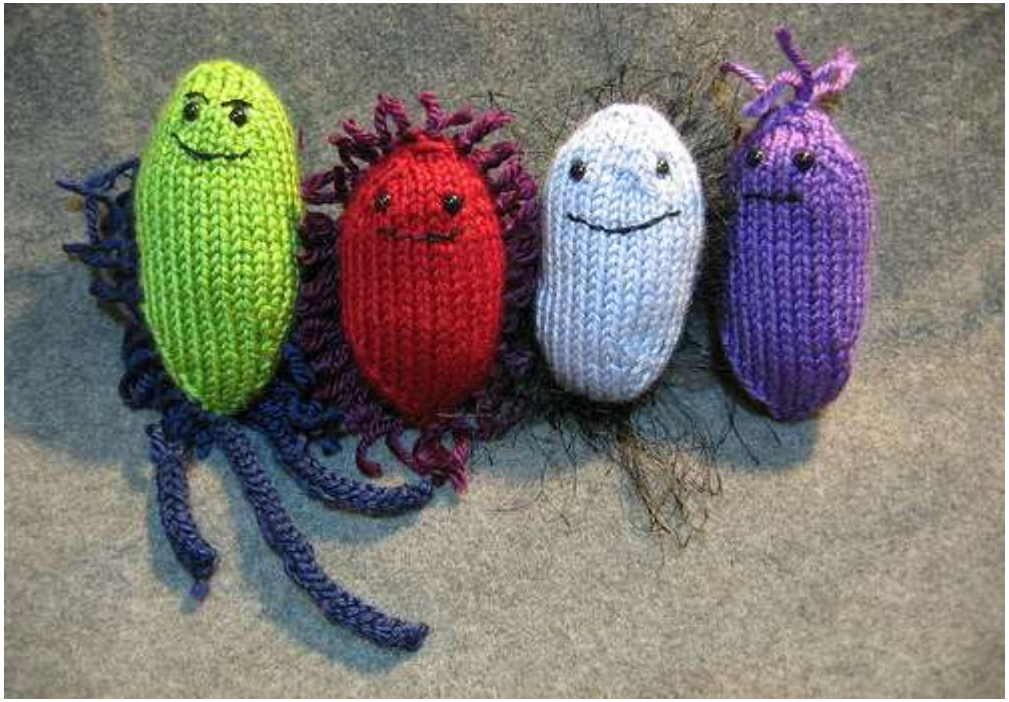
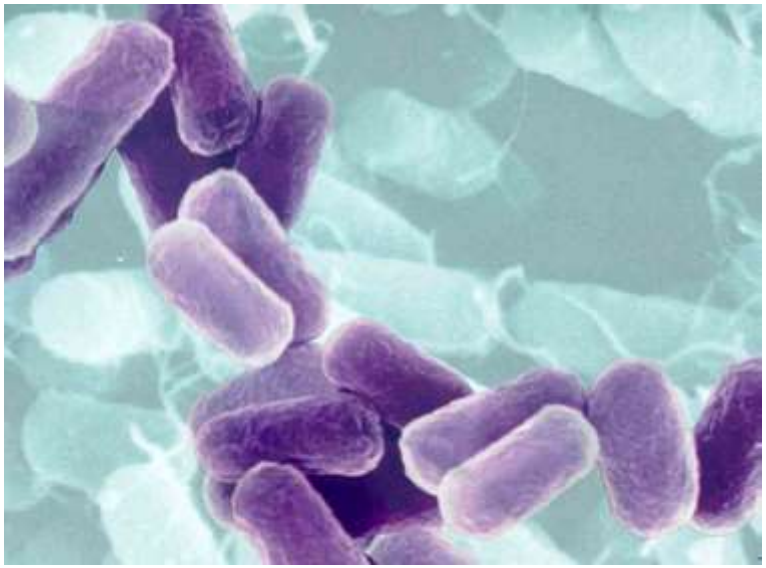
الفحص البكتيريولوجى لمياة الشرب والصرف الصحى



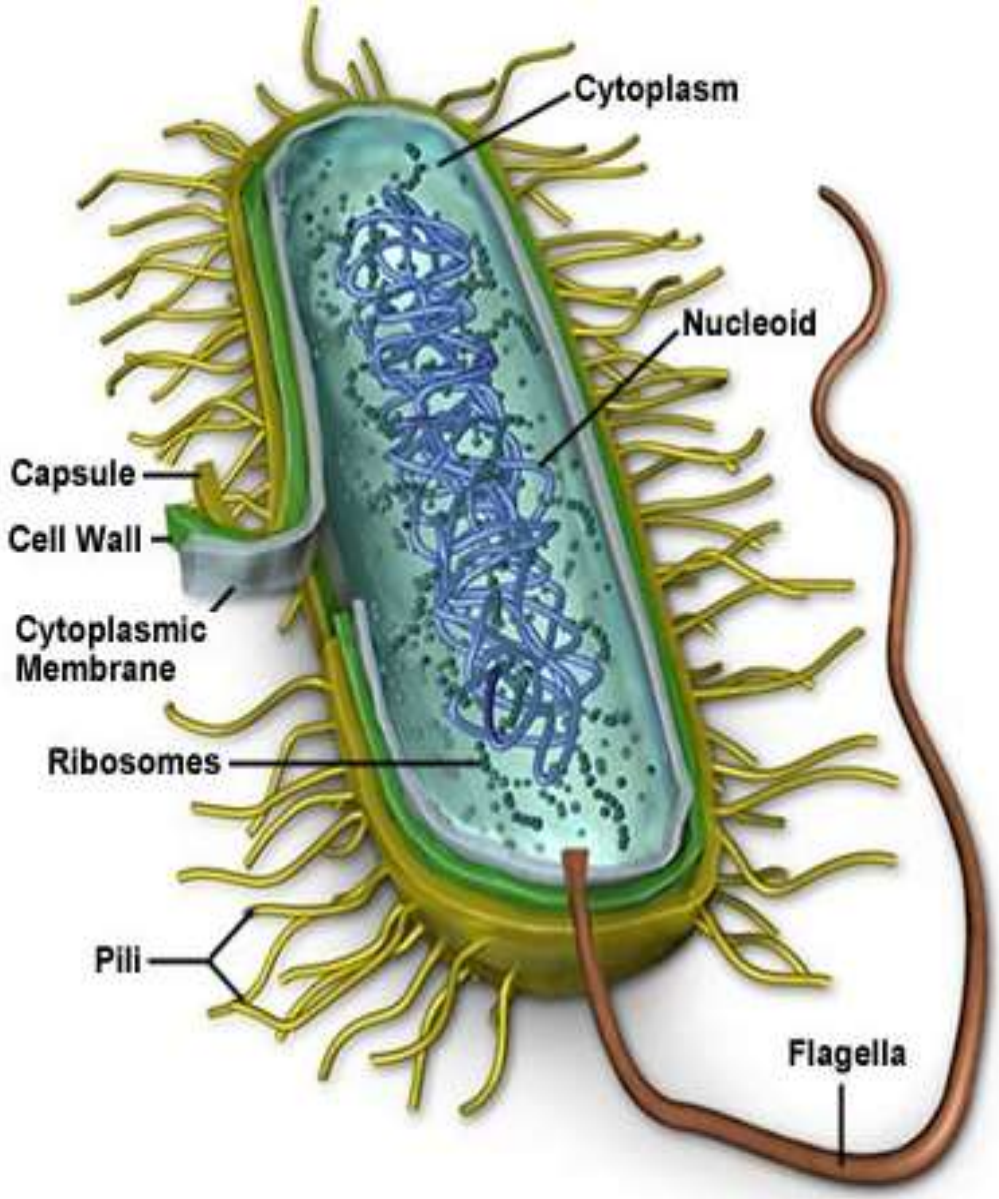
- علم البكتيريولوجي هو العلم الذي يختص بدراسة و فحص البكتيريا .
- تستقبل المياة محتواها البكتيري من الهواء و التربة و المجاري و الملوثات العضوية (الصرف) و الحيوانات و النباتات الميتة .
- و هذه المخلفات تحمل مع ملوثاتها الميكروبات الضارة مثل السالمونيللا و الشيجيللا و الكوليرا و هذه الميكروبات تسبب انتشارا سريعا للامراض المعدية مما قد ينجم عنه حدوث اوبئة كالتيفود و الكوليرا.

البكتيريا

هي كائنات حية دقيقة ميكروسكوبية ، وحيدة الخلية متوسط مقاسها من واحد الي عدة ميكرومتيرات في الطول و العرض ، قد توجد بعض البكتيريا علي شكل تجمعات منفصلة او بعضها متحركة ، و قد تحدث للبكتيريا تغييرات كثيرة في الشكل او الحجم او التركيب تبعا لعدة عوامل منها عمر البكتيريا او البيئة المحيطة بها .



تركيب الخلية



70% - 90% من وزنها الجاف ماء

80% من الوزن الجاف يتكون اساسا من مواد كربوهيدراتية و دهون و املاح معدنية و كميات صغيرة من بعض المواد الاساسية اللازمة لنمو البكتيريا .

تنقسم البكتيريا الي ثلاثة انواع

- بكتيريا المياة العادية Natural Water Bacteria

Pseudomonas fluores , Serratia marceus , Sarcina sp.

- بكتيريا التربة Soil Bacteria

Klebsella aerogese , Nitro bacteria , Nitrosomonas sp. , Bacillus sultius , Clostridium perfrogen

- بكتيريا المجاري Sewage Bacteria

و تنقسم هذه البكتيريا الي نوعين :

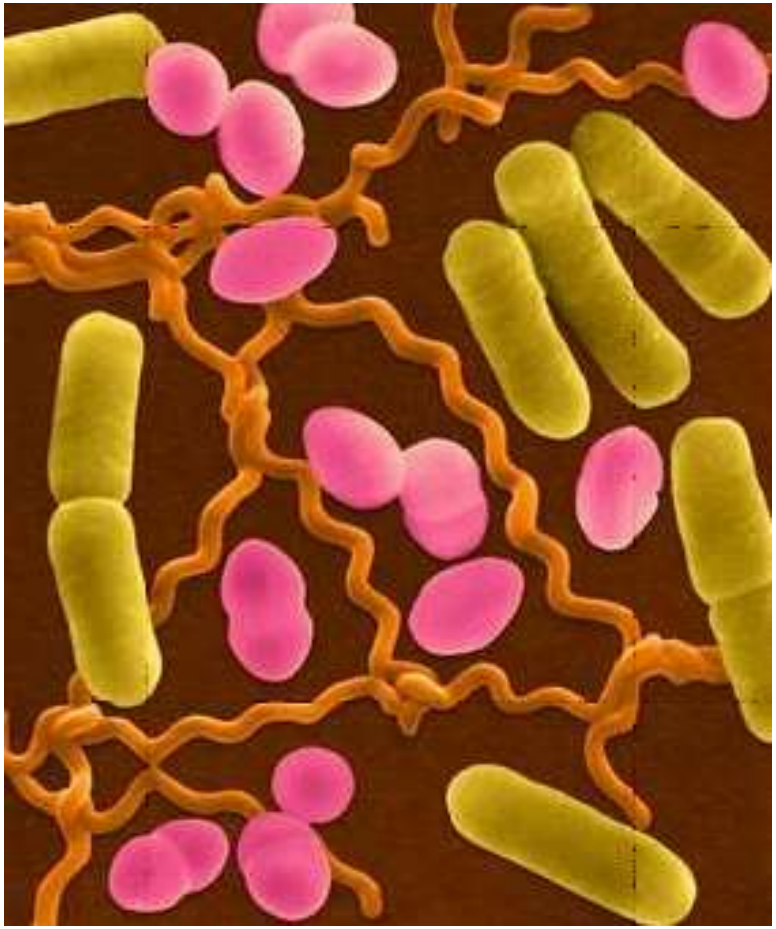
- الانواع الغير ممرضة Non Pathogenic

Clostridium welchii , E. coli , Strept. faeccales , Proteus sp.

