صغيرة من انزيم بيتا-دلتا-جالاكتوسيديز B-D-galactosidase، ولكن تثبط وعادة لا تنتج استجابة موجبة خلال زمن التحضين الا اذا وجد أكثر من ٤١٠ وحدة تكوين المستعمرات CFU / ملل.

ايشيرشيا كولاى *Escherichia coli*

تستعمل مادة يعمل عليها الانزيم Fluorogenic مثل ٤-ميثيل – امبيليفيريل-بيتا-دلتا-جلوكيورنيد
4-methyl-umbelliferyl-B-D- glucuronide (MUG)، لملاحظة وجود انزيم بيتا-جلوكيرينيديز B-glucuronidase، والذى تنتجه ايشيريشيا كولاى . هذا الانزيم يحلل المادة المستخدمة MUG وينتج مادة تتوهج Fluorescent فى وجود الأشعة الفوق بنفسجية طويلة الموجه (365 nm). وجود هذا التوهج يدل على الايجابية لايشيريشيا كولاى.

- بعض السلالات من الشيجيلا ربما تظهر هى الأخرى ايجابية للاختبار فتعطى التوهج تحت الأشعة الفوق بنفسجية .

- لأن الشيجيلا هى الأخرى مرضية للانسان ، فان وجودها الآخر يدل على الخطورة من تناول المياه أى أن وجودها يدل على الحالة الصحية للمياه وعلى ذلك لا يؤخذ على الاختبار ايجابيتة لبكتريا أخرى خلاف ايشيريشيا كولاى.

التطبيقات Applications

الاختبار الانزيمى لبكتريا القولون يوصى به لتحليل عينات مياه المصدر والشرب.

- المعامل التى تخطط لاستعمال هذه الطريقة يجب أن تجرى فى نفس الوقت اختبارات كمية(تشمل الاختلافات الموسمية)بأحد الاختبارات القياسية لبكتريا القولون لتقييم فعالية الاختبار لنوعية معينة من الماء ستحلل ومقارنة الطريقتين. هذا يكون له أهمية خاصة عند اختبار مصادر المياه.
- عينات المياه الحتوية على هيوميك او مواد أخرى ربما تتلون. اذا كان هناك خلفية ملونه، قارن الأنابيب الملقحة بالنسبة لأنبوبة مرجعية Control تحتوى عينة مياه فقط.

* فى بعض نوعيات المياه، املاح الكالسيوم المرتفعة تستطيع أن تسبب ترسيب ولكن هذا لا يجب أن يؤثر على التفاعل.

* لا تستعمل مادة يعمل عليها الانزيم Substrate لتأكيد مزارع بكتريا قولون مبدئية Presumptive coliform culture أو مستعمرات من أغشية الترشيح Membrane filter colonies، لأن المادة التى يعمل عليها الانزيم ربما تتأثر بالجرعة العالية من البكتريا الغير تابعة لبكتريا القولون والتى تنتج انزيم بيتا-دلتا-جالاكتوسيديز الضعيف B-D- galactosidase وتعطى نتائج ايجابية زائفة False positive results

الاختبار الانزيمى Enzyme Substrate Test

- **البيئة Substrate Media**

التراكيب متوافرة تجاريا (Colilert and Colilert 18 for multi-tube, PLA and tray formats, Colilert MW for multi-tube format, and Colisure for multi-tube and P/A formats, available from IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME.).

على صورة أنابيب جاهزة للاستعمال عند الحاجة Disposable طريقة الأنابيب المتعددة ، وفى صورة حفر متعددة (Multi-wells Quanti-Tray)

- فى حالة طريقة الحفر المتعددة، أو فى أوعية التى سوف تحوى ١٠٠ ملل من العينة لطريقة التواجد/ الغياب. امنع تعرض المادة التى يعمل عليها الانزيم طويلا لأشعة الشمس المباشرة.

- خزن البيئة طبقا للتوجيهات واستعملها قبل انقضاء تاريخ الصلاحية تخلص من البيئة التى تغير لونها.

- **الطريقة Procedure**

طريقة الأنابيب المتعددة Multiple-tube procedure

- اختار العدد المناسب من الأنابيب لكل عينة والتى سبق ووزعت البيئة بهالاختبار الأنابيب المتعددة ويكتب عليها.
- اتبع تعليمات المصنع لتحضير التخفيفات المتتابعة لمختلف التركيبات.
- بطريقة معقمة أضف ١٠ ملل من العينة لكل أنبوبة، غطها باحكام، واخلط بشدة لتذوب.

- المخلوط يبقى عديم اللون فى اختبار ONPG فى الاساس ويتحول الى اللون الأصفر فى حالة CPRG .

- بعض الجزيئات ربما تبقى غير ذائبة خلال الاختبار؛ هذه سوف لا تؤثر على كفاءة الاختبار.

- حضن عند ٣٥ +/- ٥, درجة مئوية لمدة يحددها مصنع المادة التى يؤثر عليها الانزيم Substrate.

- يمكن اجراء الطريقة أيضا باضافة كميات مناسبة من البيئة التى بها المادة التى يعمل عليها الانزيم الى العينة وخلطها بشدة ثم توزيعها فى خمسة أو عشرة أنابيب معقمة ، حضن طبقا لطريقة الأنابيب المتعددة.

طريقة الحفر المتعددة Multi-well procedure

طريقة الحفر المتعددة تجرى باستخدام اسبات جاهزة معقمة Sterilized disposable baskets.أضف العينة الى اناء ١٠٠ ملل مع المادة التى يؤثر عليها الانزيم، هز بشدة، وصب فى الصينية Tray.

- توزع العينة فى الحفر Wells وتغلق العبوة باحكام.

- حضن عند ٣٥ +/- ٥, درجة مئوية لمدة تحدد بواسطة مصنع المادة التى يعمل عليها الانزيم.

طريقة التواجد/الغياب

Presence/absence procedure

بطريقة معقمة أضف البيئة السابق وزنها الى ١٠٠ ملل من العينة فى زجاجة بوروسليكات، معقمة، شفافة لا تتوهج Nonfluorescent.*
اختياريا، أضف ١٠٠ ملل من العينة الى المادة التى يعمل عليها الانزيم فى وعاء معقم من امداد المصنع.

- بطريقة معقمة غط واخلط بشدة للاذابة.
- حضن طبقا لارشادات المصنع

التفسير Interpretation

- **بكتريا القولون الكلية Total coliform bacteria**
  - بعد أقل فترة تحضين مناسبة ، اختبر الأنابيب أو الأوعية للتغير المناسب فى اللون.
  - ONPG يتحلل بانزيم البكتريا ليعطى لون أصفر. CPRG يتحلل بانزيم البكتريا ليعطى لون أحمر.
  - اذا لم يكن اللون متناسق خلال الأنبوبة، اخلط بالقلب قبل القراءة.
  - اقرأ تعليمات المصنع والخطوط الاسترشادية لتفسير النتائج.

