الشركة القابضة لمياه الشرب والصرف الصحي

برنامج إدارة مياه الشرب و الصرف الصحي

Water and Wastewater Management Program

gtz

Since the 1st of January 2011

giz Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit (GIZ) GmbH

ميكروبيولوجيا المياه

البرنامج الثالث

أسس الطرق الميكروبيولوجية وتقدير البنود الأساسية

Water Microbiology

Module 3

Principals of Microbiological procedures & Determination of Basic parameters

ميكروبيولوجيا المياه
Microbiology Water

البرنامج الثالث
Module 3

أسس الطرق الميكروبيولوجية وتقدير البنود الأساسية

Principals of Microbiological Procedures & Determination of Basic Parameters

Prof. Helmy Tawfik El-Zanfaly
National Research Center

June 2008

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

المحتويات

الموضوع **صفحة**

- **مقدمه.....1**
- **الفصل الاول:البكتريا الهتيروتروفية (العدد الكلى للبكتويا).....3**
- **الفصل الثانى : طرق تقدير العدد الكلى للبكتريا الهتيروتروفية فى المياه..25**
- **الفصل الثالث :استخدام كشافات التلوث الميكروبية لتقييم سلامة المياه...55**
- **الفصل الرابع :طريقة بكتريا القولون البرازيه.....77**
- **الفصل الخامس : مجموعتى البكتريا السبحيه البرازيه والكريات**

المعويه ككشاف للتلوث..... 105

- **الفصل السادس : المواصفات القياسية لمياه الشرب..... 113**

مقدمة

اختبارات مياه الشرب لصلاحيتها للاستهلاك الآدمى هو الوسيلة للتحقق من الصلاحية حتى لا يكون هناك مخاطر على صحة المستهلك. ومن الناحية البيولوجية يتم الاهتمام بمحتوى المياه من مسببات الأمراض. وبكتريولوجيا من الصعب أن يتم التحليل لجميع مسببات الأمراض لذلك يتم الكشف على ما يسمى بأدلة التلوث البرازى.

وعلى الرغم من أن محتوى المياه العام من البكتريا على صورة العدد الكلى للبكتريا قد يبدو أنه ليس له مدلول صحى الا أنه يعطى فكرة عن كفاءة عملية المعالجة، وحالة نظم توزيع المياه.
ولتأثيرالعدد الكلى للبكتريا على النجاح فى الكشف عن بكتريا القولون والتى هى أحد أدلة التلوث ولثبوت أهميته بالنسبة لفئات من المجتمع مثل الأطفال ، كبار السن ومنخفضى المناعة لذلك أهتم بتقديره.

وكشافات التلوث البرازية مثل بكتريا القولون والبكتريا السبحية البرازية يعتمد النجاح فى الكشف عنها على اتباع الطرق الصحيحة فى الكشف عنها.

ولا يتأتى التقييم الصحيح لصلاحية المياه للاستهلاك الآدمى الا باتباع الطرق القياسية فى الكشف عنها وتقدير عددها. ونظرا لأهمية ذلك فان الدورة الحالية تهتم بالتركيز على توضيح الطرق القياسية والاحتياطات اللازم مراعاتها للحصول على النتيجة الصحيحة. وسيتم استعراض الطرق المختلفة الممكن اتباعها وسنصل فى النهاية الى أنسب الطرق الممكن اتباعها طبقا لنوعية المياه المختبرة لتوحيد طرق اختبار مياه الشرب على مستوى المعامل المركزية والتى لها دور اساسى فى عمليات تقييم اداء محطات المعالجة.

الفصل الأول

البكتريا الهتيروتروفية (العدد الكلى للبكتريا)

الفصل الأول

البكتريا الهتيروتروفية (العدد الكلى للبكتريا)

Total Bacterial Count – Heterotrophic Plate Count (HPC)

1 . مقدمة:

استعمل عدد البكتريا الهتيروتروفية فى المياه قديما ومنذ بداية الاهتمام بالنواحى الصحية فى مياه الشرب كدليل على نوعية المياه . وبعد ذلك استخدم العدد الكلى للبكتريا الى جانب عدد بكتريا القولون لمراقبة نوعية مياه الشرب. وفى الولايات المتحدة الامريكية تم وضع الطريقة القياسية لتحديد العدد الكلى للبكتريا باستخدام طريقة العد فى الأطباق Plate counts procedure منذ عام 1898 (Prescott et al., 1950). واستمر العمل فى تطوير الطرق القياسية للكشف عن عدد البكتريا لتظهر فى أول طبعة لما يعرف الآن بالطرق القياسية لاختبار المياه والمخلفات السائلة Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1905).

طرق العد فى الأطباق Poured plate فى بدايتها استخدمت الجيلاتين المغذى والتحضين عند 20 درجة مئوية للحفاظ على صلابة الجيلاتين. و بعد ادخال استعمال الآجار بديلا كمادة مصلبة لبيئة تنمية البكتريا أمكن استخدام حرارة تحضين أعلى من 28 مئوية.

الطبعة الثانية من الطرق القياسية لاختبار المياه والمخلفات السائلة والتى ظهرت عام 1912 أدخلت التحضين عند 37 مئوية لمدة 24 ساعة لأطباق العد باستخدام بيئة الآجار المغذى Nutrient agar ، ولكن أدخل التحضين لأطباق العد البكتيرى عند 20 مئوية لمدة 48 ساعة وباستخدام بيئة آجار الجيلاتين.

ادخال العد البكتيرى عند 20 مئوية استمر الى الطبعة الثانية عشر من الطرق القياسية، ولكن اسقط منذ الطبعة الثالثة عشر عام 1971 والى الطبعة الخامسة عشر والتى ظهرت عام 1980. وفى الطبعة السادسة عشر عام 1985 من الطرق القياسية أدخل ثانية كعامل اختيارياً اجراؤه وهو العد البكتيرى عند 20 درجة مئوية. وفى الحقيقة ، الطبعة السادسة عشر من الطرق القياسية أدخلت تغيرات عديدة فى طريقة العد بالأطباق بادخال طريقة

اغشية الترشيح Membrane filter (MF) وطريقة الفرد على الأطباقِ Spread plate (SP)، واستخدام البيئة المنخفضة فى محتواها من المغذيات Low nutrient medium R2A مع استخدام التحضين عند 20، 28 ، 30 درجة مئوية (Reasoner and Geldreich, 1979; 1985) ومدة تحضين مختلفة لتقدير مستوى العد الكلى للبكتريا الهتيروتروفية (HPC) فى المياه.

وبعد ذلك تجدد الاهتمام بطرق العدد الكلى للبكتريا فى مياه الشرب مع الاهتمام بتقييم نوعية مياه الشرب خلال نظام توزيع المياه. هذه الأنشطة أدت الى نشأة بيئات جديدة واضافة طرق الفرد فى الأطباق Spread plate وأغشية الترشيح Membrane filter الى الطبعة السادسة عشر للطرق القياسية لاختبار المياه واامخلفات السائلة والتى ظهرت عام 1985. وفى السنوات الحديثة أجريت كثير من الدراسات البحثية واستعملت طرق وبيئات تختلف عن طريقة الأطباق المصبوبة التقليدية . Poured plate procedure . ونتائج بعض الدراسات تسببت فى اعادة تقييم الطرق وأدت الى تغيير اسم الطريقة من طريقة عد الأطباق القياسية "Standard Plate Count" الى عد الأطباق التيروتروفيه " Heterotrophic Plate Count, HPC " .

عد الأطباق الهتيروترفيه يهتم بعد البكتريا الهوائية والهوائية اختيارا Aerobic and facultative aerobic bacteria المتواجدة فى المياه والقادرة على النمو على مركبات عضوية بسيطة (كربوهيدرات، أحماض أمينية وببتيدات) المتواجدة فى بيئة المزرعة، وتحت ظروف محددة للتحضين من حيث الوقت ودرجة الحرارة. وخالص نتائج الدراسات الحديثة والتغيير فى طرق عد البكتريا الهتيروتروفية العامة فى مياه الشرب هو توافر اختيارات أكثر وتشجعت محطات المياه على استعمال هذه الطرق كأداة للحصول على تفاصيل أفضل عن تأثير عمليات معالجة المياه والتوزيع على النوعية البكتريولوجية لمياه الشرب.