- الانواع الممرضة Pathogenic

Shegella , Salmonella typhi & paratyphi

اشكال البكتيريا



Spherical

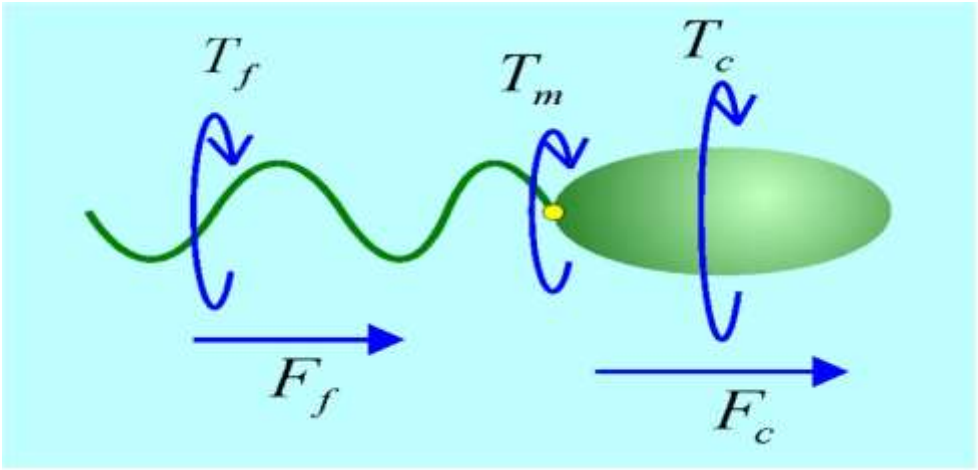
Rod

Spiral

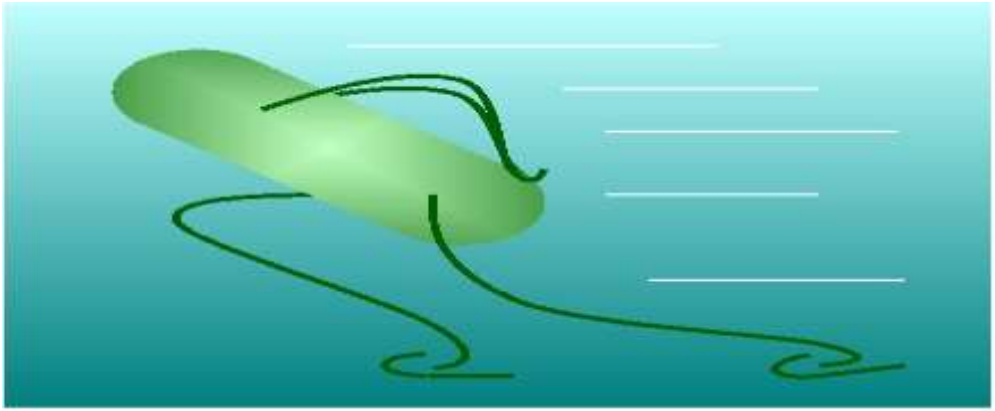
Vibreo

الحركة في البكتيريا :

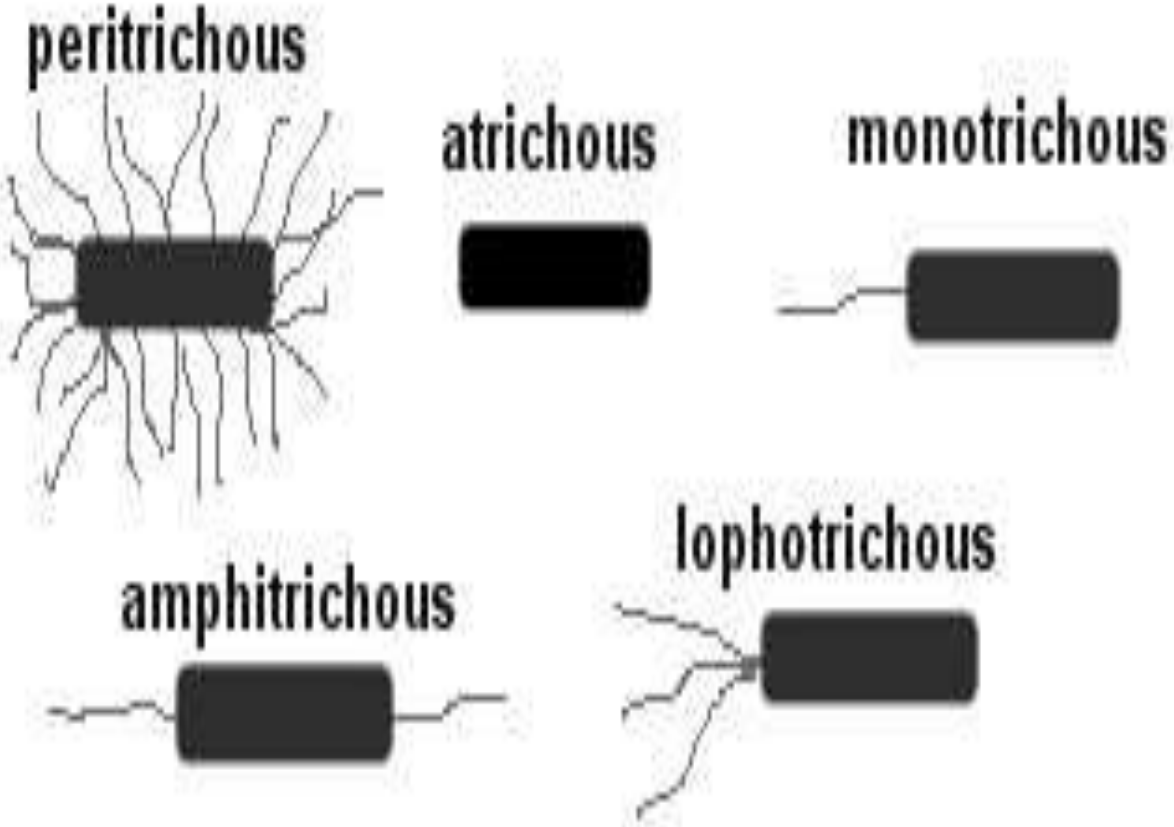
- حركة داخلية ذاتية (بروانية)

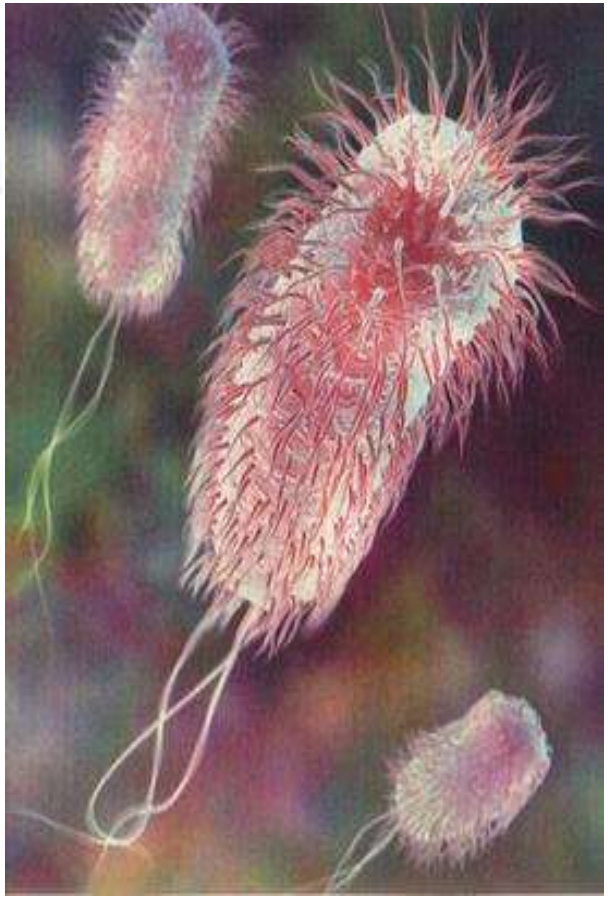


- حركة باستخدام الاسواط "flagella"



Types of flagella





التغذية Nutrition

ذاتية التغذية
Autotrophic

غير ذاتية التغذية
Heterotrophic

اشكال التغذية

رمي
Saprophyte

متكافل
Symbiosis

متطفل
Parasite

لا ينفع و لا يضر
Commercialism

اوساط الزرع

غالية
محدودة
صعبة التركيب
مثال : Czapek`s

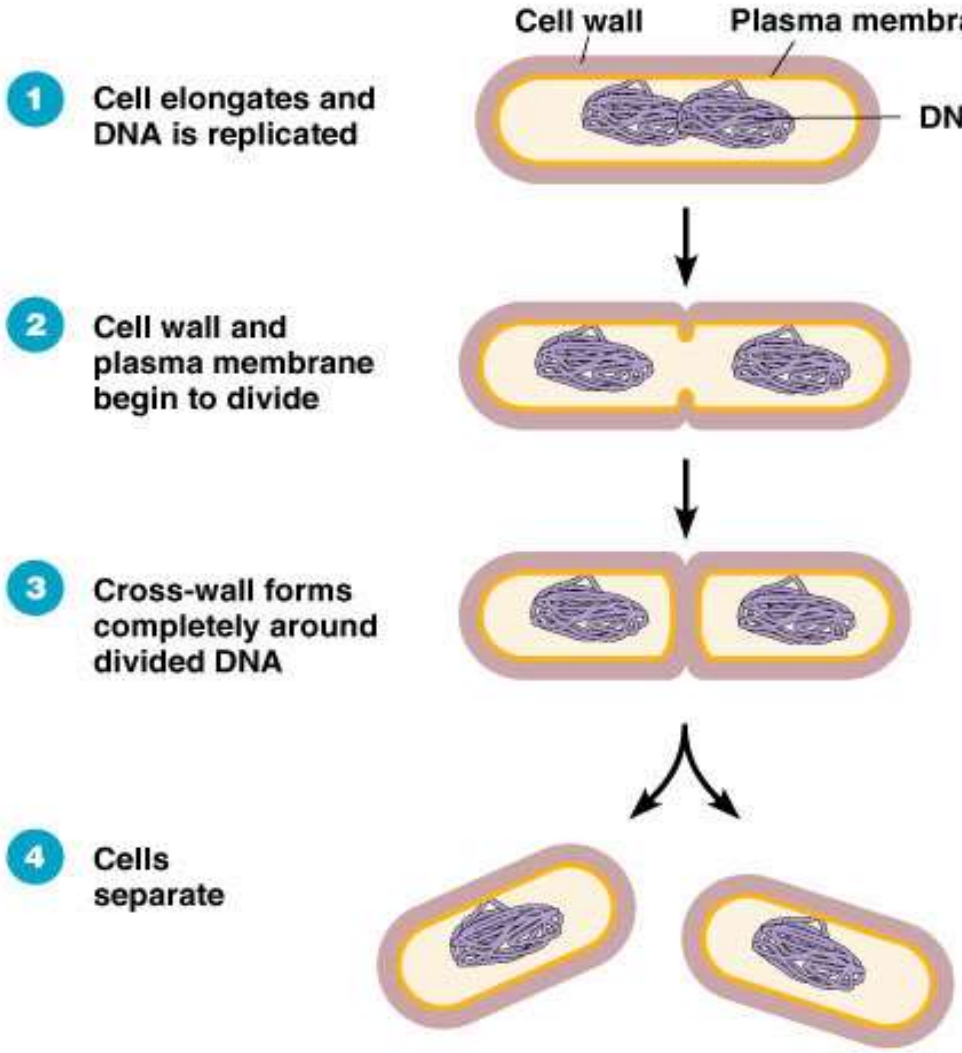
*All purpose media
ex. Nutrient agar
*Enriched media
*Selective media
*Indicator media "
Differential "

غير معروفة التركيب
رخيصة الثمن
مثال : مستخلص الخميرة

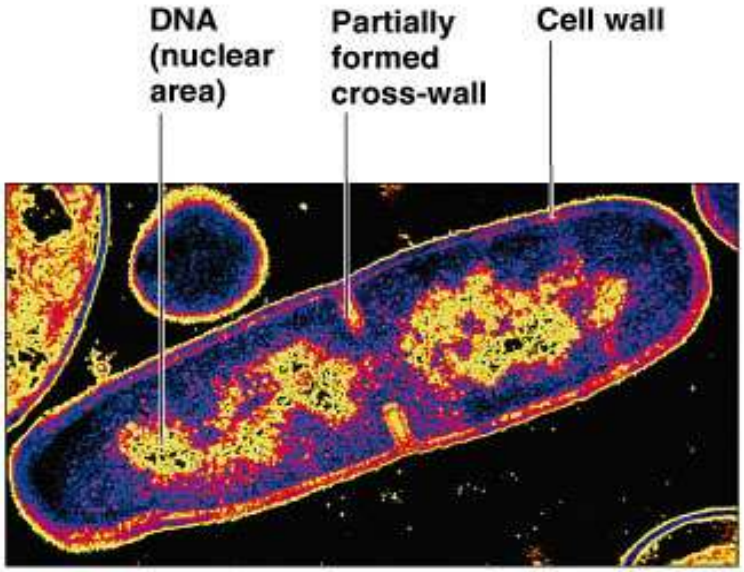
التنفس Respiration

- هوائية اجبارية Obligatory aerobic
- لا هوائية اجبارية Obligatory anaerobic
- لا هوائية اختيارية Facultative anaerobic
- شحيحة الهواء Microaerophilic