- بعض المصنعين ينصح بمقارنة لون الأنابيب بألوان مقارنه متاحة من المصنع
- العينات تكون سالبة لبكتريا القولون الكلية اذا لم يلاحظ لون فى اختبارات ONPG أو اذا كانت الأنبوبة صفراء عند استعمال CPRG.
- اذا كانت الاستجابة اللونية محل تساؤل بعد ١٨ أو ٢٤ ساعة بالنسبة لاختبار ONPG، حضن لمدة ٤ ساعات اضافية.
- اذا كانت الاستجابة سالبة بعد ٢٨ ساعة بالنسبة لاختبار CPRG حضن لمدة ٢٠ ساعة اضافية. اذا كان التلوين كثيف فان العينة تكون موجبة لبكتريا القولون الكلية، أما اذا لم يكن، فان العينة تكون سالبة.

ايشيرشيا كولاى Escherichia coli

- اختبر الأنابيب الموجبة لبكتريا القولون الكلية للتوهج Fluorescenseباستعمال لمبة أشعة فوق بنفسجية طوياة الموجه 365 nm ويفضل أن تكون قوتها ٦ وات.

- وجود التوهج يدل على أن الاختبار ايجابى لايشيريشيا كولاى. اذا كان التوهج محل شك أو غير واضح، حضن لمدة ٤ ساعات اضافية لاختبارات ONPG وحتى٢٠ ساعة لاختبارات CPRG ووجود توهج مركز يدل على الايجابية .

gtz Partner for the Future. Worldwide.

التقرير Reporting

اذا اجريت طريقة العد الأكثر احتمالا MPN، فيحسب العدد الأكثر احتمالا لبكتريا القولون الكلية وايشيريسيا كولاى من عدد الأنابيب الموجبة. واذا استخدمت طريقة التواجد/الغياب ، فان النتائج تكتب على صورة بكتريا القولون الكلية وايشيريشيا كولاى تتواجد أو غائبة فى ١٠٠ ملل من العينة.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

التحكم فى الجودة Quality Control

اختبر كل لوط من البيئة المشتراه لكفاءتها بالحقن بثلاث بكتريا مرجعية :

- ايشيريشيا كولاى
- بكتريا قولون كلية خلاف ايشيريشيا كولاى مثلا انتيروباكتر كلوكا
- بكتريا لا تتبع بكتريا القولون.
- وايضا أضف مياه معقمة مرجعية.
- أذا اعطت المياه المرجعية توهج باهت أو نتيجة ايجابية باهتة بالنسبة لبكتريا القولون، اهمل واستعمل Batch جديد من المادة التى يعمل عليها الانزيم Substrate.

- تجنب استعمال حقن كثيف Heavy inoculum.

- اذا استعملت Pseudomonas كمثال للبكتريا الغير قولونية اختار جنس لا يعطى توهج Nonfluoresent species

- حضن المرجعيات Controls عتد ٣٥ +/- ٥, درجة مئوية . اقرأ وسجل النتائج .

العد الكلى المباشر للبكتريا
Direct Total Microbial Count

- عد خلايا البكتريا المباشر فى المياه أو المخلفات السائلة عادة يفوق الأعداد المتحصل عليها من عد البكتريا الهتيروتروفية بالأطباق وذلك راجع للخطأ المتسبب عن الظواهر المتعلقة بالحيوية مثل الانتقاء Selectivity لبيئة النمو، تجمع الخلايا Clumbing والبطء فى معدل النمو.

Epifluorescence Microscopic Method

هذه الطريقة تعطى عد مباشر للعدد الكلى بسرعة (٢٠ – ٣٠ دقيقة) وبحساسية.

لا تسمح بالتفرقة بين خلايا البكتريا على أساس التقسيم، نشاط التمثيل الغذائى، أو الحيوية

- لا يمكن استعمالها لتقدير الكتلة الميكروبية Microbial biomass للاختلافات الكبيرة فى حجم الخلايا. الطريقة تحتاج الى خبرة الفنى الذى يستطيع التفرقة ما بين الخلايا الميكروبية والرواسب على أساس الشكل.

- تتركب الطريقة من تثبيت العينة للتخزين، الصبغ بصبغة Fluorochrome الترشيح بالتفريغ على غشاء بولى كربونات Nonfluorescing polycarbonate membrane، والعد بواسطة Epifluorescence microscopic

الأجهزة Apparatus

* ميكروسكوب Microscope
* مصدر للأشعة الفوق بنفسجية رأسى بحقل مستوى،
* عدسة زيتية X ١٠٠ لتعطى قوة تكبير كلية X ١٠٠٠ على الأقل.
* عينية للعد Counting graticule
* عدسة عينية ميكروميتريه ocular lens micrometer مدرجة بمسرح ميكرومترى Calibrated with stage micrometer.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

* **مرشحات Filters**
وتشمل فلاتراثارة Excitation filters (KP 400 and LP 455) ، شاطر أشعة Beam splitter(LP 510) وفلتر حاجز Barrier filter (LP 520 using mercury lamp, HBO 50).

* **خلاط أو جهاز فورتكس Blender or vortex mixer**

* **وحدة ترشيح Filtration unit** مناسبة للاستعمال بأغشية ترشيح قطر ٢٥ مم.

Seite ٦٥

gtz Partner for the Future. Worldwide.

* **أغشية ترشيح Membrane filters** من نوع البولى كربونات قطر ٢٥ مم، قطر الثقوب ٠,٢ ميكرون (يكون غير متوهج Nonfluorescent أو يجهز بغمس الغشاء فى Irgalan black ٢ جرام /اللتر من ٢% حامض خليك] لمدة ٢٤ ساعة ، ويغسل فى الماء ويجفف هوائيا) ؛ سليولوزى قطر ٢٥ مم، قطر الثقوب ٥ ميكرون.

***سرنجات Syringes** ٣ ملل لا يعاد استعمالها ويركب عليها فلاتر ٠,٢ ميكرون ولا يعاد استخدامها أيضا.
***أنابيب اختبار Test tubes** زجاجية بغطاء قلاووظ ١٣ X ١٢٥ مم.

Seite ٦٦

gtz Partner for the Future. Worldwide.

❖ **الدلائل أو الكشافات Reagents**

•**محلول فوسفات منظم Phosphate buffer**
أذب ١٣,٦ جرام KH2PO4 فى ماء وخفف الى ١ لتر .
أضبط عند pH 7 ؛ رشح خلال غشاء ترشيح ٠,٢ ميكرون.
مثبت Fixative ٥ % (وزن/حجم) جلوتارلدهيد فى محلول فوسفات منظم محضر حديثا.

* **فلوركروم FDluorochrome** ٠,١ % (حجم/ وزن)
اكريدين برتقالى فى محلول فوسفات منظم .
* **زيت للعدسة الزيتية منخفض التوهج Immersion oil, low fluorescing**

gtz Partner for the Future. Worldwide.