2. استعمالات قياسات عد الأطباق الهتيروتروفية

Uses of Heterotrophic Plate Count Measurements

الهدف من معالجة المياه هو تحقيق الامداد بمياه يتحقق فيها عنصر الأمان بالنسبة للمستهلك باستعمال سلسلة من وحدات المعالجة لخفض مستويات العكارة والملوثات الكيماوية والميكروبية. وعلى ذلك فان جودة نوعية المياه المعالجة يجب أن تبقى خلال التخزين والتوزيع الى المستهلك.

عد الأطباق الهتيروتروفية HPC وسيلة ذات فائدة فى:

- مراقبة كفاءة عمليات معالجة المياه، شاملة التطهير.
- الحصول على تفاصيل اضافية عن مستويات عد الأطباق الهتيروتروفية والتى من الممكن أن تتداخل مع الكشف عن بكتريا القولون فى عينات المياه التى تختبر لمراقبة التطابق مع المواصفات القياسية (U.S. EPA, 1975) .
- تقييم التغيرات فى نوعية المياه النهائية خلال التوزيع والتخزين، ونظافة نظام التوزيع
- تقييم النمو الميكروبى على المواد المستعملة فى انشاء عمليات معالجة مياه الشرب ونظم التوزيع.
- قياس استعادة النمو البكتيرى Regrowth أو مخاطر ما بعد النمو After growth فى مياه الشرب المعالجة.
- مراقبة التغيرات فى المجتمع الميكروبى عقب التعديلات فى المعالجة مثل التغير فى نوعية المطهر المستخدم.

3. اعتبارات منهجية Methodology Considerations

تقنية الأطباق المصبوبة Pour plate technique (PP) وصف بواسطة كوخ عام 1883(Koch, 1912; McNew, 1938) كطريقة للحصول على مزرعة نقية من البكتريا من خلايا مفردة. فى الولايات المتحدة، استعملت طريقة الأطباق المصبوبة مع التحضين عند 35 درجة مئوية لمدة 48 ساعة لعد البكتريا فى مياه الشرب. لم تستعمل طريقة الفرد على الطباق Spread plate بكثرة لأنها كانت طريقة غير قياسية حتى ظهورها فى الطبعة السادسة عشر للطرق القياسية عام 1985 (APHA, 1985) . طريقة أغشية الترشيح MF (Taylor and Geldreich, 1979) نشأت للامداد بمرونة أكبر فى عد البكتريا فى مياه الشرب المعالجة. فانها تسمح بتحليل حجم من العينة أكبر من واحد مل، والذى هو عامل يحد من استعمال طرق الأطباق المصبوبة Poured plates والأطباق المزروع على سطحها Surface. ومع ذلك فهى ليست طريقة قياسية حتى الطبعة السادسة عشر من الطرق القياسية والتى ظهرت عام 1985. وفيما يلى مميزات وعيوب كل طريقة.

3 . 1 . الأطباق المصبوبة Poured Plates

طريقة الأطباق المصبوبة مصدر قوتها هو بساطة وسهولة الاستعمال. ومن ناحية ثانية، فان لها عقبتان يجعلانها طريقة مرغوبة بدرجة أقل لعد البكتريا فى الماء.

أولها أن البكتريا فى البيئات المائية منخفضة المغذيات تعتبر بصفة عامة مضرورة فسيولوجيا Physiologically stressed . وبالتالى ظهر أنها حساسة لضرر ثانوى يتسبب عن الحرارة الناشئة عن صهر الآجار وحفظه عند درجة حرارة ما بين 43 – 46 مئوية (Stapert et al., 1962; Klein and Wu, 1974) . فلقد أظهر Klein and Wu (1974) أن أعداد البكتريا المستعادة Recovered نتيجة التعرض للبيئة المنصهرة والمحتفظ بها على درجة 45 درجة مئوية نتيجة صب البيئة عليها فى طريقة الأطباق المصبوبة تقل عن مثيلتها الناتجة عن استعمال طريقة الأطباق المنثورة. وعلى ذلك استنتج أن طريقة الأطباق المصبوبة PP غير مناسبة لعد البكتريا الهتيروتروفية المضرورة نتيجة تواجدها فى البيئة المائية الفقيرة فى المواد المغذية أو الحساسة للحرارة (45 مئوية). وكنتيجة لهذا، وعلى الأقل جزئيا، فان طريقة الأطباق المصبوبة PP بصفة دائمة تنتج أعداد من البكتريا أقل من تلك الناتجة عن استعمال طريق الأطباق المنثورة (الزرع على السطح) SP .

(Buck & Cleverdon, 1960; Van Soestbergen & Lee, 1969; Means et (al., 1981; Taylor et al., 1983; Reasoner & Geldreich, 1985).

وكذلك فان البكتريا تكون مغمورة فى الآجار (تحت سطحية) فى طريقة PP والمستعمرات تميل الى الصغر ولا تظهر الخصائص المورفولوجية والتى ربما تكون ذات فائدة فى التصنيف.

العقبة الثانية هو أن أقصى حجم للعينة مكن اختباره باستخدام طريقة PP واحد ملل، وهذا يحد من فائدة الطريقة عندما يكون المطلوب تحليل حجم أكبر.

3 . 2 . طريقة الفرد أو نشو الأطباق Spread plate (SP)

طريقة SP ليست أكثر صعوبة من طريقة PP ، ولكن تحتاج الى تحضير الأطباق فى وقت سابق واستعمال ساق زجاجية مثنية معقمة لفرد وتوزيع العينة على سطح الآجار. وبسبب تلك الاحتياجات، فان الطريقة تبدو بالنسبة للبعض أنها مملة أكثر من طريقة PP . وأيضا، لأن الأطباق يلزم تحضيرها مقدما، فانها يلزم فحصها لوجود تلوث قبل وضع العينة وزرعها؛ ويلزم عدم استعمالها عندما تكون كثيرة الرطوبة، أو اذا كانت قد فقدت كمية كبيرة من الرطوبة too dehydrated . ولقد أظهرت أبحاث (Clark , 1971) أن الأطباق السابق تجفيفها والتى تفقد ما بين 3 – 4 جرام / 15 ملل من البيئة فى الطبق تسمح باستخدام حجم للتلقيح يصل الى 1 ملل دون تأثير على استخلاص البكتريا. ومع ذلك، فان الحجم الذى ينصح به للزرع هو 0.5 – 0.1 ملل.

طريقة SP لتقدير البكتريا الهتيروتروفية توفر ظروف أكثر مساعدة على نمو البكتريا المتواجدة فى الماء عن طريقة PP. وبناء على ذلك، كما ظهر أعلاه، فان SP تعطى أعداد أعلى من المستعمرات عن طريقة PP. وطالما أن البكتريا فى العينة تزرع على سطح بيئة الآجار، فان نموها لا يكون مقيد بكون الآجار محيطا بها. وعلى ذلك، فانه من السهل أن يلاحظ الفروق فى شكل المستعمرة، القوام، الصبغات، الحجم، والخصائص الأخرى.

وفى دراسات عديدة قورنت دقة طريقة SP بطريقة PP وكانت النتائج مختلطة، ففى حين أن (Van Soestbergen and Lee, 1969) قد ذكر أن طريقة PP هى أكثر دقة عن طريقة SP ، ذكر (Taylor et al., 1983) العكس. ولكن بالمقارنة فانه يظهر أن طريقة SP

من حيث الدقة لا تقل عن طريقة PP . وتشترك الطريقتان فى محدودية حجم العينة الممكن اختباره (لا تزيد عن 1 ملل فى كلتا الحالتان).