Reproduction التكاثر



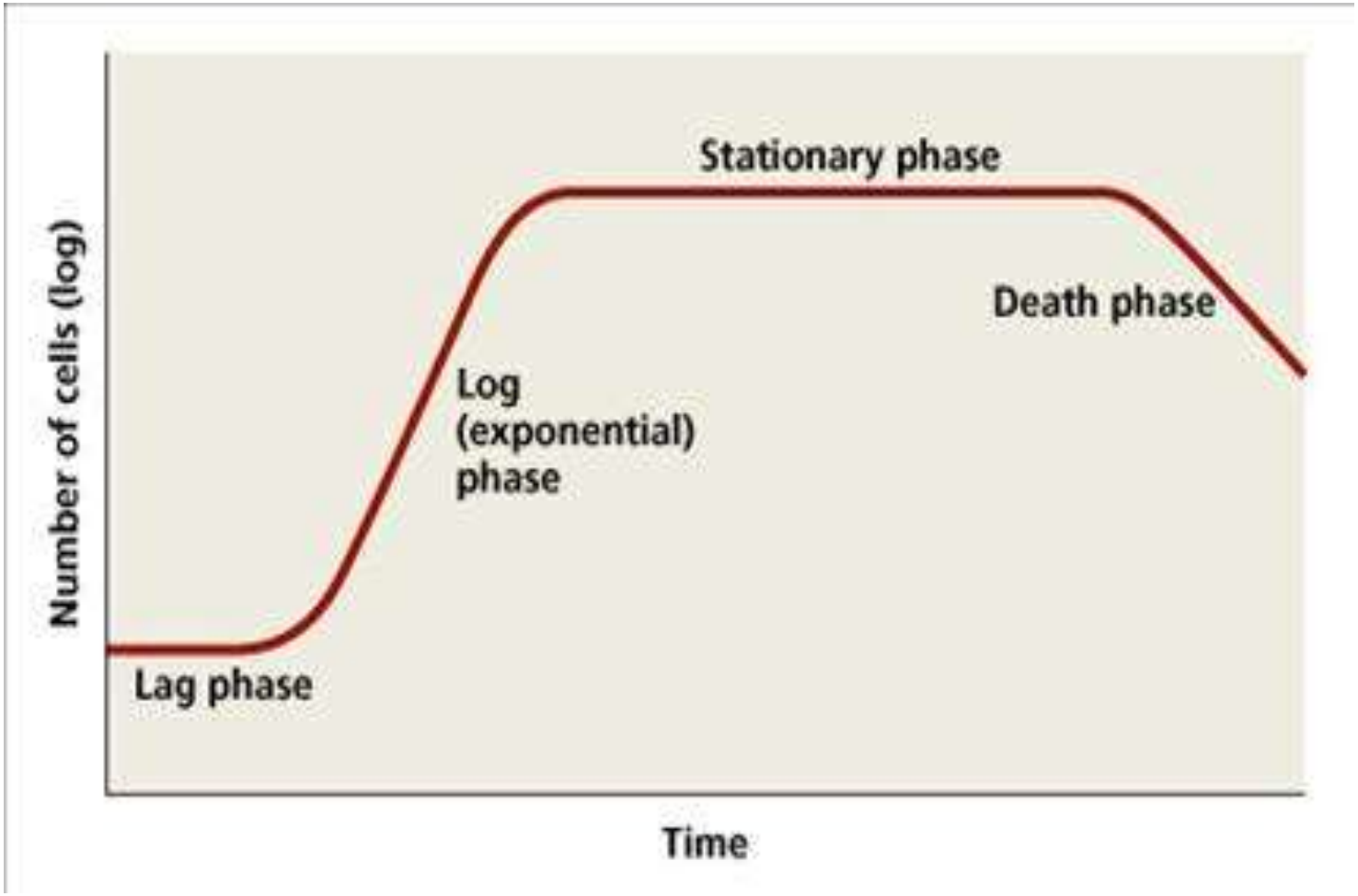
(a) A diagram of the sequence of cell division.



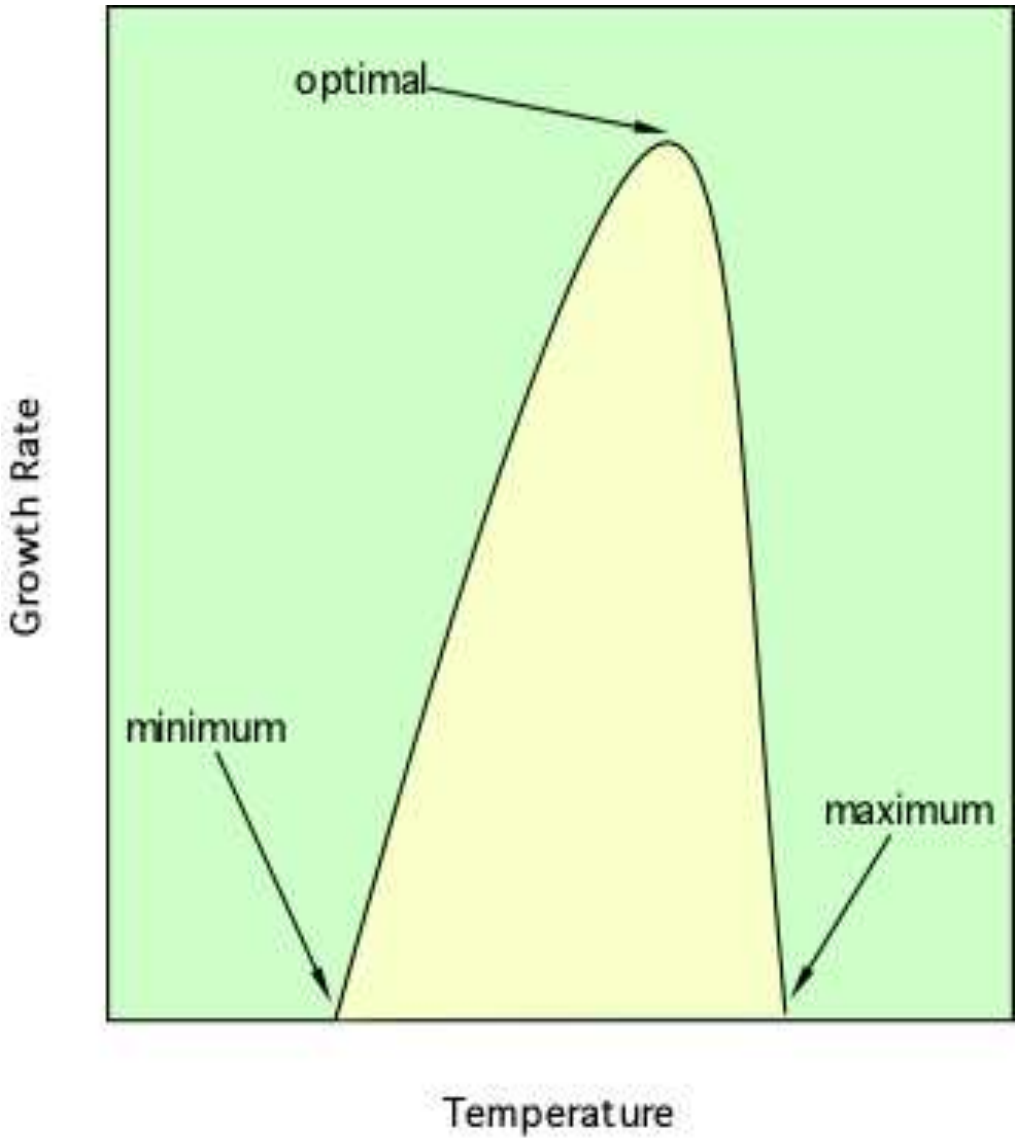
(b) A thin section of a cell of *Bacillus licheniformis* starting to divide.

Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

مراحل النمو


Number of cells (log)
Stationary phase
Death phase
Log
(exponential)
phase
Lag phase
Time

درجات الحرارة



محبة للبرودة
Psychophilic

المعتدلة
Mesophilic

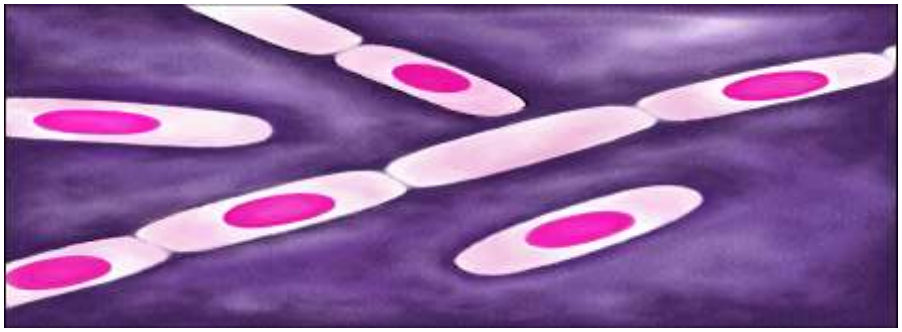
المحبة للحرارة
Thermophilic

الرقم الهيدروجيني

معظم البكتيريا تعيش في وسط 8.5-7 بعضها في الوسط الحمضي مثل بكتيريا الالبان Lactobacillus و الاخري في الوسط القلوي مثل بعض انواع الكوليرا Cholera vibreo في وسط 8.9 .

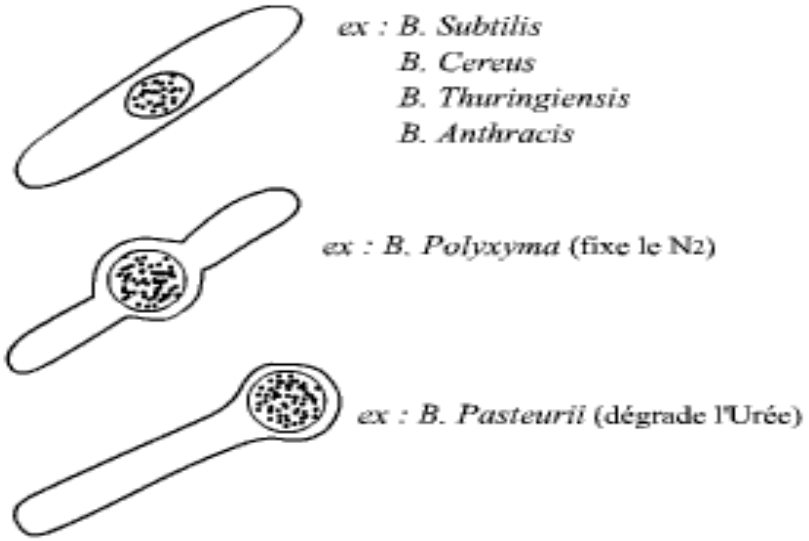
الجرثومة

من ناحية الشكل :



1. بيضاوية الشكل
2. مستديرة الشكل

من ناحية الوضع (المكان) :



1. مركزية Central
2. قبل طرفية Sub terminal
3. طرفية Terminal

أهم الأجهزة المستخدمة في التحاليل البكتريولوجية

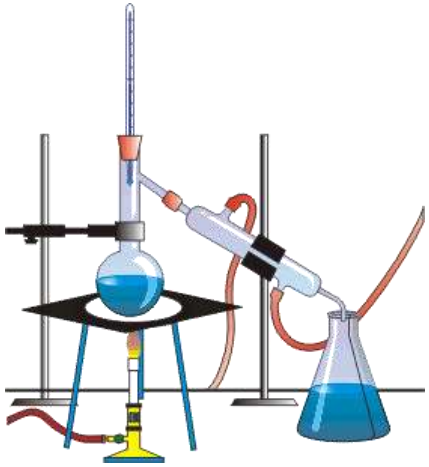
PH-meter

analytical balance

Water bath

Dry oven

Burner



Distillation system

Colony Counter

Autoclave

Refrigerator

Membrane filter

Microscope

الكيماويات ومحاليل الاستنباط المستخدمة :

- محلول الاستنباط (M – Endo Broth) عبوة 100 جم للبكتريا القولونية الكلية.
- محلول الاستنباط (M – Endo Broth) أمبولات 2 مللي لتر معقمة.
- محلول الاستنباط (M – FC Broth) عبوة 100 جم للبكتريا الغائطية.
- محلول الاستنباط (M – FC Broth) أمبولات 2 مللي لتر.
- حمض روزاليك (Rosolic acid) عبوة 25 جم.

تابع الكيماويات ومحاليل الاستنباط المستخدمة

- ملح ثنائي هيدروجيني فوسفات البوتاسيوم (Potassium dihydrogen phosphate).
- ملح كلوريد ماغنسيوم (Magnesium chloride).
- ملح ثيوكبريتات الصوديوم (Sodium thiosulfate).
- أيدر وكسيد صوديوم (Sodium hydroxide).
- كحول مثيلي أو إيثيلي 95% (Methanol or ethanol).
- ماء مقطر.