٤ . الطريقة Procedure

* اجمع العينات.
* أضف ٩ ملل من العينه الى انبوبة اختبار محتوية علة ١ ملل مثبت. العينة المثبته يمكن تخزينها عند ٤ مئوية حتى ٣ أسابيع بدون نقص معنوى فى أعداد الخلايا.
* وزع وخفف عينات من مصادر mesotrophic or eutrophic للحصول على نتائج .
* اخلط عينه باستعمال خلاط أو فورتكس، وخفف ١/١٠ فى محلول فوسفات منظم.
* عينات المياه النقية ربما لا تحتاج الى تخفيف ولكن الحجوم الكبيرة (أكبر من ١٠٠ ملل) ربما يحتاج اليها للحصول على أعداد حقيقية.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

* ضع ١ ملل من العينة أو تخفيف منها على مرشح بولى كربونات غير متوهج nonfluorescent مدعم بغشاء سليولوزى Cellulosic membrane filter فى Filter holder
* باستعمال فلاتر تركب على سرنجة، أضف ١ ملل فلوركروم وانتظر دقيقتان، أضف حوالى ٣ ملل محلول منظم من الفوسفات المرشح للسماح بتوزيع أكثر للخلايا.
* وكبديل، اخلط الفلوركروم مع العينة فى انبوبة صغيرة، واسمح بالتفاعل،

أضف الخليط الى Filter holder

gtz Partner for the Future. Worldwide.

- رشح بالتفريغ (حوالى ١٣ kPa) .
- اغسل باستعمال ٢ ملل من الفوسفات المنظم ورشح.
- أزل مرشح البولى كربونات بملقط وجفف هوائيا لمدة ١ – ٣ دقيقة.
- يمكن قطع الفلتر الى ٤ أجزاء ويحفظ اذا لزم.
- ضع الفلتر المجفف على نقطة من الزبت Immersion oil على شريحة ميكروسكوب نظيفة.
- أضف نقطة صغيرة من نفس الزيت على سطح الفلتر.
- بلطف غط الفلتر بغطاء شريحة Cover.
- يمكن تخزين العينة بضع شهور بدون فقد للتوهج Fluoresence

* اختبر على الأقل ١٠ مجالات عشوائية مختارة على الفلتر باستعمال عدسة زيتية X ١٠٠ (اذا لم تكن توزيع الخلايا منتظم خفف العينة وعاود الخطوات).
* يفضل عد ١٠ – ٥٠ خلية فى المجال.
* عد الخلايا فى ٢٠ مربع على الأقل وباستعمال عدسة عينية مقسمة.

•الحسابات Calculations

احسب المتوسط لاعداد الخلايا على الفلتر.
عدد الخلايا/ملل= (متوسط الخلايا/المربع) X (مربعات/فلتر) X (معامل التخفيف)/ حجم العينة ملل.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

الفطريات

FUNGI

gtz Partner for the Future. Worldwide.

- الفطريات وليدة المياه هى الأخرى كائنات انتهازية والتى هى غالبا ذات مدلول صغير من وجهة نظر الصحة العامة، وعلى ذلك فان تواجدها فى بعض الحالات يؤدى الى استعمار جسم الانسان ومن الممكن أن تؤدى الى مضاعفات مميته.

- وفى مواقف أخرى تنشأ الاصابات الفطرية من استعمال جرعات عالية من المضادات الحيوية والعلاج الذى يؤدى الى انخفاض المناعة. وفى حالة الاصابات العرضية الغير مميته، ربما يتسبب الفطر فى ظهور الحساسية، التوكسينات الفطرية Mycotoxins، اصابات جلدية، الأظافر، الشعر، اصابات فى أعضاء التناسل.

وسيلة الانتقال فى الغالبية العظمى عن طريق الهواء أو الماء فى المنزل، المستشفيات، والينابيع الساخنة Spa.

وجدت الفطريات الخيطية شائعة فى البيئات المائية، ولكن لم يحظى تواجدها فى مياه الشرب سوى اهتمام قليل.

كنتيجة لتجزء الميسيليا ومقاومة الجراثيم للتطهير، ربما تمر السلالات المختلفة المتواجدة فى مصادر المياه الخام خلال المرشحات الرملية وتقاوم عمليات التطهير بدرجات واسعة والتى تؤدى الى الاختلاف فى الازالة. وبينما معالجة المياه الخام بالتجلط الكيماوى والتطهير فعالة لازالة الفطريات، فان تلك الكائنات تواجدت فى ٤ من ١٢ عينة معالجة.

فشل عمليات المعالجة فى ازالة خيوط الفطر وجراثيمه بالكامل يجعل من ذلك طريق الى التواجد فى نظم التوزيع.

هناك مصادر اضافة أخرى للفطر الى خزانات المياه المعالجة تنشأ من التلوث بالتراب الموجود الهواء أو نتيجة دخول التربة الملوثة الى الشبكات من خلال كسرأو اثناء عمليات الاصلاح.

بدخول الفطريات نظام التوزيع، ربما يثبت الفطر نفسه وبسرعة فى رواسب المواسير وفى مناطق نشوء الفيلم الحيوى. على أن المناطق المفضلة لاستيطان الفطر هى مكان وصلات المواسير والمركبات المستخدمة لمنع التسرب بين الوصلات

لأن الكونيديا فى الفطريات الخيطية المتشعبة Filamentous مقاومة للكلور المتبقى فى خطوط التوزيع (٣,. مجم/اللتر) فان عمليات استيطان الفطر تتم دون القضاء عليها بعمليات التطهير المعتادة.

النمو الزائد للفطر فى مواطن تكون الفيلم الحيوى Biofilm يمكن أن يشكل احتياج الى الكلور Chlorine demandوالذى من شأنه أن يخفض من المتبقى من المطهر فى شبكة المواسير.

تكرارية تواجد وتوزيع الأجناس Profile من الفطر فى مصدر المياه ربما يختلف كانعكاس للاختلاف الموسمى فى درجة الحرارة، مصدر المياه، ونظم المعالجة. فمثلا، ١٧,٦ % من ٩٧٨ عينة جمعت من خطوط النقل ونظام التوزيع لمحطة مياه بنيفادا الجنوبية كانت ايجابية للفطر.

.فى دراسة أخرى على ٦ نظم مياه جوفية معالجة بالكلور فى بنسلفانيا ونيو جيرسى تواجد الفطر فى ٥٥،٢ % من ٧٢٧ عينة مختبرة.

المياه الدافئة تعتبر مناسبة لنمو الفطر فى نظم التوزيع. وكان النمو عند ١٣ – ٢٠ درجة مئوية أكثر من الحرارة المرتفعة ما بين ٢٠ – ٢٩ درجة مئوية.

ربما يرجع ذلك الى التنافس بنمو البكتريا الهتيروتروفية عند الحرارة المرتفعة والتى يكون لها تأثير معاكس على نمو الفطر.