3 . 3 . أغشية الترشيح Membrane Filter

ورود طريقة أغشية الترشيح كطريقة لتقدير عد ال ەتيروترفيك بكتريا HPC قدمت مرونة كبيرة الى طريقة أطباق العد Plate count procedure لمياه الشرب وذلك من خلال السماح بتحليل حجم من العينة أكبر من 1 ملل. هذه الطريقة تسمح بعد تركيزات منخفضة من البكتريا فى مياه الشرب النهائية Finished drinking water ومحدوديتها تعتمد على كمية المياه الممكن مرورها من خلال الغشاء دو ن انسداد ثقوبه، أو ترسيب كثير من المواد على سطح الغشاء والتى تتداخل مع امكانية نمو البكتريا ووصول الغذاء اليها من خلال الثقوب Bores .

مقارنة العد البكتيرى المتحصل عليه باستخدام أغشية الترشيح بتلك المتحصل عليها بطريقة PP أظهرت أن طريقة الأغشية تعطى نتائج مساوية أو أكثر من طريقة PP (جدول 1) . وهذا الجدول يعطى ملخص لنتائج استعمال طرق MF, PP, SP خلال دراسات مختلفة وباستعمال نفس البيئة . والنسب ما بين نتائج SP and MF الى نتائج PP، أو نتائج MF to SP تظهر الكفاءة النسبية للطرق.

Table 1 Comparison of HPC results by pour plate, spread plate, and membrane filter methods on the same medium within each referenced study

Temperature (°C)	Method (CFU/ml)			Ratio			Reference
	PP	SP	MF	PP/MF	PP/SP	MF/SP	
16	3,100	6,300	–	–	0.49	–	Buck and Cleverdon, 1960
RT	42	–	113	0.37	–	–	Stapert et al., 1962
37	108	115	–	–	0.94	–	van Soestbergen and Lee, 1969
35	23	110	–	–	0.21	–	Klein and Wu, 1974
	62	200	–	–	0.31	–	
20	170	230	–	–	0.74	–	Means et al., 1981
35	210	240	–	–	0.87	–	
20	740	3,100	–	–	0.24	–	Taylor et al., 1983
20	1,020	–	986	1.03	–	–	Maul et al., 1985
35	430	510	270	1.59	0.84	0.53	Reasoner et al., 1985
28	4,000	7,000	4,600	0.86	0.57	0.65	
20	2,700	6,100	3,900	0.69	0.44	0.64	
35	3.3	4.9	–	–	0.67	–	Lombardo et al., 1986
28	4.0	5.2	–	–	0.76	–	
28	–	5.2	4.8	–	–	0.92	
22	100	710*	–	–	0.14	–	Gibbs and Hayes, 1988

RT = room temperature. CFU, colony-forming units. PP, pour plate. SP, spread plate. MF, membrane filter.
* Based on ratio given in the reference and arbitrarily assigning the value of 100 CFU/ml as the pour plate mean.

وفى مقارنات MF to SP ، هناك نتائج مختلطة لأن اختيار البيئة يؤثر بشدة على أعداد البكتريا بالاضافة الى حرارة التحضين وحتى مصدر المياه . ولقد ظهر من

دراسات (LeChevallier et al 1980) أن طريقة أغشية الترشيح وباستعمال بيئة m-SPC (والتى تسمى الآن m-HPC) كانت أفضل من طريقة PP لاستخلاص البكتريا من مياه شرب معالجة بالكلور، ولكن ليس هناك اختلاف معنوى بين الطريقتين عند تحليل المياه الخام . وفى مقارنة طريقة PP باستخدام بيئة عد الأطباق Plate count medium وطريقة Reasoner and Geldreich (1985) وجد أنه عند 28 أو 20 درجة مئوية كحرارة تحضين فان طريق أ غشية الترشيح وباستعمال بيئة m-HPC أو R2A تحصل على نتائج لاعداد البكتريا أعلى من استخدام طريقة PP القياسية فى تحليل مياه الشرب. وعند درجة 35 مئوية كحرارة تحضين ، كانت نتائج m-HPC مساوية أو أكبر قليلا من نتائج طريقة PP . ولقد قارن Fujiok et al., (1986) طريقتى SPC MF, وباستخدام بيئتى m-HPC agar and R2A agar لعد البكتريا فى مياه الشرب ووجدوا أن طريقة PP تستخلص فقط 80 % من البكتريا فى حين أن طريقة MF تستخلص 100% من البكتريا باستعمال أى من بيئتى m-HPC or R2A .

وأجريت دراسات مقارنة عديدة ، ولكن دور البيئة المستخدمة لتقدير عدد البكتريا الهتيروتروفية يجب أن يؤخذ فى الاعتبار عند المقارنة . والجدول التالى (جدول 2) يوضح المقارنة لنتائج تقدير البكتريا الهتيروتروفية فى مياه الشرب باستخدام بيئات متعددة وطرق مختلفة .

Table 2. . Comparison of HPC results using different media

Temperature (°C)	Method (CFU/ml) PP	SP	MF	Reference
35	3,137 (SPC)*	–	4,273 (m-HPC)	Taylor and Geldreich, 1979
20	170 (SPC)	440 (R2A)	510 (m-HPC)	Means et al., 1981
20	–	4,000 (R2A)	12 (m-HPC)	Fiksdal et al., 1982
	–	1,000 (R2A)	110 (m-HPC)	
35	–	20 (R2A)	6 (m-HPC)	
	–	4 (R2A)	<1 (m-HPC)	
35	277 (SPC)	–	283 (m-HPC)	Green et al., 1983
20	1,123 (NA)	–	1,217 (m-HPC)	Maul et al., 1985
	1,192 (NA)	–	1,192 (R2A)	
35	22 (SPC)	200 (R2A)	32 (m-HPC)	Reasoner and Geldreich, 1985
28	80 (SPC)	360 (R2A)	140 (m-HPC)	
20	22 (SPC)	90 (R2A)	47 (m-HPC)	
35	53 (SPC)	–	66.7 (m-HPC)	Fujioka et al., 1986
	53 (SPC)	–	57.1 (R2A)	
26	590 (SPC)	1,550 (R2A)	–	Stetzenbach et al., 1986
22	100 (YEA)	710 (YEA)	–	Gibbs and Hayes, 1988
	440 (R2A)	–	–	
	100 (YEA)	3,900 (R2A)	–	

CFU, colony-forming units.

* Media: SPC = standard plate count agar; NA = nutrient agar; YEA = yeast extract agar, R2A medium (Reasoner and Geldreich, 1979), m-HPC medium (Taylor and Geldreich, 1979; m-HPC was published originally as m-SPC medium)

4 . البيئات ودرجة حرارة وزمن التحضين

الطبعات الأولى من الطرق القياسية قدمت لتقدير العد فى الأطباق Plate count درجتى حرارة للتحضين هما 20 مئوية (العد عند حرارة الغرفة) و 37 مئوية (العد عند حرارة الجسم). عد الأطبق عند 37 مئوية يعتقد أنه يعطى مؤشر عن وجود البكتريا سريعة النمو وتميل الى أنها تن تمى للنوعيات المرضية والتى ربما تتواجد فى حالة التلوث بمخافات الصرف الصحى. فى حين أن عد الأطباق Plate count عند 20 مئوية استعمل لعد البكتريا التى تميل الى النشأة البطيئة. استعمال درجة حرارة 37 مئوية للتحضين فى الولايات المتحدة للتحضين وجد أنها فى البداية تشير الى العدد عند حرارة الجسم، ولكن خفضت درجتان.

وفى عام 1970، أهتم بعد وتصنيف البكتريا التى لا تنتمى الى بكتريا القولون فى مصادر المياه فنشأت بيئة جديدة وأعيد تقييم حرارة التحضين وهذا أدى الى التغيير فى الاسم من SPC الى HPC فى الطبعة السادسة عشر من الطرق القياسية.