متطلبات جمع العينات بناءً على الكثافة السكانية :

الكثافة السكانية المخدومة	أقل عدد للعينات في الشهر
25 – 1000	1
1001 – 2500	2
2501 – 3300	3
3301 – 4100	4
4101 – 4900	5
4901 – 5800	6
5801 – 6700	7
6701 – 7600	8
7601 – 8500	9
8501 – 12900	10

15	**17200 – 12901**
20	**21500 – 17201**
25	**25000 – 21501**
30	**33000 – 25001**
40	**41000 – 33001**
50	**50000 – 41001**
60	**59000 – 50001**
70	**70000 – 59001**
80	**83000 – 70001**
90	**96000 – 83001**

100	130000 – 86001
120	220000 – 130001
150	320000 – 220001
180	450000 – 320001
210	600000 – 450001
240	780000 – 600001
270	970000 – 780001
300	1230000 – 970001
330	1520000 – 1230001
360	1850000 – 1520001

390	2270000 – 1850001
420	3020000 – 2270001
450	3960000 – 3020001
480	3960001 – أو أكثر

طرق سحب و تجميع العينات و حفظها

سحب العينات :

يجب ان يحقق موقع اخذ العينات ما يلي :

- تجانس العينة : حيث تؤخذ من المواقع التي تختلط فيها المياة ثم تمزج بطريقة متجانسة .
- تمثيل العينة : يعتبر اخذ عينة مجمعة من نقاط مختلفة من نفس المصدر افضل من اخذ عينة من نقطة واحدة و كلما تعددت النقاط كلما كانت العينة اكثر تمثيلا .
- المواقع المناسبة : يجب اختيار المواقع المناسبة من حيث امكانية قياس سرعة تدفق المياة و سهولة الوصول اليها .

تجميع العينات :

- تحديد مكان جمع العينات و تكرارية الجمع .
- تجهيز اوعية ذو فوهة واسعة سعة 250 سم2 من زجاج البوروسيليكات ذو غطاء مصنفر قابلة للتعقيم في الاوتوكلاف او اكياس بلاستيك معقمة .
- يلزم اضافة ثيوكبريتات الصوديوم لإزالة الكلور (0.1 سم3 من محلول 3%) تكفي لإزالة 5 مللجم / لتر كلور حر .
- تدوين بيانات العينة التي سيتم جمعها علي بطاقة البيانات الملصقة بالعبوة .
- يفتح الصنبور و يترك الماء ليتدفق لمدة خمس دقائق و يعقم باللهب .
- يفتح الوعاء دون تلويث جدرانه الداخلية و يملأ حتى المنسوب الملائم " يترك 2.5 سم " .
- تغلق فوهة الوعاء بشريط لاصق و تستوفي السجلات و البيانات الخاصة بزمن و مكان و اسم جامع العينة و ترسل للمعمل فورا او مثلجة في صندوق الحفظ خلال ست ساعات فقط من اخذ العينة .

حفظ العينات :

- يتم تحليل العينة عقب سحبها مباشرة حيث لا توجد طريقة قياسية واحدة للحفظ .
- اذا تعذر اجراء الاختبارات اللازمة بعد اخذها مباشرة فيجب حفظها عند درجة حرارة 4 م و ذلك بوضعها في صندوق ثلاجة عند نفس الدرجة لمدة لا تزيد عن 6 ساعات للفحص البكتيريولوجي

ملحوظة :

لا تستخدم نفس العينة للتحليل الكيميائي و البكتيريولوجي لأن طرق الحفظ تختلف .

تجهيز العينات :

- تغسل العبوات و اغطيتها بمنظف صناعي لا يحتوي علي فوسفات بفرشاة .
- تغسل العبوات بحمض الكروميك ثم بالماء العادي ثم المقطر ثم امرار البخار بها .
- تقلب العبوات لتصفية المياة و تنقيتها .
- تعقم العينات و بعد ذلك حفظها في الاوتوكلاف لمدة 24 ساعة .

ملحوظة :

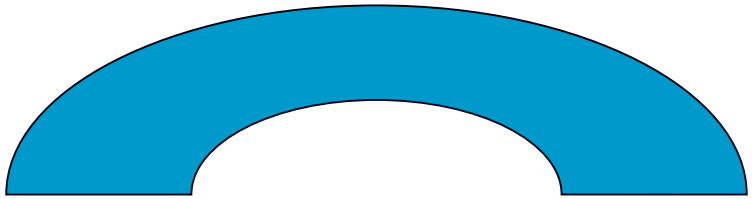
لتحليل العناصر المعدنية تغسل العبوات بحمض النيتريك 1:4 ثم الماء المقطر و البخار ، لتحليل المركبات العضوية تغسل العبوات بالأسيتون ثم امرار البخار و تجفيفها .

يتضمن التقرير المرفق مع العينة :

- تاريخ و توقيت جمع العينة.
- مكان جمع العينة.
- نوع العينة.
- اسم الشخص القائم بجمع العينة.
- رقم كودي العينة.
- أي مواد حافظة أو معالجة تمت أثناء الجمع.
- أي بيانات أخرى أو معلومات أو ملاحظات يراها جامع العينة ضرورية.

شروط اخذ عينات المياه السطحيه:

يتم جمع عينات المياه السطحية من الانهار بإحدى طريقتين:



الاولى يدوية

يمسك بالإناء الزجاجى من قاعدته وتغمر فوهته فى الماء لاستبعاد دخول المواد الطافية و يتم توجيه فوهة الاناء عكس التيار

والثانية آلية

يثبت اناء الجمع على قاعدة معدنية ذات ذراع طويل وتغطى فوهة الاناء بسدادة متصلة بحبل من النايلون ثم يتم توجيه فوهة الاناء ناحية التيار ويغمر الاناء فى الماء ثم يتم جذب الحبل بسرعة ليسمح للماء بالدخول

شروط أخذ العينات المرشحة (من صنبور) :

- مرور 20 دقيقة على الأقل بعد إضافة الكلور (لضمان فترة التلامس).
- اختيار صنبور شائع الاستعمال سليم.
- يفتح الصنبور لمدة دقيقتين وتغسل فوهته.
- يتم تعقيم الصنبور بالحرق.
- تنزع الشاش من على فوهة زجاجة جمع العينة ويتم حرق فوهة الزجاجة والغطاء.
- تملئ الزجاجة مع مراعاة ترك فراغ حوالي 1.5 سم ثم تحرق فوهة الزجاجة والغطاء ويتم إحكام إغلاق الزجاجة.

شروط أخذ عينة المياه الجوفية :

تشغيل الطلمبة لمدة 48 ساعة على الأقل بصفة مستمرة للآبار الجديدة قبل أخذ العينة.

إدارة الطلمبة قبل أخذ العينة بمدة نصف ساعة للآبار التي سبق تشغيلها.

أخذ العينة من أول صنبور بعد الطلمبة.

تكرارية جمع عينات مياه الشرب للاختبار المعملي

الغـــــرض	الاختبـــــــــار	أدنى تكرارية للجمع
مراقبة العمليات	اختبار العكارة التحليل الكيميائي الاختبارات الطبيعية	يومياً مرتين أسبوعياً مرتين أسبوعياً أسبوعياً
التحكم في العمليات	اختبار الترويق تحديد تركيز محلول الشبة تعيين تركيز الكلور المتبقي	أسبوعياً يومياً يومياً
المراقبة والتحكم في العمليات	تحليل بكتريولوجي	يومياً

قانون الحد الأعلى للتلوث
(Maximum Contamination Limit M.C.L.)

يحدد

- **الطريقة المستخدمة في القياس.**
- **عدد العينات المطلوبة للتحليل.**
- **حجم العينة المستخدمة في التحليل.**
- **الحد الأقصى للبكتريا القولونية [الغائطية وغير الغائطية] المسموح بها في :**
  - **مياه الشرب.**
  - **مياه الصرف الصحي.**

طرق التعقيم و التطهير Sterilization & Disinfection

التعقيم Sterilization : هو تدمير كل اشكال الكائنات الحية التي تشمل البكتيريا و الفيروسات و الفطريات (العادية و المتجرثمة) سواء كانت ممرضة او غير ممرضة .

التطهير Disinfection : هو تدمير (قتل) الكائنات الحية الممرضة سواء كانت في حالة خضرية (عادية) او غير متجرثمة .

Methods of Sterilization طرق التعقيم

الطرق الطبيعية
Physical Methods

- الحرارة Heat
- الاشعاع Radiation
- المرشحات Filtration

الطرق الكيميائية
Chemical Methods

- غاز اكسيد الاثيلين
- غاز الفورمالدهيد

Methods of Disinfection طرق التطهير

الطرق الطبيعية
Physical Methods

- البسترة
- حمام الفاكسين Vaccine bath
- الغليان Boiling
- البخار المنفرد Single steam

الطرق الكيميائية
Chemical Methods

- العوامل المؤكسدة
- برمنجنات البوتاسيوم .
- فورمالدهيد + برمنجنات البوتاسيوم .
- الهالوجينات
- الاوزون .
- ثاني اكسيد الكلور .

التحليل البكتيريولوجي

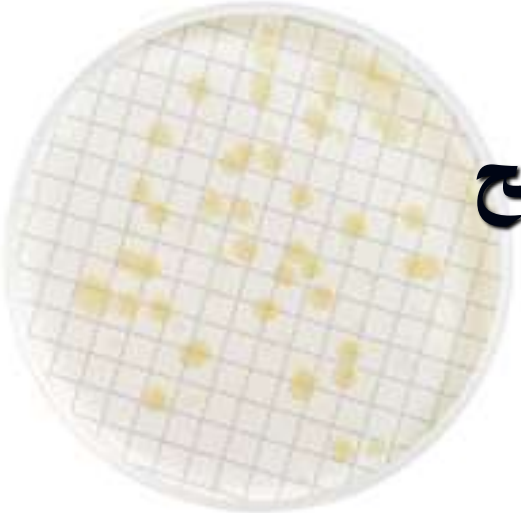
- يعتبر التحليل البكتيريولوجي اكثر الاختبارات حساسية للكشف عن تلوث المياة .
- يجب فحص المياة بشكل متكرر باختبارات بسيطة بدلا من فحصها علي نحو متباعد باختبارات معقدة .
- يقوم المعمل بتقدير العدد الكلي للبكتيريا حيث ان زيادتها لاسيما في عينات المياة الجوفية له دلالاته كما يستخدم للدلالة علي :
- العلامة المبكرة للتلوث .
- تقدير مدي كفاءة عمليات المعالجة .
- تقدير مستوي نظافة و سلامة شبكة التوزيع .

الاحتياطات الواجب إتباعها في التحاليل البكتريولوجية

- يجب إجراء التحليل بمجرد جمع العينة.
- تحت أي ظروف لا تزيد المدة بين الجمع والتحليل عن 6 ساعات.
- تسجيل وقت ودرجة حرارة تخزين العينة.
- تعقيم كل الأدوات والمواد المستخدمة.
- الرج والمزج الجيد عند كل تخفيف.
- التعقيم باللهب عقب إجراء كل تخفيف.
- يجب أن تكون الحضانة ذات حجم مناسب يسمح بتجانس درجة الحرارة.
- استخدام قطعة من القطن في الماصات المستخدمة.
- استخدام تجربة غفل دائماً للتأكد من التعقيم.
- استبعاد العينة التي لا يصاحبها بطاقة بيانات كاملة.
- لا يعتد بنتائج العينة التي مضى عليها أكثر من 24 ساعة قبل التحليل.

