USAID | EGYPT
FROM THE AMERICAN PEOPLE

مشروع دعم قطاع مياه الشرب و الصرف الصحي

الشركة القابضة لمياه الشرب والصرف الصحى

البرنامج التدريبى
ميكروبيولوجيا المياه

تم إعداد هذا المستند بواسطة شركة كيمونكس إنترناشيونال ليقدم للوكالة الأمريكية للتنمية الدولية.

البرنامج التدريبي ميكروبيولوجيا المياه

مشروع دعم قطاع مياه الشرب و الصرف الصحي

ممول من الوكالة الأمريكية للتنمية الدولية

Contract No. EPP-I-00-04-00020-00, Order No. 3 T-2012.03.134

المحتويات

أولا: نظرة عامة على البرنامج التدريبى (ميكروبيولوجيا المياه)

١. الهدف العام للدورة التدريبية
٢. المجموعة المستهدفة
٣. عدد المتدربين
٤. منهجية التدريب
٥. مساعدات التدريب
٦. قائمة الموضوعات
٧. مكان التدريب و طريقة الجلوس بجلسات التدريب

ثانيا: خطة التدريس بالدورة التدريبية (ميكروبيولوجيا المياه)

١. أهداف الدورة
٢. موضوعات الدورة
٣. مدة الدورة
٤. البرنامج الزمنى للدورة

أولا: نظرة عامة على البرنامج التدريبى (ميكروبيولوجيا المياه)

١. الهدف العام للدورة التدريبية

تجري في معامل البكتيريولوجي الاختبارات البكتيريولوجيه وهي من ضمن معامل مياه الشرب التى تجرى بها اختبارات فحص جودة المياة وصلاحيتها للاستخدام من الناحيه البكتيريولوجيه . لمعرفة الحمل البكتيري قبل الدخول الى محطات المعالجة وكذلك بعد معالجتها للتحقق من كفاءة عملية المعالجة وتطابق نوعية المياة مع المعايير المحلية والدولية.

وتهدف الدورة الى رفع كفاءة العملين بالمعامل الفرعية التابعة **لشركة مياه الشرب والصرف الصحى لشمال وجنوب سيناء** وتزويدهم بما يتعلق بدراسة والتدريب على التحاليل المختلفة لمياه الشرب والطرق المعتمدة من الجهات المنوط بها وضع المواصفات القياسية لمياه الشرب الناحيه البكتيريولوجيه ، وتشمل هذه التدريبات التدريب على القياسات المختلفة لتقدير دلائل التلوث البكتيري والتى من خلالها يمكن الوقوف على نوعية المياه وتحديد مواصفاتها من حيث الوجهه البكتيريولوجيه ومدي خلوهذه المياه من البكتيريا المعويه الممرضه والتي لها تاثير علي الصحه العامه وعلى جودة المياه من الناحيه البكتيريولوجيه. وسيتم استعراض الطرق المختلفة الممكن اتباعها طبقا للمواصفات القياسيه المحليه والعالميه. كما يتم التدريب على الطرق القياسية لتحديد مدى تلوث مصادر المياه من الناحيه البكتيريولوجيه.

٢. المجموعة المستهدفة

العاملين بمعامل المحطات والعاملين بالمعامل الفرعية التابعة **لشركة مياه الشرب والصرف الصحى لشمال وجنوب سيناء** ، التابعة للشركة القابضة لمياه الشرب والصرف الصحى، والمنوط بهم التحاليل الخاصة بمياه الشرب.

٣. عدد المتدربين

يبلغ عدد المتدربين المقدر لحضور دورة **ميكروبيولوجيا المياه)**

ما بين ----- متدرب من معامل المحطات والمعامل الفرعية.

٤. 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 بنوعية 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 وتوجيه 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 ويتم اختبار عملي للمتدربين علي عينة مياه وكتابة التقرير لمدي صلاحية المياه للشرب والاستخدام من الناحيه البكتيريولوجيه.

- **المراجع العلمية و الكودات و المواصفات:** يتم إعطاء المتدرب المراجع العلمية التى أعتمد عليها والتى يمكن الرجوع إليها لزيادة التعمق فى المجال
- **فى نهاية الدورة يتم تقييم الحاضرين من خلال اختبار تحريرى فى مواد الدورة.**

٥. مساعدات التدريب

- جهاز عرض الشرائح (Power Point Projector)
- سبورة بيضاء أو سبورة ورقية
- شاشات عرض.

٦. مكان التدريب و طريقة الجلوس بجلسات التدريب

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 ٥ × ٧ مترا لتستوعب المتدربين والمدرب لتسمح بسهولة حركة المدرب وإمكانية وصولة لأماكن جلوس المتدربين. ويلزم أن تتوفر بالقاعة الإضاءة اللازمة والتهوية الكافية والأجهزة الصوتية المناسبة.

ثانيا: خطة التدريس بالدورة التدريبية

دورة ميكروبيولوجيا المياه

المحاضر: أ.د. محمد محمد كامل

١) أهداف الدورة

بنهاية الدورة فإن المشاركين سوف يتم تدريبهم على :

- تقدير الحمل البكتيري علي درجتين من التحضين ٣٧ و ٢٢درجه مئويه
- تقدير مجموعة بكتيريا القولون الكليه بطريقتين: ١. العد الاحتمالي MPN ٢. طريقة الاغشيه MF
- تقدير مجموعة بكتيريا القولون البرازيه
- تقدير مجموعة البكتيريا السبحيه البرازيه
- تقدير اعداد الكوليفاج كطريه سريعه للكشف عن التلوث البرازي
- كتابة التقرير في ضوء المواصفات القياسيه المصريه ٢٠٠٧
- تقييم النتائج المتحصل عليها من التحليلات البكتيريولوجيه في المياه
- كتابة التقارير والتعليق علي النتائج المتحصل عليها

٢) موضوعات الدورة

- المقدمة وشرح الهدف من الدورة.
- طرق تقدير الدلائل البيولوجيه في المياه
- الأدوات والأجهزة المستخدمة فى التحليلات البكتيريولوجيه للماء
- الصفات البيولوجيه للماء
- الطرق البيولوجية لقياس تركيز الملوثات
- أعداد التقارير والتعليق على النتائج

٣) مدة الدورة

تستغرق الدورة مدة عشرة أيام متواصلة و يبدأ العمل يوميا من الساعة التاسعة صباحا حتى الساعة الرابعة بعد الظهر، أى مدة سبعة ساعات يوميا يتخللها نصف ساعة لتناول المشروبات والغداء.

ميكروبيولجيا المياه

الميـــــاه:

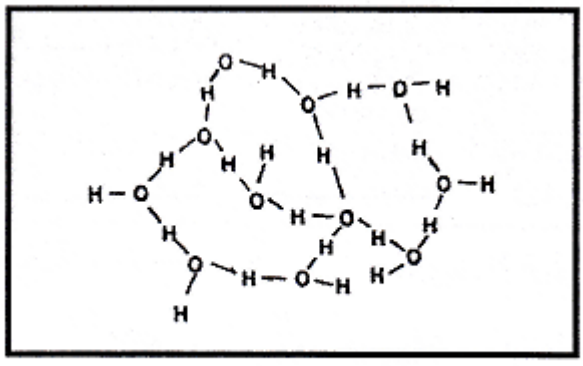
الماء أساس الحياة وتزداد الحاجـة للميـاه كمـا ونوعـا لمختلـف الاسـتعمالات علـى نطاق عالمي يوما بعد يوم بسب زيادة عدد سـكان العـالم وارتفـاع مسـتوي المعيشـة وانتشار الصناعة وزيادة الرقعة الزراعيـة المرويـة إلـى غيـر ذلـك ويعتبـر معـدل استهلاك الفرد للمياه اليوم مؤشرا على مستوي حياة الفرد.

لذلك لابد من إدارة حكيمة لمصادر المياه فى جميع مراحلهـا للمسـاهمة فـى الوصـول لبيئة نظيفة وقابله للاستمرار (Sustainable Development).

خواص الماء Properties of Water:

الماء عبارة عـن مركـب كيمـاوي ينـتج مـن تفاعـل غـاز الأوكسـجين مـع غـاز الهيدروجين ويرمز له (H2O) والأصح أن يرمـز لـه (H2O)n ويتكـون المـاء مـن ايونين هيـدروجين مربـوطين بواسـطة رابطـة تسـاهمية (Covalent Bond) مـع أوكسجين مشحون بشحنه سالبة وبزاويـة تسـاوي (105o) وتكـون جزئيـات الميـاه بالحالـة السـائلة مربوطـة مـع بعضـهما الـبعض بواسـطة روابـط هيدروجينيـة Hydrogen Bond وتكون على شكل عنقود.

وتتميز المياه بخواص فيزيائية وكيماوية تجعلها أهـم مـادة فـى الطبيـة علـى الإطـلاق بالنسبة لجميع أنواع الكائنات الحية.



شكل (١) تماسك جزيئات المياه مع بعضها البعض

يساهم الزحف العمراني والتجمعات السكنية بتأثيرات سلبية على تلوث المياه وجريان المياه السطحي وزيادة استخراج المياه الجوفية وغير ذلك من الآثار السلبية.

تلوث المياه Water Pollution:

تزداد الحاجة إلى المياه الصالحة للشرب والاستعمال المنزلي والزراعي والصناعي والاستجمام وتوليد الطاقة على نطاق عالمي ولكن تلوث مصادر المياه السطحية والجوفية فى معظم دول العالم اخذ يقلص من إمكانية استغلال مصادر المياه دون معالجة مكلفة.

يعرف قانون البيئة تلوث المياه بأية مخلفات من أي مصدر من المصادر يكون من شانها التأثير على المياه وأوجه استخداماتها المختلفة أو أن تضر بالصحة العامة.

لتحديد نوعية ودرجة تلوث المياه توجد فحوصات كيماوية وفيزيائية وحيوية تجري حسب الهدف المراد تحقيقه من إجراء الفحص مثل:

١- الحكم على مدي صلاحية أو عدم صلاحية موارد المياه للاستعمالات المختلفة (الشرب، الزراعة، ... الخ).

٢- معرفة درجة ونوعية التلوث المياه ودرجة المعالجة اللازمة للتخلص من الملوثات.

٣- الحكم على كفاءة عمليات المعالجة لمحطات التنقية والطرق المختلفة المتبعة فى ذلك.

الكائنات الحية المسببة للأمراض Pathogens:

تسبب المياه الملوثة بالكائنات الحية الدقيقة والطفيليات الممرضة العديد من الأمراض للإنسان والحيوان (Waterborne Diseases) وتدخل هذه الكائنات الحية المسببة للأمراض لمصادر المياه السطحية غالبا من خلال المخلفات الإنسانية والحيوانية وتعاني بعض دول العالم الثالث التي لا تقوم بحماية مصادر مياه الشرب من التلوث أو لا تطهر مياه الشرب من الجراثيم من حدوث وفيات بأعداد كبيرة من السكان وخصوصا بين الأطفال وكبار السن.

ونظرا لان فحص المياه للكشف عن الكائنات الحية المسببة للأمراض يتطلب وقتا طويلا وتكلفة عالية لذلك فان تحليل المياه من الناحية البيولوجية تعتمد بدرجة كبيرة على دلائل التلوث البكتريولوجية مثل.

- **العد الكلي البكتيري Total bacterial count.**
- **مجموعة بكتريا القولون الكلية Total coliform.**
- **مجموعة بكتريا القولون البرازية Focal coliform.**
- **ايشرشيا كولاي *Escherichia coli* .**
- **مجموعة البكتريا السبحية Faecal streptococci.**

(Enterococci)

أهم الأمراض التي تنتقل بواسطة مياه الشرب الملوثة

نوع الكائن الحي	اسم المرض
البكتريا Bacteria	التيفود Typhoid
	الكوليرا Cholera
	الدوسنتاريا Dysentery
	الالتهابات المعوية Enteritis
الفيروسات Viruses	التهاب الكبد الوبائي Infectious hepatitis
	شلل الأطفال Polio
	الاسهالات المعوية الفيروسية Virusal Dysentery
الحيوانات الأولية (البروتوزوا) Protozoa	الاسهالات الأميبية Amoebic Dysentery
الطفيليات Parasites	البلهارسيا Schistosomiasis
	الاسكارس Ascaris

الكائنات الحية Organism:

عبارة عن مكون خلوي يقوم بجميع مظاهر الحياة قد يكون وحيد الخلية Uni-Cellular أو متعدد الخلايا Multicellular.

الكائنات الحية الدقيقة Microorganism:

عبارة عن مكون خلوي صغير (دقيق الحجم) ويقوم بجميع مظاهر الحياة كاملة ولا يمكن رؤيته بالعين المجردة ويعرف باسم Microbe.

علم الأحياء الدقيقة Microbiology:

يختص بدراسة الأحياء الدقيقة وهو يختص بدراسة الأحياء الدقيقة فى خطين – الأول: دراسة الكائنات الحية حسب أنواعها وأشكالها وتركيبها ووظائفها وفروعه هي:

- **علم البكتريا Bacteriology دراسة البكتريا.**
- **علم الفطريات Mycology دراسة الفطريات.**
- **علم الطحالب Phycology دراسة الطحالب.**
- **علم الفيروسات Virology دراسة الفيروسات.**

الثاني: دراسة نشاط الكائنات الحية الدقيقة فى بيئاتها ودورها فى التغيرات التي تحدث فى الطبيعة.

- **ميكروبيولوجيا التربة Soil Microbiology.**
- **ميكروبيولوجيا الهواء Air Microbiology.**
- **ميكروبيولوجيا الغذاء Food Microbiology.**
- **ميكروبيولوجيا الصناعة Industrial Microbiology.**
- **ميكروبيولوجيا المياه Water Microbiology.**

ميكروبيولوجيا المياه

Water Microbiology

يختص بدارسة أنواع الكائنات الدقيقة الحية الموجودة فى مصادر المياه المختلفة ودورها فى تغيير صفات المياه وكذلك دراسة مصادر تلوث مياه الشرب وطرق تنقية المياه للاستهلاك الآدمي.

اشتقت تسمية البكتريا من الكلمة اللاتينية Bakterion معناه عصا قصيرة وذلك للاعتقاد السائد قديما بان كل البكتريا عضوية الشكل وبالرغم من عدم صحة هذا الاعتقاد فى وقتنا الحاضر حيث تتخذ البكتريا أشكالا عديدة إلا أن التسمية مازالت حتى يومنا هذا.

الصفات العامة للبكتريا:

- تحتوي الخلية البكتيرية على حمض ريبونيوكليك Ribonucleic acid R .N.A وحمض دي أوكس ريبونيوكليك Deoxyribonucleic acid .D.N.A
- تحتوي الخلية البكتيرية على نواة بدائية Prokaryotes غير محاطة بغشاء نووي Nuclear membrane أى مادة نووية منتشرة بسيتوبلازم الخلية.
- يتم انشطار المادة النووية بالتخثر العرضي لتعطي وحدتين توزعان على الخليتين الجديدتين.
- تتكون المادة النووية من وحدات وراثية متشابهة وتوجد فى أزواج وتسمي Replica وتسمي بالكروموسوم البكتيري ويحدث اتصال بينهما وبين الغشاء البكتيري عند مكان محدد ويعتقد البعض أن الإنزيمات المفرزة بالغشاء البكتيري له علاقة مباشرة فى وظيفة مضاعفة الوراثة.
- لا يحتوي سيتوبلازم الخالية البكتيرية على عضيات سيتوبلازمية Cytoplasmic Organelles يقوم الغشاء السيتوبلازمي بوظيفة

الميتوكوندريا لذلك نجده منبعج للداخل فى سيتوبلازم الخلية مكونا ما يسمي الميزوزوم Mesosome – أي انه زيادة فى سطح الغشاء المفرز للإنزيمات.

- الأهداب البكتيرية تتميز الأهداب البكتيرية بصغر قطرها وتتكون من ليفة واحدة مادتها الأساسية بروتين الهدبين (الفلاجللين Flagellin) وسمكه يتراوح ما بين ١٠-٢٠ ملليميكرون وللهدب حبيبة قاعدية Basal granule ثم يخترق الهدب جدار الخلية البكتيرية والغشاء السيتوبلازمي.

الشكل الخارجي للخالية البكتيرية

Morphology of Bacterial cell

حجم الخلية البكتيرية Size of bacterial cell:

وحدة قياسها الميكرون يختلف حجم الخلايا من جنس لآخر الخلايا الكروية أقطارها تتراوح من ٠.٥ – ١ ميكرون.

أبعاد الخلايا العصوية يتراوح طولها ٢-٥ ميكرون والعرض ما بين ١.٠٠٠.٥ ميكرون.

(١متر = ١٠٠سم) (١سم = ١٠ ملليمتر) (١ ملليمتر = ١٠٠٠ ميكرون) (١ ميكرون = ١٠٠٠ نانوميتر).

كثافة الخلايا البكتيرية Gravity of the bacterial cell:

تعتمد كثافة الخلية البكتيرية على كمية المواد الداخلة فى تركيب الخلية والتي تزيد كثافة اغلبها عن كثافة الماء الذي يمثل اكبر نسبة من مكونات الخلية.

كثافة الماء هي ١.٠٠ جم/سم٣.

كثافة البروتين هي ١.٤ جم/سم٣.

كثافة الدهون هي ٠.٩ جم/سم٣.

كثافة الأملاح المعدنية ٢.٥ جم/سم٣.

كثافة المواد الكربوهيدراتية ١.٤-١.٦ جم/سم٣.

كثافة الأحماض النووية ١.٧-١.٨ جم/سم٣.

لذلك متوسط الكثافة النسبية للخلايا البكتيرية (١.١٦+٠.٠٩) جم/سم٣ تقريبا.

عموما تتبع الخلايا البكتيرية نظام التغذية النباتي Halophytic بعد سطح الخلية البكتيرية ذا أهمية خاصة فيما يتعلق بطريقة التغذية حيث انه مفرز للإنزيمات ويقوم بامتصاص الغذاء.

- **فمن خلال السطح تفرز الإنزيمات الخارجية الخلوية Extracellular enzymes لتقوم بتكسير وتحليل المواد المعقدة فى الوسط الخارجي إلى صورها البسيطة والذائبة.**
- **فمن خلال السطح تقوم الخلية البكتيرية بامتصاص الصور البسيطة والذاتية للمادة الغذائية.**

لذلك يعد السطح هو طريق الخلية البكتيرية للحصول على الطاقة اللازمة لأنشطتها الحيوية المختلفة.

فزيادة السطح تؤدي لإفراز الخلية البكتيرية للإنزيمات حيث تقوم هذه الإنزيمات بتحليل المادة الغذائية المعقدة التركيب والموجودة فى الوسط الخارجي كذلك تؤدي زيادة السطح لزيادة معدل امتصاص الخلية لجزئيات الغذاء البسيطة والذائبة والتي تم تحليلها بفعل الإنزيمات.

ففي الخلية البكتيرية نجد أن السطح هو المسئول عن التفاعلات الايضية المختلفة التي من شانها توفير الطاقة للحجم الخلوي وكذلك للكتلة الخلوية وكلما كانت نسبة السطح إلى كل من الوزن والحجم كبيرة فان النشاط البكتيري يكون هائلا.

شكل وترتيب الخلايا البكتيريا Shape and arrangement of bacterial cells:

الخلية البكتيرية المفردة أما أن تكون مستديرة Spherical أو تتخذ شكل العصا المستقيمة أو الاسطوانة cylindrical or rod like.

أولا: البكتريا المستديرة أو الكروية Spherical or cocci مفردها coccus.

كرويات مفردة Monococcus خلية مفردة من أمثلتها Micrococcus موجبة لجرام معظمها رمية تعيش على المواد العضوية وغير العضوية.

والبعض الآخر سالب لجرام معدية مسببة للأمراض Meningococcus, Gonococcus.

كرويات ثنائية Diplococcus:

تنقسم الخلية الكروية انقساما واحدا فى اتجاه واحد Diplococcus مثل Diplococcus pneumoias.

السبحيات الكروية Streptococci:

تنقسم الخلية المفردة انقسامات متتالية فى اتجاه واحد وتظل متصلة مع بعضها ويتخذ التركيب الناتج على شكل سلسلة أو سبحة ويعرف بـ Streptcoccus.

كرويات رباعية:

تنقسم الخلية البكتيرية المفردة انقسامين متتاليين فى مستويين أو اتجاهين متعامدين فيتكون سطح رباعي Micrococcus tetragenia Tetracoccus.

كرويات ثمانية مكعبة:

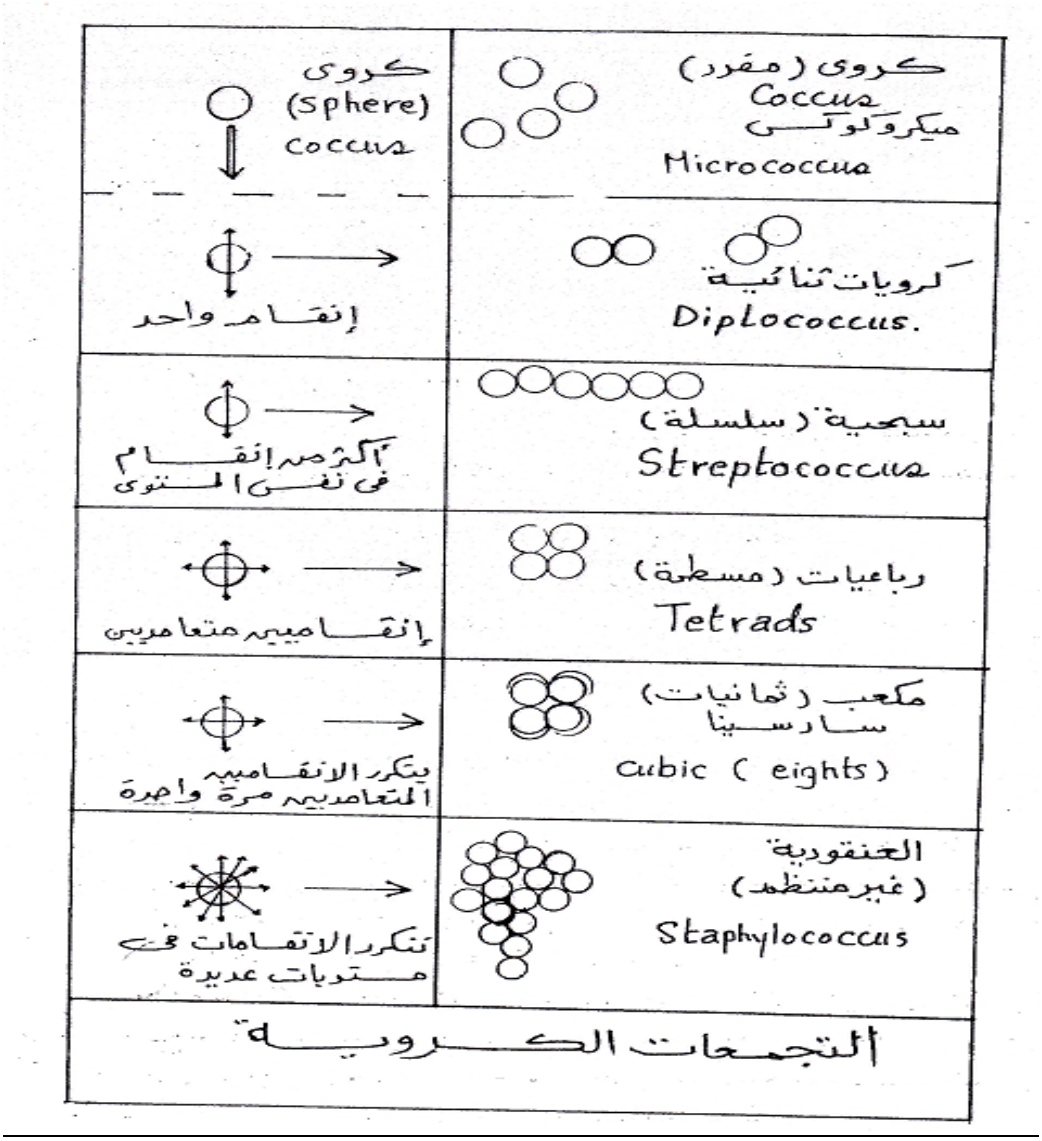
تنقسم الخلية البكتيرية المفردة ثلاثة انقسامات متعامدة على بعضهما فتكون على شكل مكعبي تعرف Sarcina المشتق من الكلمة اللاتينية Sarcina.

مثل Sarcina & Sporosarcina.

كرويات عنقودية Staphylococcus:

تنقسم الخلية البكتيرية المفردة عدة مرات فى محاور غير منتظمة فيتكون مجموعة من الخلايا الكروية التي تتصل ببعضها فى صورة غير منتظمة فى شكل عنقودي كروي Staphylococcus والمشتق من الكلمة اللاتينية Staphylos والتى

تعاني عنقـود عنـب مـن أمثلتهـا *Staphylococcus aureus* ويشـبه هـذا التجمـع العنقودي البكتريا الخضراء الزرقة المعروفة باسم Merismopodia.