ولإدراك الحاجة لطريقة أغشية الترشيح لتقدير البكتريا فى مياه نظام التوزيع Distribution system أدى الى نشأة بيئة m-HPC (m-SPC) agar بواسطة Taylor and Geldreich (1979). هذه البيئة نشأت لتعطى نتائج مماثلة لبيئة (SPC agar) أو بيئة Tryptone glucose yeast extract agar. وكلتا البيئتان مذكورتان فى الطرق القياسية لتقدير العد فى الأطباق Plate count عند 35 مئوية. ويتضح أن بيئة m-HPC مع أغشية الترشيح يسمحان بالمرونة فى حجم العينة الممكن اختبارها وبالتالى زيادة حدود الطريقة فى الكشف عن البكتريا.

وباختصار فان الاهتمام نحو تعظيم استخلاص البكتريا وذلك لوضع صورة للبكتريا المتوقع تواجدها فى مياه الشرب المعالجة ادى الى نشأة بيئة R2A والتى وضع مكوناتها Reasoner and Geldreich (1979, 1985) . وعلى عكس بيئة عد الأطباق القياسية Standard plate count media وبيئة m-HPC ، بيئة R2A هى بيئة منخفضة فى محتواها من المغذيات وذلك بالنسبة لتركيز كل مكون من مكوناتها وكذلك المحتوى الكلى، ولكن بها مكونات كثيرة مختلفة من المغذيات . وباستعمال الحرارة القياسية (35 مئوية) للتحضين لمقارنة HPC الناتج على الأطباق المنثورة SP ، MF وباستخدام بيئة R2A بذلك الناتج بطريقة PP ، وطريقة m-HPC MF، فان بيئة R2A نتج عنها أعداد أكبر عن ذلك المتحصل علية باستخدام البيئات الأخرى . طول مدة التحضين هام بالنسبة لبيئة R2A؛

بسبب محتواها من التركيزات المنخفضة من المغذيات، ا لبكتريا فى مياه الشرب تميل الى النشوء أكثر بطئا والتحضين لمدة 5 – 7 أيام عند 20 أو 28 درجة مئوية تظهر أعلى أعداد من البكتريا على تلك البيئة.

شكل 1 يوضح الفروق فى نتائج HPC المتحصل عليها باستخدام طريقتى SP , MF وبيئة R2A, m-HPC , standard method plate count (SMA) agar عند 20، 28، و 35 درجة مئوية وتحضين لمدة من 2 الى 14 يوم.

ويظهرمنه أن التحضين عند 35 درجة مئوية أقل من أى من 28 أو 20 درجة مئوية بصرف النظر عن البيئة المستخدمة.

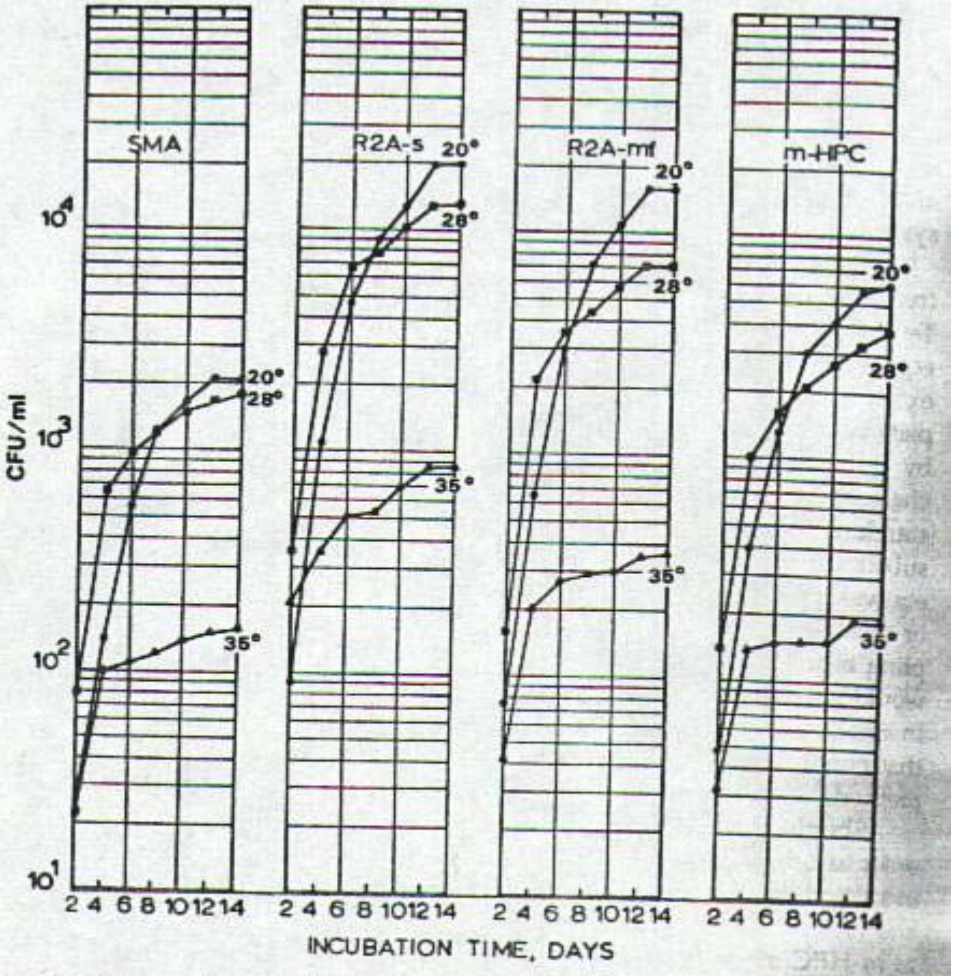


Figure 4.1. Comparison of 20°C, 28°C, and 35°C bacterial counts of treated distribution water. CFU, colony-forming units. SMA, Standard Methods plate count agar. R2A-s, R2A medium with spread plates. R2A-mf, R2A medium with membrane filters. m-HPC, HPC medium with membrane filters. Bacterial counts obtained using media and methods options in *Standard Methods* (16th ed.). Data adapted from Reasoner and Geldreich (1985).

استعملت بيئة R2A لعد البكتريا الهتيروتروفية فى نوعيات مختلفة من مياه الشرب شملت مياه آبار (Stetzenbach et al, 1986)، مياه ناتجة عن معالجة عند نقطة الاستعمال بالكربون المنشط (Reasoner et al., 1987)، مياه معالجة بالتهوية لازالة كيماويات متطايرة (Fronk-Leist and Love, 1984)، لعد البكتريا المصاحبة للكربون المنشط من مياه الشرب (Camper et al., 1986)، ولاختبار تلف أغشية التناضح العكسى (Ridgway et al., 1983, 1984).

Table 22.3 Effect of length of incubation on HPC results

Temperature (°C)	Medium and method	Bacterial count (CFU/ml) Incubation time, days 1	2	3	4	5	6	7	Reference
35	SPC-PP	–	2,300	–	5,000	–	–	6,200	Klein and Wu, 1974
35	R2A-SP	–	10	–	–	–	–	20	Fiksdal et al., 1982
20	R2A-SP	–	0	–	–	–	–	4,000	
35	R2A-MF	–	5	–	–	–	–	10	
20	R2A-MF	–	0	–	–	–	–	40	
20	m-HPC-MF	–	190	945	1,217	–	–	–	Maul et al., 1985
	R2A-MF	–	287	904	1,192	–	–	–	
	NA-PP	–	389	855	1,123	–	–	–	
35	SPC-PP	–	22	–	100	–	110	115	Reasoner and Geldreich, 1985
28	SPC-PP	–	90	–	640	–	950	1,000	
20	SPC-PP	–	22	–	130	–	570	900	
35	R2A-SP	–	200	–	340	–	500	510	
28	R2A-SP	–	360	–	2,800	–	6,700	7,200	
20	R2A-SP	–	90	–	1,100	–	4,700	6,100	
35	R2A-MF	–	41	–	200	–	270	280	
28	R2A-MF	–	160	–	2,200	–	3,500	4,000	
20	R2A-MF	–	75	–	650	–	3,000	4,900	
35	m-HPC-MF	–	32	–	140	–	150	150	
28	m-HPC-MF	–	140	–	1,000	–	1,700	1,900	
20	m-HPC-MF	–	48	–	400	–	1,600	2,000	
35	PCA-PP	1.3	16.8	–	30.8	34.2	34.8	34.8	Silley, 1985
20	PCA-PP	1.7	21.2	–	101	114.3	121.3	125.8	
22	YEA-PP	–	–	100*	–	–	–	1,800	Gibbs and Hayes, 1988

CFU, colony-forming units.
* Based on plating ratio given in the reference and arbitrarily assigning the value of 100 CFU/ml as the pour plate mean.