طريقة العد الكلى للبكتيريا

-اختبار عد الأطباق القياسي (Standard plate count test)



-استخدام غشاء الترشيح

طرق الحساب وكتابة التقرير

- يفضل أن يكون العدد المناسب للمستعمرات يستحسن عمل طبقين لكل عينة وفى حال العد (115و145)مستعمرة تكتب المتوسط 115+145/2=130 وذلك فى حالة استخدام 1ملل من العينة .
- فى الطبق من 30-300 ويسجل كل المستعمرات التى يتم عدها لكل 1ملل من العينة COLONY FORMING UNIT/1ML
- يذكرفى التقريرالطريقة المستخدمة ودرجة حرارة التحضين
- فى حالة تخفيف العينات تعد المستعمرات ثم تقسم على الحجم الاصلى للعينة (معامل التخفيف)
- فى حالة وجود مستعمرات بكتيرية شكلها مفرودة فى الطبق تعد كل واحدة على أنها مستعمرة واحدة
- فى حالة عدم وجود مستعمرات يكتب التقرير على أن العد أقل من واحد
- لو ظهرت المستعمرات فى نموات كثيفة فى الطبق ومتداخلة مع بعضها تكتب النتيجة تفلطح
- لو ظهرت نموات كثيفة جدا ولايمكن عدها نتيجة ـالتخفيف الخطأ ـزيادة حجم العينة ـالتلوث (الوسط /الادوات) ---تكتب النتيجة حادث معملى

خواص الكشاف indicator properties

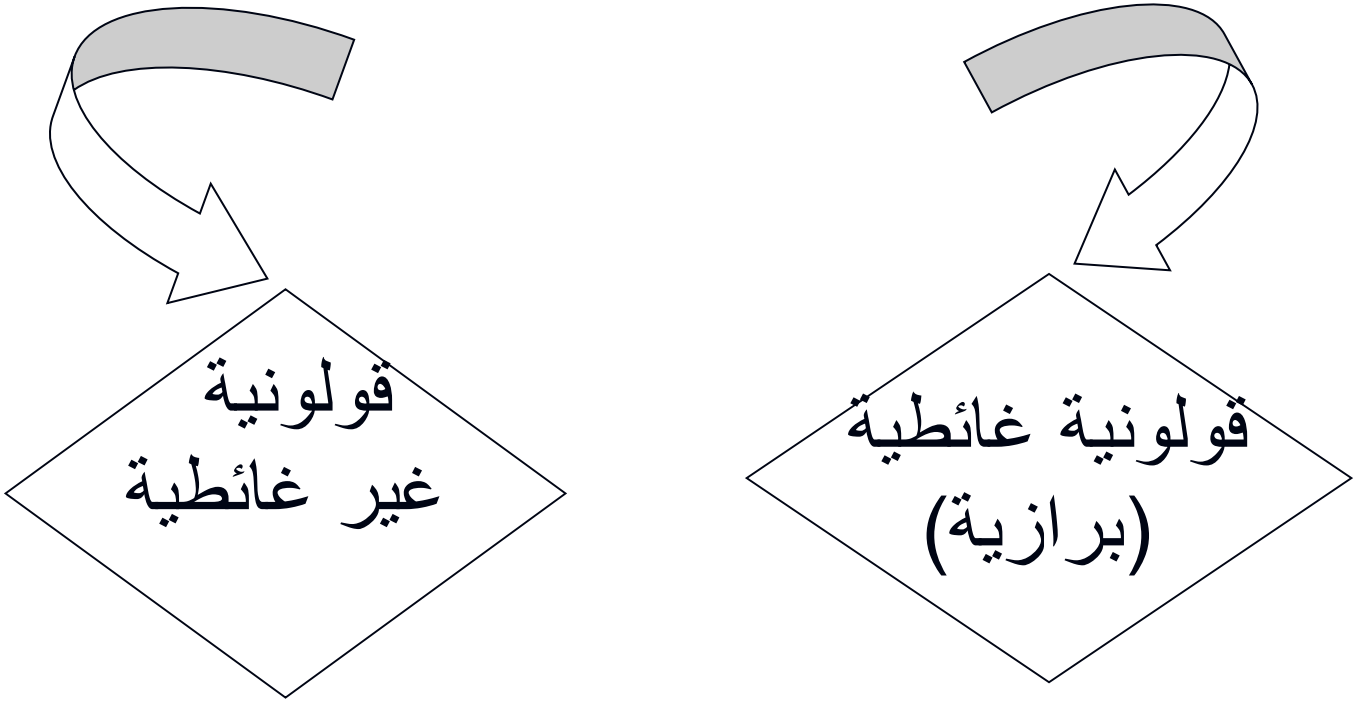
- سهولة الاختبار و يعطى نتائج متساوية فى كل انواع المياه.
- لا يسبب امراض للانسان او ضرر له واختباراته مؤكدة .
- يعطى نتائج سلبية فى المياه السليمة safe water.
- يزداد فى الكثافة كلما زادت درجة التلوث .
- يتحمل الظروف البيئية اكثر من الميكروبات الممرضة المصاحبه له وعادة يكون موجود عند وجود ممرضات ويتواجد بأعداد كبيرة .
- ان تكون مدة التجربة للكشاف اكبر قليلا من الممرضة حتى تعطى نتائج سليمة ولا يزيد المدة عن اللازم حتى لا تعطى نتائج بعد مدة طويلة .

دلالات التلوث

ان الكشف عن دلالات التلوث توفر وسيلة لمراقبة جودة المياة و تشمل الكائنات الحية المستخدمة كدلالات التلوث كالآتي :

- **المجموعة القولونية الكلية Total Coliform Group**
- **القولونية النموذجية (البرازية) Feacal Coliform**
- **السبحية البرازية Strept. Feacales**
- **البكتيريا العنقودية Staphlococcus sp.**

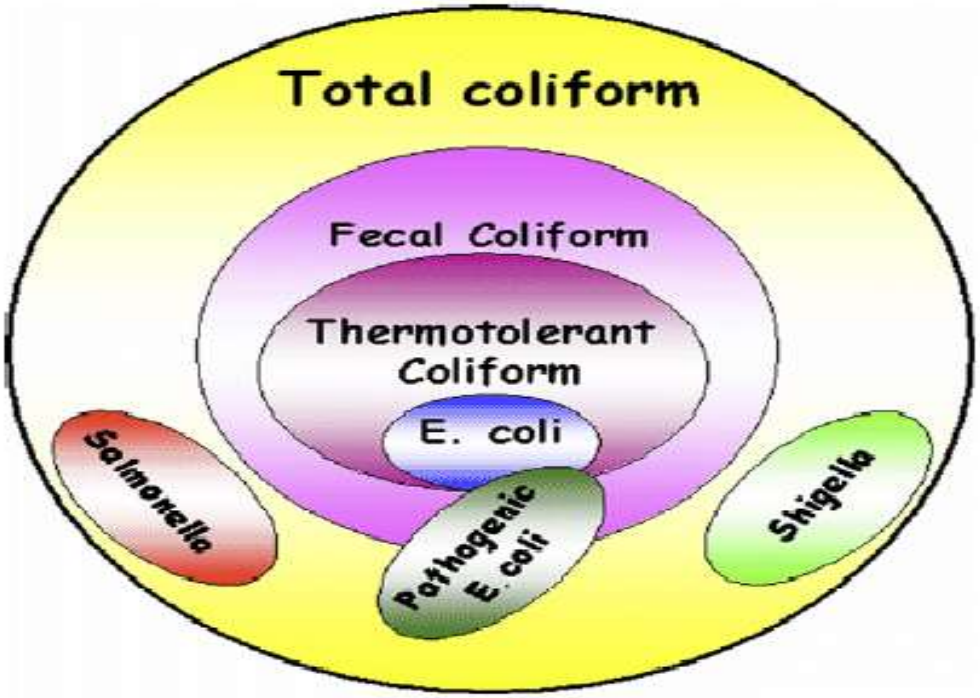
البكتريا القولونية



توجد البكتريا القولونية الغائطية في الأمعاء الآدمية .
يعتبر وجود هذه البكتريا في الماء دليلاً على التلوث وعدم صلاحية الماء للشرب
وجود هذه البكتريا في مياه الصرف المعالجة يعني عدم صلاحيتها لإعادة الاستخدام .
المعايير القياسية لمياه الشرب تتطلب ألاّ يزيد العدد الكلي للبكتريا عن 50 خلية / سم3 عند درجة حرارة 37°م وأن تكون خالية تماماً من البكتريا القولونية والسبحية.

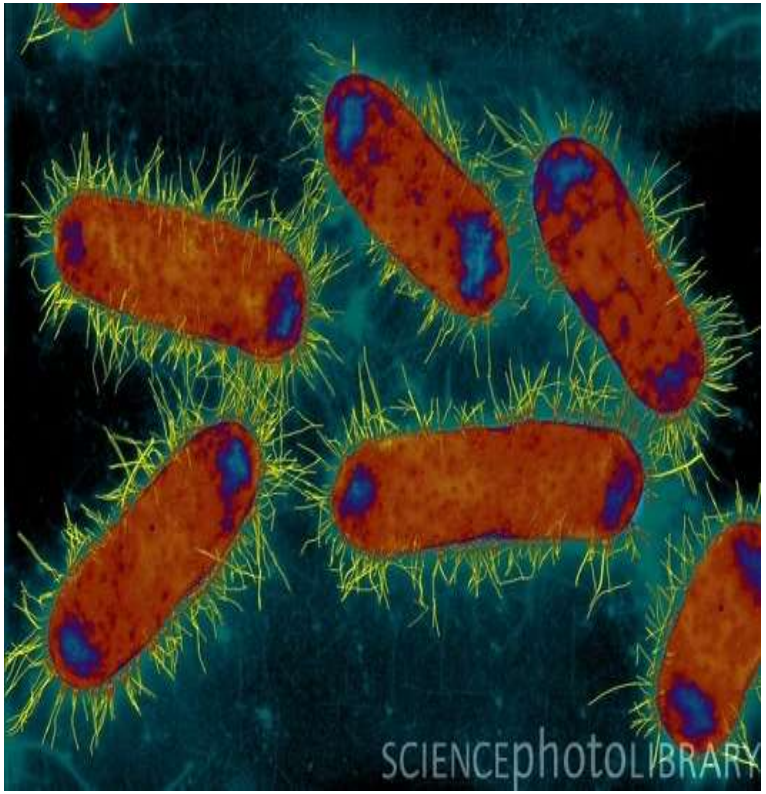
الخواص العامة للمجموعة القولونية

- بكتيريا هوائية او لا هوائية .
- تخمر سكر اللاكتوز و تعطي غاز خلال 48 ساعة عند35م .
- غير متجرثمة .
- عصوية الشكل .
- سالبة لصبغة جرام .

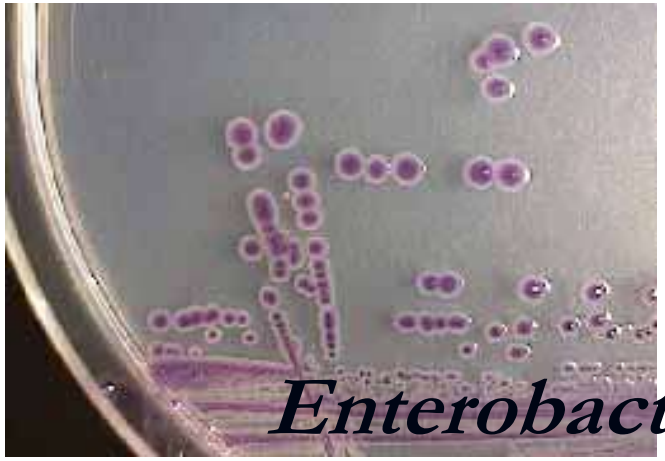


Coliform group "Coli-aerogenas group"