ثانيا: البكتريا العصوية (الاسطوانية) Rod likes:

(أ) العصويات المستقيمة Straight rods:

الخليـة البكتيريـة المفـردة تشـبه العصـا Rod likes أو اسـطوانية Cylindrical وتعرف باسـم Bacilli ومفردهـا Bacillus البكتريـا العصـوية المسـتقيمة والتـى تمتلك جراثيم داخلية وتتنفس هوائيا.

ويوجد كذلك بكتريا الكلوستريديم Clostridium وهـي عضـوية تعـيش بمعـزل عـن الأكسوجين، بعضهما مترمم والآخر وبائي وتمتلك جـراثيم داخليـة ذات قطـر اكبـر مـن قطر الخلية.

وتختلف أبعاد الخلية العصوية تبعـا لنـوع البكتريـا فبعضـها خلايـاه طويلـة والآخـر خلاياه قصيرة يزيد طول خلاياه قلـيلا عـن عرضـها وغالبـا توجـد الخلايـا العصـوية المفردة مثل:

1. **عصويات ذات نهايـات مسـطحة مسـتقيمة مثـل *Bacillus anthracis* وهـي بكتريا وبائية.**
2. **عصـويات ذات نهايـات مسـتديرة مثـل *Escherichia coli* وهـي مـن مجموعة بكتريا القولون البلازية Fecal coliform .**
3. **عصويات مغزليـة Fusiform مثـل Fusobacterium وهـي بكتريـا تشـبه المغزل فى شكلها.**

إلا انه فى حالات قليلة يشاهد تجمع خليتين عضويتين أو أكثر وذلك مثل:

1. **تجمع خليتين عضويتان تعرف باسم عصويات ثنائية Diplobacilli.**
2. **تجمـع أكثـر مـن خليتـين يكـون سلسـلة تعـرف باسـم عصـويات سـبحية Streptobacilli.**

ولا يعد هذان التجمعان نماذج مورفولوجية ثابتـة ولكـن يعـزي لمرحلـة مـن مراحـل النمو أو إلي الظروف البيئية السائدة.

وفي بعض الحالات تترتب الخلايا العصوية بجوار بعضهما فيما يعرف بالترتيب العمادي Palisade arrangement تعرف بمجموعة الكوراينى بكتريا Corynebacteria والتي تسبب مرض الدفتريا ولكن يضع بعض العلماء مجموعة Corynebacterium كمجموعة مستقلة ضمن مجموعة كبيرة باسم تعدد الأشكال Polymorphism لأنه قد تكون تجمعا لعصويات مستقيمة أو منحنية.

(ب) **العصويات المنحنية** Curved rods:

توجد على هيئة خلايا مفردة نادرا لا تتجمع خلاياها وهناك نوعان معروفان من البكتريا العصوية المنحنية هما:

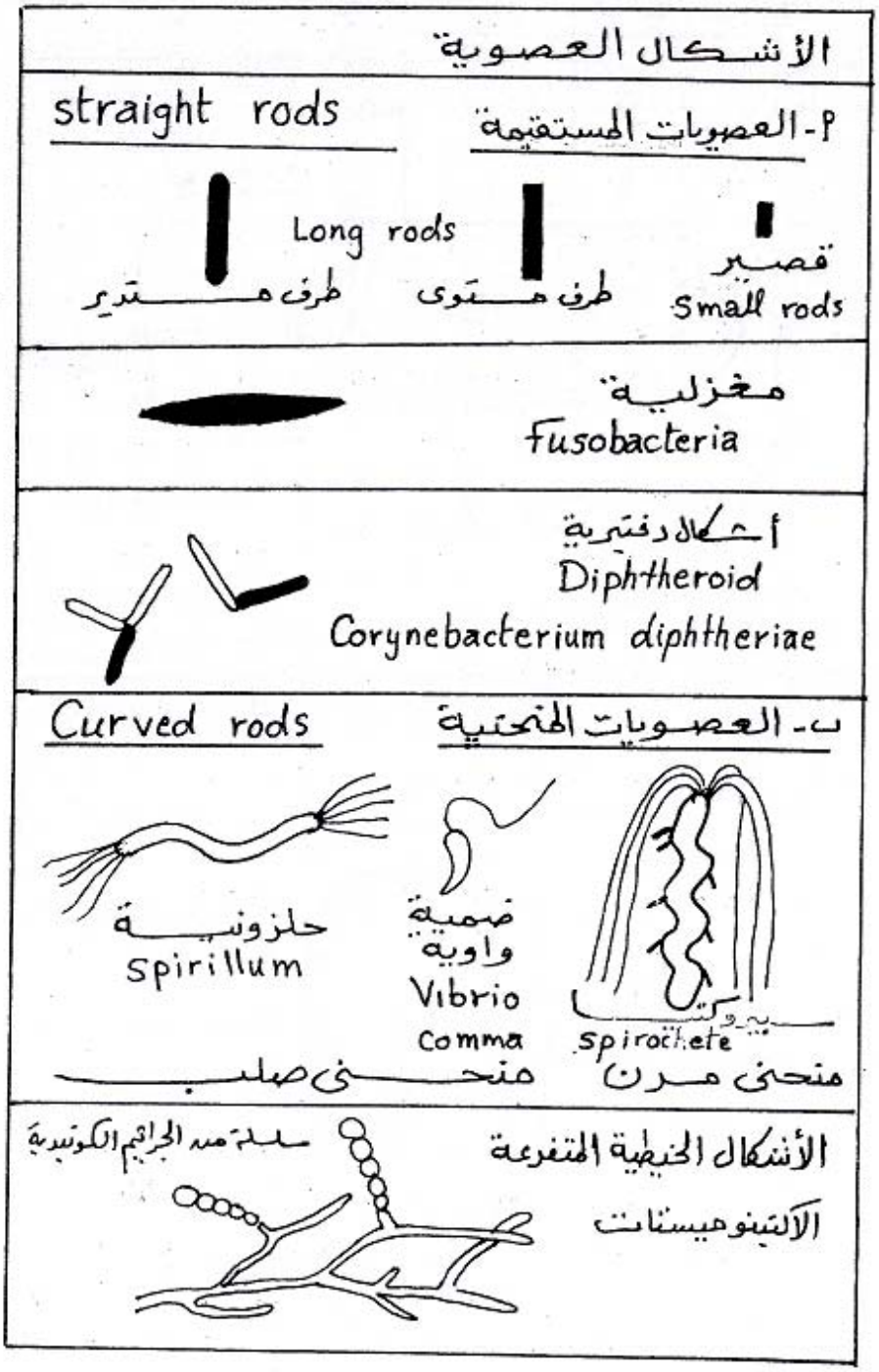
١- **البكتريا الضمية** (**أو الواوية**) Vibrio:

وفيها تنثني الخلايا العصوية إلى اقل من لفة واحدة أي عبارة عن حلزون غير كامل ومن أمثلتها البكتريا المسببة للكوليرا.

٢- **البكتريا الحلزونية** Sprilla:

وفيها تنثني الخلية البكتيرية أكثر من لفة وتبدو لولبية أو حلزونية ومفردها Spirillum ومن أمثلتها Sprillum وكلا من البكتريا الضمية والحلزونية سالب الجرام.

ثالثا: البكتريا ذات الأشكال الخيطية هي مجموعة الكائنات تعرف بالاكيتنومايسات Actinomycetis وهي تشبه الفطريات الطحلبية Phycomycetes فى وتكوين الميسيليوم ومن أمثلتها جنس Actinomyces وجنس Streptomyces وتتميز أفرادها بتكوين جراثيم خارجية فى سلاسل محمولة على ميسليوم هوائي تعرف بالجراثيم الكونيدية.



الأشكال العصوية
straight rods
أ- العصويات المستقيمة
Long rods
طرف مستدير
طرف مستوى
قصير
Small rods
مغزلية
Fusobacteria
أشكال دفتيرية
Diphtheroid
Corynebacterium diphtheriae
Curved rods
ب- العصويات المنحنية
حلزونية
spirillum
ضمية
واوية
Vibrio
comma
سبيروكيت
spirochete
منحنى صلب
منحنى مرن
الأشكال الخيطية المتفرعة
سلسلة من الجراثيم الكونيدية
الاكتينوميستات

ظاهرة تعدد الأشكال Polymorphism:

بعض أجناس البكتريا تتميز بوجود خلايا ذات أشكال متباينة وهو ما يعرف بظاهرة تعدد الأشكال أو تباين الأشكال ومن أمثلتهما:

أ. جنس الرايزوبيم Rhizobium.

ب. جنس الميكوبكتريا Mycobacteria عصويات مستقيمه وأحيانا عصويات منحنية.

ج. جنس الكوريني بكتريا Corynebacterium (عصوي مستقيم وأحيانا تبدو انتفاخات بالخلية).

د. تميل للتفرع Bacteriodes.

هـ. البكتريا الهلامية Myxobacteria تتميز بقدرتها على التجمع وتتكون كتل هلامية.

تركيب الخلية البكترية

Structure of bacterial cell

أسهم الميكرسكوب الالكتروني فى معرفة التركيب الداخلي للخلايا البكتيرية نفسم تركيب الخلية البكتيرية قسمين.

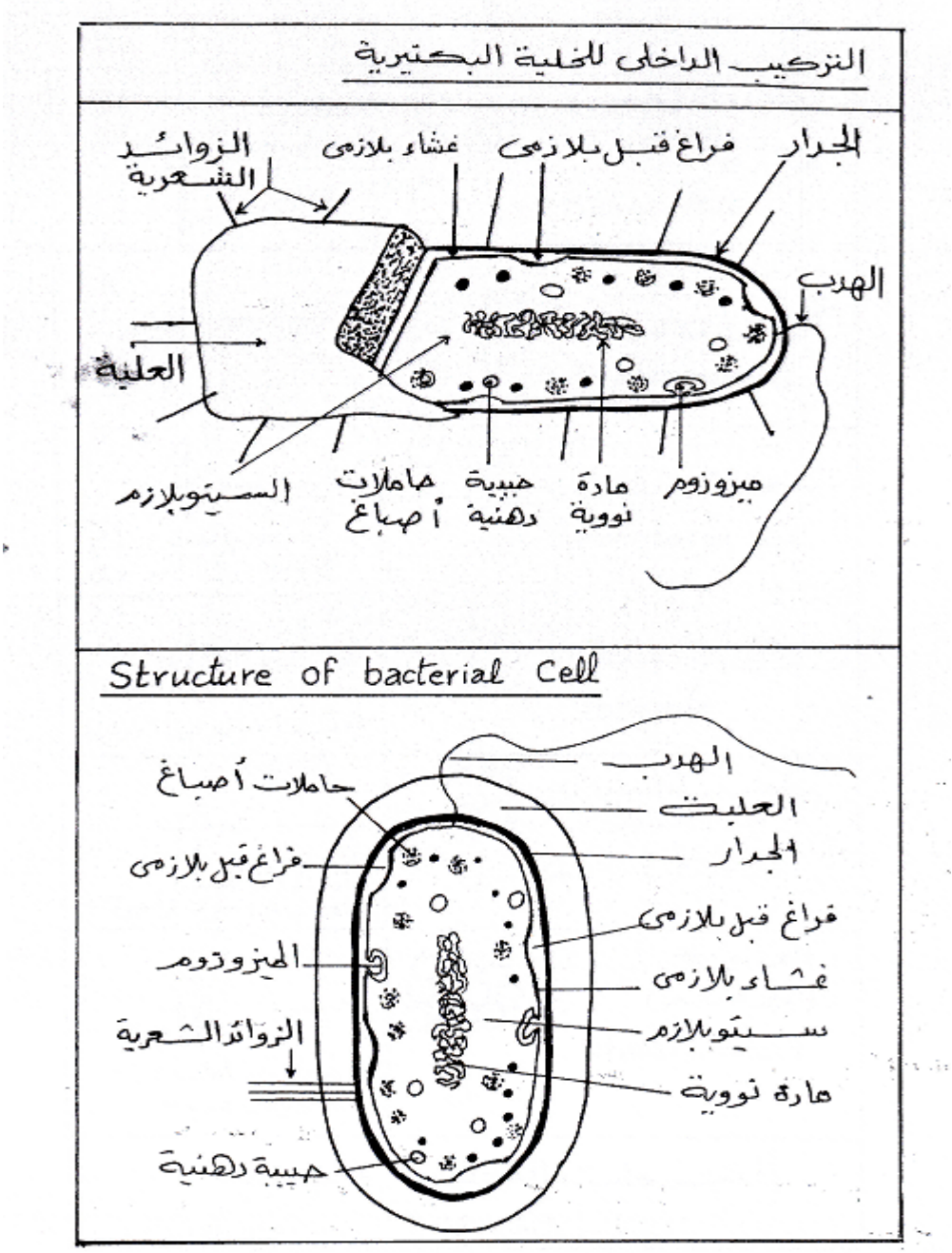
أ- تراكيب سطحية (خارجية) Superficial structures:

وتشمل الجدار الخلوي Cell wall العلبة (الغلاف) Capsule الأهداب (الاسواط) Flagella والزوائد الشعرية Pili يلاحظ أن الأهداب اذا كانت ذات حبيبة قاعدية متصلة بالغشاء السيتوبلازمي للخلية.

الهدب فيتكون من ٣ مناطق حبيبة قاعدية متصلة بالغشاء السيتوبلازمي خطاف – خيط ويوجد خارج الخلية.

ب- التراكيب الداخلية Internal structure:

وتشمل كل ما يوجد داخل الجدار الخلوي وخاصة البروتوبلازم Protorplasm ويحدده من الخارج الغشاء البلازمي Plasmic membrane ويفصل بينه وبين الجدار الخلوي فراغ يعرف باسم الفراغ قبل بلازمي Periplasm وتشمل أيضا السيتوبلازم وما يحتويه من عضيات سيتوبلازمية ومحتويات غير حية وكذلك الجهاز النووي.



أولا: التراكيب السطحية (الخارجية) للخلية

Superficial structures of bacterial cell

* جدار الخلية البكتيرية Bacterial cell wall :

الجدار هو الطبقة الخارجية للخلية البكتيرية وهو ذو طبيعة صلبة حيث يحدد معالم الخلية ويجعل الشكل ثابت ومحدد كما انه يقوم بحماية الخلية المؤثرات الخارجية وله خاصية النفاذية الاختيارية ويختلف سمكة باختلاف نوع البكتريا ١٠-٨٠ nm نانوميتر (nm نانوميتر = 10^9 Nanometer من المتر) ويبلغ الوزن الجاف للجدار ٢٠% من الوزن الجاف للخلية البكتيرية ويفضل صلابة الجدار تتحمل الخلية البكتيرية ضغوط اسموزية تبلغ ٣٠ ض.ج..

والاختلاف فى التركيب الكيميائي للجدار يتم على أساسة تقسيم البكتريا إلى موجبة وسالبة لصبغة جرام.

التركيب الكيماوي لجدار الخلية البكتيرية:

جدار الخلية البكتيرية تتكون من وحدات تركيبية تختلف باختلاف نوع الخلايا وجدار الخلية السالبة لجرام يختلف تركيبة عن جدار البكتريا الموجبة لجرام.

ويتركب جدار الخلية بصفة عامة سالبة أو موجبة لجرام من الآتي:

١- ببتيدات Peptides:

تتكون من ٣-٨ أحماض أمينيه من بينها DandL Alanine D- glutanic و glycine وواحد فقط من الحمضين الآتيين (L-lysine or Diaminopimelic).

٢- سكريات أمينيه Amino sugar:

- **استيل جلوكوز أمين N- Acetylglucosamin.**
- **استيل حمض الميورواميك N-Acetyl muramic acid**

ويتحمل مع بعضهما بالتبادل ليكونا معا بوليمر يسمي ببتيدوجليكان Peptidoglycan (أو الميورين Murein) هو الهيكل الأساسي للجدار الخلوي البكتيري وهو المسئول عن صلابة الجدار وهو عبارة عن ليفات قوية يتكون منها تركيب مثقب له ثلاثة أبعاد تشبه الشبكة المثقبة – وان هذا التركيب يسمح بمرور الماء والمواد الغذائية من خارج الخلية لداخلها كما يسمح بخروج فضلات الخلية من الداخل للخارج ويتصل بحمض الميوراميك والمشترك فى تركيب الميورين رابطة ببتيدية عرضية قصيرة تتكون من ٣ أحماض أمينيه على الأقل هي سبب صلابة الببتيد وجليكان وتوجد هذه الروابط الببتيدية العرضية بكثرة بجدار البكتريا الموجبة لجرام مما يساعد على ارتباط كل طبقة من طبقات الببتيدوجليكان مع الطبقة التي تليها فيبدو الجدار أكثر تجانسا فى تركيبه أما جدار البكتريا السالبة لصبغة جرام فيبدو اقل تجانسا لأنه يحتوي على طبقة واحدة من البتيدوجليكان لذلك تبدو اقل تجانسا.

٣- حمض التيكويك Teichoic:

وهو تجمع لوحدات (الجليسرول ترتبط مع د – الأنين والفوسفات) أو تجمع لوحدات (البربيتول ترتبط مع د – الأنين والجلوكوز).

ويوجد فقط فى جدار البكتريا الموجبة لصبغة جرام ولا يؤدي وجوده إلى صلابة الجدار الخلوي حيث انه لا يوجد فى طبقة منفصلة – بل يوجد فاصل فى تركيب طبقات الميورين نتيجة ارتباطه بها عن طريق الروابط التعاونية Covalent bonds.

٤- الدهون والدهون الفوسفورية Lipids & phospholipids:

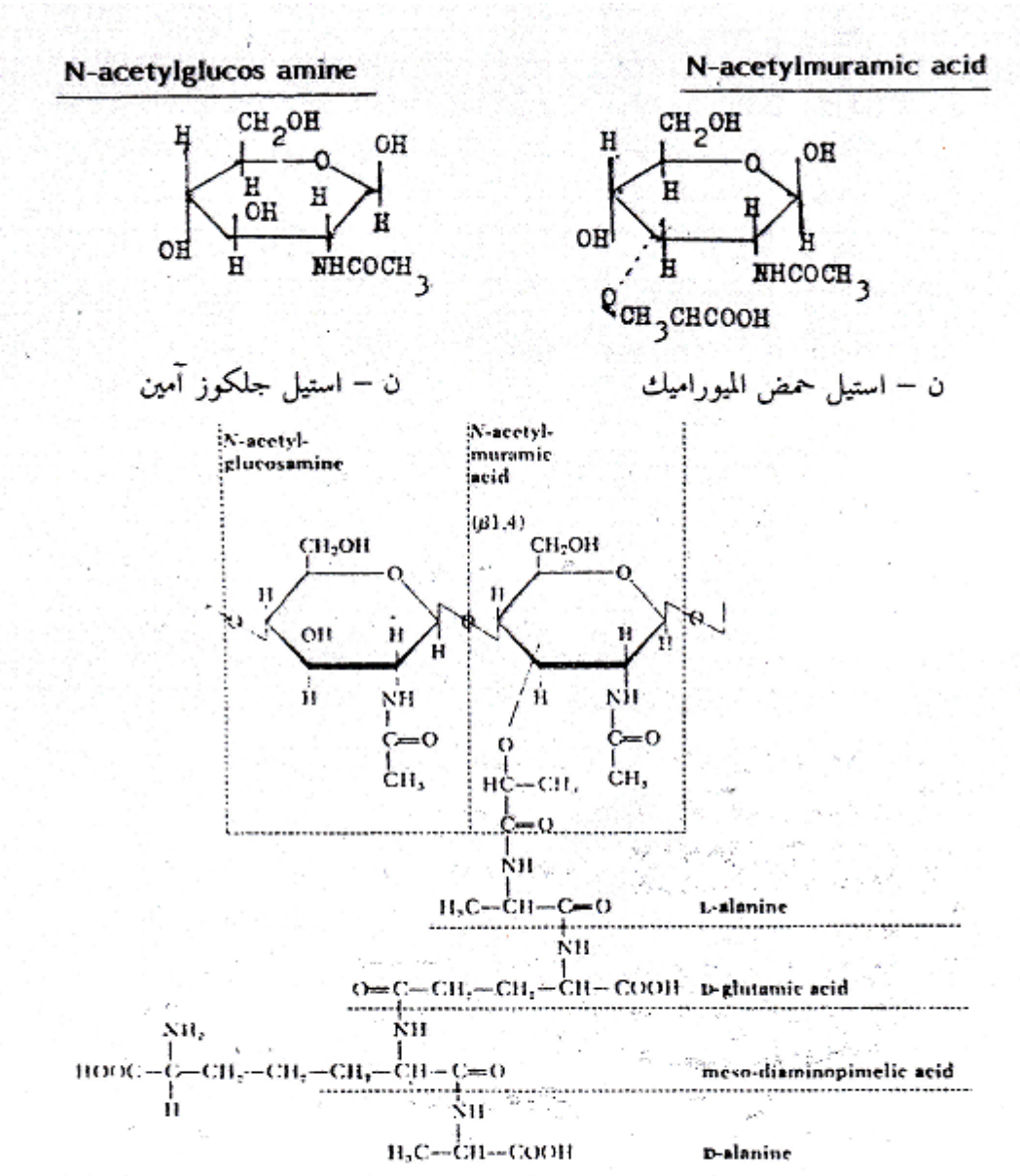
الدهون بنسبة ضئيلة فى جدار الخلايا الموجبة لجرام أما الثانية الدهون الفوسفورية توجد فى جدر الخلايا السالبة لجرام.

٥- عديدات السكاكر الدهنية Lipopolysaccharides :

توجد فقط فى جدار الخلايا السالبة لصبغة جرام ويكون لها أحيانا درجة عالية من سمية فتزيد من قدرة الخلايا على إحداث أمراض للنبات والحيوان.

٦- البروتينات الدهنية Lipoproteins:

توجد فى جدار الخلايا السالبة لصبغة جـرام مرتبطـة بطبقـة الميورسـين بواسـطة روابط هيدروجينية ضعيفة.



شكل لتوضيح ارتباط ن – استيل حمض الميوراميك مع ن – استيل جلكوز امين بين ذرتى الكربون رقم١، ٤ فى الوضع بيتا وهذا التركيب يمثل الهيكـل التـركيبى لجـدار الخلية – ويتصل بحمض الميوراميك رابطة ببتيدية قصيرة محتوية على الأحماض ل – ألانين، د–جلوتاميك، ميزو داى امينو بميليك، د–الآنين.

البكتريا الموجبة لصبغة جرام:

يحتوي الجدار على طبقات الميورمين وتتصل هـذه الطبقـات عرضـيا بـروابط ببتيديـة فتعطي للجدار تجانس وتماسك وصلابة ويوجـد كـذلك حمـض التيكويـك داخـل طبقـة الميورمين بواسطة الروابط التعاونية.

ولا يحتوي على البروتينات الدهنية وعديـدات السـكاكر الدهنيـة والـدهون الفوسـفورية ويبلغ سمك الجدار ٢٠-٨٠ mm وتمثل طبقـة الميـورمين حـوالي ٥٠% مـن الـوزن الجاف للجدار وهذا الجدار قابـل للتحلـل بفضـل انـزيم ليسـوزيمLysozyme والـذي يقوم بتحليل الرابطة بيتا ١-٤.

البكتريا السالبة لجرام:

يحتوي الجدار على طبقة واحدة من الميورمين لـذلك يسـهل تحطـيم الجـدار ميكانيكيـا عن جدار الخلية الموجبة لجرام يمثل الميورمين ١٠% مـن الـوزن الجـاف للجـدار ولا يحتوي الجدار على حمض التيكويـك ماعـدا نـوع واحـد فقـط مـن جـنس E. coli ويحتوي الجدار على طبقة الدهون الفوسفوريه التي تحـيط بطبقـة الميـورمين ثـم طبقـة عديدات السكاكر الدهنية ويتطلب ذلـك وجـود ايونـات Ca++ ووجـد أن كثيـر مـن البكتريا السالبة لجرام تنتج مواد عديدة التسكر الدهنية تعتبر سامة لجسم العائل.

يعد الجزء الدهني من عديدات التسكر الدهنية هي الحامل للسـمية ويعتبـر مـن السـموم الداخلية Endotoxins.

ثم طبقة البروتين الدهني Lipoproteins وتوجد فـى جـدار البكتريـا السـالبة لصـبغة جرام وان هذه الطبقة ترتبط بطبقة الميورين بواسطة روابط هيدروجينية ضعيفة.

أهم الفروق بين مكونات الجدار الخلوية فى البكتريا السالبة والموجبة لجرام

الصفة	الموجبة لجرام	السالبة لجرام
السكريات الامينية	%٢٢-١٠	%٨-٢
عدد طبقات الميورين ونسبته	طبقات (٥٠-٨٠%)	طبقة واحدة (١-٥)
سمك الجدار	nm ٨٠-٢٠	nm ١٠
الدهون والدهون الفوسفوريه	صفر – ٣	٢٢-١١
البروتينات الدهنية	-	+
حمض التيكويك	+	-
عديدات السكاكر الدهنية	-	+

٢- العلبة:

هي منطقة هلامية Slime لزجة Viscous توجد خارج الجدار الخلوي فى عديد من الأنواع البكتيرية وتسمي بالغلاف ويتراوح سمك هذه الطبقة بين الأغشية الرقيقة إلى طبقات كثيفة يبلغ سمكها اكبر من قطر الخلية البكتيرية نفسها.