*الفطريات تختلف حسب نوعية مصدر المياه الخام. ولقد وجد أن مياه نهر تحتوى فطريات محبة للحرارة Thermopile fungi اكثر من ماء بحيرة. والقليل معروف عن التنوع فى الفطريات فى خطوات المعالجة على أنه لوحظ أن هناك تغيرات فى نوعيات الفطر مع التغير فى pH كنتيجة المعالجة بالجير ,كذلك نتيجة للمعالجة بالكلور.

* وجد ان كثافة الفطر فى مصادر المياه مختلفة، جزئيا بسبب البيئة المختارة للزرع ودرجة حرارة ومدة التحضين. عدد الفطريات الخيطية المختلفة والخميرة التى وجدت فى ٩٧٨ عينة مجمعة من محطة مياه فى جنوب نيفادا خلال فبراير- يوليو ١٩٨٨ صنفت فى ٢٠ جنس وكانت الأجناس الشائعة هى Cladosporium, Phoma, and Candida parapsilosis.

فى حين كانت فى حالة نظامى توزيع (أحدهما معالج بالكلور والآخر غير معالج) فى جنوب كاليفورنيا ، هى Penecillium, Sporocybe, Acremonium, and Paeciolomyces . وكان متوسط الكثافة للفطر فى حالتى النظام المعالج والغير معالج هو ٣٤ و ١٨ كائن / ١٠٠ ملل، على الترتيب.

فى أوروبا لوحظ نفس النموذج من الفطريات الخيطية، فكان الجنس Aspergillus fumigatus هو الشائع فى نظم التوزيع لخمسة عشر مصدر فى فنلندا.

*فى انجلترا كان الشائع *Cephalospdrium* sp,*Verticillium* sp., *Trichoderma sporulosum, Nectria veridesceus, Phoma* sp., and *Phialophora* sp. وكان عدد الفطر فى هذه المياه أقل من ١٠/١٠٠ ملل.

ولأن الفطر يتكاثر عادة بالجراثيم أكثر من التجزئة Fragments للميسيليا، ربما كان ذلك حجة على أن تواجد الفطر فى مصادر المياه هو وليد المصادفة يعنى أنه ينتج من التلوث من الهواء أكثر من امكانية استعماره نظام التوزيع.

*الشواهد المتاحة تدل على أن، عدد الفطر المرتفع جدا والمتواجد فى بعض العينات يمكن تفسيره بدخول الجراثيم عرضيا الى النظام أو اثناء جمع العينة.

*استعمار الفطر يتواجد فى اماكن الفيلم الحيوى والذى ربما يكون صنبور الحريق، الخزانات أو الملحقات على مواسير التوزيع فى المساكن.

*النمو اللزج Slime الذى يظهر على مخارج التسرب البطىء من الصنابير وجد أنه يرجع الى نمو هيفات الفطر لجنسين من *Fusaria* . وفى هذه الحالة فان هذا النمو يعود الى تلوث عند منطقة التسرب وليس نتيجة وجود الفطر فى المياه وخروجه عند فتحة الصنبور.

الفطر شاملا الخميرة والأجناس الخيطية أو العفن، واسع الانتشار. وهى كائنات هتيروتروفية لها نواة وذات جدر صلبة. وهى ربما تتواجد حيث تتواجد المواد العضوية الغير حية، على الرغم من أن بعض الأجناس مرضى والبعض الآخر طفيلى.

المياه شديدة التلوث يكون أصل الفطر فيها من النوعيات التى تعيش فى التربة. على أن الارتباط ما بين كثافة الفطر وتواجد المادة العضوية جعل هناك امكانية اتخاذ تواجد الفطر على أنه دليل على التلوث. ولسوء الحظ لم يمكن اتخاذ جنس معين أو مجموعة معينة على أنها مهمة فى هذا

gtz Partner for the Future. Worldwide.

*هناك بعض الاستثناءات، فلكون الخميرة Candida lambica لديها القدرة على استخدام سكريات البنتوز، اتخذ تواجدها دليل على التلوث بمخلفات صناعة الورق والتى هى غنية بالسكريات من هذا النوع.

وبعض أجناس الخميرة والفطر الخيطى تعتبر من صفات المياه الدافئة ولذلك ربما تكون نافعة كدليل على التلوث الحرارى.

ولأن الفطريات لديها القدرة على انتاج العديد من الانزيمات، فان لها القدرة على النشاط التحليلى لمعظم المواد الطبيعية المعقدة وكذلك بعض المركبات التركيبية وتشمل المبيدات الحشرية.

Seite ١٣

gtz Partner for the Future. Worldwide.

*معظم الفطر هوائى أو قليل الاحتياج للأكسوجين Microaerophilic، علىالرغم من أن القليل يظهر تمثيل غذائى لاهوائى وقليل جدا منها له القدرة على النمو لاهوائيا تماما.

*بعض الأجناس لا تحتاج الى هواء. من الممكن أن يكون الفطر مصدرالطعم فى المياه.

*فيما عدا Aspergillus fumigatus, A. flavus and A. niger فان الفطريات التى عزلت من المياه لا يمكن اعتبار أن لها أهمية طبية. على أن الاصابة بالفطريات اعتبرت أن لها أهمية فى حالة الأفراد منخفضى المناعة.

Seite ١٤

gtz Partner for the Future. Worldwide.

الفطريات فى مياه التنزه Fungi in recreational waters

بعض الفطريات الممرضة للانسان ربما تتواجد فى مياه التنزه مثل حمامات السباحة والشواطىء وفى أماكن الاستحمام (الدش).

Trichophyton mentagrophytes يسبب التينيا Tinea pedis والتهاب القدم Athletes foot وعزلت من أرض الدش. وكثير من الأجناس الممرضة عزلت من رمال الشواطىء فى هاواى والمانيا.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

حيويتها مع المعالجة بالكلور Survival on chlorination

الخمائر قاومت ١ مجم من الكلور الحر لمدة ٢٠ دقيقة.

ايشيرشيا كولاى لم تقاوم أكثر من ٥ دقائق مقاومة لوجود ٠،٠٣ . مجم كلور.

الكانديدا البيكانس Candida albicans لا تقاوم ٤ مجم كلور لمدة ٣٠ دقيقة عندما كان عددها ٥١٠ / ملل.

بالنسبة للخميرة من نوع C. parapsilosis وهى تسبب مشاكل صحية فى المناطق الاستوائية وجد أنها شديدة المقاومة عن بكتريا القولون.

*خلايا الفطر وخاصة الكونيديا يمكن أن تقاوم الكلور أكثر من بكتريا القولون وذلك عند التعرض لمدة ١٠ دقائق لمقدار ١٠ مجم / اللتر من الكلور عندما كان عدد الجراثيم ٦١٠ / ملل.

نماذج النمو Growth patterns

في المياه يوجد نموذجين لنمو الفطر.

١. فطريات الماء الحقيقية True aquatic fungi تنتج Zoospores أو جاميطات Gametes متحركة بفلاجلا.

بعض الفطريات خاصة المتواجدة فى الحشرات لها طور طور أميبى Amoeboid stage.