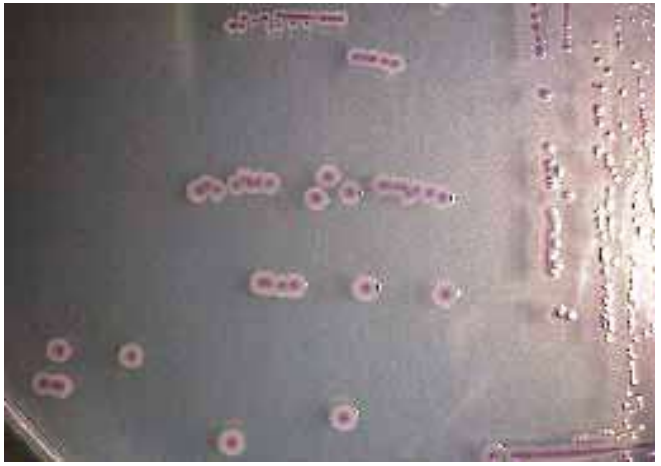
Family : Enterobacteriaceae



Escherichia coli

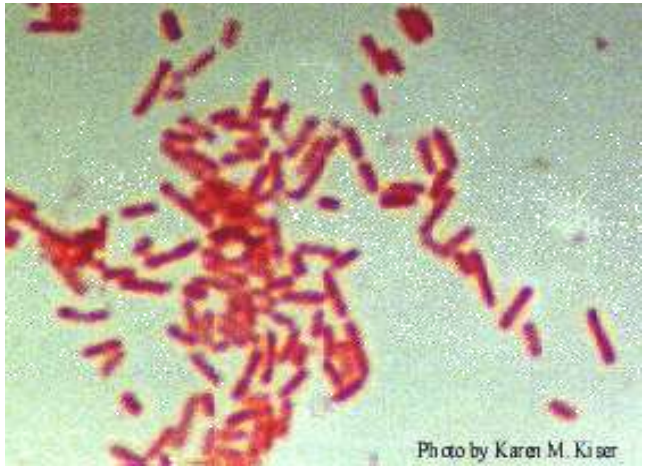


Enterobacter cloacae



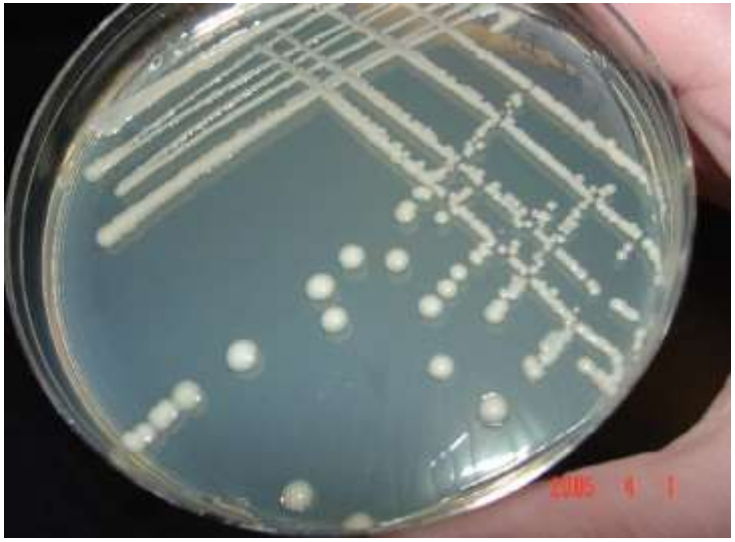
Citrobacter freundii

Enterobacter aerogenes

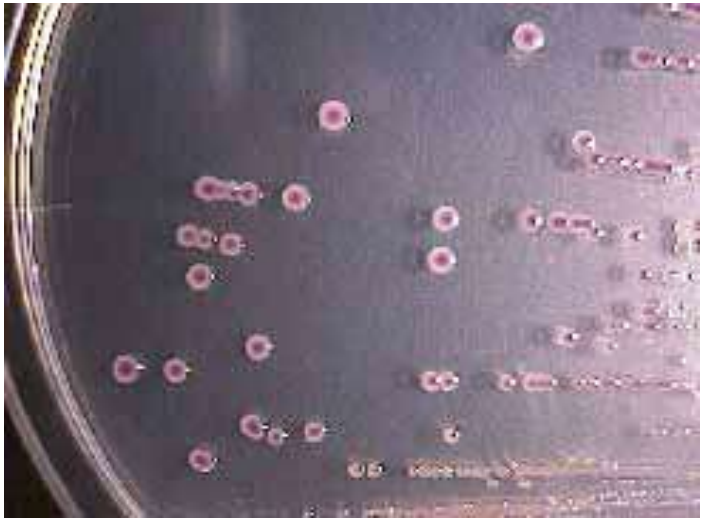


Citrobacter diversus

Serratia marcescens



klebsiella pneumoniae



klebsiella oxytoca

كثافة المجموعة القولونية المتوقعة

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

التحليل البكتريولوجى باستخدام طريقة الأنابيب المتعددة

أسس تخفيف العينات

التلقيح

تعتمد معولية Reliability النتيجة التى يتم الحصول عليها على عدد الأنابيب الملقحة بكل مقدار اختبارى

المياه غير الملوثة

يحتاج الأمر إلى تلقيح خمسة أحجام من ماء العينة، كل منها ١٠ ميليلتر، فى خمسة أنابيب يحتوى كل منها على ١٠ ميليلتر من مستنبت مزدوج القوة Double-strength

المياه الملوثة

تحتاج للفحص باستخدام أحجام تلقيح مختلفة فى تخفيفات عشرية

التلقيحات المعتادة

١- ١٠ ميليلتر من العينة فى كل خمسة أنابيب يحتوى كل منها على ١٠ ميليلتر من مستنبت مزدوج القوة

٢- ١,٠ ميليلتر من العينة فى كل خمسة أنابيب يحتوى كل منها على ١٠ ميليلتر من مستنبت مفرد القوة

٣- ١,٠ ميليلتر من تخفيف ١ : ١٠ من العينة (أى، ٠,١ ميليلتر من العينة) فى كل خمسة أنابيب يحتوى كل منها على ١٠ ميليلتر من مستنبت مفرد القوة

البيونات وماء التخفيف

أنواع المستنبتات (البيونات)

- مرق لوريل تريبتوز (LTB)
- مرق ماك كونكى MacConkey
- مرق لاكتوز Lactose

تحضير الأوساط

أ- تذاب الكمية المعينة من الوسط المجفف فى ماء مقطر للحصول على وسط ظنى مزدوج أو مفرد القوة

ب- يوزع الحجم المطلوب فى أنابيب زرع تحتوى على أنبوب (Durham) مقلوب، وتغطى أنابيب الزرع

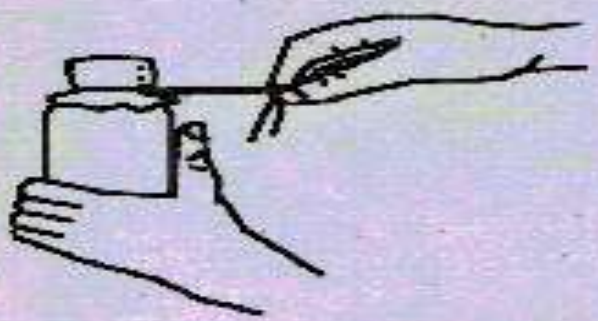
جـ- تعقم الأنابيب فى جهاز التعقيم أو آنية طهى بالضغط (Pressure Cooker) فى درجة حرارة ١١٤م لمدة ١٠ دقائق

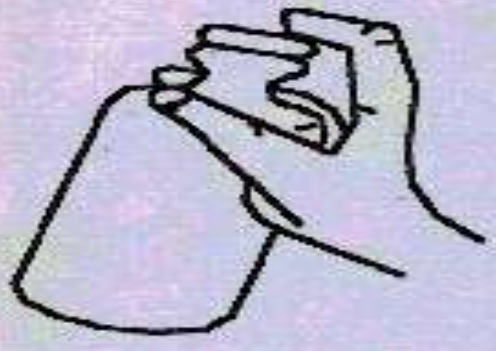
د- يجب أن يخزن الوسط المعقم فى درجة حرارة الغرفة (٢٥م تقريبا)

التطبيق على المياه غير الملوثة

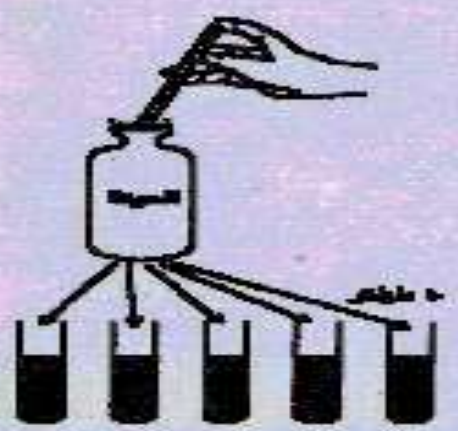
الطريقة

أ- يلزع الورق الملفوف على زجاجة العينة



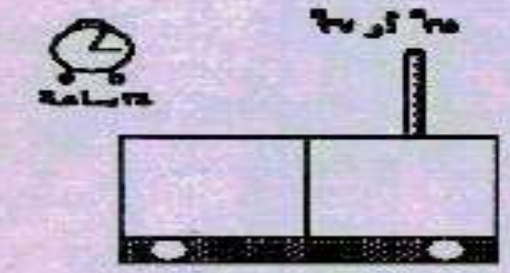


ب- ترج الزجاجة بقوة بينما السدادة فى موضعها وذلك حتى تتوزع الجراثيم توزيعا متساويا



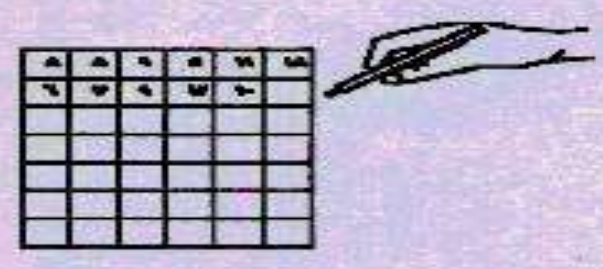
جـ- باستعمال ممص معقم سعته ١٠ ميليلتر، يوضع ١٠ ميليلتر من العينة فى كل أنبوبة من خمس أنابيب تحتوى على ١٠ ميليلتر من مرق الفحص الذاتى (مزدوج القوة)

تابع" التطبيق على المياه غير المئولة

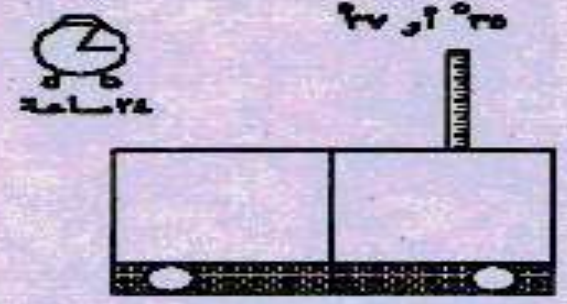


د- تحضن الأنابيب في الحاضنة في درجة حرارة ٣٥م أو ٣٧م لمدة ٢٤ ساعة

هـ- عند انتهاء ٢٤ ساعة من الحضانة، افحص كل أنبوب بحثا عن الغاز. فإذا كان هناك غاز فسوف يمكن رؤيته في أنبوبة Durhan، أما إذا لم يوجد غاز فتزج الأنبوبة بهدوء، فإذا شوهد فوران من الفقاعات الصغيرة، تعتبر الأنبوبة إيجابية

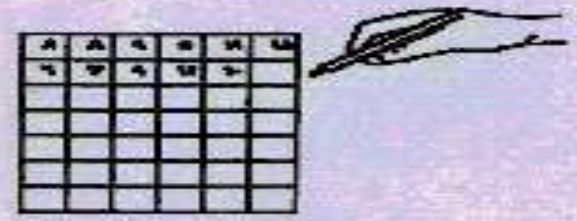


و- تسجل عدد الأنابيب الإيجابية بعد ٢٤ ساعة في جدول

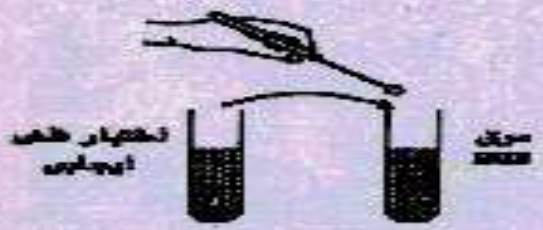


ز- يعاد تحضين الأنابيب السلبية لمدة ٢٤ ساعة أخرى

"تابع" التطبيق على المياه غير الملوثة

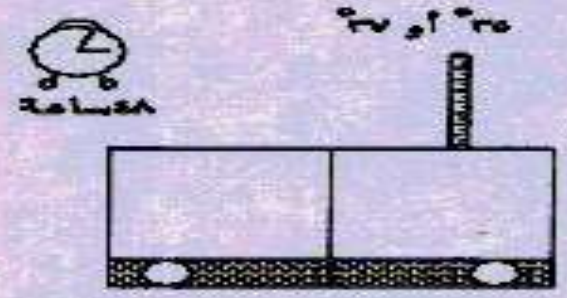


ح- تسجل عدد الأنابيب الإيجابية بعد ٤٨ ساعة على الجدول



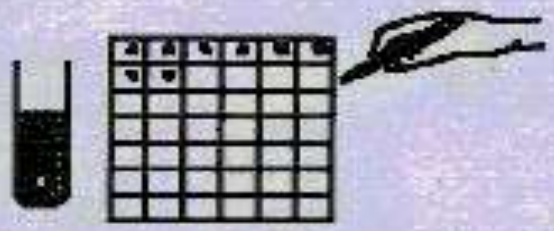
ط- يجرى الفحص التأكيدى فى نهاية كل من الحضانة لمدة ٢٤ ساعة ولمدة ٤٨ ساعة على السواء. وباستعمال عروة تنقل نقطة أو نقطتين من كل أنبوبة ذات نتيجة إيجابية ظنية إلى أنبوبة مقابلة معقمة تأكيدية حجمها ١٠ ميليلتر وتعقم العروة على اللهب

ى- إذا أريد أيضا تحرى وجود القولونيات الغائطية تزرع مزارع ثانوية الى أنبوبتين تحتويان على مرق تأكيدى وتحضران من كل من الأنابيب الإيجابية الظنية

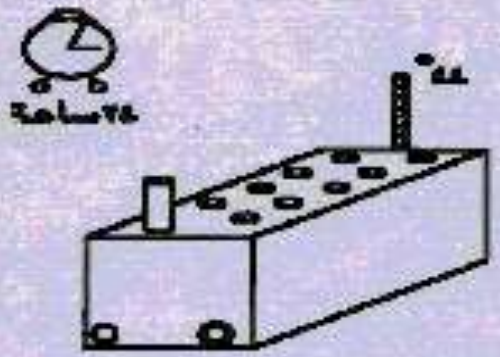


ك- لتأكيد وجود القولونيات تحضن فى الحاضنة أنبوبة مزرعة ثانوية من كل أنبوبة إيجابية ظنية لمدة ٤٨ ساعة فى درجة حرارة ٣٥م أو ٣٧م