العلبة تتكون من مواد مختلفة منها: عديدات التسكر Polysaccharides وعديد الببتيد Polypeptide ودهني مفسفر Phospholipid وتتكون العلبة من احد هذه المواد أو نتيجة حدوث اتحاد بين مادتين ولوحظ وجود مادة DNA بجانب مكونات وجود الجدار التالية.

- جنس Streptococcus غلاف هذا الجنس يتكون من حمض الهياليورونيك Hyaluranic ويتكون نتيجة اتحاد استيل جلوكوز أمين وحمض جلوكيورونيك.
- جنس *Yersinia pestis* يتكون الغلاف من ارتباط مواد عديدة التسكر مع مواد بروتينية.

٣- أهداب الخلية البكتيرية The bacterial Flagella:

زوائد رفيعة وطويلة جداً تسمي اسواط Flagella أعضاء الحركة البكتيريا التي لا تحتوي على أهداب تتحرك حركة بطيئة تسمي الحركة الانزلافية Giliding movement والبعض يتحرك حركة دودية Flexion movement والبعض يتحرك حركة دائرية سريعة حول محور الخلية وبطريقة طولية.

البكتريا التي تمتلك أهداب تسمي بكتريا متحركة Motile والاسواط خيوط دقيقة جدا تخرج من السيتوبلازم من منابت خاصة متصلة بالغشاء السيتوبلازمي على هيئة حبيبات قاعدية وتمر الأهداب من خلال منطقتي الجدار الخلوي والعلبة ويتراوح سمك السوط من ١٠ إلى ٣٠ نانوميتر.

تركيب الاسواط البكتيرية:

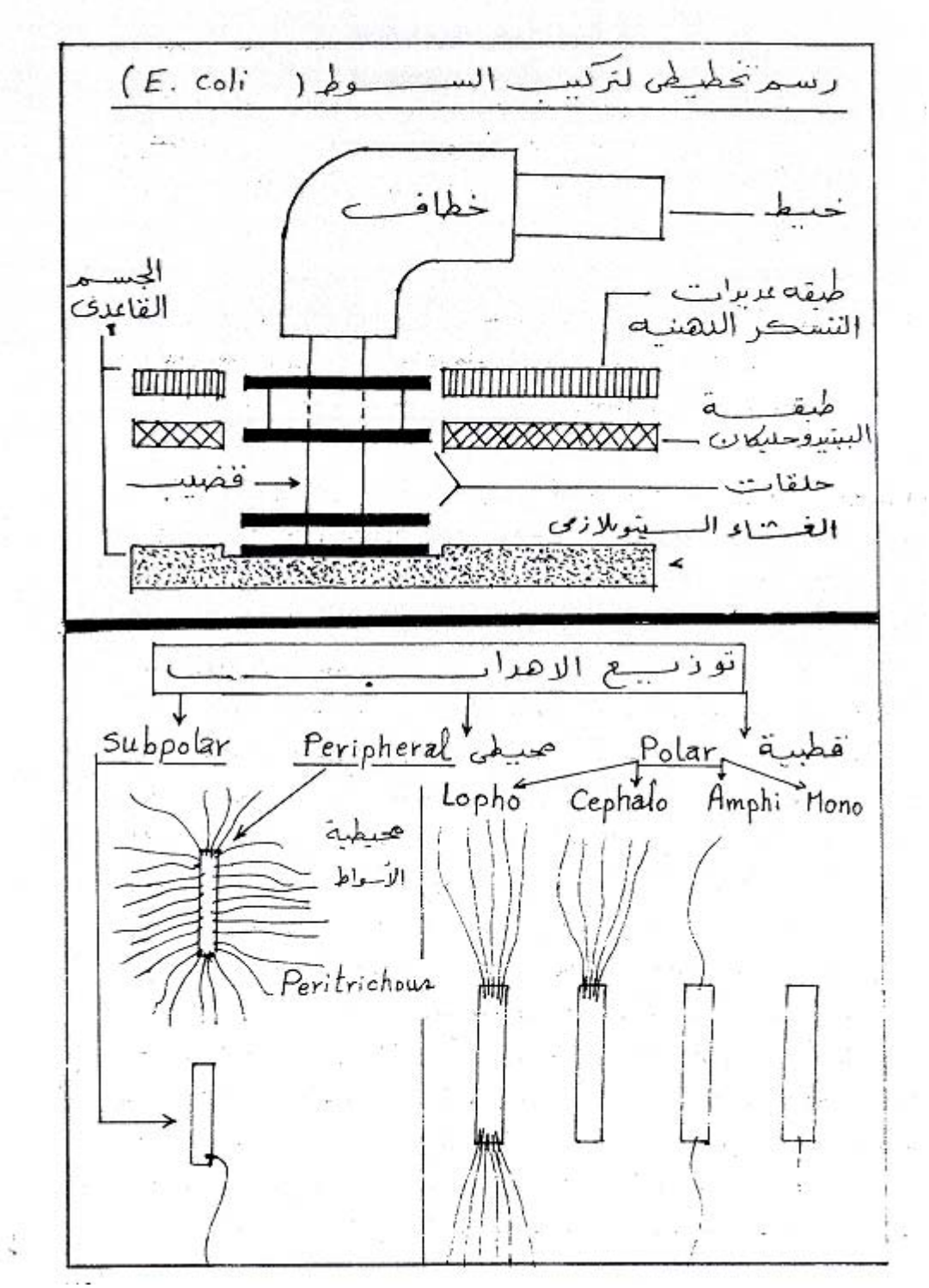
تنشأ الاسواط البكتيرية من خلال الغشاء السيتوبلازمي ويتكون من ٣ أجزاء الخيط والخطاف والجسم القاعدي.

الجسم القاعدي basal body حلقات تربط الخطاف بالغشاء السيتوبلازمي ويختلف عددها فى البكتريا الموجبة لجرام ففي البكتريا السالبة لجرام يتكون من زوجين من الحلقات يتصلان من مركزيهما بقضيب.

أما فى البكتريا الموجبة يتكون الحجم القاعدي من زوج من الحلقات الداخلية منه تتصل بالغشاء السيتوبلازمي.

الخطاف Hook تركيب منحني الشكل طرفه القريب من الخلية يتصل بالجسم القاعدي بواسطة قضيب والطرف البعيد يتصل بالخيط.

الخيط هو الجزء الذي يظهر خارج الخليـة البكتيريـة متمـوج حلزونـي الشـكل يتكـون من ألياف من بروتين الفلاجللين وعددها يتـراوح مـا بـين ٣ إلـى ٦ أليـاف بروتينيـة تلتوي أو تلتف معـا مثـل الضـفيرة الجوفـاء. يختلـف التركيـب الكيمـاوي لبـروتين الفلاجللين.



توزيع الأهداب على سطح الخلية البكتيرية:

أهداب طرفية (قطبية) Polar Flagella.

- هدب واحد على طرف واحد من الخلية البكتيرية Monotrichous مثل Vibrio وجنس Nitrosomonas
- هدبين كل واحد منهما على قطب يسمي Amphotrichous. مثل بكتريا Pseudomonas.
- مجموعة أهداب توجد على احد الاقطاب Cephalotrichous. مثل بكتريا الحلزونية Spirllium.
- مجموعتين من الأهداب عند كل قطب Lophorichous.
- أهداب محيطية La teralflagella (Peripheral) أهداب على طول امتداد الجدار الخلوي البكتيري Pcritrichous.

أهداب محيطية lateralflagella (Peripheral) أهداب على طول امتداد الجدار الخلوي البكتيري Peritrichous مثل *E. coli*.

الزوائد الشعرية:

زوائد البيلي – Pili:

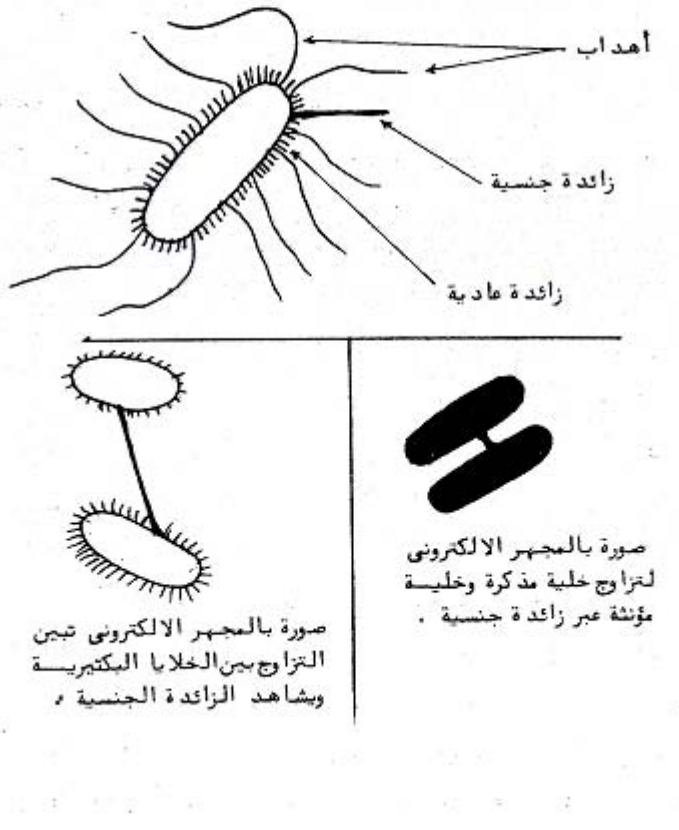
مفردها (بيلوس – Pilus) وتعرف باسم فمبريا Fimbriae زوائد خيطية قصيرة العدد (٢٥٠ – ٣٠٠) تغطي جدار الخلية وهي غير متموجة – توجد فى افراد بكتريا السالبة لجرام ليس لها علاقة بالحركة تتكون من بروتين البيلين Pilin.

١- زوائد البيلي الجنسية Sexpili أو F-Pili:

توجد فى بكتريا *E. coli* عددها من ١-٢ فى الخلية الواحدة تساعد الخلية فى إعطاء مادتها الوراثية أثناء التكاثر الجنس أي أن الايبسوم Episome الذي يتحكم فى الخصوبة الوراثية يتحكم فى إنتاج هذه الزوائد حيث يعتمد عليها نقل الكروموسوم من الخلية الواهبة للخلية المستقبلة – ويعتقد أن البيلي قد يساعد فى تقارب الخليتين أثناء عملية التزواج.

٢ – زوائد البيلى الالتصاقية :

وجود هذه الزوائد فى بعض أنواع البكتيريا يكسبها صفة الالتصاق بالخلايا النباتية أو الحيوانية أو السطوح الخاملة وتؤدى إلى تثبيت الخلية البكتيرية فى الأنسجة الحيوانية حيث تمكنها من الحصول على الغذاء ، توجد علاقة بين قدرة البكتيريا المسببة لمرض السيلان ووجود البيلى ، ويمكن أن تلتصق خلايا السلالات بواسطة البيلى بسهولة بالكثير من الخلايا ذات النواة الحقيقية وهذا الالتصاق ضرورى لتكشف (ظهور) المرض حيث أن السلالات التى لا تملك البيلى تفشل فى إحداث المرض .



التراكيب الداخلية للخلية البكتيرية

The internal structure of bacterial cell

وتشمل جميع التراكيب التي توجد داخل جدار الخلية البكتيرية وهي البروتوبلازم Protoplasm أو (البروتوبلاست Protoplast) وهو عبارة عن مادة الحياة فى جميع خلايا الكائنات الحية ويوجد بداخل الجدار الخلوي أي أن كل ما يوجد بداخل الجدار الخلوي يسمي البرتوبلازم أو البروتوبلاست ويشمل:

- الغشـــاء الســـيتوبلازمي (البلازمـــي –البروتـــوبلازمي) Cytoplasmic membrane.
- السيتوبلازم ومحتوياته Cytoplasm and its content.
- المادة النووية (الجهاز النووي) Nuclear material (system).

الغشاء السيتوبلازمي Cytoplasmic membrane:

يعـرف باسـم الغشـاء البلازمـي Plasma membrane أو الغشـاء البرتـوبلازمي Protoplasmic nembrone وهو الطبقة التـي تقـع أسـفل الجـدار الخلـوي مباشـرة وهو محدد تماما وله تركيب منفصل عن جدار الخلية ويوجد أحيانـا منطقـة فـراغ بـين الغشاء البلازمي والجـدار الخلـوي تعـرف باسـم الفـراغ قبـل بلازمـي "بـريبلازم" Periplasm ويبلغ سـمك الغشـاء حـوالي ١٠ nm وبواسـطة الفحـص الميكرسـكوبي الدقيق وجد أن الغشـاء يتكـون مـن ٣ طبقـات محـددة وسـمك كـل مـن الطبقتـين الخارجيتين يبلغ حوالي ٢.٥ nm وسمك الطبقة الثالثة ٥ nm.

حيث تتكون من طبقتين من الفوسفوليبيدات (دهون) الخارجية محبـة للمـاء بينمـا الثانيـة توجد للداخل وهي كارهة للمـاء ونتيجـة لهـذا التركيـب (التركيـب المـوزايكي) تقـوم الأغشية بوظائف فسيولوجية مختلفة وهذا ا لتركيـب المـوزايكي نـاتج عـن اختلافـات تحدث فى طبقة (جزئيات) البروتين التـي توجـد مطمـورة فـى طبقتـى الفوسـفوليبيدات (الدهون)... وهذه الطبقات تزيد مـن السـطح النشـط للغشـاء وبالتـالي تحـدث زيـادة كبيرة فى النشاط الانزيمي.

التركيب الكيماوي للغشاء البلازمي:

يحتوي الغشاء البلازمي على حـوالي ٦٠% بـروتين ٣٠% دهـون ١٠% كربوهيـدرات والبروتين الموجود أما أن يكون بروتينيا إنزيميا أو ذا وظيفة إنزيمية.

ويبلغ وزنة الجاف حـوالي ١٠% مـن الـوزن الجـاف للخليـة البكتيريـة وقـد يحتـوي الغشاء على حمض الميكوليك Mycolic acid ويوجـد مرتبطـا بـالمواد الأخـرى وهـو المسئول عن الصبغ المقاوم للأحماض.

خصائص الغشاء البلازمي:

تعتبر خاصية النفاذيـة الاختياريـة Selective permeability أهـم خصـائص الغشـاء وذلك راجع لطبيعة تركيبة الموزايكي أي انه غشاء شبة منفذ Semipermeable.

وظائف الغشاء البلازمي:

١. يتحكم الغشاء البلازمي فى مرور المواد الغذائية لداخل الخليـة وكـذلك نـواتج النمـو لخارج الخلية وعلى ذلك فأي ضرر للغشـاء قـد يـؤدي لمـوت الخليـة نتيجـة فقـد الغشاء لقدرته على عمليـة الـتحكم فـى دخـول وخـروج المـواد وبالتـالي تتـأثر الوظائف الفسيولوجية للخلية نتيجة فقد كثير من المواد المهمـة مـن داخـل الخليـة أو دخول المواد السامة إلى الخلية.

٢. الغشـاء مركـز لتفـاعلات الاكسـدة البيولوجيـة بالخليـة مثـل نظـام السـبتوكروم Cytochrome oxidase system وانزيمات الايدروجين Dehydrogenase.

٣. الغشاء مركز لإنزيمـات تحليـل المـواد الغذائيـة Hydrolysis enzymes وكـذلك إنفاذ المواد الغذائية.

٤. تخليق الجدار الخلوي لاحتوائه على كل الإنزيمـات المسـئولة عـن تخليـق بـروتين الجدار ويوجد بالغشاء كـذلك مراكـز معينـة لهـا دور هـام فـى عمليـة الانقسـام الخلوي.

٢- السيتوبلازم Cytoplasm:

هذه الكلمة مشتقة من Kytos plasma بمعني أن Kytos الخلية Cell وكلمة Plasma معناها مادة Substance أي بمعني مادة الخلية.. أي المادة التي تشغل معظم حيز الخلية ويحد السيتوبلازم من الخارج الغشاء البلازمي ويشبه السيتوبلازمي البكتيري سيتوبلازم الكائنات الأخرى من حيث طبيعته وتركيبه الكيميائي وأهم ما يميز السيتوبلازم انه ذو طبيعة غروية ونسبة الماء به حوالي (٧٠-٨٥%) ويحتوي على مواد كربوهيدراتية وبروتينية ودهنية وأملاح معدنية ونسبة عالية من الأحماض النووية وخاصة حمض الريبونيكليك Ribonucleic acid RNA. موزع فى جميع انحاء السيتوبلازم ويحتوي السيتوبلازم أيضا على الفوسفور – الكبريت – الصوديوم – البوتاسيوم – الكالسيوم – الماغنسيوم – الحديد – الموليبديم – الفانديم – النحاس – الزنك – البورون ومركبات الكلور وترجع أهمية هذه المواد إلى أنها أصل المواد اللازمة لتكوين الخلية الجديدة وإنها مصدر الطاقة وبعض هذه المواد يلعب دور هام فى حياة الخلية البكتيرية.

ويحتوي السيتوبلازم على:

أولا: **العضيات السبتوبلازمية Cytoplasmic organelles**:

وهي الريبوسومات Ribosomes، الميزوزومات Mesosomes، الاصباغ التمثيلية Photosynthetic pigments.

ثانيا: **المحتويات غير الحية للسيتوبلازم**:

Inart Cytoplasmic inclusions (Non – Living) وهي عبارة عن مواد غذائية نتيجة للنشاط الايضي للخلية البكتيرية وتخزن علي صورة حبيبات أو كرات صغيرة تخزن فى سيتوبلازم الخلية وتعد هذه الحبيبات مخزن للمواد الغذائية.

من هذه الحبيبات: حبيبات الجليكوجين حبيبات لدهون ، حبيبات الفوليوتينية وفي بعض الأنواع حبيبات الكبريت.

أولا: **العضيات السيتوبلازمية Cytoplasmic organelles**:

١- الريبوسومات Ribosomes:

حبيبات صغيرة ومنتشرة فى سيتوبلازم الخلية البكتيرية وتختلف فيما بينها من حيث الشكل والحجم والكثافة وتتراوح أقطارها ما بين ١٠-٢٠ nm تتكون هذه الحبيبات من البروتين وحمض ريبونيوكليك وتسمي Riponucleoprotein وتبلغ كمية حمض الريبونيوكليك بالريبوسومات حوالي ٩٠% من كمية بالخلية البكترية والريبوسومات يبلغ وزنها حوالي ٤٠% من وزن الخلية الجاف.

ويتم بناء البروتين بالريبوسومات وتحتوي الخلية السريعة النمو والموجودة فى وسط غذائي جيد حوالي ١٥٠٠٠ حبيبه ريبوسومية. أما الخلية الموجودة فى وسط غذائي فقير وذات النمو البطئ فإنها تحتوي على عدة مئات فقط من الحبيبات الريبوسومية.

٢- الميزوسومات Mesosomes:

اشتقت هذه التسمية من الكلمة الاغريقية Mesos وتساوي Middle أو وسط أو داخلي وكلمة Soma وتساوي Body تعرف بالاجسام الداخلية وتعرف بالكوندريودات Chondrioides وهي تراكيب غشائية داخل خلوية Intracellular membranous structure.

وهذه التراكيب أكثر شيوعا فى البكتريا وهي أكثر شيوعا فى الموجبة لجرام عن البكتريا السالبة لصبغة جرام وهي عبارة عن انبعاجات كثيرة الالتفاف للغشاء السبتوبلازمي تتخذ أشكالا مختلفة وأكثر شيوعا هو الشكل الخيطي السوراي والشكل الحوصلي ويوجد اتصال بين الميزوسوم والغشاء البلازمي للخلية البكتيرية.

وظائف الميزوسوم:

١. له دور هام فى انقسام الخلية.

٢. له دور هام فى تكوين الجدر العرضية.

٣. يكون وصلة Link بين الغشاء السيتوبلازمي والنواة.

٤. له دور هام فى انقسام المادة النووية وتوزيعهما على الخليتين الجديدتين.

٥. له دور هام كموضع (مكان) للتنفس وإنتاج الطاقة أي يقوم بدور مشابه لدور الميتوكوندريا فى الخلايا الراقية.

٣- الإصباغ التمثيلية Photosynthetic pigments:

توجد في أنواع البكتريا الذاتية التغذية مثل بكتريا الكبريت الخضراء وبكتريا الكبريت القرمزية يتواجد فى السيتوبلازم تراكيب غشائية خاصة تعرف بحوامل الإصباغ تحتوي علي كلوروفيل بكتيري.

ثانيا: **الفجوات Vacuoles**:

معظم الخلايا البكتيرية تحتوي على فجوات وهي ليست من المحتويات الدائمة بالخلية حيث أنها تتأثر بالظروف البيئية المتواجدة فيها الخلية والحالة الفسيولوجية للخلية – منها فجوات غازية.

٣- الجهاز النووي Nuclear System

(المادة النووية Nuclear material)

أولا: النواة Nucleus:

عبارة عن مادة كروماتينية والنواة بدائية وهي المسئولة عن جميع العمليات الحيوية بالخلية ولكن أهم وظائفها – هو نقل المادة الوراثية من جيل إلى جيل نظرا لما تحويه من جينات وتتركب النواه أساسا من خيط واحد مزدوج من الحمض النووي DNA دي اوكسي ريبوز الذي يتكون من سكر خامسي (دي اوكسي ريبوز) ومجموعة فوسفات والقواعد النتروجينية البريميدينية والبيورنية.

ويعد المحتوي الجيني للحمض النووي دي اوكسي ريبوز وحدة عبورية مفردة أي انه يمثل كروموسوم واحد.

وتتناسب كمية المعلومات الوراثية (الجينات) المحمولة على الكروموسوم مع طوله فمثلا كروموسوم بكتريا E. coli يبلغ طوله ١١٠٠ ميكرون يحمل كمية معلومات وراثية تفوق حجم ما يحمله كروموسوم الميكوبلازما فى بعض الأحيان يلتف الكروموسوم حول نفسه ليكون حلقه مستقلة تعرف بالكروموسوم الدائري.

وظائف الأحماض النووية بالخلايا الحية:

١. يحتوي الكروموسوم البكتيري على المعلومات اللازمة لبناء البروتين وتوجد هذه المعلومات مرتبة خاصا على نيوكليوتيدات الحمضي النووي DNA الذى يوجد معظمه فى الكروموسوم البكتيري – وأحيانا توجد بنسبة بسيطة منه فى جزئيات اصغر وهي البلازميدات (الخيط الصبغي الصغير). بواسطة هذه المعلومات الوراثية تستطيع الخلية البكتيرية بناء بروتينات الخلية كل نوع يحتوي على ٢٠٠ حمض اميني مرتبة ترتيب خاص ينتج عنه النشاط الحيوي للبروتين واي خلل فى الترتيب يؤدي لفقد النشاط الحيوي للبروتين.

٢. امداد الخليتين البنويتين بنسخة طبق الاصل من الكروموسوم من خلال عملية التضاعف Replication.

ثانيا: **الإبيسومات** Episomes:

أجزاء من الحمض النووي DNA توجد خارج الكروموسوم البكتيري وتعرف باسم الزائدة الكروموسومية Extrachromosomal DNA ويبلغ حجمها ١٠/١ حجم الكروموسوم ويستطيع الابيسوم تكرار نفسه بطريقة مستقلة عن الكروموسوم. تقوم الابيسوم بنقل المادة الوراثية بين الخلايا البكتيرية.

ثالثا: **البلازميدات Plasmids**:

عناصر وراثية خارج الكروموسوم البكتيري وتظل خارجه وتسمي بالخيط الصبغي الصغير وتتحكم البلازميدات فى عديد من الانشطة الفسيولوجية للخلية البكتيرية.