تأثير حرارة التحضين وجد أنها هامة جدا للحصول على أقصى أعداد من البكتريا باستعمال أى بيئة .

جدول 3 يظهر نتائج دراسات عديدة، يظهر منها تأثير فترة التحضين، الاختلاف بين البيئات وحرارة التحضين على نتائج عد البكتريا. وبصفة عامة، اطالة فترة التحضين يصاحبها زيادة فى أعداد البكتريا الهتيروتروفية.

من دراسة Reasoner and Geldreich (1985) ظهر أن كل البيئات المستخدمة أعطت أقل أعداد من البكتريا عند التحضين على 35 مئوية، وبصرف النظر عن طول مدة التحضين أو الطريقة المستخدمة (شكل 1 وجدول 3). ووجد أن التحضين على درجة 20 مئوية أعطى أعلى الأعداد على كل البيئات عندما طالت مدة التحضين الى 12 – 14 يوم. الا أن العدد عند 28 مئوية كان أعلى عن العدد على 20 درجة مئوية من اليوم الثانى الى اليوم السادس، ولمعظم الأغراض فان 28 درجة مئوية ظهر أنها هى أفضل حراره للتحضين عليها. وأيد ذلك Lombardo et al., (1986) وذكر أن أفضل بيئة هى R2A مع التحضين على 28 درجة مئوية لمدة 7 أيام ذلك بالنسبة لتحليل مياه الشرب.

وفى انجلترا، فان الطريقة القياسية لعد البكتريا الهت يروتروفية هى PP باستعمال بيئة آجار مستخلص الخميرة Yeast extract agar (YEA) والتحضين عند 20 – 22 مئوية لمدة 3 أيام. وقارن Gibbs and Hayes (1988) بيئتى R2A, YEA باستخدام طريقتى PP and SP مع التحضين لمدة 3 ، 7 أيام لعد البكتريا فى عينات من مياه الشرب . وتلخصت النتائج فى التالى:

- بمقارنة العد بعد 3 أيام بنظيره بعد 7 أيام تحضين وجد أن بيئة R2A أعطت 4 أضعاف أعلى فى العدد عند 3 أيام، 8 أضعاف أعلى فى العد عند 7 أيام من نظيرها بيئة YEA,
- طريقة SP أعطت 7 أضعاف ما أعطته طريقة PP عند كلا من 3 ، 7 أيام,
- أعطت بيئة R2A بطريقة SP 93 ، 27 ضعف ما ظهر على بيئة YEA بطريقتى PP و SP على الترتيب.
- استخدام R2A بطريقة SP مع التحضين لمدة 7 أيام أعطت أعداد 520 ضعف أعلى مما ظهر على بيئة YEA وباستخدام PP والتحضين 3 أيام.

فى النهاية توصل الى الاستنتاج أن طريقة الاختبار فى انجلترا تعطى أعداد قليلة جدا مما قد يخل بقواعد الصحة العامة والتى ترتبط بأعداد البكتريا الهتيروتروية فى مصادر المياه ويجب مراجعة الطريقة المتبعة.

وعلى ذلك فهناك ادلة كثيرة من العديد من الدراسات تقول أن طريقة PP والبيئة الغنية والتحضين عند 35 مئوية لمدة قصيرة تؤدى الى خفض أعداد البكتريا التى ربما تتواجد فى مياه الشرب. وهذه المجموعة من الظروف تسمح فقط لجزئية البكتريا سريعة النمو بالظهور والتى ربما يكون مرجعها الى تلوث بمخلفات الصرف الصحى . وهناك جزئية كبيرة من البكتريا تناسبها طريقة SPأو MF مع بيئة تحتوى على مو اد مغذية متعددة وبتركيزات منخفضة، مع استخدام حرارة تحضين منخفضة ولمدة أطول من 72 ساعة. وهناك حالات تنجح فيها البيئات عالية التغذية مع اطالة فترة التحضين.

ولا توجد طريقة ولا ظروف تسمح بالحصول على عدد كل البكتريا التى ربما تتواجد فى المياه (Buck, 1979) وعلى ذلك فهناك الاختيار للطريقة والبيئة ويجب التقييم طبقا لنوعية المياه التى غالبا ما يتم تحليلها قبل الوصول الى قرار . ولقد ذكرت عبارة عن Goulder (1976) يقول فيها " على الرغم من عد الأطباق يمثل فى أحسن الظروف جزء صغير من كل البكتريا فانه من الأفضل استعمال الب يئة التى تعطى أعلى الأعداد لأن أى زيادة فى الجزيئية التى يتم احصائها يزيد من حساسية الطريقة والتى تتخذ كوسيلة لتقدير حجم التغيير فى النوعية الميكروبيولوجية". هذه المقولة تعتبر مناسبة للنوعية البكتريولوجية لمياه الشرب.

5. استخدام مراقبة البكتريا الهتيروتروفية

5. 1 . عمليات المعالجة

واحد من أبسط الاستخدامات لعدد البكتريا الهتيرتروفية هو مراقبة الانخفاض الذى يحدث فى الحمل البكتيرى للمياه خلال مرورها على مراحل معالجة مياه الشرب . وفى حين أنه هناك بيانات متوافرة عن الازالة أو التثبيط فى بكتريا القولون والممرضات خ لال عمليات المعالجة، فهناك القليل من البيانات المنشورة والمتاحة عن الخفض فى عدد البكتريا الهتيروتروفية ويستثنى بالطبع ما هو مرتبط بالمياه النهائية والتى تم تطهيرها وتدخل نظام التوزيع . ومن الممكن أن يكون انخفاض عدد البكتريا الهتيروتروفية متلازما مع الانخفاض فى بكتريا القولون خلال عمليات المعالجة . ولقد حدد Geldreich (1988) نسب الازالة بالنسبة للمياه الخام (صفر%)؛ تخزين المياه الخام (50 %)؛ التجلط والترسيب (62%)؛ الترشيح الرملى السريع (96%)؛ والتطهير (99% أو أكثر).

وفى الدراسات التى تصف تأثير استخدام التطهير عند نقاط بديلة خلال معالجة المياه، استخدم Cummins and Nash (1979) طريقة الأطباق المصبوبة (PP) القياسية مع التحضين

على 35 مئوية لمدة 48 ساعة. وعند استعمال الكلور مع المياه الخام قبل الترويق، انخفض عدد البكتريا الهتيروتروفبة فى المنتج النهائى من المياه بمقدا ر 87,1 %. وعند معالجة المياه الخام المخزنة بالكلور سجل انخفاض مابين 98,7% و 99%. وفى النهاية عند استخدام الكلور ما بين الترويق والترسيب، أو بين التجلط والترسيب والترشيح وجد انخفاض 99,6% و أكبر من 99,98 % على الترتيب.

ومن خلال المعلومات التى جمعها Hutchinson and Ridgway (1977) يتضح أن المعالجة المبدئية للمياه باستعمال الرمل الخشن ومعدل الترشيح السريع ازالت 50 – 80 % من عدد البكتريا (عد أطباق عند 37 درجة مئوية) بينما الترسيب البسيط أزال حوالى 50%.

ومن خلال أبحاث Ridgway (1978) اتضح أن مصدر المياه يلعب دورا فى استعادة نمو Regrowthالبكتريا فى نظام التوزيع فور فقدان الكلور الحرالمتبقى.