"تابع" التطبيق على المياه غير الملوثة



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

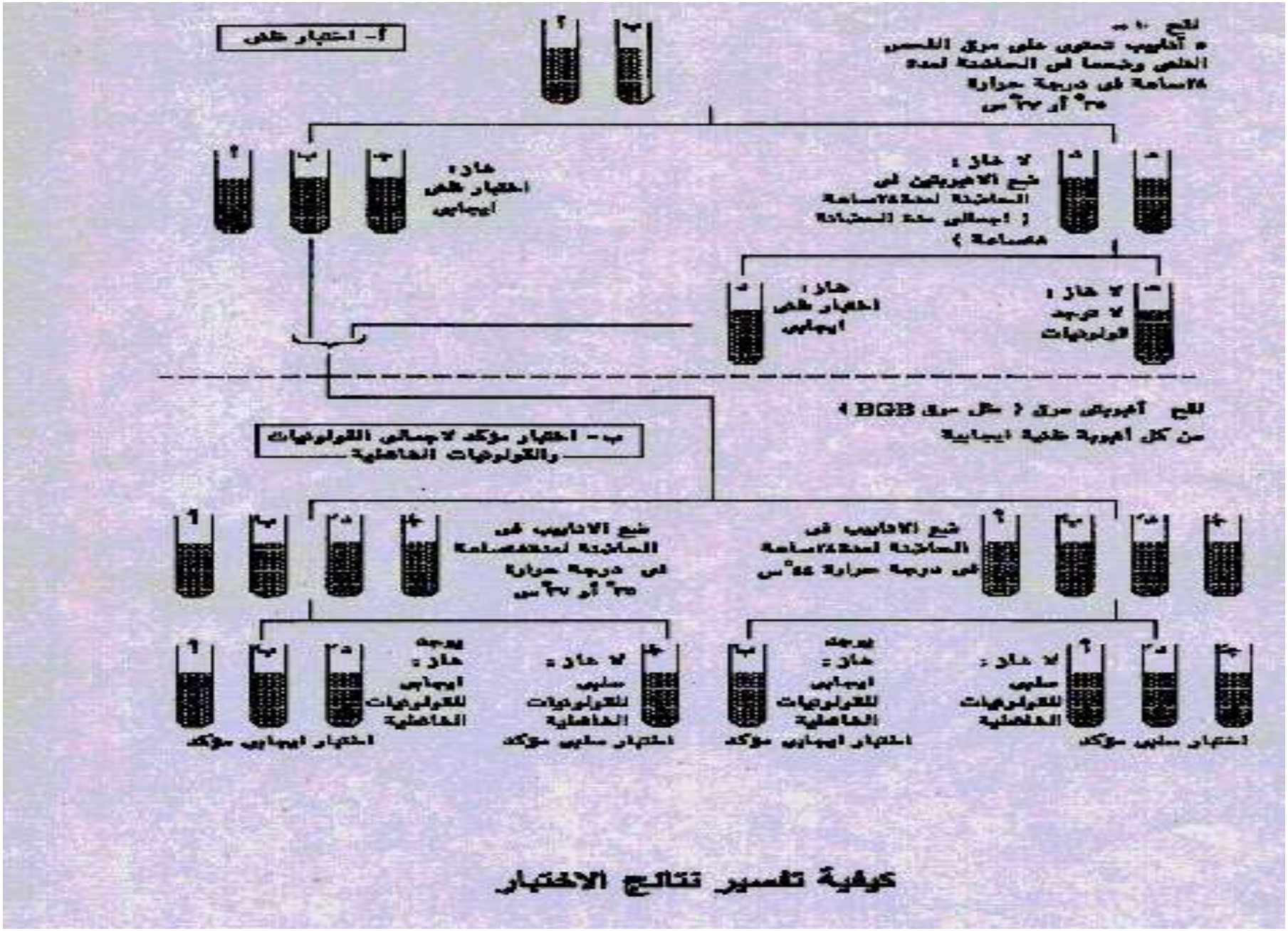


م- لتأكيد وجود القولونيات الغائطية تحضن فى الحاضنة أنبوبة مزرعة ثانوية أخرى من كل أنبوبة إيجابية ظنية لمدة ٢٤ ساعة فى درجة حرارة ٤٤ – ٤٥م

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

الأعداد الأكثر احتمالا MPN لتوافيق مختلفة من نتائج إيجابية وسلبية عند استعمال ٥ أجزاء من العينة كل منها ١٠ ميليلتر

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



كيفية تفسير نتائج الاختبار

طريقة استخدام الجدول في حساب العد الاحتمالي

Factor "x"	MPN	Results	Code	0.001 ml sample	0.01 ml sample	0. 1 ml sample	1 ml sample	10 ml sample
*10 *10 *1	9180 1720 141	General rule	5-5-3 5-4-1 5-3-2	0 0 0	3 1 0	5 4 2	5 5 3	5 5 5
*1	27	2nd rule	4-3-0	0	0	0	3	4
*1 *10	280 1780	3rd rule	5-4-3 5-3-3	0 1	1 2	2 3	4 5	5 5
*100	>1600 34800	4th rule	5-5-5 5-5-1	1	5	5	5	5
	<2	5th rule	0-0-0	0	0	0	0	0
	2	6th rule	0-1-0	0	0	1	0	0

التحليل البكتريولوجى باستخدام الأنابيب المتعددة

فحص البكتريـــا السبحية المعوية

تركيب بيئة الأزيد دكستروز بروث (Azide dextrose broth)

٩ جم	خلاصة لحم	٣٠ جم	تربتون
١٥ جم	جلوكوز	١٥ جم	ملح طعام
٠,٤ جم	صوديوم أزيد	١٠٠٠ مل	ماء مقطر
٢ مل	بروموكريزول بربل (يعد إزالة ١,٥ جم فى ١٠٠ مل كحول)		

الاختبار التأكيدى الأول

باستخدام بيئة كاتاميسين لسكولين أزيد . وتركيبه كالآتى

٢٠ جم	تربتون	٥ جم	خلاصة خميرة
١ جم	كلوريد الصوديوم	١ جم	صوديوم سترات
١ جم	أسكولين	٥ جم	سترات أمونيوم أحادية
٠,١٥جم	صوديوم أزيد	١٠ جم	ماء مقطر

العـــدد الاحتمـــــالى

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

فحص بكتريا سودوموناس ايروجنوزا

تستخدم بيئة تركيبها كالآتى

ملحوظة:
فى حالة فحص عينة من الماء ١٠ سم^{٣} فأكثر تحضر البيئة مضاعفة التركيز أى تضاعف الكميات الآتى بيانها

٢ جم	اسبارجين	٠,٥ جم	كبريتات ماغنسيوم
١٠ جم	كبريتات بوتاسيوم		ثنائى فوسفات أحادى
١ جم	هيدروجين البوتاسيوم	١٠٠٠جم	ماء مقطر

الاختبار التأكيدى

باستخدام بيئة الاسيتاميد أجار (Acetamide agar) وتركيبها

١٠ جم	اسيتاميد	٥ جم	ملح طعام
١٥ جم	أجار	٠,٥ جم	كبريتات ماغنيسيوم
٠,٠١٢ جم	دليل أحمر فينول	١٠٠٠ مل	ماء مقطر
١,٤ جم	أحادى هيدروجين ثنائى بوتاسيوم		
٠,٠٧ جم	ثنائى هيدروجين أحادى بوتاسيوم		

فحص بكتريا المكورات العنقودية

تستخدم طريقة العـد الاحتمالى (MPN) على بيئة ستـافيلـوكـوكس مانيتول بروث (M. Staphlococcus broth)

ملحوظة:
فى حالة فحص عينة من الماء ١٠ سم^{٣} فأكثر تحضر البيئة مضاعفة التركيز أى تضاعف الكميات الآتى بيانها

١٠ جم	تريتون	٢,٥ جم	خلاصة خميرة
٢ جم	لاكتوز	١٠ جم	مانيتول
٧٥ جم	ملح طعام	٠,٠٤٩جم	صوديوم أزيد

٥ جم ثنائى بوتاسيوم أحادى هيدروجين فوسفات

١٠٠٠ جم ماء مقطر

التحليل البكتريولوجى باستخدام طريقة الترشيح الغشائى

الحجوم المقترحة للمرشح الغشائى للكوليفورم الكلى

مصدر المياه	الحجم × المرشح سم٣							
	١٠٠	٥٠	١٠	١	٠,١	٠,٠١	٠,٠٠١	٠,٠٠٠٠١
مياه شرب	×							
حمامات سباحة	×							
آبار، عيون	×	×	×					
بحيرات، وخزانات	×	×	×					
منافذ مياه			×	×	×			
خارج المسبحة			×	×	×			
مياه أنهار				×	×	×	×	
ماء صرف مكلور				×	×	×		
ماء صرف خام					×	×	×	×

مستلزمات طريقة الترشيح الغشائي (MF)

١. شفاط مائي Water aspirator، أو مفرغ هواء Vacum pump كهربائي

٢. قارورة ايرلنماير (ذات مقبض جانبي) سعة لتر واحد وأنبوبة مطاطية متصلة بها ذات سمك حاف لمنع انطواء الأنبوبة عند إحداث الفراغ

٣. دعامة للمرشح مكونة من قاعدة أو دعامة مسامية Porous

٤. أطباق بترى Petri زجاجية أو بلاستيكية بمقياس ٦٠×١٥ مليمتر

٥. مرشحات غشائية، قطرها ٤٧–٥٠ مليمتر، وقطر مسامها ٠,٤٥ مكرومتر.

٦. رفائد ماصة مغذية Nutrient pads

٧. ملقط.

٨. عدسة مكبرة، قدرتها على التكبير ٤ أو ٥ أضعاف

ملاحظات على غشاء الترشيح

- عند وضع الغشاء على الطبق المحتوى على الوسط الخاص بنوع البكتريا لابد من اخراج الفقاعات الهوائية بين الغشاء والوسط .

- لابد أن تكون المادة التى يرسم بها مربعات غشاء الترشيح من النوع الذى لايؤثر على البكتريا ولايعوق نموها , ويظهر ذلك عند ملاحظة أن كل المستعمرات البكتيرية تتكون في داخل المربعات فقط .

- يجب ان يصنع غشاء الترشيح من مواد لاتؤثر عتى نمو البكتريا مثل مادة خلات السليلوز وأن يكون حجم المسام أقل من حجم البكتريا.
- عند ظهور المستعمرات البكتيرية تحت سطح غشاء الترشيح يتم رفض هذا النوع من الاغشية .

- يجب أن يكون استخدام الملقاط من النوع المفلطح الاطراف اى ليست به أى شرشرة ويكون عريض .

- فى حالة استخدام بطانة المص يجب ألا يكون غشاء الترشيح عائما على سطح الطبق الزجاجى .

- يجب ان يكون الغشاء خالى من المساحات الغير مسامية لأن تلك المساحات تمنع انتشار المغذيات فى الغشاء فتعوق النمو وتكون مستعمرات غير واضحة .

- عند عد البكتيريا القولونية يجب أن تكون زاوية الاضاءة بدرجة 60-80 فوق المستعمرات .

اختبارات مراقبة الجودة

1 - تحضر عينة ضامنة معقمة،تختبر كل عشر عينات فى المرشح الغشائى .

2- المياه المقطرة المعملية تستخدم فى تحضير المحاليل،وماء التخفيف وتحلل شهريا بمراقبة التوصيل الكهربى،الرقم الهيدروجينى، الكلور المتبقى،وفى حالة وجود أى نتائج تزيد عن القياسى يلزم البحث عن ماء آخر،كما يلزم مراجعة آثار المعادن مثل الرصاص ، الكادميوم ،الكروم،النحاس،النيكل، الزنك .

3- تحليل عينة غير معروفة لإثبات الكفاءة(performance Sample)سنويا لمراقبة تلوث المياه ذات التجفيف الحر أو ماء الشطف free dilution or Rinse Water

4- راجع زجاجة عينة لكل كمية معقمة 25سم3من المرق المغذى الى الزجاجة لملاحظة التعقيم أو النمو عند وضعها فى حضانة عند 35م لمدة 24ساعة. فى حالة الايجابية ، فان كمية الزجاجات يلزم اعادة غسلها وتعقيمها ثانيا .

تحضير كميات صغيرة من الأوساط المتطلقة بمرق M-Endo MF ومرق MFC

أولاً: مرق M-Endo MF

١. تذاب ٢,٤ جرام من مستنبت مجفف فى ٥٠ مل من الماء المقطر ويضاف ١ مل من الكحول الإثيلى ٩٥٪
٢. تعقم بالتسخين برفق إلى مجرد نقطة الغليان

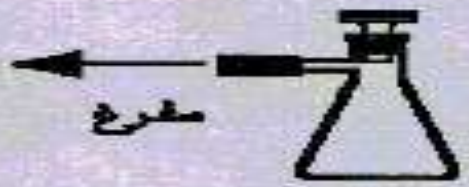
ثانياً: مرق MFC

١. تذاب ١,٩ جرام من الوسط المجفف فى ٥٠ مل من ماء مقطر يحتوى على ١,٠٪ من حمض الروزولديك فى ٠,٢ مول/لتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم.
٢. يسخن للوسط إلى نقطة الغليان
٣. يبعد عن الحرارة بسرعة ويبرد إلى ما دون ٤٥°م.