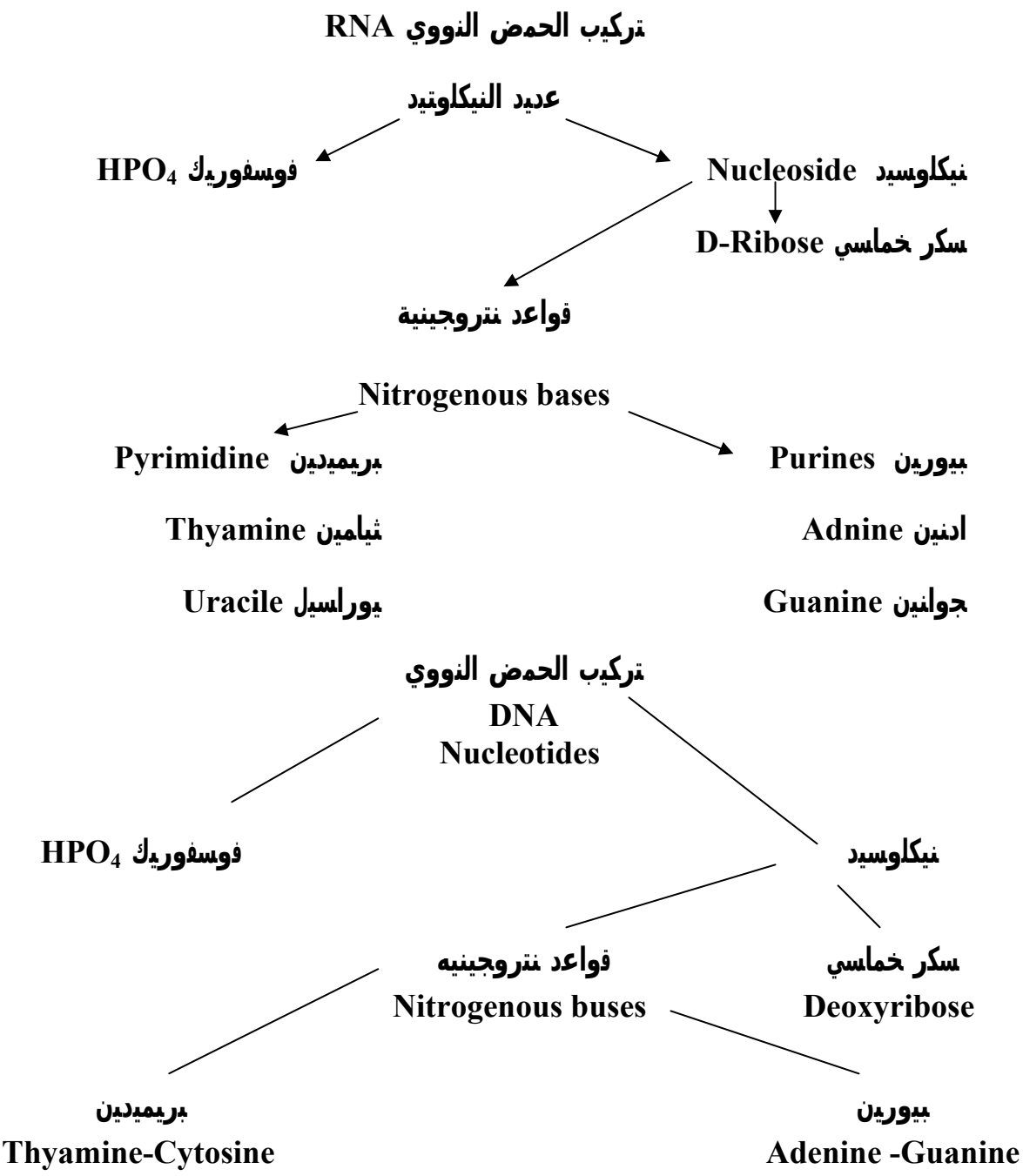
فجينات البلازميدات تضيف للخلية قدرات وصفات اضافية لم تكن موجودة من قبل فى الخلية.

أجناس بسيدوموناس Psendomonas تحتوي بلازميداتها على جينات تكسبها تكسير مادة الكامفور واجناس E. coli تحتوي بلازميدتها على جينات تكسبها خاصة مقاومة المضادات الحيوية والبعض الآخر تحتوي بلازميداتها على جينات تكسبها صفة مقاومة السموم الداخلية Endotoxins.

ومن أهم مجاميع البلازميدات المنتشرة فى الأجناس البكتيرية:

بلازميدات عامل المقاومة Resistance Factor (RF).

بلازميدات عامل الخصوبة Fertility particles (FP).


تركيب الحمض النووي RNA
عديد النيكلوتيد
فوسفوريك HPO_4
Nucleoside نيكلوسيد
سكر خماسي D-Ribose
قواعد نتروجينية
Nitrogenous bases
Pyrimidine بريميدين
Purines بيورين
Thyamine ثيامين
Adnine ادنين
Uracile يوراسيل
Guanine جوانين
تركيب الحمض النووي
DNA
Nucleotides
فوسفوريك HPO_4
نيكلوسيد
قواعد نتروجينيه
Nitrogenous buses
سكر خماسي
Deoxyribose
بريميدين
Thyamine-Cytosine
بيورين
Adenine -Guanine

طرق تجميع العينات:

- يتم تجميع وإعـداد عينـات الميـاه للاختبـارات الميكروبيولوجيـة فـى زجاجـات نظيفة ومعقمة ويجب إضافة ثيوسـلفات الصـوديوم بكميـة كافيـة لإزالـة الكلـور المتبقي فى الماء للعينة حتى تكون الاختبـارات الميكروبيولوجيـة ذات دلالـة أكثـر دقة للمحتوي الميكروبيولوجي في عينة المياه أثناء اخذ العينة.
- كذلك بالنسبة لعينات ميـاه الصـرف الصـحي المعـالج والمعامـل بـالكلور يجـب إضافة ثيوسلفات الصوديوم الكافي لإزالـة الكلـور فـى زجاجـة العينـة ١٢٠مـل أضف ٠.١ مل من محلول ثيوسـلفات الصـوديوم بتركيـز ١٠% التـي سـتكون كافية لإزالة الكلور المتبقي حتى ١٥ ملليجرام/لتر.
- بالنسبة لمياه الشرب أضف ٠.١ مل مـن ثيوسـلفات الصـوديوم بتركيـز ٣% فـى ١٢٠ مل عينة مياه كافية لإزالة 5 مليجرام/لتر كلور متبقي.
- الزجاجات وغطائها يجب تعقيمها اوتوكلافيا أو بالحرارة الجافة.
- من الممكن إضافة ثيوسلفات الصوديوم داخل الزجاجـات قبـل التعقـيم ثـم تعقيمهـا اوتوكلافيا.
- أما تجميع عينـات ميـاه ذات محتـوي عـالي مـن العناصـر الثقيلـة (المعـادن) وخاصة النحاس أو الزنك (اكبر من ١ ملليجـرام/لتـر) أو عينـات ميـاه الصـرف الصحي ذات المحتوي العالي من هـذه المعـادن يجـب إضـافة مـواد ذات تـأثير كُلاّبي Chelating agent وبذلك نقلل تـأثير سـمية علـى هـذه العناصـر علـى الميكروبات الموجودة.
- مثل إضافة محلول EDTA (استخدام ٣٧٢ ملليجرام/لتـر مـن أمـلاح الصـوديوم الثنائية من حمض ايثلين داي أمين تتـرا اسـتيك مـع ضـبط هـذا المحلـول عنـد درجة حموضة ٦.٥).

(إضافة ٠.٣ مل من هذا المحلول ١٥% لكل ١٢٠ مل من العينة).

- عند تجميع العينات يجب عدم ملئ الزجاجـات لنهايتهـا مـع تـرك منطقـة خاليـة ١٠سم حتي يسهل خلط وتجانس العينة وذلك بالرج قبل الفحص.

- ويتم اخذ العينة تحت ظروف تعقيم وتطهير المصدر المـأخوذ منـه العينـة حتـي لا يحدث التلوث من الخارج ويتم غلق الزجاجات بإحكام.
- يتم اخذ العينة من شبكة التوزيع بحيث تكون من مصدر الشـبكة رأسـا ولـيس مـن خزان وتكون بعيده عن أي تلوث يتم فتح الصـنبور أولا لمـدة ٣ دقـائق ثـم تغلـق ويتم تطهيرها وحرق الصنبور ثم تفـتح مـرة أخـري وبعـد ٢ دقيقـة يـتم اخـذ العينة.
- يتم اختيار نقط من الشبكة تمثل درجة التوزيع الكاملة للمنطقة.
- مواقع العينات يجب أن تكون من مواقع عامـة مثـل مراكـز الشـرطة أو مراكـز الإطفاء أو النـوادي أو المقـاهي أو المكاتـب الحكوميـة أو مـدارس أو محطـات للقطار أو الأتوبيس أو مواقع تجميعية أو مواقع تجارية أو مطاعم أو مصانع.

المياه السطحية:

لدراسة مجري مائي يتم اختيار المواقع التى يـتم دراسـتها بكتريولوجيـا والتـي تشـتمل على الخطوط الأساسية. يـتم اختيـار المواقـع والتـى تعكـس أى تغييـر تحـدث فـى المجري المائي.

عينه مياه الشرب:

لابد من المحافظة على هذه العينات علي درجة اقل مـن ١٠مْ أثنـاء النقـل مـن مواقـع العينات للمعمل لابد من إجـراء التحاليـل الميكروبيولوجيـة المطلوبـة فـى نفـس يـوم استقبال العينات إذا كان ذلك ممكـن أو توضـع فـى الثلاجـة (٤مْ) ليلـة واحـدة عقـب وصولها متأخرة.

- يجب ألا تزيد عن ٨ ساعات من تجميع العينات لتحليلها للعد الكلي البكتيري.
- يجب ألا تزيد عن ٣٠ ساعة من تجميع العينات لتحليلهـا لوجـود مجموعـة بكتريـا القولون الكلية.
- عموما عينات المياه المجمعة من مصادرها يجب المحافظـة عليهـا علـى اقـل مـن ١٠مْ أثناء النقل فى حدود ٦ ساعات ويتم التحليل فى حدود ٢ ساعة.

بسم الله الرحمن الرحيم

"وجعلنا من الماء كل شيء حي"

صدق الله العظيم

Water: Indicators and pathogens

Prof. Dr. Mohamed Kamel

The Importance of Water

1- It is evidently clear that water is one of the prime elements responsible for life on earth.
2- Two thirds of the earth's surface covered by water.
3- The human body consisting of 75 % of it.
4- Further in the body, it regulates the activities of fluids, tissues, cells, lymph, blood and glandular secretions.
5- Necessary for photosynthesis.

Role of water in disease transmission

Water-borne diseases:
are any illness caused by drinking water contaminated by human or animal feces, which contain pathogenic microorganisms.
Water borne diseases spread by contamination of drinking water systems with the urine and feces of infected animals or people.

USAID | EGYPT
FROM THE AMERICAN PEOPLE

This is likely to occur where public and private drinking water systems get their water from surface waters (rain, creeks, rivers, lakes etc.), which can be contaminated by infected animals or people. Runoff from landfills, septic fields, sewer pipes and residential or industrial developments can also sometimes contaminate surface water.
This has been the cause of many dramatic outbreaks of fecal-oral diseases.

USAID | EGYPT
FROM THE AMERICAN PEOPLE

Cholera: *Vibrio cholerae.*
Diarrheal disease: *E. coli.*
Dysentery : Shigella/Salmonella.
Typhoid: *Salmonella typhi.*

USAID | EGYPT
FROM THE AMERICAN PEOPLE

Historical events in the provision of safe drinking water

USAID | EGYPT
FROM THE AMERICAN PEOPLE

1820's	The sand filter was put into use by James Simpson in the U.K. to clarify drinking water.
1852	Filtering water became law in London, England.
1854	John Snow linked the cholera outbreak in London to a specific water pump based on epidemiological evidence.
1881	Koch showed that pure cultures of bacteria were destroyed by hypo-chlorites.
1885	Frankland reported the first routine examination of water in London, using gelatin plate counts.
1887	Escherich found *Bacillus coli* (now *E. coli*) ubiquitous in human feces.
1890	Koch published the *Germ theory of disease*, linked the cholera outbreak to *Vibrio cholerae* in water.
1891	The Franklands introduced the concept of bacterial indicators.

1892	Schardinger in Australia suggested the use of *E. coli* as an indicator in water monitoring.
1893	Blachstein coins the term coliform.
1904	Eijkman found a highly selective detection method for *E. coli*, using elevated temperatures, 44–46 ◦C.
1907	Winslow and Walker report that *E. coli* is largely fecal in origin while other coliforms are not.
1919	Typhoid fever outbreak in Pforzheim (Germany) 400 deaths; drinking water proven as source. Led to establishing protected areas as sources of drinking water and decontamination of the water.
1948	Mackenzie finds that most coliforms are indole negative while *E. coli* is indole positive.
1948–1950	UK tests for *E. coli* with indole test; US uses fecal coliform (acid and gas at 44 ◦C).
1930–1950	Most developed countries introduce chlorination.
2003	The WHO recommends *E. coli* as the best indicator of fecal contamination.

Detection of pathogenic bacteria

Methods for detecting pathogens in water are mostly still in the development stage, because:

(a) Their sensitivity is still poor. The methods for detecting the pathogen are usually very sensitive, but because of the low level of pathogens in water, large volumes need to be analyzed.

(b) Only a few of the multitude of possible pathogens are currently detectable. Given the water may contain hundreds of different pathogens, and these may vary over time.

(c) Pathogen testing methods are relatively specific and will not detect all pathogens present.

(d) Analysis of water samples for pathogens requires a specialized laboratory, highly trained personnel and appropriate bio-safety containment.

(e) Although some pathogens can be tested rapidly, most pathogen sampling and detection methods still have a time-to-(verified)-result of several days.

Bacterial indicators

Characteristics of the ideal indicator

(a) The indicator should be absent in unpolluted water and present when the source of pathogenic microorganisms of concern is present.

(b) The indicator should not multiply in the environment.

(c) The indicator should be present in greater numbers than the pathogenic microorganisms.

(d) The indicator should respond to natural environmental conditions and water treatment processes in a manner similar to the pathogens of concern.

(e) The indicator should be easy to isolate, identify and enumerate.

(f) The test should be inexpensive thereby permitting numerous samples to be taken.

(g) The indicator should not be a pathogenic microorganism.

Classification

USAID | EGYPT
FROM THE AMERICAN PEOPLE

Group	Definition
General (Process) indicator.	A group of organisms that demonstrates the efficacy of a process, such as total heterotrophic bacteria or total coliforms for chlorine disinfection.
Fecal indicator	A group of organisms that indicates the presence of fecal contamination, such as thermotolerant coliforms or *E. coli*. Hence, they only infer that pathogens may be present.
Index and Model organisms	A group/or species indicative of pathogen presence and behaviour respectively, such as *E. coli* as an index for Salmonella and F-RNA coliphages as models of human enteric viruses.

USAID | EGYPT
FROM THE AMERICAN PEOPLE

Thank You

بسم الله الرحمن الرحيم

"وجعلنا من الماء كل شيء حي"

صدق الله العظيم

Bacterial indicators of fecal pollution

By

Prof. Dr. Mohamed Mohamed Kamel

Bacterial indicators of fecal pollution

* Total coliforms.
* Fecal coliforms.
* *Escherichia coli.*
* Fecal streptococci.
* Coliphages.

Total viable bacterial counts

HPC measurements are used to:

(a) Indicate the effectiveness of water treatment process thus as an indirect indication of pathogen removal.

(b) As a measure of numbers of regrowth organisms that may or may not have sanitary significance.

USAID | EGYPT
FROM THE AMERICAN PEOPLE

Total coliform

The coliform or total coliform group includes all of the aerobic and facultative anaerobic gram-negative ,non spore –forming, rod –shaped bacteria that ferment lactose in 24-48 hours at 35 C°.

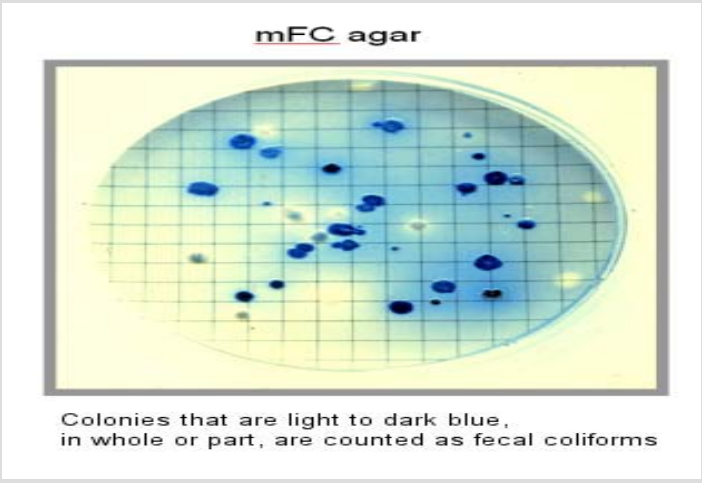
USAID | EGYPT
FROM THE AMERICAN PEOPLE

USAID | EGYPT
FROM THE AMERICAN PEOPLE

Fecal coliform

The fecal coliform are part of the total coliform group. They are defined as gram – negative , non –spore forming rods, that ferment lactose in 24±2 hours at 44.5 ±0.2C° with the production of gas in a multiple – tube procedure or produce acidity with blue colonies in a membrane filter procedure or M-FC agar.

USAID | EGYPT
FROM THE AMERICAN PEOPLE



USAID | EGYPT
FROM THE AMERICAN PEOPLE

Escherichia coli

Escherichia coli is the most ideal indicator of fecal pollution of water because:

(a) It is the only fecal coliforms bacteria of true fecal origin.

(b) It is present in large numbers in the feces of warm-blooded animals.

USAID | EGYPT
FROM THE AMERICAN PEOPLE

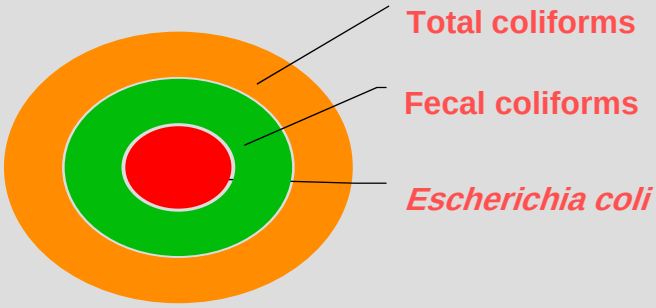
(c) It survives longer than some bacterial pathogens, yet is resistant to regrowth outside of the host under typical environmental conditions.

(d) It can be detected and quantified simply and affordably.

(e) *E. coli* could not multiply outside the intestines of warm blooded animals.

USAID | EGYPT
FROM THE AMERICAN PEOPLE

Relationships among total and fecal coliforms and *Escherichia coli*

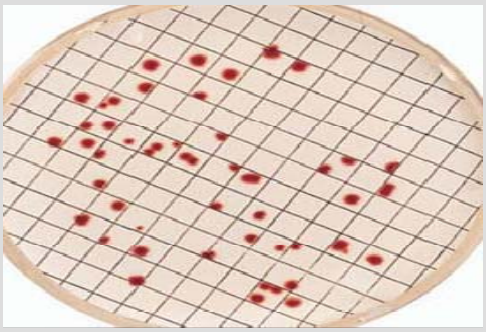


USAID | EGYPT
FROM THE AMERICAN PEOPLE

Fecal streptococci

Parallel to the work on coliforms, a group of Gram-positive coccoid bacteria known as fecal streptococci (FS) were being investigated as important pollution indicator bacteria.

All fecal streptococci that grow at pH 9.6, 10°C and 45°C and in 6.5% NaCl.



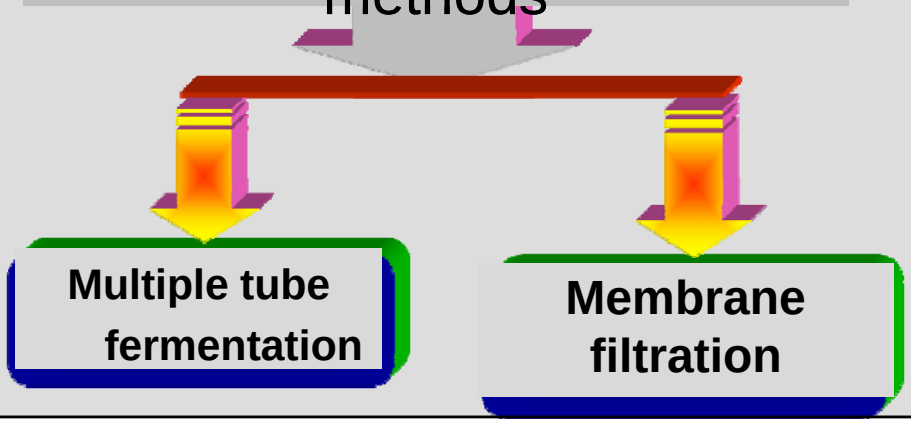
Fecal streptococci on m-enterococcus agar

Coliphages

* Viruses which infect and replicate in bacteria, known as bacteriophages or simply as phages.
* Phages are present in human and animal feces.
* Phages are used as a model of enteric human viruses.
* Phages have no hazardous for humans.

USAID | EGYPT
FROM THE AMERICAN PEOPLE

There are two standard methods



USAID | EGYPT
FROM THE AMERICAN PEOPLE

Thank You

التعقيم

Sterilization

التعقيم Sterilization

تعريف:

هو إبادة أو إزالة جميع الميكروبات الموجودة بالأدوات أو المواد سواء كانت على حالة خضرية أو على حالة جراثيم.

طرق التعقيم:

أولا: الحرارة:

١. الحرارة الجافة Dry Heat (يحتاج لحرارة أعلي من الرطبة ومدة أطول).

٢. الحرارة الرطبة Moist Heat.

ثانيا: التعقيم بواسطة الكيماويات.

ثالثا: التعقيم بواسطة الترشيح.

١- الحرارة الجافة وتشمل:

أ. اللهب المباشر (لهب بنزن) لتعقيم ابر التلقيح وفوقه الأواني الزجاجية الزجاجات والشرائح الزجاجية والأنابيب وقد تستعمل بضع نقط كحول ثم إشعالها كما فى تعقيم فوهة الصنبور وغير ذلك.

ب. الهواء الساخن (الفرن) ويستخدم لتعقيم الزجاجات والأواني الزجاجية (والماصات الزجاجية) وأطباق بتري بعد وضعهما فى العلب.

ويتم التعقيم على درجتين من الحرارة ١٨٠مْ لمدة ٢/١ ساعة و١٦٠مْ لمدة ساعة.

الحرارة الرطبة: أي باستخدام البخار وتشمل:

١- استخدام حرارة البخار (درجة الحرارة ١٠٠مْ) ويستخدم لذلك جهاز Steamer (المبخر) جهاز ارنولد وهو عبارة عن إناء محكم الغلق يوضع بداخله ماء به أرفف لوضع المواد والبيئات المراد تعقيمها.. والجهاز مزود بثرومستات وترمومتر بغطاء الجهاز.

طريقة عمله:

يسخن الماء حتي درجة الغليان ١٠٠مْ تحت الضغط الجوي العادي ويخرج البخار الذى يستخدم فى تعقيم البيئات التى تفسد عند استعمال الحرارة العالية (أكثر من ١٠٠مْ) مثل: بيئة السكريات، بيئة الكربوهيدرات، بيئة اللبنن بيئة الجيلاتين. (خوفا من تكسير أو حرق السكريات).

وتعرض البيئات للبخار لمدة ٢٠ دقيقة يوميا على ثلاثة أيام متعاقبة ويسمي بالتعقيم المتقطع Intermittent sterilization وهذا التكرار راجع لتدمير الخلايا الخضرية ثم تترك العينة على درجة الحرارة العادية لتتاح الفرصة لجراثيم البكتريا أن تنبت متحولة لخلية خضرية ثم يعاد التعقيم مرة أخري لقتل هذه الخلايا الخضرية وهكذا فى المرة الثالثة.

٢- الحرارة الرطبة (نجار تحت ضغط Steam under pressure):

وهي أحسن وأسرع وسيلة للتعقيم حيث أن الحرارة الرطبة قادرة على اختراق الخلايا ومن ثم تنشأ قدرتها على تدمير هذه الخلايا كما إنها قادرة على اختراق جدر الجراثيم وقتلها.

يستخدم فى هذا النوع من التعقيم جهاز الاوتوكلاف (عبارة عن إناء من معدن يتحمل الضغوط العالية (سميك الجدر) وحكم المغلق بغطاء سميك يحكم قفله بداخله مكان لوضع الماء مزدوج الجدر بالحالة الداخلية مكان لوضع المواد والأجهزة المراد تعقيمها يوجد بالجهاز مكان لدخول الماء وخروجه مزود بترموستات وترمومتر يوجد به صمام أمان.

لتشغيل الجهاز:

توضع المواد المراد تعقيمها ثم يوضع الماء بالقدر الكافي حتي العلامة ثم يغلق غلقا محكما ثم يشغل الجهاز لتسخين الماء على أن يكون صمام فتحة الهواء مفتوحة لخروج الهواء الموجود وعند خروج البخار يغلق الصمام فيرتفع الضغط داخل حلة الاوتوكلاف ويظهر ذلك على المانومتر الذى سبق ضبطه عند الضغط المطلوب ١.٥

والحرارة المطلوبة ١٢١مْ (حيث ترتفع درجة الحرارة بارتفاع الضغط) (١٠٠مْ على الضغط الجوي العادي).