ولقد تم تقدير عدد البكتريا باستعمال طريقة الأطباق المصبوبة PP مع بيئة YEA agar والتحضين عند 37 مئوية لمدة 48 ساعة أو 22 مئوية لمدة 7 أيام. وكانت نسبة الازالة للبكتريا الهتيروتروفية من مياه النهر مرورا بمراحل المعالجة

(impoundment + prechlorination +coagulation + filtration + chlorination) تراوحت ما بين 1 – 4 لوغاريتم. ويعتمد استعادة نمو البكتريا عند التوزيع على فقدان الكلور الحر المتبقى، نوعية المياه، مستوى المواد العضو ية فى المياه النهائية. ولقد قام MacLeod & Zimmerman (1987) بمحاولة احلال الكلور المتحد Combined chlorineمحل الكلور الحر المتبقى فى نظام توزيع مياه الشرب فى محاولة للتغلب على ظاهرة استعادة نمو البكتريا ولكن استمرت الزيادة المعنوية فى اعداد البكتريا.

5. 2 . التخزين والتوزيع Storage and Distribution

مراقبة النوعية البكتريويولوجية لنظم التخزين والتوزيع الشائع فيها استعمال التحليل للبكتريا الهتيروتروفية. فالتغيرات فى النوعية البكتريولوجية للمياه المعالجة من وقت دخولها نظام التوزيع حتى وصولها الى المستهلك يمكن تقديرها من خلال استعمال برنامج مناسب لجمع العينات والتحليل للبكتريا الهتيروتروفية HPC.

التغيرات ربما تسبب مشاكل فى الناحية الجمالية Aesthetic للمياه والتى تشمل نشوء الطعم والرائحة، تلون المياه، النمو اللزج، المشاكل الاقتصادية والتى تشمل التآكل فى المواسير وتحلل المواد (Water Research Center, 1976).

أعداد البكتريا تميل الى الزيادة خلال التوزيع وكثافة أعدادها تتأثر ببعض العوامل تشمل النوعية البكتريولوجية للمياه النهائية والتى تدخل نظام التوزيع، الحرارة، مدة البقاء، والمغذيات المتاحة (Geldreich, 1974; Olson and Nagy, 1984). ولقد ركزت العديد من الدراسات الحديثة على التغيرات فى نوعية المياه خلال نظام التوزيع فى صورة قياس البكتريا الهتيروتروفية.

تواجد البكتريا الملونة Pigmented bacteria فى المياه الخام، المياه خلال مراحل المعالجة ونظام التوزيع درسه (Reasoner & Geldreich, 1980 and Reasoner et al., 1989) واستعمل فى تلك الدراسات لتقدير البكتريا الهتيروتروفية طرق وبيئات Standard PP, m-HPC MF, R2A MF مع التحضين عند 35 مئوية. ومن الدراسة استخلص أن يئتى m-HPC and R2A قد أظهرا أعداد من البكتريا الهتيروتروفي ة، وتشمل البكتريا الملونه، أكبر من طريقة Standard PP. وكان التحضين لمدة 7 أيام هو الأقدر على اظهار البكتريا الملونه على بيئتى m-HPC and R2A . مثلت البكتريا الملونة نسبة معنوية من HPC .المتواجد فى المياه من شبكات التوزيع . ووجد كذلك ارتباط بين أعداد البكتويا الملونة وموسم الدراسة. كانت البكتريا الصفراء والبرتقالية اللون متواجدة بصفة دائمة.

وجد LeChevallier et al.(1980) أن أعداد البكتريا بطريقة m-HPC تتراوح ما بين أقل من 2., الى 1 X 10^4 cfu/ ml . وكان العدد فى نهايات الشبكات حيث لا

يوجد كلور 23 ضعف العدد عند تواجد الكلور الحر . كذلك وجد أن هناك علاقة مابين العكارة ومحتوى المياه من البكتريا HPC فعندما تكون العكارة أكبر من 5 NTU تزيد الأعداد فى مياه الشبكات ما بين 1 – 3 لوغاريتم . وبتصنيف البكتريا المتواجدة فى الشبكات وجد أن أكثر من 30% منها تنتمى للبكتويا الانتهازية Opportunistic pathogens وحوالى 35 % مضادات Antagonistic لبكتريا القولون. واستنتج أن تقدير أعداد بكتريا HPC مفيد ليدل على وجود البكتريا الانتهازية ، تثبيط بكتريا القولون ، التدهور فى خواص مياه الشرب.

ولقد وجدت Olson and Hanami (1981) وبلستعمال Plate count agar وبطريقة SP والتحضين عند 35 مئوية لمدة 48 ساعة أن هناك اختلافات موسمية فى عدد البكتريا الهتيروتروفية وأن الأجناس الشائعة تختلف ما بين المصدر ونقط أخذ العينات من نظام التوزيع وأن العوامل المؤثرة فى تلك الاختلافات قد تكون عوامل طبيع ية وكيمائية فى خط التوزيع. ولقد وجد أن الأجناس الشائعة فى نظام التوزيع مع استعمال الكلور كانت Acinetobacter, Pseudomonas/Alcaligenes, and Flavobacterium وحيث لا يستعمل الكلور وجد أن الأجناس الشائعة هى

Pseudomonas/Alcaligenes, Acinetobacter, Flavobacterium and Klebsiella.

وهنا يجب التفرقة ما بين استعادة النمو Regrowth وهو النمو الناتج عن البكتريا المضارة والحية Injured bacteria من تأثير الكلور أو تلك التى فى حالة سكون Dormancy والتى هى ليست نشطة أو ميته ، أما After growth فهو النمو الناتج عن انفصال البكتريا المعلقة (الفيلم الحيوى)على سطح مواسير توزيع المياه .

ولقد وجدت البكتريا الهتيروتروفية بأعداد أقل فى شهور الصيف غن شهور الشتاء (عكس المتوقع) قد يرجع ذلك الى زيادة جرعة الكلور المستخدمة صيفا للوقاية من أمراض الصيف (Brazos and O'Connor, 1988).

ولقد درس تأثير الفيلم الحيوى Biofilm على نوعية المياه من خلال عدد البكتريا الهتيروتروفية (LeChevallier et al. 1987) فباستعمال بيئة R2A وطريقة SP مع التحضين عند 20 – 24 مئوية لمدة 7 أيام) وجد زيادة فى الأعداد مع انسياب المياه من محطة المعالجة (10^4 cfu / ملل) الى نهاية الخطوط (10^6 cfu/ ملل).

الندف المتكونة من المادة المستخدمة للتحكم فى التآكل (أورثوفوسفات الزنك) كانت تحتوى على 2،4 $10X^6$ cfu/ملل وكان الأسمنت المبطن لسطح الأنابيب يحتوى على 2 $10X^4$ cfu/سم^2 .

5. 3 . الفيلم الحيوى ونمو البكتريا على مواد الانشاء

النمو الميكروبى المصاحب لسطوح الخزانات Basins ومواد الانشاءات الأخرى المستعمله فى عمليات المعالجة ومواسير التوزيع ونظم السباكة فى المنازل Household plumbing systems قيمت باستعمال طرق عد البكتريا الهتيروتروفية. وكذلك استعمل عدد البكتريا الهتيروتروفية فى الدراسات البكتريولوجية لأوساط التآكل.

وفى دراسة أجراها Nagy and Olson (1986) استعمل طريقة SP مع بيئات Plate coun agar, m-HPC, and R2A. تراوحت أعداد البكتريا

بين 11 cfu/ 100سم^2 الى 5,75 10X cfu/100سم^2 من سطح الأنبوبة. ووجد أن معدل الزيادة فى الأعداد على سطح الأنابيب حوالى 1 لوغاريتم كل 10 سنوات خدمة. ووجد أن عدد البكتريا غير مرتفع وغير موزع بانتظام على سطح الأنابيب وربما يرجع ذلك الى سرعة المياه، المستوى المنخفض من المواد المغذية، مستوى الحقن المنخفض والناتج عن المعالجة وكذلك وجود المتبقى من المطهر. وكانت أجناس البكتريا الموجودة هى نفسها المتواجدة فى المياه.