٢. يوجد نموذج آخر لنمو الفطر يكون غير متحرك فى جميع مراحل دورة الحياة. ويكون النمو والتكاثر لاجنسى Asexual

*أمكن معرفة ٣ اشكال للنمو

(١) نمو خيطى Filamentous growth بجراثيم تنتج بتركيب خاص

(٢) نمو خيطى متفرع مع التجزء لتكون جراثيم فردية تسمى arthroconidia

(٣) نمو خلوى فردى ينتج على كل خلية أبوية تسمى التبرعم Budding كم فى الخميرة.

وحيث تتكاثر الفطريات تتوافر المادة العضوية فى المياه أو التربة.

وتواجد أكثر من نوع هو دليل على تأقلم تلك الأنواع للظروف البيئية المتوافرة.

*وبحصر تواجد الفطريات فى المياه، المخلفات السائلة والمواد العضوية الملوثة وجد ٩٨٤ جنس: ١٣٣ جنس تنتمى الى Mastigomycotina لها Zoospores بفلاجلا؛ ٧٩ تنتمى الى Zygpmycotina؛ ١٦١ تنتمى الى Ascomycotina؛ ١٨ Baidiomycotina؛ ٥٩٣ تنتمى الىDeuteromycotina.

طرق الزراعة:

١ . طريقة الأطباق المصبوبة Poured plate

العينات

تجمع العينات كما سبق (QC/QA) ويمكن استعمال أمبولات بلاستيكيه لها غطاء محطم. وهى عادة معقمة وتنقل رأسية ويتخلص منها بعد الاستعمال. يمكن الاحتفاظ بالعينات ٢٤ ساعة.

اذا لم يتم التحليل عقب الجمع تحفظ العينات فى الثلاجة.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

البيئات

للعد،

Neopeptone-glucose-rose bengal-aureomycin agar هى البيئة المعتادة ولو أن الخبرة أظهرت أن Czapek agar (فى حالة Aspergillus, Penicillium and related fungi) و Yeast extract-malt extract-glucose agar or Diamalt agar(للخمائر) ربما تكون مفضلة و لتقدير الخصائص Inventory استعمل Neopeptone-glucose agar.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

Neopeptone-glucose-rose Bengal aureomycin agar

5 g. neopeptone, 10 g. glucose, 3.5 mL rose Bengal solution (1 g/100 ml reagent-grade water), 20 g. agar in 1 L reagent-grade water.

يفضل توزيعها فى أنابيب بكميات ١٠ ملل وتعقم فى الأوتوكلاف ، النهائى حوالى pH ٦,٥.

*حضر محلول كلورتتراسيكلين أو تتراسيكلين (١جرام مضاد قابل للذوبان / ١٥٠ ملل reagent-(grade water واحفظه فى الثلاجة. قبل الاستعمال، عقم بالترشيح.

*لاستكمال البيئة، أضف ٠,.٥ ملل محلول معقم لى ١٠ ملل من البيئة الأساسية المنصهرة والمبردة عند ٤٥ مئوية.

*حضر محلول كلورتتراسيكلين أو تتراسيكلين (١جرام مضاد قابل للذوبان / ١٥٠ ملل reagent-(grade water واحفظه فى الثلاجة.

*قبل الاستعمال، عقم بالترشيح. ولاستكمال البيئة، أضف ٠,.٥ ملل محلول معقم لى ١٠ ملل من البيئة الأساسية المنصهرة والمبردة عند ٤٥ مئوية.

*قبل الاستعمال، عقم بالترشيح. ولاستكمال البيئة، أضف ٠,.٥ ملل محلول معقم لى ١٠ ملل من البيئة الأساسية المنصهرة والمبردة عند ٤٥ مئوية.

Czapek (or Czapek-Dox) agar

أذب ٣٠ جرام سكروز، ٣ جرام نترات الصوديوم ، ١ جرام داى بوتاسيوم هيدروجين فوسفات، ٠,.٥ جرام سلفات المغنسيوم ، ٠,.٥ جرام كلوريد البوتاسيوم، ٠,.١ كبريتات الحديدوز، ١٥ جرام آجار فى لتر Reagent-grade water. بعد التعقيم يكون pH ٧,٣.

.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

***هذه البيئة نافعة عند عزل Aspergillus, Penicillum, Paecilomyces وبعض الفطريات الأخرى المشابهة فى الاحتياجات الفسيولوجية.**

Yeast extract-malt extract-glucose agar .

أذب ٣ جرام مستخلص الخميرة، ٣ جرام مستخلص المولت، ٥ جرام نيوببتون، ١٠ جرام جلوكوز و ٢٠ جرام آجار فى لتر Reagent-grade water لا حاجة لضبط pH.

هذه البيئة مفيدة فى عزل الخمائر.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

Yeast extract-malt extract-glucose agar .

*أذب ٣ جرام مستخلص الخميرة، ٣ جرام مستخلص المولت، ٥ جرام نيوببتون، ١٠ جرام جلوكوز و ٢٠ جرام آجار فى لتر Reagent-grade water لا حاجة لضبط pH.

*هذه البيئة مفيدة فى عزل الخمائر.

Diamalt agar

أذب ١٥٠ جرام دياموات و ٢٠ جرام آجار فى لترReagent-grade water لا حاجة لضبط pH. البيئة تكون عكرة ولا حاجة للترشيح. هذه البيئة مفيدة فى تنقية عزلات الخميرة ولدراسة أجناس الخميرة فى الاختبارات الخاصة المختلفة

gtz Partner for the Future. Worldwide.

Neopeptone-glucose agar .

أذب ٥ جرام نيوببتون، ١٠ جرام جلوكوز ، ٢٠ جرام آجار فى لتر-Reagent grade water.

بعد التعقيم يكون pHالبيئة ٦,٥. وهذه البيئة معروفة باسم Emmon's Sabouraud Agar أو Emmon's Sabouraud Dextrose Agar.

البيئة مفيدة لحفظ المزارع.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

. الطريقة Procedure

يمكن تحليل ٤٠ عينة بواسطة شخص واحد، ولكن المفضل أن تكون ٢٠ عينة.

التحضير والتخفيف Preparation and dilution

الى دورق معقم سعة ٢٥٠ ملل أضف ١٣٥ ملل Reagent0grade water مقم ، ١٥ ملل من العينة لتحصل على تخفيف ١ : ١٠ من العينة. استعمل وسيلة قياس معقمة لكل عينة، أو أقل تفضيلا، اغسل وسيلة أخذ العينة بماء معقم بين العينات المختلفة.

اخلط العينة جيدا قبل سحب الجزء منها (١٥ ملل) . هز الدورق على هزاز على ١٢٠-١٥٠ دورة فى الدقيقة لمدة ٣٠ دقيقة أو انقل محتويات الدورق الى خلاط، غطه واخلط عند السرعة المنخفضة لمدة دقيقة أو عند السرعة العالية لمدة ٣٠ ثانية. يفضل استعمال كأس خلاط معقم لكل عينة، أو اغسل جيدا بين العينات بماء معقم. ربما يتم عمل تخفيفات أكثر باضافة ٤٥ ملل ماء معقم الى ٥ ملل من تخفيف ١ : ١٠.