فلقد درج المانومتر من نقطة البداية (الضغط الجوي العادي) الصفر (١٥رطل/بوصة٢) يبدأ ارتفاع الضغط بزيادة وجود البخار يبدأ المانومتر فى الارتافع حتي يصل إلى لاضغط المطلوب تتصل درجة الحرارة ١٢١مْ وينظم هذه الدرجة وجود الثرومستات لقطع التيار وتشغيله.

ويترك الجهاز بهذا الضغط ودرجة الحرارة المطلوبة للمدة المطلوبة ثم يفصل التيار عن الجهاز ويترك ا لجهاز ليبرد وينزل الضغط ثم يبدأ فى فتح الصمام وفتح الجهاز وتستخرج منه الأدوات.

ولا يجب الإسراع فى فتح الاتوكلاف حتى لا تغلي البئات السائلة بشدة وتفور نتيجة وجودها على درجة اعلي من ١٠٠مْ وتطير السدادات أو تكسر الأواني الرخامية.

والاتوكلاف: هو اساس معمل الميكروبيولوجي ويستخدم في:

١. معظم البيئات الميكروبيولوجية التي تتحمل درجات الحرارة العالية.
٢. الشاس – القماش – القطن – السدادات.
٣. المرشحات المختلفة.
٤. المزارع البكتيرية الممرضة يتم التخلص منها بالتعقيم بواسطة الاوتوكلاف.

الاحتياجات لنمو الكائنات الدقيقة

زراعة الكائنات الدقيقة تعتمد أساسا على عوامل هامة:

١. المواد الغذائية القابلة للاستخدام.
٢. توفر الرطوبة اللازمة للنمو.
٣. توفر الأكسوجين أو الظروف اللهوائية (غازات أخري) التي يحتاجها الميكروب لنموه.
٤. استخدام درجة الحرارة المناسبة درجة الحموضة PH المناسبة للنمو.
٥. منع التلوث للبيئة أي تكون معقمة.

الأساسيات فى مكونات البيئات الغذائية:

١. مصدر كربوني للحصول على الطاقة مثل المواد الكربوهيدراتية سكر الجلوكوز والمالتور واللاكتوز....

٢. مصدر نتروجين مثل الببتون ومشتقاته.

٣. مصدر للفوسفات والكبريت الفوسفور يستخدم فى تخليق نيكلوتير ونيكلوسيد والأحماض النووية والفوسفوليبيدات والكبريت لتكوين الأحماض الامينية الكبريتية.

٤. الأملاح المعدنية مثل الصوديوم والبوتاسيوم والمغنسيوم والكالسيوم وابون الفوسفور وبعض المعادن بكمية ضئيلة جدا مثل الزنك وغيره والمنجنيز والتى تستخدم فى نمو البكتريا.

٥. الماء عنصر مهم لتكوين البروتوبلاست للخلية البكتيرية الماء الحر يجب أن يكون قابل للاستخدام ونقل المواد الغذائية.

٦. عوامل النمو مثل الفيتامينات والأحماض الامينية والقواعد النتروجينية البيورين والبيربمدين.

العوامل التى تؤثر على البيئات الغذائية وتاثيرها على الخصائص المشجعة للنمو:

- تعتمد البكتريا قدرتهما على النمو على بعض العوامل الفيزيقية والكيميائية.
- فالنمو يكون أساسا على تكاثر الخلايا البكتيرية وزيادة كثافتها فى البيئة الغذائية.
- فاستخدام البيئة المناسبة والمحتوية على مواد غذائية وعوامل النمو التى تشجع زيادة إعداد البكتيرية وكل ذلك معتمد على عوامل أخري تؤثر على النمو فى البيئة.

البيئات الغذائية

Culture media

البيئة الغذائية:

هي تلك البيئة التى يمكن للكائن الحي أن ينمو فيها أو عليها وهي متباينة فى التركيب وهي تستعمل لتنمية البكتريا ودراسة تأثير الكائنات الحية على احدث المواد الغذائية فى الوسط الغذائي وعموما تتكون أي بيئة من مصدر كربوني والتى يحصل عليها من الكربوهيدرات ومصدر ازوتي ويحصل عليه من أملاح الامونيوم والنترات وبعضها يتطلب أزوت عضوي ويفضل استخدام الببتون.

وتضاف للبيئة الغذائية أملاح معدنية والماء ومواد النمو الإضافية اللازمة لنمو الأحياء الدقيقة.

ويجب توفر جميع العوامل الضرورية للنمو كتوفر نسبة الرطوبة وتركيز ايون الإيدروجين والضغط الازموزي والتوتر السطحي وحالة الأكسدة والاختزال.

أنواع البيئات الغذائية

بيئة غذائية سائلة Nutrient broth تصلح لتنمية أنواع كثيرة من البكتريا الهوائية.
ا(بيتون + مستخلص اللجم)
أحيانا يضاف لها مستخلص الخميرة

بيئة الاجار المغذي Nutrient agar
يكون فى حالة صلبة فى درجة حرارة الغرفة ٢٥ْم يمكن اسالته بالتسخين يستخدم لنمو المستعمرات البكتيرية (1.5% agar)

بروتين حيواني أو نباتي ← (تحلل مائي / إنزيم التربسين) بروتين ← ببتون
↓
ببتيد
↓
أحماض امينية

مستخلص اللحم Beet extract ← تحضر بتركيز المستخلص المائي للحمم البقري غير الدهني عن طريق الغليان يحوي هذا العصير على جميع المكونات اللحم القابلة للدوبان

تصنف البيئات الغذائية للأنواع التالية:

١. البيئات المقواه Enriched Media: إضافة بعض المواد الضرورية إلى المنبت الغذائي الصلب أو السائل كالدم، السيرم وبعض المستخلصات النباتية والحيوانية لكي تساعد هذه المواد على نمو وتكاثر البكتيريا.

٢. البيئات المنتقية Selective Media:

إضافة بعض المواد الكيماوية أو المختارة إلى المنبت الغذائي لأجل منع نمو نوع واحد أو مجموعة من البكتريا وليس الأنواع الأخرى.

فمثلا إضافة صبغة الابوسين، الكريستال البنفسجية، وازرق المثيلين للمنبت الغذائي حيث يؤدي لنم نوع معين من البكتريا وعدم نمو الأنواع الأخرى.

٣. البيئات المفرقة للميكروبات Differential Media:

فمثلا تلقيح خليط من البكتريا على بيئة آجار الدم Blood agar فان بعض البكتريا سوف تحلل كريات الدم الحمراء بينما الأخرى لا تحلله – ظهور بقعة شفافة حول مستعمرة البكتريا هي برهان ثابت على عملية تحلل الدم Blood Hemolysis.

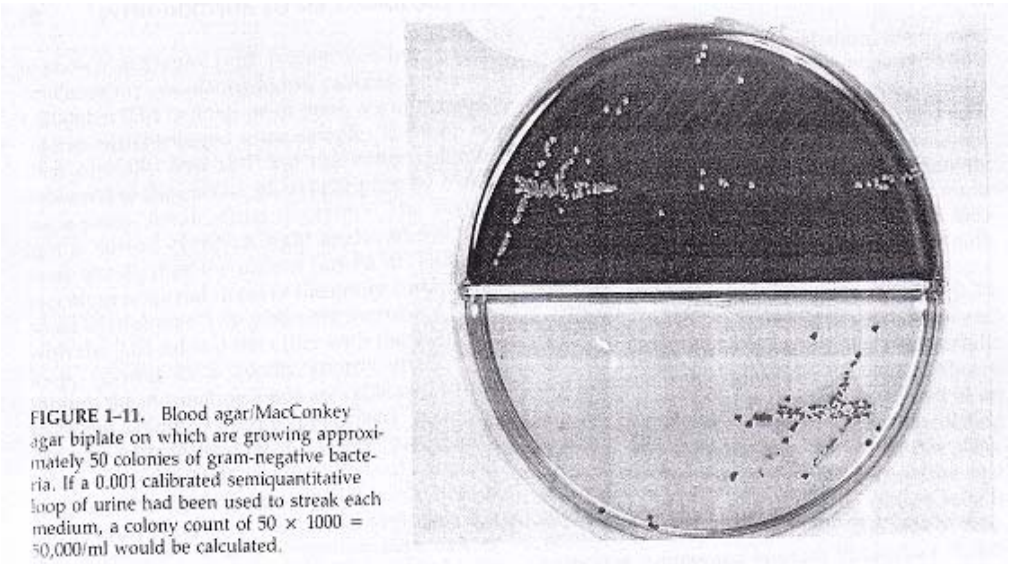


FIGURE 1–11. Blood agar/MacConkey agar biplate on which are growing approximately 50 colonies of gram-negative bacteria. If a 0.001 calibrated semiquantitative loop of urine had been used to streak each medium, a colony count of 50 × 1000 = 50,000/ml would be calculated.

٤. بيئات المعايرة Assay Media:

بيئات غذائية تحتوي على مواد غذائية خاصة وثابتة تستعمل لبيان كمية الفيتامينات والأحماض الأمينية والمضادات الموجودة فى المادة كذلك بيئات غذائية خاصة يمكن استخدامها فى الفحص عن قوة المواد المطهرة.

٥. بيئات عد البكتريا Media for Enumeration of bacterial:

بعض البيئات الغذائية تستخدم لإحصاء العد الكلي البكتيري فى المياه.

٦. البيئات المستخدمة لبيان صفات البكتريا Characterization:

تستخدم للتعرف على نوع النمو وعلى التغير الكيميائي الناتج عن الأحياء المجهرية مثل بيئات السكر التخمرية.

٧. لبيئات الخاصة:

تحضر أنواع من البيئات الغذائية المختلفة لأجل إكثار وعزل والتعرف على أنواع مختلفة من الأحياء المجهرية.

وهناك عوامل أخري تؤثر على النمو فى البيئات الغذائية:

١. درجة الحموضة PH كل مجموعة من الكائنات لها حدود فى نموها ولها حد امثل لكي تعطي أقصي نمو لها.

لذلك يجب ضبط PH للبيئة. وهناك أنواع مختلفة من PH indicator Thymol blue, methyl red, phenol red, etc. كما يجب إضافة أملاح منظمة phosphate buffer.

١- جهد الأكسدة والاختزال Oxidation Reduction Potential تمثلا البكتريا الهوائية تحتاج للأكسوجين واللاهوائية تستخدم الحالات المختزلة (ظروف لا هوائية) وبالتالي غياب الاكسوجين المذاب ففي حالة الظروف الهوائية يكون مستقبل الاكسوجين الهيدروجين.

٢. درجة الحرارة: كل عمليات النمو تعتمد على التفاعلات الكيميائية ومستوي هذه التفاعلات تتأثر بدرجة الحرارة وبالتالي يتأثر نمو البكتريا بدرجة الحرارة ولكل نوع من البكتريا يوجد لها حدود من درجات الحرارة وكذلك لها درجة حرارة مثلي.

٣. الضغط الاسموزي: يؤثر الضغط الاسموزي تأثير مباشر على سرعة واتجاه تيار الماء من الوسط الخارجي والكائن الدقيق وقد يؤثر على مقدار استفادة الكائن من الرطوبة وتحرك المحاليل لداخل الخلية وخارجها مرتبط بالغشاء البلازمي والجدار الخلوي للخلية.

٤. الرطوبة Moisture: النشاط المائي Water activity فالماء فى مصادر البيئات يكون ميسور والبكتريا تعتبر من صور الحياة المائية Aquatic forms لانها تتغذي بالانتشار الغشائي فالماء يذيب المواد الغذائية اللازمة لها ويحمل نواتج الايض لخارج الخلية والمحافظة على رطوبة البرتوبلازم فالماء يمثل ٧٠-٩% من مكونات الخلية بكمية الرطوبة الحرة هي التى تحدد نمو ومدي نشاط البكتريا وليست كمية الرطوبة الكلية الماء النقي النشاط المائي له = ١ ثم تقل كلما ارتفع تركيز المواد المترابة بماء الوسط الحد الأدني للنشاط المائي اللازم لنمو البكتريا العادية = ٠.٩١ .

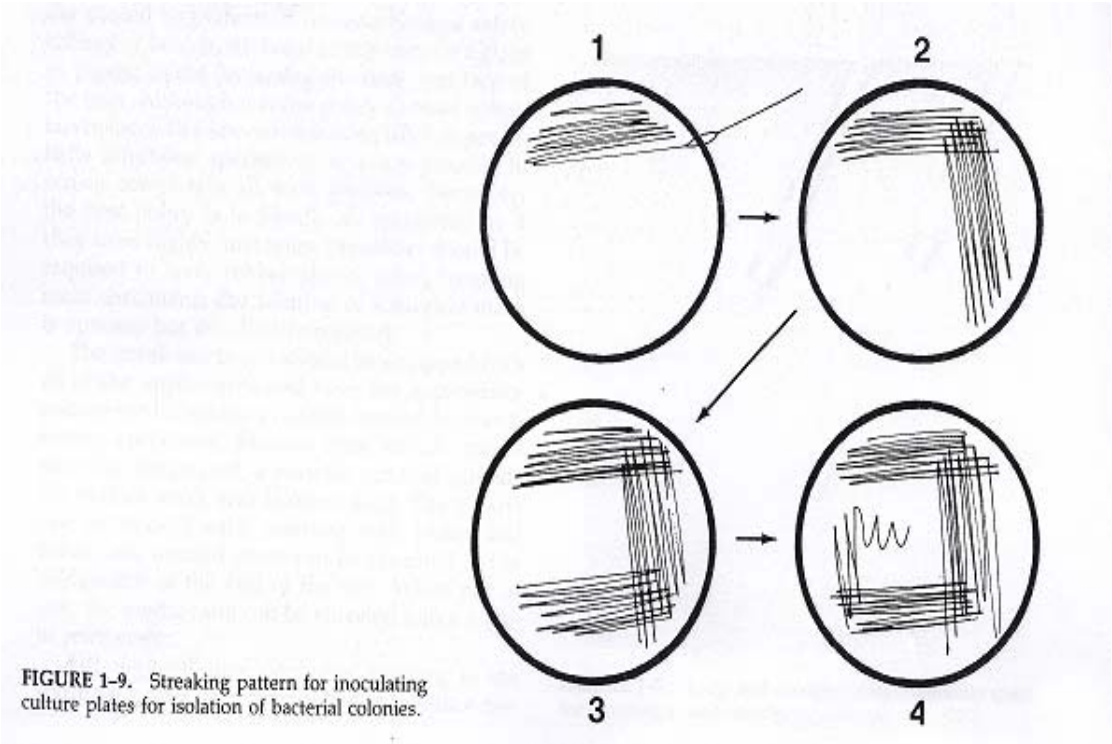


FIGURE 1–9. Streaking pattern for inoculating culture plates for isolation of bacterial colonies.

طرق التحاليل البكتريولوجية للمياه

قد تحتوي المياه المعالجة أو الغير معالجة بطرق غير كافية على كائنات دقيقة مسببة لكثير من الامراض يستغرق الكشف من هذه المسببات المرضية البكتيرية والتى تسبب امراضا مثل الدوسنتاريا الباسيلية والتيفود وغير ذلك وقتا طويلا وتحتاج لمجهود أكثر مما انه يتطلب احتبارات كثيرة لذا يستعاض عن الكشف عن تلك المسببات المرضية سواء كانت فيروسية بكتيرية أو طفيلية والتى قد يحتمل وجودها فى الماء بالكشف عن وجود الدلائل البكتيرية مثل العد الكلي البكتيري عند درجتي حرارة ٣٥ أو ٣٧مْ، ٢٠مْ أو ٢٢مْ – وبكتيريا القولون الكلية وبكتريا القولون البرازية وكذلك ابشرشياكولاي والبكتريا السبحية البرازية.

الصفات العامة للدليل المثالي:

- يجب ألا تكون هذه الدلائل البكتيرية ممرضة.
- يجب وجودها بإعداد عالية فى المواد البرازية للإنسان والحيوان.
- يجب ألا تتكاثر (تتضاعف) فى المياه الطبيعية.
- قدرة تحملها مشابهة أو أكثر من الميكروبات المرضية المعوبة.
- يجب أن توجد بإعداد اكبر من الميكروبات المرضية المعوبة.
- مدي استجابتهما لعمليات المعالجة يجب أن يكون مماثلا لاستجابة الميكروبات المرضية المعوبة.
- ان يكون من السهل الكشف عنها وعدها بواسطة طرق بسيطة وسريعة وغير مكلفة.

١. أدلة عامة General indicators:

هذه المجموعة من البكتريا تعطي صورة عامة على حالة ونوعية المياه من الناحية الميكروبيولوجية مثل العد الكلي البكتيري – مجموعة بكتريا القولون الكلية.

٢. أدلة التلوث البرازي Faecal pollution indicators:

هذه المجموعة وجودها يدل على وجود التلوث البرازي مثل مجموعة بكتريا القولون البرازية – ايشرشياكولاي – مجموعة البكتريا السبحية البرازية وهذه المجموعة يدل وجودها على احتمال وجود الميكروبات المعوية.

٣. أدلة العمليات Process indicators:

هذه المجموعة التى تستخدم كدلالة على كفاءة عمليات المعالجةمثل العد الكلي البكتيري وبكتريا القولون الكلية فمن الممكن استخدامها كدلالة على كفاءة عملية التعقيم بالكلور.

لتحديد نوعين وجوده المياه ومدي درجة تلوثها وخطورتها على الصحة العامة لذلك نعتمد على نظام وجود أو عدم وجود عدة دلائل بكتريولوجية وعموما تقسم الدلائل البكتريولوجية إلى:

١. دلائل كفاءة عمليات المعالجة Process indicators.

- العد الكلي البكتيري Total viable bacterial.
- بكتريا القولون الكلية Total count coliforms .

٢. دلائل تدل على نوعية المياه بصفة عامة General indicator:

- العد الكلي البكتيري.
- بكتريا القولون الكلية.

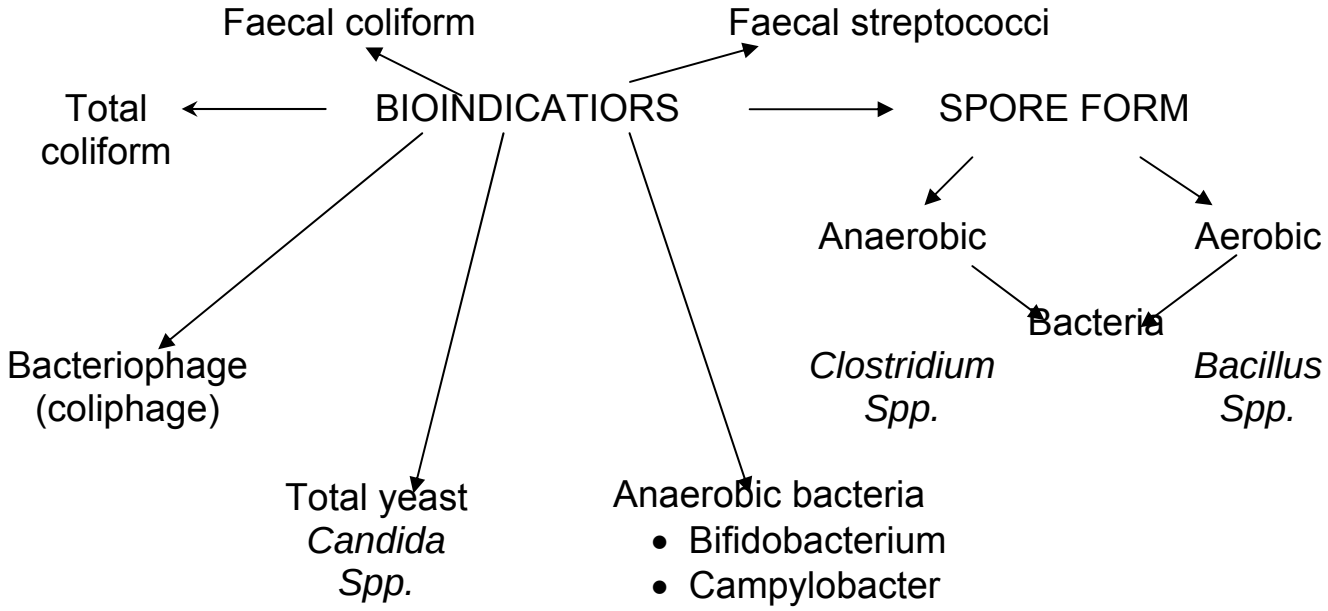
٣. دلائل تدل على التلوث البرازي فى المياه Faecal pollution:

- بكتريا القولون البرازية Faecal coliform.
- البكتريا السبحية البرازية Faecal strepotococci .
- ايشرشيا كولاي *Escherichia coli*.

وكخطوة اولي يجب نضع خط فاصل بين Indicator, Index.

- Index organism مؤشر يدل على وجود ميكروب مرضي معين فى حالة وجوده.

- مثل بكتريا *Escherichia coli* يعتبر كمؤشر جيد لوجود أو غياب بكتريا Salmonella أو Shigella فى المياه أو تستخدك كموديل لسلوك مجموعة بكتيريا Enterobacteriaceae في اي نوع من انواع المعالجة.



طرق التحاليل البكتريولوجيا للمياه:

لحماية البيئة المائية يجب عمل رصد بيئي للملوثات البيولوجية للمياه ويجب خلوها من المسببات المرضية وهذه المسببات المرضية يكون مصدرها الرئيسي التلوث البرازي الآدمي أو الحيواني للمياه وذلك نتيجة للنشاط الإنساني والذى يجب أن يكون تحت السيطرة.

وهذه المسببات المرضية المعوية تحتاج لوقت وجهد طويل للكشف عنها ووجودها يكون بتركيزات قليلة فى هذه المياه ولكل نوع من هذه المسببات لها طريقه خاصة لعزلها وعدها وتعريفهما فضلا عن الوقت والجهد.

لـذلك نسـتخدم أنـواع معينـة مـن البكتريـا كـدلائل للتلـوث سـواء العـام أو التلـوث البـرازي للميـاه كمـا أن وجودهـا يعتبـر مؤشـر علـى وجـود هـذه المسـببات المرضـية فـى هـذه الميـاه وهـذه الـدلائل البكتيريـة تشـمل العـد الكلـي البكتيـري وبكتريـا القولـون الكليـة وبكتريـا القولون البرازية وبكتريا ايشرشيا كولاي والبكتريا السبحية البرازية.

العد الكلي البكتيري في المياه (Total viable bacterial count) العد الكلي البكتيري يتمثل في انواع البكتيريا الهوائية واللاهوائية اختيارية والتي تستخدم مصدر الكربون والطاقة من المواد العضوية واعدادها يعتمد علي تركيب البيئة المستخدمة وهذة الاعداد تشمل بكتيريا سالبة لجرام تنتمي للاجناس التالية:

Pseudomonas – Aeromonas – Klebsiella – Falvobacterium – Enterobacter – Citrobacter- Serratia – Acinetobacter – Proteus and others

ومن هذة البكتيريا انواع انتهازية ممرضة:-

Pseudomonas – Falvobacterium – Aeromonas

يعتبر العد الكلي البكتيري من اهم الدلائل العامة التي تعبر الحالة العامة لنوعية المياه فهو يقيس المحتوي البكتيري الموجود في المياه ويستخدم هذا الدليل البيولوجي في عدة استخدامات مثل :-

١. الوقوف علي نوعية المياه وجودتها من الناحية العامة
٢. يستخدم كدليل علي وجود او عدم وجود الاغشية الحيوية Biofilm المتكون علي الجدران الداخلية للمواسير لشبكة التوزيع او الخزانات
٣. يستخدم كدليل علي قياس كفاءة عمليات المعالجة في المياه

ووحدة قياس العد الكلي البكتيري (Colony forming unit – CFU) عدد المستعمرات لكل حجم ماخوز من العينة.

طرق العد الكلي البكتيري :

١- طريقة الاطباق المصبوبة Pour plate method
٢- طريقة الزرع علي سطح بيئة الاجار المستخدم Spread plate method
٣- طريقة الاغشية المرشحة (والتي تحجز البكنيريا علي سطحها) ويتم وضعها بيئة الاجار المستخدم Membrane filter method

١- طريقة الاطباق المصبوبة Pour plate method

طريقة بسيطة وسهلة ويستخدم فيها حجم يتراوح ما بين ٠.١ – ٢ مل من عينة المياه او من التخفيف المناسب يتم حقنها في الاطباق الزجاجية المعقمة ثم يتم صب البيئة المسالة اسالة كاملة والتي تم تبريدها لدرجة ٥٠م والمحفوظة في حمام مائي درجة حرارتة ٤٥م .

يتم رج الاطباق برفق في اتجاه عقارب الساعة ثم عكس اتجاه عقارب الساعة حتي يتم توزيع عينة المياه علي جميع اجزاء الطبق ثم تترك حتي تتصلب ثم يتم تحضين الاطباق مقلوبة في المحضن علي الدرجة المطلوبة والوقت المطلوب .

٢- طريقة الزرع علي سطح بيئة الاجار المستخدم Spread plate method

هذة الطريقة تتفادي حدوث الصدمة الحرارية علي المحتوي البكتيري في الحجم المستخدم من العينة كما انها تظهر المستعمرات علي سطح البيئة بشكلها ومن الممكن عزلها والتعرف عليها.