ودرس Donald & Pipes (1987) نمو الكائنات الدقيقة على سطوح المواسيرالمصنوعة من الحديد الزهر Cast iron والمعرضة لمياه الشرب . عرضت سلندرات صغيرة من الحديد لمياه الشرب عند (15 – 20 مئوية) ، (4 – 15 مئوية). بعض السلندرات عرضت مباشرة للمياه بادخالها فى نظام التوزيع بينما البعض الآخر عرض لمياه الشرب فى خزانات بلاستيكية سعة 100 لتر.

زمن التعرض 28 – 41 يوم (تعرض قصير) ، 67 – 115 يوم (تعرض طويل). واحصيت البكتريا الهتيروتروفية باستعمال بيئة R2A . مستويات البكتريا الهتيروتروفية فى مياه التوزيع عند مواقع مختارة للدراسة تراوحت ما بين 4 الى 219 مستعمرة / ملل خلال الفترات الباردة الحرارة وما بين 10 الى 8300 مستعمرة/ ملل فى الفترات الدافئة . وكانت البكتريا على الحديد الزهر المعرض للمياه فى نفس المواقع يتراوح ما بين 2،1 10^4 X 10 مستعمرة/ سم^2 الى

7,59 X10^7 مستعمرة/ سم^2 خلال الفترات الدافئة، بين 56 مستعمرة / سم^2 الى X1,58 10^5/ سم^2 خلال الفترات الباردة . مستويات البكتريا الهتيروتروفية على سلندرات الحديد الزهروالمعرضة للمياه فى خزانات سعة 100 لترخلال الفترة الدافئة كانت 1,44 X 10^5 مستعمرة / سم^2 – 1,74 X 10^7 / سم^2. وكانت هناك علاقة موجبة قوية بين أعداد البكتريا فى المياه وأعدادها على سطح السلندرات . وكان هناك علاقة سالبة قوية بين تركيز الكلور والبكتريا على سطح السلندرات فى فترة الحرارة الدافئة وهذه العلاقة ربما تعتمد على الموقع . وهناك أيضا علاقة قوية ما بين حرارة المياه والبكتريا الهتيروتروفية على سطح السلندرات الزهر. سرعة المياه فوجد أنها تحد من نمو البكتريا الهتيروتروفية على السلندرات اما عن طريق زيادة التعرض للكلورامين Monochloramine أو بازالة الخلايا الملتصقة Attached cells .

ولقد وجد أن البكتريا المكونة للفيلم الحيوى أو الموجودة داخله والملتصقة بالأسطح (كربون منشط – شرائح معدنية) أصعب فى القضاء عليها من البكتريا الحرة وأن الكلورامين (Monochloramine) أقوى فى تأثيره من الكلور الحر أو ثانى أكسيد الكلور Chlorine dioxide).(LeChevallier et al., 1988.

ولقد وجد أن امرار مياه محتوية على البكتريا الهتيروتروفيه فى مواسير من PVC وأخرى من الصلب منخفض الكربون فان مياه المواسيرالمصنعة من PVC احتوت على بكتريا بكثافة أكبر من تلك الناتجة من مواسير الصلب . ووجد أن مواسير الحديد الزهر قد حدث فيها تآكل نتيجة اضافة بكتريا اليها معزولة من نظام توزيع مماثل. ووجد أيضا أن البكتريا المعزولة من المادة المتآكلة هى نفسها المتواجدة من المياه.

من المراجع التى تهتم بنمو البكتريا على أسطح مواد الانشاء والطلاء لعمليات المياه والخزانات ونظم التوزيع Colbourne (1985) and Schoenen (1986) .

وكملخص فان استعمال طرق تقدير البكتريا الهتيروتروفيه تمدنا بتفاصيل معنوية عن التغيرات فى نوعية المياه خلال المعالجة، التخزين والتوزيع. اثبتت تلك الطرق فائدتها وسوف يستمر استعمالها فى برامج المراقبة لنوعية المياه . فى الحقيقة، ربما وجدت محطات المعالجة أن عدد البكتريا الهتيروتروفية تزداد فائدته اذ أنها تدفع نحو التحكم فى مستويات منتجات الثانوية للمطهرات الضارة فى المياه. استعمال بدائل المطهرات كجزء من استراتيجية الخفض من تركيز النواتج الثانوية للتطهير ، وامكانية خفض جرعات المطهرات المستخدمة ربما يعنى

أنه سيكون هناك ثقة كبيرة بالتحليلات لعدد البكتريا الهتيروتروفية لتقدير مغزى التغيرات فى نوعية المياه والتى ستحتاج الى استجابة نحو بعض التغيير فى المعالجة.

وعلى الرغم من أنه من المعروف أن التركيزات العالية من أعداد البكتريا الهتيروتروفية يمكن أن تنشأ فى أماكن معينة فى نظام التوزيع، فان هناك ندرة فى البيانات عن التأثير على صحة الانسان والتى من الممكن أن تنشأ عن التعرض لهذه الكائنات عقب الابتلاع أو من خلال الجهاز التنفسى (الرذاذ). على أن هناك بعض معلومات عن التعرض للرذاذ Aerosol من حيث الأمراض المتولدة عن المياه waterborne pathogen مثل اللجيونيلا.، وعن أمراض الجلد والتى ترجع الى Pseudomonas aeruginosa أو بعض Mycobacteria والتى تنشأ عن التعرض لمياه استحمام ملوثة، ولكن التقارير عن التأثير الصحى الضار نتيجة الأعداد الكبيرة من البكتريا الهتيروتروفية مشتتة أو غير متواجدة. ومع ازدياد أعداد الأشخاص منخفضى المناعة والذين هم فى خطر للاصابة بالكائنات التى هى بصفة عامة غير مرضية فان البحث فى هذا المجال يحتاج اليه بشدة.

ولاستمرارية العديد من هذه البكتريا حية فى البيئة الطبيعية كان ذلك محل التساؤل عن مدى أهمية تلك الظاهرة من ناحية النوعية الصحية لمياه الشرب وصحة المستهلك . وهناك العديد من البكتريا التى من الممكن أن تدخل فى حالة أنها حية ولكن لا يمكن زراعتها Viable but (nonculturable Roszak and Colwell, 1987).

وطالما أن هذه الكائنات لا يمكن عدها بطرق الزراعة التى تستعمل الآن، فانه يجب استعمال طرق أخرى لتقدير كميتها . واستخدام طرق للكشف عن تواجد الكائنات الحية المتواجدة فى مياه الشرب والتى لا يمكن زراعتها وتقييم أهميتها بالنسبة لصحة الانسان تحتاج تلك المساحة الى مزيد من البحث.

الفصل الثـــانى

طرق تقدير العدد الكلى للبكتريا الهتيروتروفية فى المياه

الفصل الثانى

طرق تقدير العدد الكلى للبكتريا الهتيروتروفية فى المياه

Total Bacterial Count (SPC)

Total Viable Bacterial Count (HPC)

1 . مقدمة

1. 1 . الاستخدامات Applications

جميع ما ذكر كعنوان هى مصطلحات تذكر فى المراجع والأبحاث ، وأحدث تلك المسميات هى الأخير ، ويقصد بها معرفة محتوى عينة المياه المختبره من حيث العدد الكلى للبكتريا . ومن خلال تقدير عدد البكتريا الهتيروتروفية يمكن أن يتم تقدير التغيرات خلال مراحل معالجة مياه الشرب المختلفة بالاضافة الى التغيرات التى من الممكن أن تحدث فى نوعية المياه خلال نظام التوزيع Distribution system. وما يتم حصره عادة هى مستعمرات Colonies ربما تنشأ عن خلية واحدة، اثنتان، سلسلة Chain أو عنقود Cluster ولذلك يذكر العدد مميزا بالاصطلاح وحدات تكوين المستعمرة Colony forming units. (CFU) والعدد النهائى يعتمد على تفاعل ما بين المستعمرات الناشئة والبيئة التى زرعت عليها البكتريا؛ لذلك تختار التوليفة من الطريقة والبيئة التى تنتج أقصى عدد من المستعمرات من خلال التحضين على أنسب درجة حرارة وللفترة الزمنية المناسبة لذلك . وللمقارنة بين كفاءة خطوات المعالجة المختلفة يستعمل نفس الطريقة والبيئة.