للعينات المأخوذة من مجرى تخفيف ١ : ١٠ يكون عادة مناسب.خفف العينات ذات المحتوى العالى من المواد العضوية مثل الرواسب الى ١ : ١٠٠ أو ١ : ١٠٠٠ . جوانب المجرى أو عينات التربة تخفف الى ١ : ١٠٠٠ أو ١: ١٠٠٠٠.

عمل الأطباق Plating

للاختبار حضر ٥ أطباق من كل تخيف. لاستخدام Neopeptone-glucose-rose Bengal-aureomycin agar انقل بطريقة معقمة ١٠ ملل من البيئة عند ٤٥ درجة مئوية الى طبق بترى قطر ٩ سم . أضف ١ ملل من تخفيف العينة المناسب واخلط كما سبق فى حالة اختبارات البكتريا. وكبديل أضف الى طبق البترى ١ ملل من العينة، ٥.و. محلول مضاد حيوى، ١٠ ملل من البيئة عند ٤٣ الى ٤٥ مئوية. دع الآجار يتصلب بسرعة .

التحضين

لا تقلب الأطباق. حضن على درجة حرارة الغرفة (٢٠ – ٢٤ مئوية) فالضوء ولكن امنع التعرض لضوء الشمس المباشر. اختبر وعد الطباق بعد ٣,٥,٧ أيام .

العد

عد الفطريات فى الأطباق يمدنا بالأساس للمقارنة الكمية الغير دقيقة بين العينات والتخصيص يمدنا بمعلومات أهم عن الأجناس.

عند تحضير الأطباق استعمل جزء من العينة الذى من الممكن أن يعطى حوالى ٥٠ الى ٦٠ مستعمرة على الطبق. وعند اختبار نوعية جديدة اختبر على الأقل تخفيفين من العينة.

* يمكن عد حتى ٣٠٠ مستعمرة ولكن استبعد الأطباق الكثر ازدحاما. البيئة المحتوية على Rose Bengal تميل الى اعطاء مستعمرات منفصلة كما تسمح بنمو الكائنات البطيئة فى نموها. التصنيف المباشر مطلوب ويعتمد أساسا على المورفولوجى ويمكن حساب نسبة كل جنس من العدد الكلى فى العينة بانسبة للحجم المختبر والتخفيف المستخدم من العينة.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

طريق فرد الأطباق Spread plate technique

العينات

كما سبق فى طريقة الأطباق المصبوبة

البيئات Media

استعمل أى من البيئات التالية: Aureomycin-rose Bengal-glucose-peptone agar and streptomycin-tetramycin-malt extract agar

وهى ذات فائدة فى تحليل عينات المياه والصرف الصحى.

Neopeptone-glucose-rose Bengal aureomycin agar, Czapek , Yeast extract-malt extract-glucose agar, Diamalt agar.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

لتحضير بيئة Aureomycin-rose Bengal- glucose-peptone agar

أذب ١٠ جرام جلوكوز، ٥ جرام ببتون، ١ جرام بوتاسيوم داى هيدروجين فوسفات، ٠,٥ جرام كبريتات المغنسيوم ، ٠,٣٥ جرام روز بنجال ، ٢٠ جرام آجار فى ٨٠٠ ملل Reagent-grade water وعقم. أذب ٧٠ مجم أوروميسين هيدروكلوريد فى ٢٠٠ ملل Reagent-grade water، عقم بالترشيح وأضفها الى الآجار المبرد (٤٢-٤٥ مئوية). ال pH يجب أن يكون ٥,٤. صب ٢٥ ملل فى أطباق معقمة ودع البيئة تتصلب.

الأطباق المصبوبة يمكن حفظها عند ٤ مئوية لمدة تصل الى ٤ أسابيع.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

لتحضير بيئة Streptomycin-terramycin-malt extract agar

أذب ٣٠ جرام مستخلص المولت، ٥ جرام ببتون، ١٥ جرام آجار فى ٨٠٠ ملل Reagent-grade water وعقم. أذب ٧٠ مجم من كلا من الاستربتوميسين والتيراميسين كلا فى ١٠٠ ملل Reagent-grade water وعقم بالترشيح، أضفها الى الآجار المبرد (٤٢-٤٥ مئوية) . pHالبيئة يجب أن يكون ٥,٤. صب حوالى ٢٠ ملل فى أطباق معقمة ودعها تبرد. الأطباق المصبوبة يمكن الاحتفاظ بها عند ٤ مئوية لمدة تصل الى ٤ أسابيع.

Seite ٣٥

gtz Partner for the Future. Worldwide.

الطريقة Procedure

طريقة الأطباق المصبوبة.

اجر التخفيف فى ماء منظم Buffered water ، واختار التخفيفات التى تعطى ما بين ٢٠ الى ١٥٠ مستعمرة فى الطبق.

اعداد الأطباق Plating

الأطباق يسبق تجفيفها مفتوحة فى Laminar flow على درجة حرارة الغرفة ورطوبة نسبية ٣٠% لمدة ١- ١,٥ ساعة. حضر ٣ أطباق أو ٥ ،اذا كانت النتائج سيتم تحليلها احصائيا، لكل عينة أو تخفيف.

Seite ٣٦

باستعمال ماصة معقمة انقل ١ ملل من العينة أو التخفيف الى سطح كل طبق سبق تجفيفه. وزع على سطح الطبق باستعمال قضيب زجاجى على شكل حرف L كما سبق بالنسبة للاختبارات البكتريولوجية أو باستخدام جهاز لفرد العينة.

التحضين

الأطباق المغلقة وبعد جفافها على حرارة الغرفة، اقلب الأطباق، وحضن عند ١٥ مئوية لمدة ٧ أيام، فى جو عالى الرطوبة (٩٠ – ٩٥ %). وكبديل حضن عند ٢٠ مئوية لمدة ٥ – ٧ أيام. الفطر ذا النمو البطىء ربما لا ينتج مستعمرات مرئية حتى ٦ أو ٧ أيام.

. **العد والتسجيل** Counting and recording

عد المستعمرات باستخدام Quebec colony counter على الطبق. اذا كان من الضرورى تأخير العد استثنائيا، احفظ الأطباق على ٤ مئوية لمدة لا تزيد عن ٢٤ ساعة. اعتمادا على حجم المستعمرة، الأطباق المحتوية على حوالى ١٥٠ مستعمرة يمكن عدها ولكن العدد الأمثل هو ١٠٠ مستعمرة فى الطبق.