تستخدم هذة الطريقة حجم مناسب من العينة يتراوح ما بين ٠.١ – ٠.٥مل او من التخفيف المناسب

وفي هذة الطريقة تصب الاطباق ببيئة اجار المستخدم مسبقا وتترك لتتصلب ويتم قلب الاطباق حتي تجف ونتخلص من الرطوبة الحادثة علي سطح البيئة المستخدمة

يتم الزرع بالحجم المناسب من العينة والتي تكون عادة ٠.١ مل علي سطح بيئة الاجار المتلب والجاف مسبقا ويتم نشرهذا الحجم علي المساحة الكاملة للطبق بانتظام.

ثم تترك هذه الاطباق حتي يدمص الحجم او من العينة علي سطح البيئة المستخدم

ثم تقلب الاطباق ويتم تحضينها علي درجة الحرارة المناسبة والوقت المناسب

ثم تفحص ويعد العد الكلي الموجود علي السطح.

٣- طريقة الاغشية المرشحة Membrane filter method

تستخدم هذه الطريقة في حالة المياه المحتمل اعداد المحتوي الميكروبي قليلة وعكارتها قليلة يرشح الحجم المناسب من العينة علي الاغشية البكتيريولوجية وتتوزع بانتظام ثم تنقل هذة الاغشية بيئة الاجار المصبوبة مسبقا في الاطباق المعقمة وتوضع علي سطح بيئة الاجار المتصلبة والجافة ثم تحضن الاطباق مقلوبة علي درجة الحرارة المناسب والوقت المناسب

ملحوظة :

يتم تجميع عينات المياه ونقلها للمعمل في وقت اقل من ٨ ساعات لاجراء العد البكتيري ومن الممكن حفظ العينات في ثلاجة التبريد علي درجة حرارة ٤ م بمدة لا تزيد عن ٢٤ ساعة من التجميع واجراء العد الكلي البكتيري يجب رج العينة جيدا قبل استخدامها مباشرة لاجرا العد الكلي البكتيري كما يجب اجراء التخفيفات المناسبة والمتوقع بها المحتوي البكتيري المناسب (٣٠-٣٠٠ مستعمرة / ١ مل) في العد الكلي البكتيري في طريقة الاطباق المصبوبة والمحقونة بالحجم المناسب وبعد تحضينها علي الدرجة والوقت المناسب يجب ان تكون اعداد المستعمرات البكتيرية ما بين ٣٠-٣٠٠ مستعمرة حتي نتفادي عامل الخطا وخصوصا عند اجراء التخفيفات البيئات المستخدمة:

١- بيئة الاجار للعد (بيئة تربتون جلوكوز مستخلص الخميرة للاجار)

Plate count agar (Tryptone glucose yeast extract agar)

تستخدم هذه البيئة في العد الكلي البكتيري بطريقة الصب poured plate method وطريقة الزرع علي سطح البيئة spread plate method هذه البيئة غنية بالمغذيات استخدمت من قديم الزمن وهي تعطي عدد اقل من المستعمرات البكتيرية عن بيئة R2A وبيئة اجار NWRI

ومحتواها كالاتي :

Tryptone……	5 g
Yeast extract……..	2.5 g
Glucose……..	1 g
Agar……	15 g
Reagent grade water……	1 L

درجة الحموضة يجب ان تكون ٧ ± ٠.٢ بعد التعقيم بالاوتوكلاف عند درجة ١٢١ م لمدة ١٥ دقيقة

٢- بيئة m-HPC بيئة الاغشية المستخدمة للعد الكلي البكتيري

هذة البيئة غنية بالمغذيات تستخدم فقط في طرقة العد الكلي البكتيري بطريقة الاغشية البكتيريولوجبة المرشحة Membrane filter method

تركيب البيئة:

Peotone……	20 g
Gelatin……	25 g
Glycerol……	10 ml
Agar ……	15 g
Reagent grade water……	1 L

يتم اضافة كل المكونات ما عدا الجليسرول ويضبط درجة الحموضة عند ٧.١ ثم يتم طبخها بتسخينها تدريجيا وحتي درجة الغليان وذوبان كل المحتويات ثم يتم اضافة الجليسرول وترج جيدا ثم تعقم اوتوكلافيا علي درجة ١٢١م لمده ٥ دقائق.

٣- بيئة الاجار R2A

تستخدم هذه البيئة لكل من طرق العد الكلي البكتيري spread -poured plate method - plate method Membrane filter method هذة البيئة ذات محتوي اقل في المغذيات ولكن تعطي اعداد من العد الكلي اكثر من البيئات السابقة ذات المحتوي الاكثر من المغذيات وهي تتكون من المحتويات الاتية بنسبة ٠.٥ جرام لكل محتوي :

(Yeast extracts – poly peptone- Casamino acids – glucose- and soluble starch)

وكذلك sodium pyrovate - dipotassium hydrogen phosphate . بنسبة ٠.٣ جرام و magnesium sulfate heptahydrate بنسبة ٠.٣ جرام والاجار ١٥ جرام في واحد لتر من Reagent – grade water اضبط درجة الحموضة عند ٧.٢ قبل اضافة الاجار ثم يتم اذابة الاجار وتعقم البيئة اوتوكلافا علي درجة ١٢١ م لمدة ١٥ دقيقة.

بيئة NWRI الاجار والمستخدمة فى العد الكلى البكتيرى لكل طرق العد بطريقة الصب والزرع على السطح وطريقة الاغشية المرشحة وهذه البيئة ذات محتوى أقل من المغذيات وهى أيضاً تعطى اعداد عالية عن استخدام البيئات ذات المحتوى الاكثر من المغذيات ويتم استخدام هذه البيئة بطريقة تحضير مكوناتها حيث لا توجد منها بيئة جاهزة للتحضير مثل R2A

Peotone……	3g
Soluble Casein ……	0.5g
K_2HPO_4……	0.2g
$FeCl_3$……	0.001g
Agar……	15g
Reagent-grade water……	1 L

يتم ضبط درجة الحموضة ٧.٢ قبل التعقيم ويتم اذابتها ثم ثم تعقيمها اوتوكلافياً على درجة ١٢١درجة مئوية لمدة ١٥ دقيقة

درجة التحضين Incubation

تستخدم درجتيين فى عملية التحضين وهما:-

١- ٣٥ أو ٣٧ درجة مئوية وهذه الدرجة تعبر عن المحتوى البكتيرى ذات المصدر الحيوانى من ذوات الدم الحار.

٢- ٢٠ أو ٢٢ درجة مئوية وهذه الدرجة تعبر عن المحتوى البكتيرى الموجود فعلاً فى البيئة المائية قبل المعالجة.

وفى النظام الإنجليزى تستخدم درجتى ٣٧ درجة مئوية لتعبر عن المحتوى البكتيرى ذات المصدر الحيوانى من ذوات الدم الحار و٢٢ درجة مئوية لتعبر عن المحتوى البكتيرى الموجود فعلاً فى البيئة المائية بصورة طبيعية.

وفى المواصفات المصرية القياسية لسنة ٢٠٠٧ استخدمت هذان الدرجتان للحكم على نوعية وجودة المياه وصلاحيتها للشرب وبوقت مناسب للمعايير المصرية وهى كالاتى ٣٧ درجة مئوية لمدة ٢٤ ساعة

٢٢ درجة مئوية لمدة ٤٨ ساعة

وتستخدم بيئة Plate count agar ذات المحتوى الاكثر من الغذيات بحيث أنه عند اجراء العد الكلى البكتيرى فى وقت أقل من ٨ ساعات من تجميع العينات وبطريقة الأطباق المصبوبة وعلى درجة ٣٧ درجة مئوية لمدة ٢٤ ساعة ودرجة ٢٢ درجة مئوية لمدة ٤٨ ساعة وبعدها يتم العد الكلى للاطباق على الدرجة المناسبة والوقت المناسب إذا كان العد الكلى البكتيرى أكثر من ٥٠ مستعمرة لكل ا مل تكون العينة غير صالحة للشرب والاستخدام المنزلى طبقاً للمواصفات المصرية لسنة ٢٠٠٧.

بكتريا القولون الكلية Total coliform:

معظم هذه البكتريا توجد فى إعداد كبيرة بين الفلورا الطبيعية لأمعاء الإنسان والحيوانات الاخري ذات الدم الحار وعادة تكون موجودة فى المخلفات البرازية وهى موجودة بإعداد اعلي من البكتريا المعوية الممرضة ولذلك تستخدم كمؤشر احتمالي لوجود الممرضات المعوية فى البيئة المائية وهي تستخدم كدليل لنوعية المياه من الناحية الميكروبيولوجية.

وهى تنقسم إلى مجموعتين:

١- مجموعة بكتريا القولون البرازية.

٢- مجموعة البكتريا القولون اللابرازية.

ولذلك يكون مصدرها التربة والنبات ووجودها يدل على فساد نوعية المياه من الناحية الميكروبيولوجية.

كما أن هذه المجموعة تستخدم كدليل على كفاءة أو عدم كفاءة المعالجة كما أن وجودها فى المواسير فى بعض المنشآت المواسير المياه بدل على وجود التلوث ووجود الغشاء الحيوي فى هذه المواسير أو الخزانات وهذه المجموعة تشتمل على أجناس Enterobacter, Escherichia, Klebsiella, Citrobacter.

وهذه المجموعة هوائية ولا هوائية اختيارية ، سالبة لجرام غير متجرثمة عصوية الشكل وهي قادرة على تخمير السكر الثنائي اللاكتوز فى خلال ٤٨ ساعة على درجة ٣٥مْ (فى انابيب التخمر) منتجه حامض وغاز كما إنها تخمر سكر اللاكتوز فى البيئة الصلبة نتيجة حامض (أو الدهيد) يتفاعل مع مكونات البيئة التى ينمو عليها منتجا مستعمرات حمراء مع شكل بريق ولمعان خلال ٢٤ ساعة على درجة ٣٥مْ على بيئة Endo agar. وحديثا أضيف لهذه الصفات إنها ايجابية لوجود إنزيم B-D-galactosidase وإنزيم B-galactosidepermease وهما الأساس لعملية تخمر اللاكتوز وهذه المجموعة سالبة لاختبار Cytochrome – Oxidase كما إنها تمتاز بمقدرتهما على النمو فى وجود أملاح الصفراء أو مشتقاتها والتى لها تأثير مثبط على كثير من الميكروبات وخاصة التى تستطيع أن تخمر سكر اللاكتوز نتيجة حامض وغاز فى خلال ٤٨ ساعة على درجة حرارة ٣٧مْ.

بكتريـا القولـون الكليـة تسـتوطن القنـاة الهضـمية للكائنـات ذوات الـدم الحـار وكـذلك التربـة والنباتات والبيئة المائية.

Enterobacteriaceae

Total coliform

Faecal coliform

Escherichia coli

Enterobacteriaceae Family:

1- Non Coliforms: Shigella.

Yersinia

Providencia

Salmonella

Proteus

2- Coliforms:

Total	Faecal
Escherichia	*Escherichia coli*
Citrobacter	*Citrobacter freandii*
Klebsiella	*Klebsiella pneumonia*
Enterobacter	

عموما للكشف عن هذه المجموعة يستخدم طريقتين:

١. طريقة العد الاحتمالي MPN.

٢. طريقة الأغشية البكتريولوجية MF.

عموما لعد دلائل التلوث البيولوجية تستخدم اكثر من طريقة والأساس أربع طرق هي:

أ طريقة العد الاحتمالي MPN technique .

ب طريقة الأغشية البكتريولوجية MF technique.

ج طريقة التواجد/ الغياب Presence or absence.

د استخدام الطرق الإنزيمية Use of Enzymatic substrates test وتسمي Chromagenic – fluorogenic substrate test.

بكتيريا القولون البرازية Faecal coliform (FC)

تعتبر هذه المجموعة جزء من مجموعة بكتيريا القولن الكلية Total coliform والتى تتكون من الجنس *Escherichia* والتى تمثل ٩٧% من هذه المجموعة وكذلك نسبة بسيطة من الجنس الاخر *Klebsiella* وكذلك أنواع من *Enterobacter* وهذه المجموعة تستطيع أن تخمر سكر اللاكتوز وأنتاج حمض وغاز على درجة ٣٧ درجة مئوية ولمدة ٤٨ ساعة وكذلك تسطيع أن تخمر سكر اللاكتوز وانتاج حمض وغاز على درجة حرارة عالية نسبياً (٤٤-٤٦ درجة مئوية) ولذلك تعرف ب Thermotolerant coliform بكتيريا القولون المقاومة للحرارة العالية.

ويعتبر وجود هذه المجموعة دليل على وجود التلوث البرازى كما يعبر عن وجود البكتيرا الممرضة المعوية.

ويعتبر وجود موطن هذه المجموعة أساساً فى الامعاء للمصدر الحيوانى من ذوات الدم الحار.

وهى بكتيريا هوائية ولا هوائية اختياراً عصوية غير متجرثمة سالبة لصبغة الجرام وقادرة على تخمر سكر اللاكتوز وأنتاج حامض وغاز على درجة حرارة ٤٤.٥ درجة مئوية.

وتعتبر Fecal coliform من أحسن الادلة على وجود البكتيرا المعوية الممرضة.

Escherichia coli

توجد أساساً فى أمعاء الإنسان والحيوان ذات الدم الحار ولا توجد عاداً فى البيئات الاخرى وهذا النوع وجوده يدل على التلوث البرازى ويحدث لهذا النوع تضاعف فى البيئات الإستوائية فى المياه السطحية وتعتبر *E. coli* من أهم الأدلة التى تعبر عن وجود التلوث البرازى ووجودها دليل على إحتمالية وجود الميكروبات المعوية الممرضة وتعتبر من من الدلال المهمة للوقوف على نوعية وجودة المياه.

مجموعة (FC) والتى تشمل على بكتيريا القولون المخمرة لسكر اللاكتوز عند درجة ٤٤.٥ ومنتجة جامض وغاز وهذه المجموعة تشتمل أساساً على *Escherichia coli* وكذلك *Klebsiella pneumonia* ووجودها يدل دلاله واضحة على التلوث البرازى بمواد ناتجة من الحيوانات ذات الدم الحار وتعتبر بكتيريا *E. coli* من الدلائل الهامة للتلوث البرازى ومؤشر لوجود أو غياب البكتيريا الممرضة *Salmonella , Shigella* وتعتبر *E. coli* من النماذج الهامة لسلوك أفراد عائلة ال Enterobacteriaceae أثناء مراحل المعالجة.

أولاً طريقة العد الأكثر احتمالاً (MPN)

تعتمد على أختبارين ١- الأختبار الابتدائى (الأحتمالى)

٢- الأختبار التأكيدى (التحقيقى)

وتعتمد على هذه الطريقة على المقدرة على تخمر سكر اللاكتوز وأنتاج حامض وغاز على درجة حرارة ٣٧ درجة مئوية ولمدة ٤٨ ساعة ويعتبر هذه النتيجة موجبة.

الأختبار المبدئى يتم بواسطة بيئة Lauryl tryptose broth فى أنابيب التخمر المحتوية على أنابيب درهام ويتم حقنها بعينة المياه المراد الكشف وعد بكتيريا Coliform معتمد هذا الاختبار على تخمر سكر اللاكتوز على درجة ٣٧ درجة مئوية لمدة ٤٨ ساعة فى وجود Sodium lauryl sulfate ويعتبر أنتاج الحامض والغاز اختبار مبدئى يعقبه أختبار تأكيدى لمجموعة القولون الكلية وبكتيريا القولون البرازية وايشرشيا كولاى

الأختبار التأكيدى لمجموعة بكتيريا القولون الكلية

يتم استخدام بيئة Brilliant green bile broth فى أنابيب التخمر المحتوية على أنابيب درهام والتى يتم أخذ ٠.١مل من أنابيب Lauryl tryptose broth الموجبة فى أنتاج حمض وغاز وتحضن فى أنابيب بيئة Brilliant green bile broth وتحضن عند درجة ٣٧ درجة مئوية لمدة ٤٨ ساعة وانتاج حمض وغاز فى أنابيب Brilliant green bile broth وتعتبر موجبة تأكيدياً.

الاختبار التأكيدى لمجموعة بكتيريا القولون البرازية وايشريشيا كولاى

ويتم استخدام بيئة EC broth والمحتوية على Tryptophane فى أنابيب التخمر المحتوية على أنابيب درهام يتم حقنها ب ٠.١ مل من الانابيب الموجبة (حامض +غاز) من البيئة Lauryl tryptose broth وتحضن أنابيب EC broth المحقونة على درجة ٤٤.٥ درجة مئوية لمدة ٢٤ ساعة والتى تعطى غاز تعتبر موجبة تأكيدياً لبكتيريا القولون البرازية لاختبار

وجود وعد بكتيريا *E. coli* ويتم أضافة ٠.١ مل من Kovac reagent لإنابيب EC المنتجة للغاز (+) وفى حالة تكون حلة حمراء أعلى البيئة تعتبر موجبة لبكتيريا *E. coli*

بيئة Lauryl tryptose broth

تستخدم فى الاختبار الابتدائى للكشف وعد بكتيريا القولون (Coliforms) فى التحاليل البكتيريولوجية فى المياه طبقاً ل APHA 2005

طريقة التفاعل

- ذات محتوى غذائى مناسب نوعاً
- وجود أملاح الفوسفات كمحاليل منظمة تكفل سرعة النمو وزيادة أنتاج الغاز وخاصة للانواع البطيئة فى تخمر سكر اللاكتوز من بكتيريا القولون
- كذلك مادة Lauryl sulfate تثبط الأنواع البكتيرية الغير مرغوب فيه

Tryptose……....	20g
Lactose……..	5g
Sodium chloride (NaCl)……	5g
Sodium lauryl sulfate …….....	0.1g
Dipotassium hydrogen phosphate (K2HPO4) ……..	2.75 g
Potassium hydrogen phosphate……...	2.75 g
Reagent-grade water……. …….	1 L

pH 6.8±0.1 and autoclave 15 min at 121°C

بيئة Brilliant green bile broth

تستخدم فى الاختبار التأكيدى للكشف وعد بكتيريا القولون (Coliforms) فى التحاليل البكتيريولوجية للمياه طبقاً APHA 2005

طريقة التفاعل:

- أملاح الصفراء وكذلك دليل Brilliant green غالباً ما تنثبط نمو الفلورا الميكروبية الغير مرغوبة بطريقة كاملة مثل بكتيريا الكلوستريديا والتى قادرة على تكسير سكر اللاكتوز مثل *C. perfringens*
- وتخمر سكر اللاكتوز وأنتاج حامض وغاز يدل دلاله واضحة على وجود بكتيريا القولون ولذلك تعبر عن ايجابية الاختبار التأكيدى لوجود مجموعة بكتيريا القولون الكلية

Peptone.....	10g
Lactose……..	10g

Oxbile dried……..	20g
Brilliant green……..	0.0133 g
Reagent-grade water…….	1 L

pH 7.2±0.1 and autoclave 15 min at 121°C

بيئة EC broth

تستخدم فى الأختبار التأكيدى لمجموعة بكتيريا القولون البرازية وفى نفس الوقت بكتيريا *E. coli* هذه البيئة *Escherichia coli* broth مستخدم فى التحاليل البكتيريلوجية للمياه

طريقة التفاعل:

- محتوى هذه البيئة من سكر اللاكتوز تشجع على نمو البكتيريا الموجبة لتخمر سكر اللاكتوز وخاصة بكتيريا القولون وكذلك *E. coli*
- وجود أملاح الصفراء فى المحتويات البيئة تثبط البكتيريا الموجبة لجرام أو الميكروبات التى لاتوجد بالأمعاء.
- البكتيريا المخمرة لسكر اللاكتوز لانتاج حمض وغاز.

Peptone from casein……...	20g
Lactose……..	5g
Bile Salt mixture……..……	1.5g
Sodium chloride……	5g
…….....	
Dipotassium hydrogen phosphate (K2HPO4) ……	4g
Potassium dihydrogen phosphate……..……	1.5g
Reagent-grade water ……..	1 L

pH 6.9±0.1 and autoclave 15 min at 121°C

ثانيا: طريقة الاغشية MF :

تعتمد هذه الطريقة علي استخدام الاغشية البكتريولوجية المرشحة (0.45µ) فيتم ترشيح ١٠٠ مل من عينة المياه علي الاغشية البكيتريولوجية ويتم وضع الغشاء علي سطح بيئة LES Endo agar مصبوبة مسبقا في اطباق جافة سطحها تحت ظروف معقمة ثم يتم قلب الاطباق وتحضينها علي درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة وفي هذه الطريقة يجب استخدام التخفيف المناسب الذي يكون فيه عدد المستعمرات علي الغشاء بسطح هذه البيئة (LES Endo agar) يتراوح ما بين ٢٠ الي ٨٠ مستعمرة.

* طريقة التفاعل لبيئة LES Endo agar :

- يعتبر محتوي البيئة من Sodium sulfite و Fuchsin من المواد التي تثبط نمو البكتيريا موجبة الجرام.

- مجموعة بكتيريا القولون تستطيع النمو في وجود هاتان المادتان وتخمر سكر اللاكتوز مع انتاج الدهيدات واحماض.

- الالدهيد يحرر مادة الفوكسين من مركب Fuchsin sulfite وهذه المادة تكون المستعمرات باللون الاحمر.

- وفي حالة *E. coli* هذا التفاعل يكون اكثر كثافة وذلك لزيادة انتاج الالدهيدات فيحرر الفوكسين بطريقة مبلورة مما يعطي هذه المستعمرات a permanent greenish metallic sheen (fuchsin sheen) ذات اللون المعدني اللامع المخضر والدائم بريق ذهبي.

* المكونات:

Peptone……..	10 g
Dipotassium hydrogen phosphate…….	2.5 g
Lactose ……..	10 g
Sodium sulfite anhydrous …….	3.3 g
Parasrosanilin (fuchsin)…….	0.3 g
Agar……	12.5 g
Reagent grade water……	1 L

وكذلك بيئة Membrane filter Endo broth :

حيث تستخدم هذه البيئة لعد بكتيريا القولون في المياه بطريقة الاغشية المرشحة.

طريقة عمل هذه البيئة:

- بما تحتويه البيئة من مغذيات متعددة تسمح بتطور ونمو البكتيريا المخمرة لسكر اللاكتوز من مجموعة بكتيريا القولون.
- والبكتيريا المصاحبة لمجموعة بكتيريا القولون تثبط ويوقف نموها بوجود Lauryl sulfate وكذلك Desoxycholate .
- والمستعمرات البكتيرية المخمرة لسكر اللاكتوز وتتلون باللون الاحمر نتيجة انتاج الالدهيد الذي يحرر fuchsin من مركب fuchsin sulfite.
- اما بكتيريا *E. coli* تكثف fuchsin اكثر مما تحدث البريق المعدني اللامع للمستعمرات من *E. coli* .
- هذه البيئة عادة تستخدم لتشريب وامتصاص هذه البيئة لاوراق ترشيح Pads يوضع عليه الاغشية المرشحة والتي تم حجز البكتيريا عليها.

* المكونات:

Tryptose…… ……	10 g
Peptone from meat……	5 g
Peptone from casein……..	5 g
Yeast extract……	1.5 g
Dipotassium hydrogen phosphate……	4.375 g
Sodium chloride…….	5 g
Potassium dihydrogen phosphate……	1.375 g
Lactose……..	12.5 g
Sodium desoxycholate……..	0.1 g
Sodium lauryl sulfate……	0.05 g
Fuchsin basic…….	1.05 g
Sodium sulfite……	2.1 g
Agar……	14 g
Reagent grade water……	1 L

هذه البيئة تترك ١٠ دقائق ثم توضع علي النار حتي الغليان لذوبان محتوياتها وتظبط درجة الحموضة علي ٧.٢.

وتظهر مستعمرات بكتيريا القولون بلون احمر داكن وانواع *E. coli* تعطي بريق معدني ذهبي مخضر.

* بيئة Membrane fecal coliform:

تستخدم لكشف وعد بكتيرا القولون البرازية في البيئة المائية بطريقة الاغشية البكتيريولوجية المرشحة.

- المكونات:

Tryptone	10 g
Protease peptone	5 g
Yeast extract	3 g
Sodium chloride	5 g
Lactose	12.5 g
Bile salt No. 3	1.5 g
Aniline blue	0.1 g
Agar	14 g
Reagent water	grade 1 L

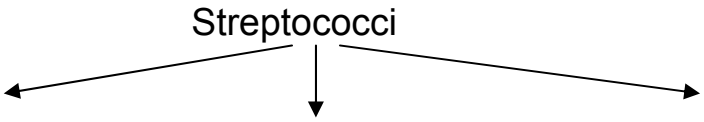
يتم اذابة ٣.٧ جرام في ١٠٠ مل مياه مقطرة ويضاف اليها ١ مل من محلول حمض Rosolic acid (١% في ٠.٢N هيدروكسيد الصوديوم) وتسخن حتي درجة الغليان يتم صبها في الاطباق وتترك حتي تبرد.