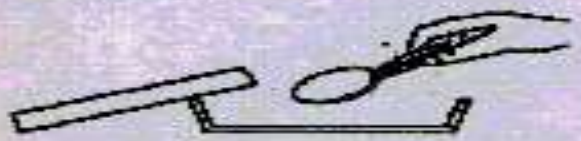
دلائل جودة مياه الشرب

تعيين إجمالى الفوسفوليبيدات

(أ) أوصل قارورة ايرلنماير جانبية المقبض Side-arm إلى مصدر الفراغ (المقفول) وضع الدعامة المسامية Porous فى مكانها. وفى حالة استخدام مضخة كهربائية، يستحسن وضع قارورة ثانية بين قارورة ايرلنماير ومصدر الفراغ



(ب) الفح طبق بترى وضع فيه رقيقة



(ج) أضف ٢ مل من وسط انتقائى مرقى

(د) ركب وحدة الترشيح بوضع مرشح غشائى معقم فوق الدعامة المسامية، مستخدما ملقطا معقما بالنار

Gram stain

1. A small sample of a bacterial culture is removed from a culture.

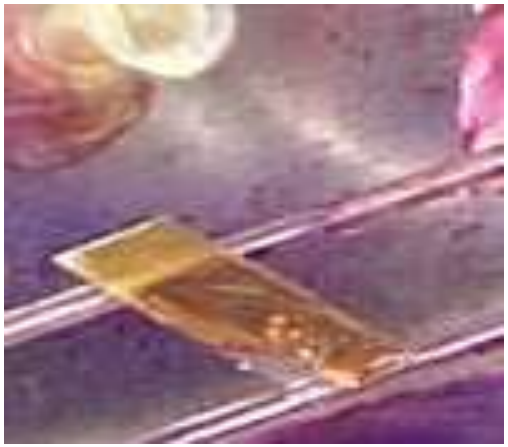
2. The bacterial suspension is smeared onto a clean glass slide.

3. The bacterial smear is then dried slowly at first and then, when dry, heated

4. Once cool, the slide is transferred to a support over a sink and flooded with a stain called Gentian Violet

5. The Gentian Violet is gently washed off the slide with running water

6. The bacterial smear is then treated with Gram's solution which consists of 1 part iodine, 2 parts potassium iodide, and 300 parts water.



7. After about 30 seconds the slide is gently rinsed with ethyl alcohol

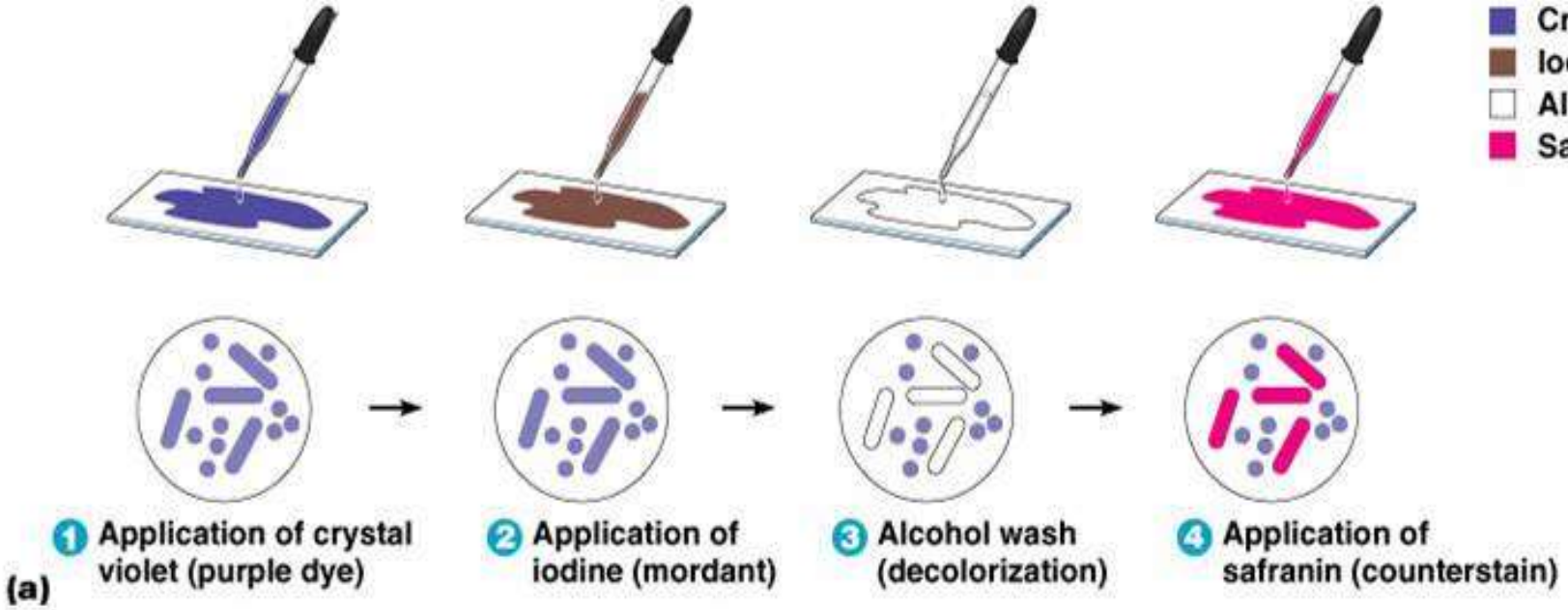
8. eosin or fuchsin, both of which are red. These are called counterstains.

9. The counter stain is left on the smear for about 30-60 seconds and then gently rinsed away with running water.

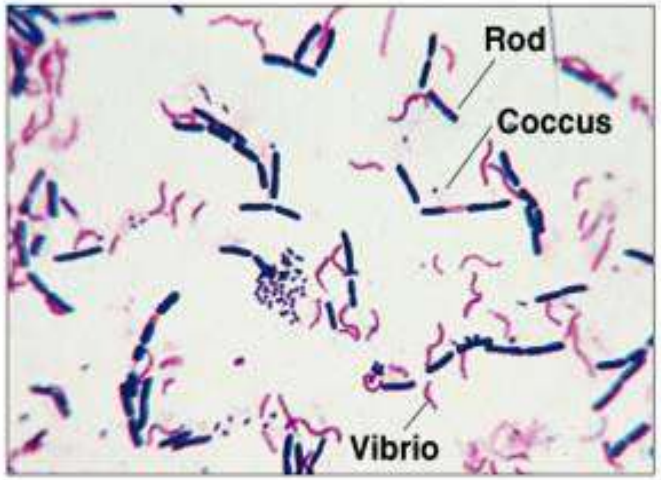
10. After the counterstain has been rinsed off, the slide is placed between some absorbent paper and the excess water gently blotted off.

11. The slide is gently warmed to drive off any residual moisture and then a drop of immersion oil is placed on the stained bacterial smear.

12. The slide is then placed on a microscope stage and the oil-immersion lens lowered into the immersion oil.

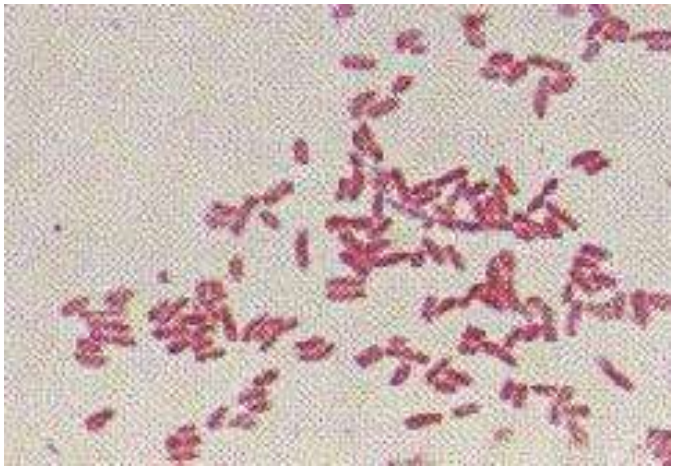


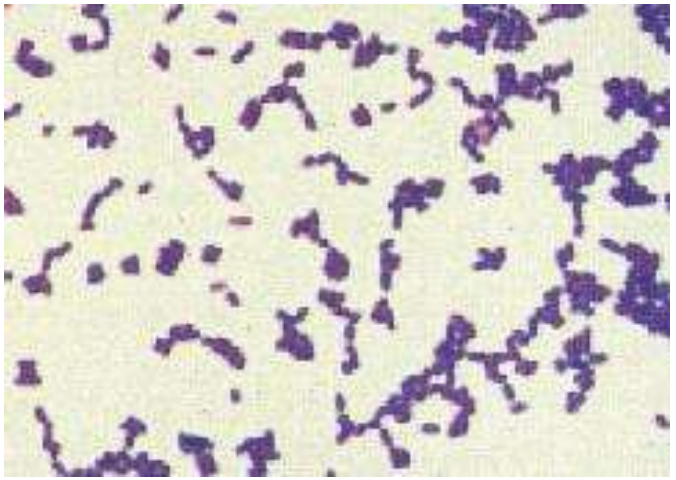
(a)

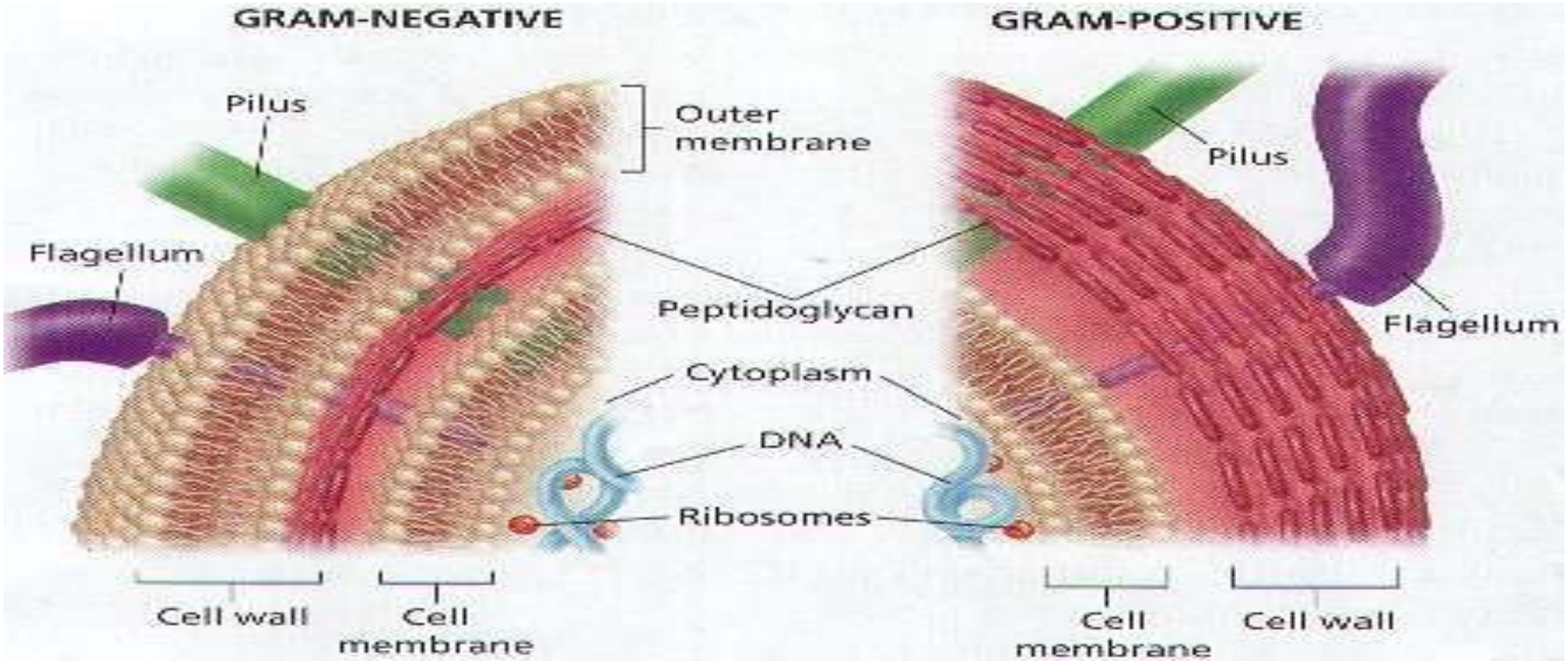


(b)

Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.






GRAM-NEGATIVE
GRAM-POSITIVE
Pilus
Outer membrane
Flagellum
Peptidoglycan
Cytoplasm
DNA
Ribosomes
Pilus
Flagellum
Cell wall
Cell membrane
Cell membrane
Cell wall

تستخدم هذه الطريقة بكثرة في معظم المعامل لأنـها :

1. تظهر الشكل الخارجي للبكتيريا .
2. تظهر نوع البكتيريا الموجودة .

نظريات تفسير الصبغة :

البكتيريا الايجابية الجرام
اكثر حامضية من السالبة .

سطح البكتيريا سالبة الجرام
اكثر نفاذية من الايجابية .

يعتمد الصبغ الايجابي
علي وجود مركب الريبونيوكليات
الماغنيسيوم و ألياف خاصة .