سجل النتائج كوحدة نكوين المستعمرة / ١٠٠ ملل CFU/100 mL من العينة الأصلية. وبالنسبة للعينات الصلبة أو شبه الصلبة يقدر العدد كوحدة تكوين المستعمرة CFU/ جرام رطب أو جاف ويفضل الجاف. اذا استعمل ٣ أطباق أو أكثر لكل عينة، استعمل المتوسط .

*أذا كان هناك أطباق لم تعطى أعداد يسجل العدد أقل من ١ مضروبا فى أعلى تخفيف. واذا كان هناك أعداد أعلى من ١٥٠ فى الطبق سجل النتيجة على أنها أعداد كبيرة لآ تعد Too numerous to count (TNTC). اذا كانت المستعمرات مزدحمة ومتلامسة أو متركبة Overlapping منتشرة، تسجل النتيجة ظلامية Obscured (OBSC)

*كرر التحليل مع استخدام تركيزات أقل (تخفيفات أعلى) أو فحص مبكر.

طريقة أغشية الترشيح Membrane filter technique.

استخدم بيئة aureomycin-rose Bengal-glucose-peptone agar المعدلة أو غير المعدلة وكذلك يمكن استعمال بيئة modified streptomycin-terramycin-malt extract agar. هذه البيئات حضرت طبقا للتركيب السابق للبيئة الغير معدلة فيما عدا أن المضاد الحيوى رفع من ٧٠ مجم / اللتر الى ٢٠٠ مجم/اللتر.

*توزع البيئة بكمية ٥ ــ ٧ ملل فى كل طبق ويفضل الأطباق محكمة الغلق.

*يستعمل حجم العينة أو التخفيف منها الذى يعطى من ٢٠ ـ ١٠٠ مستعمرة فى الطبق. تحضين الأطباق مقلوبة ويتم على ١٥ مئوية لمدة ٥ أيام فى جو رطب. وكبديل حضن عند ٢٠ مئوية لمدة ٣ أيام أو أطول اعتمادا على تواجد الفطر.
*العد وحفظ الأطباق كما سبق. الأطباق النموذجية تحتوى على ٢٠ ـ ٨٠ مستعمرة على الفلتر.

الخميرة Yeast

ذكر أن ان الخميرة تتواجد فى مصادر المياه، ولكن المعلومات عن تكرارية تواجدهان كثافتها، استعادة النمو محدودة. هذا الوضع ليس لأن هذه الكائنات ليس لها مغزى كممرضات انتهازية، ولكن البحث أكثر فى هذا المجال مطلوب اجراؤه على كل ما يرتبط بالبيئة والتى تؤدى الى ايجاد بيئة للخميرة فى الماء ودورها فى الامراض الناتجة عن التلامس مع الماء.

كانديدا البيكانز *Candida albicans* تنتمى الى الممرضات الانتهازية والتى تصبح خطيرة بالنسبة للأشخاص المجهدين Stressed من الاصابة بالسكر، السرطان ، وانخفاض المناعة المصاحبة للاصابة بالايدز أو استعمال مثبطات المناعة Immunosuppressants فى نقل الأعضاء واستعمال المضادات الحيوية الممتدة المفعول Broad-spectrum. الاصابات بالخميرة من الحفاضات بين الأطفال والأعضاء التناسلية فى السيدات نتيجة استعمال مياه ملوثة أو الممارسة الجنسية هى اصابات أقل حدة ولكن لازالت تضعف المصاب.

من المعروف أن الخميرة تتواجد فى مختلف الحيوانات ذات الدم الدافىء وتشمل الانسان، الكلاي، الحمام، نورس لبحر. كثافتها فى المخلفات الآدمية ربما تصل الى ١٠٠,٠٠٠/جرام وفى مخلفات الصرف الصحى الخام Raw sewage تتفاوت ما بين بضع آلاف الى ٢٥,٠٠٠مستعمرة / اللتر. وفى الصرف الصحى المعالج بالكلور وجدت بكثلفة ٤٠٠ مستعمرة/ اللنر، بينما فى مياه النهر وجدت بكثافة ما بين أقل من ٢ الى ١٢٥. فى البحيرات تذبذب وجود الخميرة حسب نوعية المياه ممثلة فى المادة العضوية الناتجة من صرف المخلفات والأمطار الغزيرة ، موت وتحلل النباتات موسميا، ازدهار الطحالب Algal blooms، وانقلاب مياه البحيرة Lake turnover

عملية التجلط الكيماوية Chemical coagulation لمصدر المياه الخام تزيل ٩٠ – ٩٩% من الخميرة مع ازالة على الأقل٩٠% من المتبقى بالترشيح الرملى. ولسوء الحظ، فان التطهير يكون أقلفعالية. فلقد وجد أن الخميرة تقاوم الكلور المتبقى حتى مستوى ١,٢ مج/اللترفى مياه الصنبور. هذه الزيادة فى المقاومة لكلور الحر بالنسبة للخميرة ناتج مبدئيا عن سمك وصلابة Rigidity الجدار الخلوى والذى يكون مانع للنفاذية بالنسبة للكلور. وعلى العكس فان التطهير بالأوزون يكون فعال بدرجة مساوية لتأثيره على البكتريا.

كثافة الخميرة فى مياه الشرب ربما تكون بمتوسط ١,٥ كائن / اللتر. هذا العدد البسيط يمكن أن يتوقع زيادته قليلا فى شبكة التوزيع حيث تضبط الخميرة نفسها مع الظروف بيئة المواسيروتستعمرها ببطء. والمواقع ذات الكثافة العالية من الخميرة ربما تكون أجزاء المواسير القديمة ، نهايات الشبكات، والأماكن ذات المياه الساكنة فى الشبكة. كثافة الخميرة فى دراسة على نظامى توزيع فى فرنسا حيث المعالجة بالكلور تراوحت ما بين ١ – ٢٨ / ملل وتواجدت فى ٥٠% من العينات المختبرة.

وبتصنيف الخميرة المعزولة من المياه الموزعة وجد أنها تتبع *Candidaparapsilosis, C. albicans, Cryptococcus laurentii, Rhodstorula glutins and R. rubra.* ومن هذا فان أجناس الكانديدا هى الممرضات الانتهازية الأكثر خطورة.

طريقة للخمائر Technique for yeasts.

من أعداد الفطريات المتصل عليها من المياه الملوثة حوالى ٥٠% ربما تكون مستعمرات خميرة. البيئات الصلبة السابق ذكرعا لا تسمح بنمو كل الخمائرن وعلى ذلك، فان طريقة التخصيب الكمية Quantitative enrichment ربما تكون ذات فائدة بالاضافة الى عد الأطباق Plate count.

البيئات

للتخصيب Enrichment استعمل مرق Yeast nitrogen base-glucose broth وللعزل استعمل Yeast extract-glucose agar or Diamalt agar.

Yeast nitrogen base-glucose broth أذب ١٣,٤ جرام Yeast nitrogen base فى لتر Reagent-grade water، عقم بالترشيح. حضر ٥٠٠ ملل من كلا من التركيزين ٢% ، ٤٠ % من الجلوكوز وعقم كلا منفرد بالترشيح.