يعتمد هذا الاختبار علي استخدام درجة حرارة التحضين عند ٤٤.٥°م واضافة حمض الروزوليك لبيئة M-FC broth لكي يوقف ويثبط الفلورا البكتيرية لبكتيريا القولون الطبيعية. وتظهر مستعمرات بكتيرا القولون البرازية باللون الازرق.

مجموعة البكتيريا السبحية Fecal streptococci:

هذه المجموعة تتألف من *Streptococcus faecalis, S. bovis, S. equines* وكذلك *S. avium* وعادة موطنها هو القناة الهضمية للانسان والحيوانات ذات الدم الحار. وتعتبر هذه المجموعة من اهم دلائل التلوث البرازي ومجموعة Enterococci تعتبر جزء من هذه المجموعة وتشتمل علي *Enterococcus facium* and *E. faecalis*

وتعتبر من الادلة الهامة للتلوث البرازي. كما انها تعتبر من الادلة الهامة علي احتمال وجود او غياب الفيروسات. ومجموعة البكتيريا السبحية البرازية وخاصة مجموعة enterococci يمكن الكشف عنها باستخدام بيئات اختيارية بطريقة العد الاحتمالي MPN او طريقة الاغشية المرشحة MF وهذه البكتيريا موجبة الجرام غير متجرثمة كروية في سلاسل تتحمل درجة حرارة ٦٠°م لمدة ٣٠ دقيقة وتتحمل ٦.٥% محلول ملحي من كلوريد الصوديوم وتستطيع النمو في محلول ٤٠% من املاح الصفراء وتستطيع ان تخمر سكر اللاكتوز والمانيتول والسوربيتول وتكوين حامض.



Enterococcus group	Non human source	Non fecal source
S. faecalis	*S. bovis*	*S. mitis*
S. faecium	*S. equines*	*S. salivarius*
S. gallinarum		
S. avium		

ومجموعة البكتيريا السبحية *S. bovis , S. avium , S. faecium, S. faecalis, S. equines , S. gallinarum* تعطي نتيجة موجبة مع Lancified's group antisera وتم عزلها من براز حيوانات ذات الدم الحار كما انه احيانا *S. avium* تعطي نتيجة ايجابية مع Lancified's group antisera كما ان كلا من S. faecalis subsp. Liquefaciens وكذلك S. faecalis subsp. Zymogenes ممكن التعرف عليها من خلال اختبار قدرتها علي تحليل الجيلاتين واسالته وهذه المجموعة ضمن افراد الفلورا بالقناة الهضمية للحيوانات ذات الدم الحار ويعتبر ان مجموعة enterococcus موجودة بصفة اساسية في براز الانسان اكثر من الانواع الاخري وهي من الانواع التي تتحمل الظروف البيئية المتغيرة وكذلك *S. bovis, S. equines, S. avium* تتواجد بكثافة عالية في براز الحيوانات ذات الدم الحار.

ويمكن فصل مجموعة Enterococci عن الانواع الاخري من Fecal streptococci وذلك بقدرتها علي النمو في محلول ٦.٥% كلوريد الصوديوم وقدرتها علي النمو علي درجة حموضة ٩.٦ وتستطيع النمو علي درجة حرارة ١٠°م و ٤٥°م.

ومجموعة enterococci تعتبر من الدلائل الهامة للتلوث البرازي سواء في المياه السطحية او المياه المالحة.

ولعد هذه المجموعة تستخدم طريقتين:

١- طريقة العد الاحتمالي MPN.

٢- طريقة الاغشية المرشحة MF.

اولا: طريقة العد الاحتمالي:

تتم باجراء اختبارين هما الاختبار الاحتمالي والاختبار التأكيدي.

١- الاختبار الاحتمالي Presumptive test:

تستخدم بيئة Azide dextrose broth ويتم حقن الانابيب بواسطة حجم معين من المياه والمراد الكشف وعد مجموعة بكتيريا السبحية البرازية فيها ويتم تحضينها علي درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة ووجود عكارة بالبيئة يدل علي وجود هذه البمتيريا بالبيئة ايجابية احتمالية.

*** المكونات:**

Beef extract……..	4.5 g
Tryptone……..	15 g
Glucose……	7.5 g
Sodium chloride……..	7.5 g
Sodium azide……	0.2 g
Reagent grade water……	1 L

*** طريقة التفاعل:**

- تركيز sodium azide الموجود في هذه البيئة توقف وتثبط نمو الفلورا الميكروبية السالبة الجرام.

- وجود مجموعة enterococci يستخدم كدليل علي التلوث البرازي.

ولاجراء الاختبار التأكيدي: يتم اخذ ٠.١ من الانبوبة المحتوية علي نتيجة ايجابية احتمالية من Azide dextrose broth ويتم تخطيطها علي اطباق محتوية علي بيئة Pfizer

selective enterococcus agar (PSE) وتحضن الاطباق مقلوبة علي درجة حرارة ٣٥°م لمدة ٢٤ ساعة وتظهر المستعمرات بلون بني مسود brownish-black مع هالة بني وهذا اختبار تأكيدي لتأكيد وجود بكتيريا السبحية البرازية ومن الممكن نقل المستعمرات لبيئة Brain Heart Infusion والمحتوية علي ٦.٥% كلوريد الصوديوم ونموها علي درجة حرارة ٤٥°م .

*** مكونات بيئة Pfizer selective enterococcus agar:**

Peptone C……	17 g
Peptone B……	3 g
Yeast extract……	5 g
Bacteriological bile…….	10 g
Sodium chloride……..	5 g
Sodium citrate……..	1 g
Esculin……	1 g
Ferric ammonium citrate…….	0.5 g
Sodium azide……..	0.25 g
Agar……	15 g
Reagent grade water……	1 L

درجة الحموضة ٧.١ بعد التعقيم.

وعند استخدام هذه البيئة تسال هذه البيئة جيدا ثم حفظها علي درجة حرارة ٤٥-٥٠°م وى تزيد فترة الحفظ عن ٤ ساعات قبل استخدامها.

* طريقة التفاعل:

- تركيز sodium azide الموجود في البيئة يوقف ويثبط البكتيريا الاخري المصاحبة لهذه المجموعة.

- كذلك وجود املاح الصفراء والتي تتحملها مجموعة enterococci توقف وتثبط البكتيرا المصاحبة لها.

- مجموعة enterococci تحلل glucoside esculin وينتج الجلوكوز و esculin.

- Esculin تكون عبارة عن (6-B-glucoside 7-hydroxy coumarin) glucosidic coumarin derivatives والتي تكون قادرة علي النمو في وجود املاح الصفراء ووجود sodium azide وقادرة علي التحليل المائي ل esculin الذي بدوره

يتفاعل مع Ferric ions الموجودة في ferric ammonium citrate ليكون diffusible black complex.

ثانيا: طريقة الاغشية :MF

يتم ترشيح حجم معين من عينة المياه علي المرشحات البكتيريولوجية 0.45µm ثم نقلها برفق علي سطح بيئة m-enterococcus agar الموزعة في الاطباق.

* بيئة m-enterococcus agar:

تستخدم لعد والكشف عن المجموعة السبحية البرازية.

- المكونات:

Tryptone……..	2 %
Yeast extract……	0.5 %
Glucose……..	0.2 %
Dipotassium hydrogen phosphate……	0.4 %
Sodium azide……	0.04 %
2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC)……	0.01 %
Agar……	1 %
Reagent grade water……	100 ml

سخن هذه البيئة حتي الذوبان ولا تعقم بواسطة الاوتوكلاف ثم يتم توزيعها علي اطباق بتري وتترك حتي تتصلب ثم تستخدم. وهذه البيئة صالحة للاستخدام للكشف عن وعد بكتيرا السبحية البرازية في المياه العذبة والمالحة.

* طريقة التفاعل:

- وجود sodium azide يوقف نمو المجموعات المصاحبة لها.

- مجموعة fecal streptococci وخاصة enterococci تختزل ال (TTC) لتعطي red formazan فتظهر المستعمرات باللون الاحمر.

* بيئة m-E agar for enterococci:

تستخدم للكشف عن وعد بكتيريا السبحية البرازية.

- المكونات:

Peptone……	1 %
Sodium chloride……	1.5 %
Yeast	3 %

extract……	
Esculin ……	0.1 %
Actidione ……	0.005 %
Sodium azide……	0.015 %
Agar……..	1.5 %
Reagent grade water…….	100 ml

أ اخلط ٠.٢٥ جم من nalidixic acid في ٥ مل reagent grade water واضف نقط من N٠.١ هيدروكسيد الصوديوم حتي يتم الذوبان للمضاد الحيوي ثم يتم اضافة هذا المخلوط للبيئة السابقة.

ب اضف ٠.١٥ جم من TTC واخلطه جيدا حتي الذوبان.

ج صب البيئة بعد ذلك في اطباق بتري وتترك لتتصلب.

ملحوظة: يجب ضبط ال pH للبيئة قبل صبها عن ٧.١.

ملحوظة: تحفظ الاطباق المصبوبة في درجة حرارة ٢ الي ١٠°م بعيدة عن الضوء ولمدة اقل من ثلاث اسابيع.

- هذه البيئة صالحة للكشف عن بكتريا enterococci من المياه العذبة والمالحة.
- نجد من مميزات هذه البيئة في طريقة التفاعل:

- وجود Actidione الذي يثبط نمو الفطريات علي البيئة فيحدث تداخل خلال التفاعلات علي البيئة ويقلل كفاءتها.
- وجود تركيز من sodium azide مع وجود المضاد الحيوي Nalidixic acid يوقف نمو المجموعات البكتيرية الاخري.
- ارتفاع تركيز sodium chloride الي ١.٥% مما يؤدي لارتفاع الضغط الاسموزي والذي تتحمله هذه المجموعة فلذلك مما يزيد من الاختيارية للكشف عن هذه المجموعة.

*** بيئة EIA substrate:**

- مكوناتها:

Esculin……	0.1 %
Ferric citrate……	0.05 %
Agar……..	1.5 %
Reagent grade water……	100 ml

تظبط درجة الحموضة عند ٧.١ قبل التعقيم.

تسخن البيئة حتي الذوبان ثم تعقم وتبرد لدرجة ٥٠م وتوضع في حمام مائي ٤٦°م ثم تصب في اطباق بتري وتترك لتتصلب في درجة حرارة من ٢-١٠°م في مدة لا تزيد عن ثلاث اسابيع.
الخطوات:
يتم ترشيح حجم معين من عينة المياه علي المرشحات البكتيرية المعقمة (لكي تعطي اعداد المستعرات في النهاية فيما بين ٢٠ الي ٦٠ مستعمرة علي سطح الغشاء الموجود علي البيئة في اطباق بتري) وتوضع علي سطح بيئة m-E ثم تحضن الاطباق مقلوبة علي درجة ٤١°م لمدة ٤٨ ساعة ثم ينقل الغشاء بعناية بعد التحضين الي بيئة EIA medium ويحضن علي درجة حرارة ٤١°م لمدة ٢٠ دقيقة.
ثم يتم عد المستعمرات Pink to red والتي تتغير للون الاسود او البني المحمر ويتم عد المستعمرات بواسطة Flourescent lamp وعدسة تكبير.

*** الاختبار التكميلي:**

تلتقط بعض المستعمرات النموذجية من الطبق التي علي الغشاء وتخطط لعزلها نقية علي سطح بيئة Brain Heart Infusion في الاطباق ثم تحضن علي درجة حرارة ٣٥°م لمدة ٢٤-٤٨ ساعة. انقل مستعمرة نقية من بيئة Brain Heart Infusion في انابيب تحتوي علي BHI broth وتحضن علي درجة ٣٥م لمدة ٢٤ ساعة ثم افحصها بالميكروسكوب بعد صبغها بصبغة جرام.
اضف نقط من هذه المستعمرة علي شريحة زجاجية الي نقط من فوق اكسيد الهيدروجين H_2O_2 المحضر حديثا ٣ % ولاحظ وجود فوران من عدمه لاختبار انزيم الكتاليز حيث ان مجموعة بكتريا السبحية البرازية سالبة لاختبار الكتاليز.
مجموعة البكتيريا السبحية البرازية تكون موجبة صبغة الجرام كروية الشكل في سلاسل قصيرة.

اقل ٠.١ مل من المزرعة BHI broth الي كل من البيئات التالية:
١- بيئة Bile Esculin Agar: يتم تحضينها بعد الحقن لمدة ٤٨ ساعة.
٢- بيئة Brain Heart Infusion with 6.5% NaCl: يتم تحضينها بعد الحقن لمدة ٤٨ ساعة.

فالمستعمرات التي تكون سالبة لاختبار الكتاليز وموجبة للصبغ بجرام وكروية وتستطيع النمو في بيئة Bile Esculin agar وكذلك تنمو علي درجة حرارة ٤٥م في بيئة BHI broth. وهذا يؤكد ان هذه المستعمرة من مجموعة البكتيريا السبحية البرازية. والمستعمرات التي تستطيع النمو علي ٤٥م وتنمو في بيئة تحتوي علي ٦.٥% كلوريد الصوديوم ويؤكد ذلك انها تنتمي الي مجموعة Enterococci.

ميكروبيولوجيا المياه العملي

Heterotrophic bacteria

تشمل كل البكتيريا التي تستخدم المواد الغذائية العضوية للنمو تلك البكتيريا الموجودة في الماء او التربة او الغذاء.

التغذية في البكتيريا تغذية نباتية Halophytic mode of nutrition

تحصل علي غذائها في صورة ذائبة في الماء.

تلعب الانزيمات الخارجية التي تفرزها البكتيريا خارج الخلية دور كبير في الحصول علي الغذاء.

يعتبر الماء من اكثر العناصر الممثلة ٧٠-٩٠% من وزن الخلية.

تحتاج الخلية البكتيرية اكسجين ونيتروجين وكربون وفوسفور وعناصر الصوديوم والبوتاسيوم والكبريت والحديد والماغنيسيوم والكالسيوم بنسب مختلفة.

تقسم البكتيريا حسب احتياجاتها الغذائية للحصول علي الطاقة الي:

Autotrophic
Heterotrophic

يعرف العد الكلي البكتيري Heterotrophic plate count بعدة اسماء مثل:

- Standard plate count
- Total viable count
- Total count
- Total viable bacterial count
- Water plate count
- Heterotrophic plate count.

طبقا للمواصفات المصرية لسنة ٢٠٠٧ والتي توصي بالاتي:

١- استخدام طريقة صب الاطباق Pour plate method

والبيئة المستخدمة هي Standard plate count agar ودرجات التحضين هي ٣٧م لمدة ٢٤ ساعة, و٢٢م لمدة ٤٨ ساعة. علي ان يكون العد الكلي البكتيري بمياه الشرب لا يتجاوز ٥٠ مستعمرة لكل ١ مل من العينة.

وهذه الانواع عادة ما تستخدم في تغذيتها وكمصدر للطاقة والكربون لها من مواد عضوية وتشمل هذه الانواع اللاتي:

Pseudomonas, Aeromonas, Klebsiella, Flavobacterium, Enterobacter, Acintobacter, Citrobacter, Proteus* and *Serratia.

وتتكون بيئة Standard Plate count من :

Tryptone	**5.0 g/L**
Yeast extract	**2.5 g/L**
Glucose	**1.0 g/L**
Agar	**15 g/L**

وتذاب في 1 liter of laboratory pure water.

pH should be 7.0 ± 0.2 after autoclaving at 121C for 15 minutes.

العد الكلي عند ٣٧م يعطي دلالة علي نمو البكتيريا ذات علاقة بالانواع المرضية او الانتهازية , اما العد الكلي عند ٢٢م يعطي دلالة علي اعداد البكتيريا النامية في المياه.

اهمية العد الكلي البكتيري كدليل من دلائل تلوث المياه

يعتبر العد الكلي من اهم الدلائل حيث:

- يعبر عن الحالة العامة لنوعية المياه من الناحية الميكروبية.
- يقيس الحمل البكتيري الموجود في المياه.
- يستخدم كدليل علي وجود الاغشية الحيوية Biofilm المتكون علي المواد التي تسري بها المياه (شبكات التوزيع والخزانات).
- من الدلائل المستخدمة لتقدير كفاءة اتمام عمليات المعالجة.
- كدليل علي مدي كفاءة عملية الكلورة Chlorination
- يستخدم في الرصد الميكروبيولوجي لمجري مائي للوقوف علي توعية المياه ونقاط التلوث.
- يستخدم في المساعدة علي اختيار ماخذ المحطات.
- يستخدم في الكشف عن نظافة او عدم نظافة شبكة التوزيع والخزانات.

لا يعتبر العد الكلي البكتيري دليل يتعلق بالصحة العامة او الناحية المرضية طبقا لمنظمة الصحة العالمية بتقريرها لسنة ٢٠٠٢م.

حيث لا يوجد دلائل علي ان استهلاك مياه الشرب محتوية علي مستوي عالي من العد الكلي (٥٠ CFU/ ١ مل) ولكن قياسها كدليل علي نوعية المياه وليس كمقياس علي خطورتها علي الصحة العامة. عموما فان الطرق المستخدمة في تقدير العد الكلي طبقا ل APHA وهي:

١- طريقة الصب.

٢- طريقة الفرد.

٣- طريقة الاغشية.

العينات:

عينات المياه يجب اخذها في زجاجات معقمة محتوية علي sodium thiosulfate (٠.٢٥ مل من sodium thiosufate بتركيز ٣%) في زجاجة اخذ العينات حجمها ٢٥٠ مل وهذا كافي لازالة ٥ ملليجرام/ لتر كلور متبقي. تعقم الزجاجات بغطائها ومحتوية علي محلول sodium thiosulfate في الاوتوكلاف . يجب اخذ العينة من الصنبور الموجود في اماكن عامة بعيدا عن دورات المياه ويتم حرق الصنبور ثم فتحه لمدة ٣ دقائق ثم يتم اخذ العينة مع عدم ملئ الزجاجة لنهايتها وترك منطقة خالية حتي يسهل خلط العينة وتجانسها. يتم اختيار نقاط شبكة التوزيع من اماكن تمثل درجة التوزيع الكاملة للمنطقة وتكون هذه المناطق بعيدة عن التلوث الخارجي. ويتم اخذ العينة تحت ظروف تعقيم مع تطهير المصدر المأخوذ منه العينة حتي لا يحدث التلوث من الخارج ويتم غلق الزجاجة باحكام.

يجب حفظ العينة في درجة حرارة ٤-١٠م في Ice box وتنقل للمعمل لتحليلها قبل ٨ ساعات.

في داخل المعمل يتم اجراء اختبار العد الكلي البكتيري كالتالي:

- رج العينة جيدا.
- يتم اسالة بيئة النمو (العد) وبعد تمام الاسالة تحفظ علي درجة ٥٥م.
- اجراء التخفيفات المناسبة في محلول Ringer اذا لزم الامر بحيث تكون اعداد البكتيريا في حدود ٣٠-٣٠٠ مستعمرة لكل طبق (في حالة المياه الملوثة).

R2A agar:

- Low nutrient.
- Use for pour, spread plate and membrane filtration methods.

Composition:

Yeast extract	**0.5 g/L**
Proteose peptone No.3	**0.5 g/L**
Casamino acid	**0.5 g/L**
Glucose	**0.5 g/L**
Soluble starch	**0.5 g/L**
K2HPO4	**0.3 g/L**
Sodium pyruvate	**0.3 g/L**
Magnesium sulfate heptahydrate	**0.05 g/L**
Agar	**15 g/L**

In 1 liter laboratory pure water. adjust pH at 7.3 and autoclave at 121C for 15 minutes.

NWRI agar (HPCA):

تستخدم كطريقة للصب وطريقة للفرد وطريقة MF وهي ذات محتوي غذائي قليل يستخدم لانتاج اعلي عدد من العد الكلي البكتيري:

Composition:

Peptone	**3.0 g/L**
Soluble casein	**0.5 g/L**
K2HPO4	**0.2 g/L**
Mg SO4	**0.05 g/L**
Fe Cl3	**0.001 g/L**
Agar	**15 g/L**

In 1 liter laboratory pure water. adjust pH at 7.2 before autoclaving at 121C for 15 minutes. Incubation at 35C for 48 hrs, and at 20 – 28C for 5-7 days.

RAPID MEDIA for detection of coliforms

1- Hicrome coliform agar:
Hicrome coliform agar with lauryl sulfate is recommended for simultaneous detection of *E. coli* and total coliforms in water.
Composition:

Peptone special	**3.0 g/L**
Sodium pyruvate	**1.0 g/L**
K2HPO4	**3.0 g/L**
KH2PO4	**1.7 g/L**
Na Cl	**5.0 g/L**
Tryptophane	**1.0 g/L**
Sodium lauryl sulfate	**0.1 g/L**
Chromogenic mixture	**0.2 g/L**
Agar	**12 g/L**

In 1 liter laboratory pure water. adjust pH at 7.2 before autoclaving at 121C for 15 minutes.

قد يضاف Novobiocin (5 mg/l) عند وجود اعداد عالية من البكتيريا الموجبة الجرام.

Mode of action:

Sodium pyruvate + peptone + tryptophane كمصدر للنيتروجين والكربون والاحماض الامينية

Potassium phosphate كمواد منظمة

Chromogenic mixture : يتكون من
Salmon-Gal and X-glucuronide.

هذه البيئة تساعد في نمو ال injured bacteria .

مجموعة بكتيريا القولون الكلية تفرز انزيم ß-D- galactosidase الذي يحول المادة المونة المرتبطة وتظهر غير ملونة ← مادة ملونة احمر.

GAL + Salmon ← Salmon-GAL (colorless)

تفرز *E. coli* انزيم ß-D-glucuronidase

X + glucuronidase (dark blue violet red) ← X-glucuronidase

Rapid Hicoliform agar /broth:
Composition:

Peptone special	**5.0 g/L**
Sorbitol	**1.0 g/L**
K2HPO4	**2.7 g/L**
KH2PO4	**2.0 g/L**
Na Cl	**5.0 g/L**
Sodium lauryl sulfate	**0.1 g/L**
Iso propyl-B-D-thiogalactopyranoside (IPTG)	**0.1 g/L**
Chromogenic substrate	**0.08 g/L**
Flurogenic substrate	**0.05 g/L**
Agar	**15 g/L**

In 1 liter laboratory pure water. adjust pH at 7.2 before autoclaving at 121C for 15 minutes.

تستخدم لعد بكتيريا coliforms وكذلك *E. coli* .

Mode of action:

- Special peptone غني بالتربتوفان وتمد البكتيريا بالمواد الغذائية الضرورية
- Sorbitol مصدر للكربون
- Buffer phosphate كمحاليل منظمة
- IPTG يشجع ويكبر ويسرع تخليق الانزيمات ويزيد نشاط انزيم الجالاكتوسيداز وكذلك الانزيمات الاخري
- Sodium lauryl sulfate يثبط نمو الميكروبات المصاحبة لمجموعة بكتيريا القولون الكلية وخاصة الموجبة الجرام
- Flurogenic substrate تنكسر هذه المادة بواسطة انزيم الجلوكورونيداز الذي تفرزه بكتيريا الاشرشيا كولاي ويظهر التفاعل الايجابي بظهور لون فلورسنتي خفيف عند استعمال لمبة الاشعة فوق البنفسجية.
- Chromogenic substrate ينتج عنه لون اصفر عند تكسيره بواسطة انزيم الجالاكتوسيداز المفرز بواسطة بكتيريا القولون الكلية
- تذاب في ١ لتر laboratory pure water

Hicrome Enterococci broth

Sodium azide يمنع نمو البكتيريا المصاحبه لمجموعة Enterococci هذه المجموعه تفرز انزيم β-glucosidase تكسر مادة chromogenic من اللون الاصفر الي اللون الازرق المخضر.

m-Enterococcus agar:

Tryptone……..	**2 %**
Yeast extract……	**0.5 %**
Glucose……..	**0.2 %**
Dipotassium hydrogen phosphate……	**0.4 %**
Sodium azide……	**0.04 %**
2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC)……	**0.01 %**
Agar……	**1 %**
Reagent grade water……	**100 ml**

Don't autoclave

Esculin $\xrightarrow{H_2O}$ Gulgose + Esculin $Fe^{+++}\longrightarrow$ black complex

(Bile esculin test)

Detection and determination of total coliform

الكشف وعد بكتيريا القولون الكليه في المياه

1. Presence /Absence
2. Most probable number (MPN)
3. Membrane filtration (MF)

اختبارات تقدير مجموعة coliform تعتمد علي تخمير سكر اللاكتوز

Glucose-O-galactose (Lactose)

e permease

Glucose-O-galactose → glucose + galactose

انزيم جلاكتوسيديز

G (glucose)

G-6-P

F-6-P

F1,6P

Glyceraldhyde 3P

Pyruvic acid

Formic acid $\longrightarrow H_2 + CO_2$

Acetyl CoA $\longrightarrow$ Acetic

Aceton $\longrightarrow$ Butandiol

Standard total coliform multiple tube fermentation technique or (MPN)
Presumptive test:

Lauryl Tryptose broth:

Tryptose……	**20.0 g**
Lactose……	**5.0 g**
Dipotassium hydrogen phosphate, (K_2HPO_4)……..	**2.75 g**
Potassium dihydrogen phosphate, (KH_2PO_4)……..	**2.75 g**
Sodium chloride, (NaCl)…….	**5.0 g**
Sodium lauryl sulfate……	**0.1 g**
Distilled water……	**1 L**

Note: you can add 0.01 g / L bromocresol purple as an indicator for acid production.
The pH was adjusted to 6.8 ± 0.2 before autoclaving at 121°C for 15 minutes.

Confirmed test:
Brilliant green bile broth:

Peptone……	**10.0 g**
Lactose……	**10.0 g**
Oxgall……	**20.0 g**
Brilliant green…….	**0.0133 g**
Distilled water……	**1 L**

The pH was adjusted to 7.2 ± 0.2 before autoclaving at 121°C for 15 minutes.

تعتبر كلا من Bile (Oxgall) وكذلك Brilliant green غالبا من العوامل المثبطه لنمو الميكروبات الغير مرغوبه والتي تشمل ميكروبات قادره علي تكسير سكر اللاكتورز مثل clostridia وكذلك oxible من العوامل التي تثبط نمو الميكروبات الموجبه الجرام.

EC broth for fecal coliform:

Tryptose or trypticase…… 20.0 g

Lactose…… 5.0 g

Bile salt mixture or bile salts No.3…….... 1.5 g

Dipotassium hydrogen phosphate, (K_2HPO_4)…… 4.0 g

Potassium dihydrogen phosphate, (KH_2PO_4)…… 1.5 g

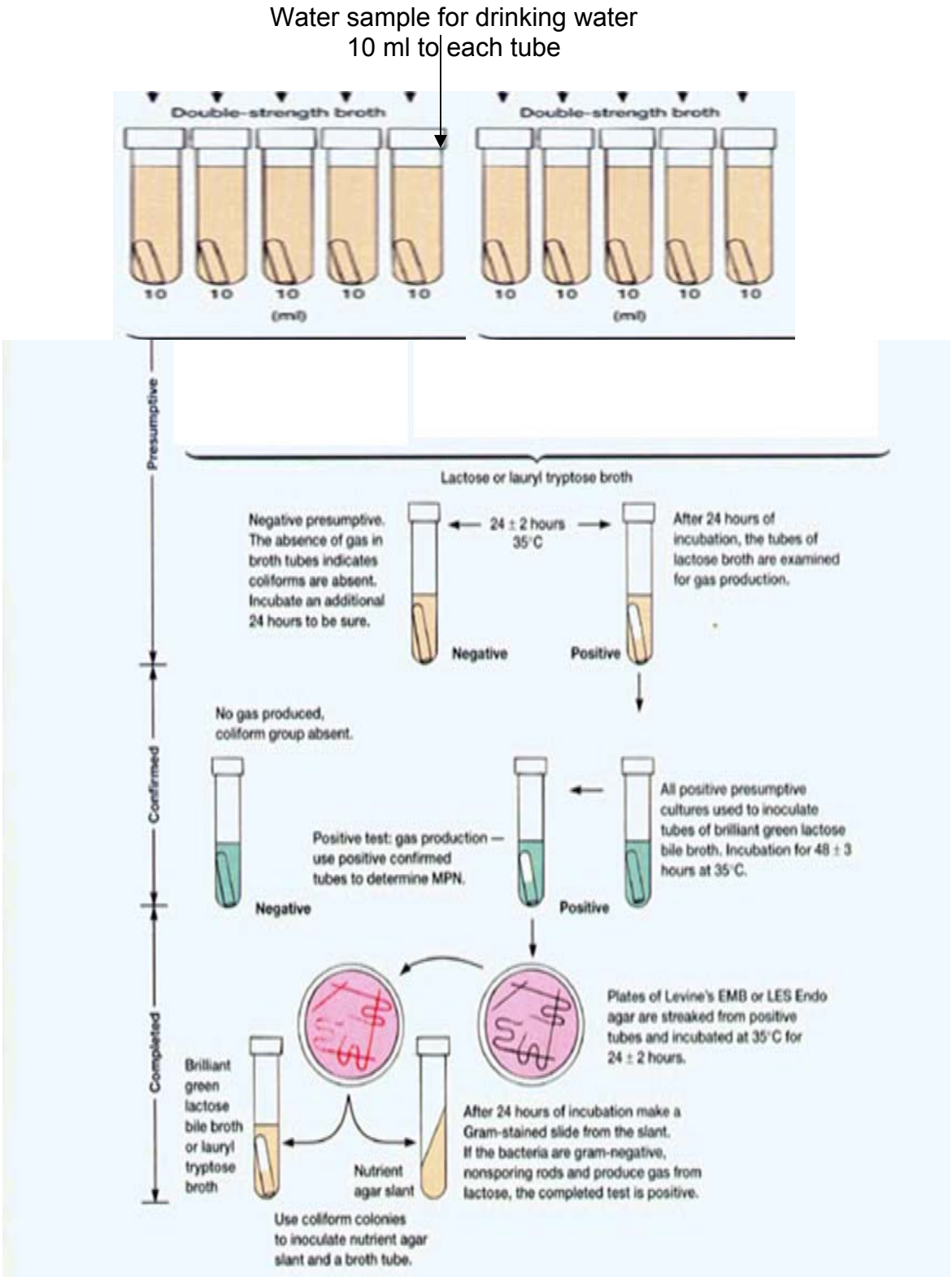
Sodium chloride, (NaCl)…… 5.0 g

Distilled water…… 1 L

The pH was adjusted to 6.9 ± 0.1 before autoclaving at 121°C for 15 minutes.

EC- MUG for fecal coliform + (*E.coli*)

- **EC medium component**
- **4-methyl ambellifryl** β-Dglucuronide (MUG) 0.05 mg/liter


Water sample for drinking water
10 ml to each tube
Double-strength broth
Double-strength broth
10 10 10 10 10
(ml)
10 10 10 10 10
(ml)
Presumptive
Confirmed
Completed
Lactose or lauryl tryptose broth
Negative presumptive. The absence of gas in broth tubes indicates coliforms are absent. Incubate an additional 24 hours to be sure.
24 ± 2 hours
35°C
After 24 hours of incubation, the tubes of lactose broth are examined for gas production.
Negative
Positive
No gas produced, coliform group absent.
Positive test: gas production — use positive confirmed tubes to determine MPN.
All positive presumptive cultures used to inoculate tubes of brilliant green lactose bile broth. Incubation for 48 ± 3 hours at 35°C.
Negative
Positive
Plates of Levine's EMB or LES Endo agar are streaked from positive tubes and incubated at 35°C for 24 ± 2 hours.
Brilliant green lactose bile broth or lauryl tryptose broth
Nutrient agar slant
After 24 hours of incubation make a Gram-stained slide from the slant. If the bacteria are gram-negative, nonsporing rods and produce gas from lactose, the completed test is positive.
Use coliform colonies to inoculate nutrient agar slant and a broth tube.

Water sample for drinking water

Presence /Absence
For total coliform

100 ml Lauryl tryptose broth II

water sample

Incubation at 37°C for 48hrs

0.1 ml on EC

Incubation at 44.5°C for 24 hrs

Gas + for FC

2-3 drop Kovac reagent
+ *E.coli* ring red

0.1 ml on BGB

Incubation at 37°C for 48 hrs

Acid + gas
+ for TC

MPN-method for detection of coliform
from drinking water

↓

Lauryl tryptose broth II
10 tubes

↓

Incubation at 37°C
For 48 hrs

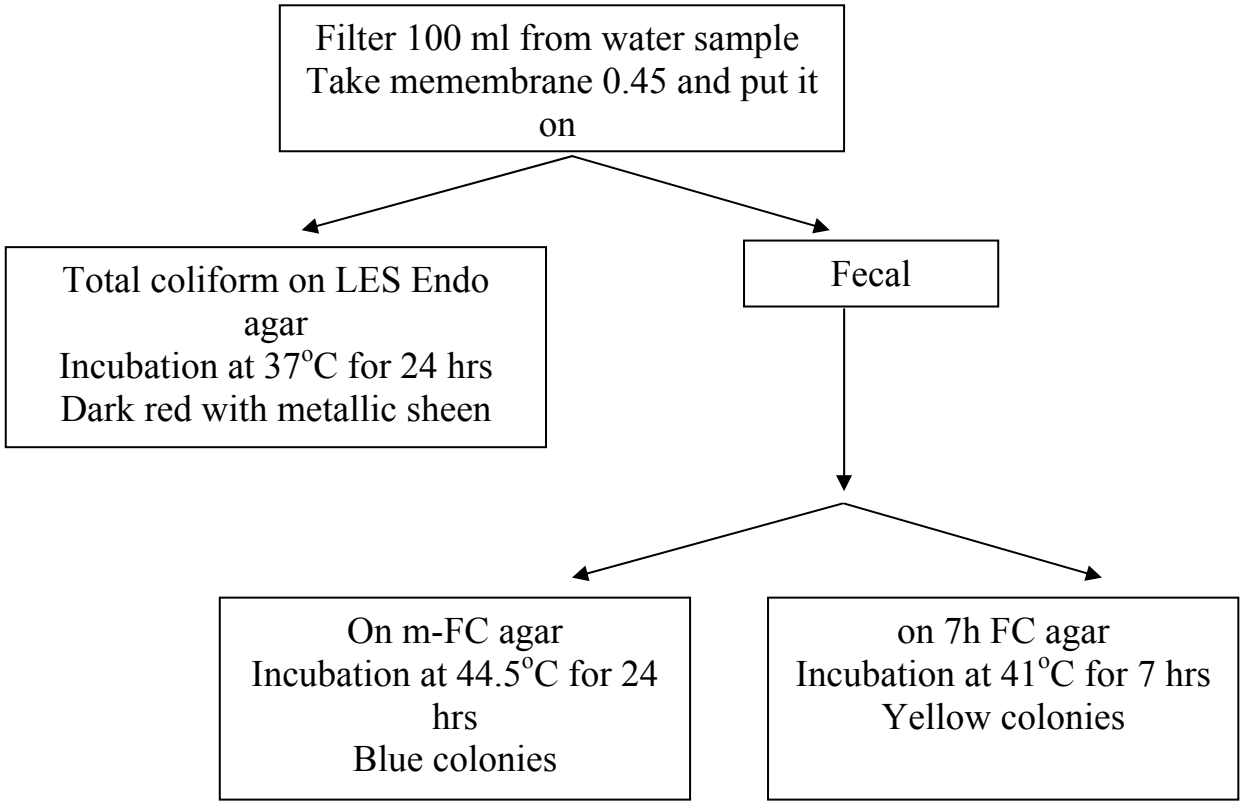
↓

Gas (+)

Brilliant green bile lactose broth
Incubation at 37°C for 48 hrs

EC broth
Incubation at 44.5°C for 24 hrs
Gas (+)

MF -method for detection of coliform
from drinking water



MPN-method for detection of fecal streptococci
from drinking water

↓

Azide dextrose broth II
10 tubes

↓

Incubation at 37°C
For 48 hrs

↓

Turbidity (+)

↓

Confirmation by streaking on
m-Enterococcus agar

Incubation at 37°C
For 48 hrs

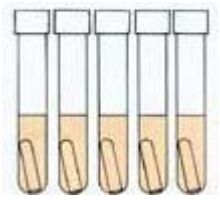
Red colonies

MF -method for detection of fecal sterprococci
from drinking water

Filter 100 ml from water sample
Take memembrane 0.45 and put it on
m-Enterococcus agar

Red colonies

Raw water

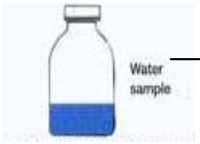


١ مل من التخفيف الاول لكل أنبوبه من الصف الأول

أولا: طريقة العد اكثر احتمالاً (MPN)

يتم عمل تخفيفات متتاليه فى محلول Ringer معقم كالتالى:-

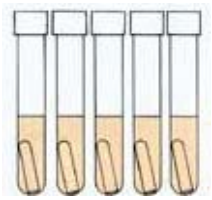
.



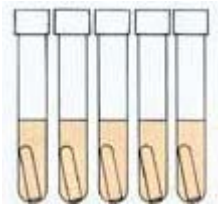
1 ml / 1 ml / 9ml

يتم عد بكتيريا القولون الكليه باختيار انسب التخفيفات التى تعطى ايجابيه وسلبيه مع الاختبار ويكون متتاليه

بيئة Lauryl Tryptose broth



١ مل من التخفيف الذى يليه



١ مل من التخفيف التالى لكل

ء

At 37°C for 48 h

Incubation at 37 48h

(5 3 1)

نأخذ من كل انبوبه تعطى غاز لكل صف على حده وتحقن فى انبوبة ال EC media وتحضن عند 44.5°C for 24h

Acid and gas is positive tube

لو Gas is Positive for Fecal coliform group

فمثلاً 4 3 0 ننظر للجدول والرقم المناضر لعدد بكتيريا TC ونضرب فى مقلوب التخفيف الأوسط.

Membrane filter طريقة

M-Endo Agar

Tryptose or polypeptone	**10.0 g**
Thiopeptone or thiotone	**5.0 g**
Casitone or trypticase	**5.0 g**
Yeast extract	**1.5 g**
Lactose	**12.5 g**
Sodium chloride, NaCl	**5.0 g**
Dipotassium hydrogen phosphate, K2HPO4	**4.375 g**
Potassium dihydrogen phosphate, KH2PO4	**1.375 g**
Sodium lauryl sulfate	**0.05 g**
Sodium desoxycholate	**0.10 g**
Sodium sulfite, Na2SO3	**2.10 g**
Basic fuchsin	**1.05 g**
Agar (optional)	**15.0 g**
Pure water	**1 L**

Heat to dissolve and not autoclaved

LES Endo agar

Yeast extract	**1.2 g**
Casitone or trypticase	**3.7 g**
Thiopeptone or thiotone	**3.7 g**
Tryptose	**7.5 g**
Lactose	**9.4 g**
Dipotassium hydrogen phosphate, K2HPO4	**3.3 g**
Potassium dihydrogen phosphate, KH2PO4	**1.0 g**
Sodium chloride, NaCl	**3.7 g**
Sodium desoxycholate	**0.1 g**
Sodium lauryl sulfate	**0.05 g**

Sodium sulfite, Na2SO3	**1.6 g**
Basic fuchsin	**0.8 g**
Agar	**15.0 g**
Pure water	**1 L**
	pH 7.2

محتويات البيئة تذاب فى ٩٨٠ مل من الماء النقى ويسخن حتى درجة الذوبان ثم تبرد إلى ٦٠ درجة مئويه واضف ٢٠ مل من كحول الايثانول وقلب جيداً ثم برد الى ٤٥ درجة مئويه وتوزع على الاطباق واتركها حتى تتجمد ثم خزنها فى الثلاجه على درجة ٤ درجة مئويه لمده لاتزيد عن اسبوعان.

الاطباق المستخدمه 60x15 mm او 50x9 mm والاغشيه البكتيريولوجيه من ماده سليلوز نيترات ذات مسام ٠.٤٥ µm .

يتم الترشيح لحجم معين على الغشاء ثم يوضع على الاطباق المحتويه على بيئة M-Endo Agar أو LES- Endo agar- .

وتحضن على درجة ٣٧^{0}م لمدة ٢٤ ساعة تظهر مستعمرات بكتيريا القولون باللون الاحمر ببريق معدنى ذهبى مخضر Red colonies withmetallic (golden) sheen بعض المستعمرات تضهر بلون الاحمر داكن محاط بمخاط بدون بريق metallic

Mode of Action

هذه البيئة تحتوى على sodium deoxycholate and sodium lauryl sulphate تمنع نمو البكتيريا المصاحبة لمجموعة بكتيريا القولون وخاصة الموجوده بعينات المياه المعرضة للكلوامين.

Sodium sulfite + Basic Fuchsin ⟶ Fuchsin- sulfite

عموماً بكتيريا القولون الكليه تخمر سكر اللاكتوز معطيه الدهيدات والتى تحرر Fuchsin من (Fuchsin- sulfate)

والتى تعطى اللون الاحمر الداكن للمستعمرات أما *E.coli* تنتج الدهيدات أكثر لذلك تحرر كميه من الفوكسين والذى يعطى اللون المعدنى الذهبى المخضر.

M-FC medium

Tryptose or biosate	**10.0 g**
Proteose peptone No. 3 or polypeptone	**5.0 g**
Yeast extract	**3.0 g**
Sodium chloride, NaCl	**5.0 g**
Lactose	**12.5 g**
Bile salts No. 3 or bile salts mixture	**1.5 g**
Aniline blue	**0.1 g**
Agar (optional)	**15.0 g**
Pure water	**1 L**

سخن حتى تمام الذوبان ثم بعد الطبخ الجيد ثم برد حتى درجة 00^{0}م ثم اضف ١٠ مل ١% حمض الروزليك Rosolic المذاب فى 0.2N من NaOH .

وفى البيئات ممكن يضاف بعد تبريدها 50 mg of carbenicillin

ملحوظة: توزع بعد الذوبان واضافة الروزليك على الاطباق وتخزن فى الثلاجة ولا تستخدم بعد تخزينها لاكثر من من أسبوعان.

M-7h FC agar

Proteose peptone No. 3 or polypeptone	**5.0 g**
Yeast extract	**3.0 g**
Lactose	**10.0 g**
d-Mannitol	**5.0 g**
Sodium chloride, NaCl	**7.5 g**
Sodium lauryl sulfate	**0.2 g**
Sodium desoxycholate	**0.1 g**

Bromcresol purple	**0.35 g**
Phenol red	**0.3 g**
Agar	**15.0 g**
Pure water	**1 L**

Heat to boiling (to dissolve)
pH 7.3 cool 55 t0 60^{o}C

بعد ترشيح حجم مناسب من العينه تضع الغشاء على الاطباق المحتويه على بيئة M-FC وتحضن على درجة ٤٤^{0}م تظهر مستعمرات بكتيريا القولون البرازيه باللون الازرق لوجود صبغة aniline blue .

Mode of Action

وجود Bile Salt (3) مهم لمنع نمو الميكروبات المصاحبة لمجموعة بكتيريا القولون. وكذلك حمض الريزوليك يمنع نمو الميكروبات المصاحبه لمجموعة بكتيريا القولون البرازيه.

من الممكن استخدام بيئة M-7h FC نضع

الغشاء على الاطباق المحتويه على هذه البيئه وتحضن على درجة ٤١ درجه مئويه لمدة ٧ ساعات تظهر المستعمرات بلون أصفر نتيجة تخمر سكر المانتول نتيجة حمض فى وجود دليل بروموكريزول برربيل والفينول رد تظهر بصورة مستعمرات صفراء محمره.

يجب أن تكون أعداد المستعمرات على الغشاء لاتزيد عن ٨٠ مستعمره (٢٠-٨٠ مستعمره لكل حجم مناسب).

Detection and Determination of Enterococci (FC)

1- Presence/ Absence (Drinking water Only)

2- MPN العد الاكثر الأحتمالى

3- MF طريقة الاغشيه

مجموعة البكتيريا السبحيه البرازيه FS تتكون من عدد من الأنواع الجنس Streptococcus مثل

S. faecalis

S. faecuim

S. avium

S. bovis

S. equnus

S. gallinarum

كل هذه الأنواع تعطى ايجابيه فى التفاعل مع Lancefield Group D antisera

عموماً مجموعة FS تعتبر معيستها فى القناه الهضميه لذوات الدم الحار وخاصة *S. faecalis- S. faecuim*

مجموعة Enterococcus هى جزء من FS وتشمل:

S. faecalis- S. faecuim- S. gallinarum- S. avium

وهذه المجموعة لها القدره على النمو فى وجود ٦.٥% صوديوم كلوريد pH 9.6 وعلى درجتى ١٠^{0}م و٤٥^{0}م.

وهى تعتبر من الادله المثاليه للتلوث البرازى فى marine water .

Presence/Absence

هذه الطريقه تستخدم فقط لمياه الشرب المراد معرفة صلاحيتها للشرب.

يتم تحضير بيئة الاختبار الابتدائي Azide dextrose broth **بضعف قوتها بحجم ٥٠ مل في زجاجه لاتقل عن ٢٥٠ مل وتغلق وتعقم.**

Azide dextrose broth (APHA, 2005)

This medium was used as a presumptive test for the detection of enterococci in water samples using multiple tube fermentation technique.

Typical composition (g/liter)

Beef extract……. 4.5 g

Tryptone or polypeptone……... 15.0 g

Glucose…… 7.5 g

Sodium chloride, NaCl…… 7.5 g

Sodium azide, NaN3……..... 0.2 g

Distilled water……..…… 1 L

The pH was adjusted to 7.2 ± 0.2 at 25°C before sterilization.

بعد حقن الزجاجه المحتويه علي ٥٠ مل من البيئه المتخصصه Azide dextrose broth ب ١٠٠ مل من عينة المياه المراد معرفة صلاحيتها للشرب وتحضن لمده ٤٨ ساعة علي درجه حراره من ٣٥ – ٣٧ درجه مئويه.

وفي حالة وجود عكاره يعتبر هذا ايجابيه الاختبار

ثم يؤخذ ٠.١ مل وتخطط علي الاطباق المحتويه علي بيئة Pfizer selective enterococcus (PSE) agar

Pfizer selective enterococcus (PSE) agar (APHA, 2005)

This medium was used as a confirmed test for the detection and enumeration of enterococci.

Typical composition (g/liter)

Peptone C…….....	**17.0 g**
Peptone B…….	**3.0 g**
Yeast extract…….……	**5.0 g**
Bacteriological bile……	**10.0 g**
Sodium chloride, NaCL……	**5.0 g**
Sodium citrate…….....	**1.0 g**
Esculin…….....	**1.0 g**
Ferric ammonium citrate…….	**0.5 g**
Sodium azide, NaN_3…….....	**0.25 g**
Agar……	**15.0 g**
Distilled water……..…….……	**1L**

The pH was adjusted to 7.1± 0.2 before autoclaving at 121°C for 15minutes.

Streak and incubate at 37°C for 48h Brownish colonies (salt tolerance test)

↓

Brain Heart Infusion broth	**25g**
Sodium chloride	**60g**
Bromocresol purple	**1.5g**
(in 100 ml of Ethanol 95%)	
Glucose	**1.0g**
In pure water	**1L**

Autoclaved

↓

(Growth with acid yellow)+ *S. faecalis*

wate Fe

Black complex Glucose + Esculin Esculin

→ →

العد الأحتمالى MPN

لمجموعة بكتيريا (FS)

Drinking water ten tubes az**ide dextrose broth II**

Raw water Serial dilution

ويتم اختيار ثلاث تخفيفات متتاليه تحفن فى az**ide dextrose broth I**

Turbidity is positive results

↓

Streaking o.1ml on PSE

↓

Brownish-black colonies is positive for fecal streptococci

↓

0.1 in salt tolerance medium with 6.5% NaCl

↓

Growth (yellow) Enterococci

↓

0.1 ml on brain heart infusion at 45^{o}C for 24h

↓

Growth positive results

طريقة الاغشيه (MF)

يتم ترشيح حجم معين علي الاغشيه البكتيريه ونضع الغشاء علي اطباق محتويه علي m-Enterococcus_agar وتحضن علي درجة حراره ٣٧ درجه مئويه لمدة ٢٤ ساعة وتعطي مستعمرات لونها احمر طوبي نتيجة اختزال TTC

<u>m-Enterococcus agar:</u>

Tryptone……………………………………………………..	**2 %**
Yeast extract…………………………………………………	**0.5 %**
Glucose……………………………………………………..	**0.5 %**
Dipotassium hydrogen phosphate………………………	**0.4 %**
Sodium azide…………………………………………	**0.04 %**
2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC)………………	**0.01 %**
Agar…………………………………………………………..	**1 %**
Reagent grade water……………………………………	**100 ml**

Don't autoclave

$$\text{MPN-index/100ml} = \frac{\textbf{No. of positive tube} \times \textbf{100}}{\sqrt{\textbf{No. of ml in negative tubes} \times \textbf{No. of ml in all tubes}}}$$

Using MPN method:

Samples	Total viable bacterial count /ml		MPN-index/100ml		
	At 37°C	**At 22°C**	**Total coliform**	**Fecal coliform**	**Fecal streptococci**
Egyptian standard 2007	**≤50**	**≤50**	**Free**	**Free**	**Free**

Using MF method:

Samples	Total viable bacterial count /ml		CFU/100ml		
	At 37°C	**At 22°C**	**Total coliform**	**Fecal coliform**	**Fecal streptococci**
Egyptian standard 2007	**≤50**	**≤50**	**Free**	**Free**	**Free**