*لعمل البيئة النهائية، أضف بطريقة معقمة الى ٢٥٠ ملل دورق معقم ٢٥ ملل من محلول Yeast nitrogen base ، ٢٥ ملل من أى من ٢% أو ٤٠% من محلول الجلوكوز لعمل ١% أو ٢٠% تركيزجلوكوز نهائى. سد الفلاسكة بسدادة قطن وخزنها الى وقت الاستعمال.

Yeast extract-malt extract-glucose agarسبق ذكرها.

Diamalt agarسبق ذكرها.

الطريقة

٥ . ٣ . ١ . تحضير العينة والتخفيف Sample preparation and dfilutionكما سبق.

التخصيب Enrichment

فى دورق ٢٥٠ ملل حضر yeast nitrogen base medium containing 1% glucoseوفى آخر yeast nitrogen base medium containing 20% glucose

* احقن ١ ملل من التخفيف المناسب من العينةوحضن على درجة حرارة الغرفة على هزاز (١٢٠ – ١٥٠ لفة / الدقيقة لمدة ٦٤ ساعة على الأقل.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

العزل Isolation

*خذ الدوارق من على الهزاز ودعها ساكنة لمدة ٤ ــ ٥ ساعات. اذا تواجدت خلايا الخميرة سترسب وتبقى البكتريا والفطريات الخيطية فى المعلق ويطفو الفطر وربما يتعلق بجدار الدورق الزجاجى.

*بواسطة لوب من سلك النيكل كروم خذ لوب من الراسب عند سطح التقاء الراسب مع السائل أعلاه وازرع بالتخطيط على Yeast extract –malt extract glucose agar.

*استعمل ٣ أطباق لكل دورق.

Seite ٥١

gtz Partner for the Future. Worldwide.

*حضن على حرارة الغرفة بعيدا عن ضوء الشمس المباشر لمدة يومين الى ثلاث أيام.
*ليس من الضرورى قلب الأطباق.
*للحصول على مزرعة نقية التقط من مستعمرات منفصلة وأعد التخطيط على أطباق من نفس البيئة أو على أطباق من بيئة Diamalt agar.

Seite ٥٢

gtz Partner for the Future. Worldwide.

العد Counting

من الصعب الوصول الى عدد حقيقى بعد عملية التخصيب والعزل.

اذا افترض أن خلية واحدة فى العينة الأصلية سوف تنتج مستعمرة واحدة أو أكثر على الطبق بعد التخصيب، فيمكن أن يذكر أن الخمائر أو نوع معين منها، يتواجد عند الحد الأدنى من الأعداد اعتمادا على التخفيف الأعلى الموجب.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

الفطر الممرض للانسان

Fungi

Pathogenic to Human

gtz Partner for the Future. Worldwide.

Occurrence and Significance تواجده ومغزاه.

العزل الروتينى للفطر من المجارى المائية الملوثة ومحطات معالجة المخلفات السائلة عادة ينتج أجناس قليلة نوعا ما ممرضة للانسان وغيره من الحيوانات الراقية. *Geotrichum candidum* وجد أنه مرتبط بحالات مرضية فى الولايات المتحدة وعزل عالميا.

Exopphiala mansonii هو أحد مسببات عادة فى المناطق الاستوائية Chromomycosis.

كذلك *Aspergillus fumigatus* المسبب لحالة Pulmonary aspergillosis.

Seite ٥٥

gtz Partner for the Future. Worldwide.

*Pseudallescheria boydii المسبب لحالة Eumycotic mycetomas. الاصابة تحدث من جرح تلوث باستخدام مواد ملوثة أو استنشاق مواد ملوثة مثل المواد المتنائرة (الرذاذ) فى محطات الصرف الصحى أو الهواء الملوث.

*الفطر Scedosporium apiospermumوجوده فى مجرى مائى ربما يمثل انسياب من التربه. وفطريات أخرى Zoopathogenic نادرا ما تم عزلها باعداد بسيطه من المجارى المائية سواء كانت ملوثة أو غير ملوثة. وخميرة Candida albicansاستخلصت باعداد مختلفة محطات معاجة المخلفات السائلة ، المجارى المائية التى تستقبل مخلفات وكذلك من مياه التنزه

Seite ٥٦

في الانسان هذا الفطر عادة يكون معايش أو رفيق، مثل Geotrichum candidumويتواجد مع العائل فى تناسق؛ حتى ٨٠% من البالغين الاصحاء يتواجد لديهم Candida albicans عند مستوى محسوس فى البراز، بينما ٣٥% حاملى لتلك الخميرة فى تجويف الفم وذلك فى غياب أى حالة مرضية. جزء كبير جدا من الاناث لديهم هذه الخميرة فى الجهاز التناسلى بدرجات متفاوته من الكثافة.

تواجد الكانديدا البيكنس فى المخلفات السائلة الغير معالجة، نواتج محطات معالجة المخلفات السائلة ، أو المياه الملوثة ليس من المدهش.

*عزلت من هذه البيئات على البيئات الروتينية المضاف لها المضادات الحيوية والمواد التى تقضى على البكتريا ولكن ليس على البيئات التى ذكرت فى طريقة الطباق المصبوبة أو المذكورة تحت عنوان طرق للخميرة. وعزلت من البيئة البحرية على بيئة Maltose-yeast nitrogen base-chloramphenicol-cycloheximide.

تصنيف *Candida albicans*

يمكن تصنيفها ضمن الخمائر البيضاء والقرنفلية Pink تنمو على أغشية الترشيح السوداء ذات الثقوب قطر ٨,. ميكرون على بيئة Maltose-yeast nitrogen base-chloramphenicol-. cyclohexamide. من كل مستعمرةن احقن ٥,. ملل من سيرم العجل أو الانسان،

حضن عند ٣٧ مئوية لمدة ٢ – ٣ ساعات، انقل نقطة أو اثنين الى شريحة، اختبر ميكروسكوبيا لانتاج انابيب جرثومية germ tubes من معظم الخلايا. من الخمائر البيضاء، *Candida albicans*فقط هى التى تنتج الهيفات القصيرة من الخليى الأب خلال ٢ – ٣ ساعات من التحضين.

Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH
Water & Wastewater Management Program
Holding Company for Water and Wastewater (HCWW),
Corniche El Nil, Water Treatment Plant-Road El Farag
Tel.: +2 02 245 98 405/411
Fax: +2 02 245 98 405/411
Website: www.gtz.de

الوكالة الألمانية للتعاون الفني
برنامج إدارة مياه الشرب و الصرف الصحي
الشركة القابضة لمياه الشرب و الصرف الصحي
كورنيش النيل محطة مياه ريض الفرج
تليفون : ٠٠٢٠٢ ٢٤٥ ٩٨ ٤٠٥/٤١١
فاكس: ٠٠٢٠٢ ٢٤٥ ٩٨ ٤٠٥/٤١١
موقع إلكتروني: www.gtz.de