وهناك ثلاث طرق وأربعة بيئات لتقدير عدد البكتريا الهتيروتروفية جاء ذكرها فى Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater وسيتم ذكرها.

1 . 2 . اختيار الطريقة Selection of Method

يجب الأخذ فى الاعتبار أن الطرق التى تستخدم فى تقد ير العدد الكلى للبكتريا والتى سيرد ذكرها، وعلى تعددها، لا تنجح فى تنمية واظهار العدد الحقيقى للبكتريا المتواجدة فى عينة المياه المختبرة لعدة اعتبارات . من أهم تلك الاعتبارات، عدم إمكانية توفير الظروف التى تلائم نمو وتكاثرجميع نوعيات البكتريا من حيث التغذية والاحتياج للأكسوجين بالاضافه الى حرارة ومدة التحضين. و فلقد ذكر فى هذا المجال أنه تحت أحسن الظروف فان ما يتم تقديره من أعداد لا يزيد عن ثلث العدد الحقيقى الموجود فى العينه المختبره . وحيث أنه من المفروض أن الغرض من الاختبار هو الوقوف على صورة عامه لمحتوى ا لعينه من البكتريا فان الاهتمام يكون مركز على عدد البكتريا الحيه ولا يدخل هنا ما يشمله العدد فى بعض الطرق من بكتريا غير حيه ولذلك أقترحت التسمية بالاصطلاح الثالث لتلك المجموعة من البكتريا.

ومن المفروض أنه لمعرفة محتوى العينه من البكتريا أن يستبعد أى عامل آخر قد يمثل مصدرا اضافيا خارجى لأعداد من البكتريا، لذلك يراعى أن تكون جميع الأدوات المستخدمة فى التقدير معقمه أى خالية من أى كائنات حيه تتداخل فى التقدير كما يتم العمل تحت ظروف معقمة Aseptic conditions.

1 . 2 . 1. طريقة الأطباق المصبوبة Pour plate method

طريقة الأطباق المصبوبة والتى سيأتى تفصيلها فيما بعد هى طريقة سهلة الاجراء ويمكن أن تستوعب حجم من العينة الأصلية أو تخفيف منها يتراوح ما بين 1, ملل الى 2 ملل . المستعمرات الناتجة صغيرة نسبيا ومضغوطة، وميل المستعمرات الى التعدى على بعضها أقل عن طريقة الزرع على سطح الأطباق Surface growth. ومن ناحية أخرى فان المستعمرات المغموسة تنمو ببطيء ومن الصعب نقلها وهذا يمثل أحد عيوب الطريقة . وهنا حاجة ماسة الى حمام مائى ذا ثرموستات لتلطيف حرارة البيئة Tempering وعلى الرغم من ذلك فامكانية حدوث صدمة حرارية للبكتريا ال موجودة فى العينة قائمة وتتسبب فى اضرار للخلايا Injury نتيجة استعمال البيئة عند درجة حرارة 45-46 مئوية وتلامسها مع الخلايا البكتيرية الموجودة فى العينة وبالتالى قد تتسبب فى عدم نموها.

1 . 2 . 2 . طريقة الفرد على الأطباق Spread plate method

طريقة فرد جزء من العينة او تخفيف منها على سطح البيئة والتى سيأتى ذكرها تفصيليا فيما بعد لا يحتمل أن يحدث منها صدمة حرارية للخلاي ا والمشار اليها فى الطريقة السابقة والمستعمرات تتكون على سطح البيئة فى الطبق والتى يمكن تمييزها بسهولة عن فقاعات الهواء والشوائب التى قد تتواجد فى البيئة وتتداخل أو تعيق العد . والمستعمرات الناتجة على سطح البيئة هنا يمكن نقلها بسرعة وسهولة الى أى بيئات أخرى لاجراء مزيد من الاختبارات عليها، وطبيعة المستعمرة من حيث الشكل يمكن ملاحظته ومقارنتها بالأوصاف المنشورة كأول خطوة فى عمليات التصنيف.

وما يحد استعمال تلك الطريقة هو صغر حجم العينة أو التخفيف منها الممكن استعماله (1, - 5,.ملل) والذى يحدده قدرة البيئة المستعملة والمحدودة على الامتصاص والتى تتوقف على درجة جفاف البيئة . ولاتباع هذه الطريقة يلزم توفير البيئات التى ستسعمل وتكون سابقة التجفيف وبالتالى يكون لها القدرة على امتصاص أكبر للعينة المختبرة.

1 . 2 . 3 . طريقة أغشية الترشيح Membrane filter method

تتيح طريقة الترشيح بالأغشية اختبار حجوم كبيرة من المياه المنخفضة فى العكارة وهى الطريقة المختارة فى حالة المياه المنخفضة فى محتواها من البكتريا (أقل من 1 الى 100 وحدة تكوين المستعمرات / ملل (CFU/ml). وهذه الطريقة لا ينتج عنها صدمة حرارية ولكن تضيف الى تكاليف اجراء للاختبار ثمن غشاء الترشيح Membrane filter. ومن أمثلة العيوب الأخرى صغر المساحة المتاحة لنمو المستعمرات، الحاجة الى ضوء منعكس حتى يمكن رؤية المستعمرات على خلفية بيضاء اذ ا لم يستعمل فلتر ملون أو صبغة، امكانية تلف الخلايا بالضغط ال زائد وكذلك امكانية وجود فروق فى نوعية المرشحات Membranes.

1 . 3 . الأدوات العامة اللازمة للتقدير

1 . 3 . 1 . ماصات مدرجه Pipettes معقمه سعة (ا ملل – 2 مم- 5 ملل – 10 ملل) أو Micro pipette (اذا توافرت).

1 . 3 . 2 . أنابيب اختبار معقمه Test tubes تستوعب 20 ملل على الأقل للتخفيف أو

زجاجات تخفيف Dilution bottles سعة 150 ملل مدرجه أو غير مدرجة بغطاء قلاووظ تتحمل حرارة التعقيم.

1 . 3 . 3 . أطباق بترى زجاجيه أو بلاستيك Petri dishes قطر 10 سم معقمه وقطر 5 سم فى حالة اتباع Membrane filtration technique.

1. 3 . 4 . جهاز Vortex لمزج العينه جيدا مع محلول التخفيف ولضمان التجانس.

1. 3 . 5 . لهب بنزن للتعقيم

1 . 3 . 6 . قضبان زجاجيه Glass rods مشكله على شكل حرف (L) Spreaders معقمه فى علب معدنيه لفرد الجزئية المستخدمة من عينة المياه على سطح البيئة.

1 . 3 . 7 . حمام مائى يصل بالمياه الى درجة الغليان لاسالة البيئة التى ستستخدم وآخر مضبوط على درجة 46 – 47 مئوية لتلطيف حرارة البيئة Tempering قبل صبها فى أطباق البترى سواء فى وجود عينة المياه (Poured plate)أو عدمه لاستخدام تلك الأطباق فى فرد العينة على سطح البيئة بها (Streak plates)

1 . 3 . 8 . حضانتان يتم ضبط حرارة كلا منهما طبقا للبيئة المستخدمة.

1 . 3 . 9 . جهاز الترشيح الغشائى Membrane Filtration Apparatus فى حالة اتباع طريقة أغشية الترشيح Membrane filter.

1 . 3 . 10 . Binocular ذو اضاءه سفليه عاديه وعلويه يمكن التحكم فى زاوية ميل سقوط لأشعة على الطبق أو جهاز Quebec colony counter يمكن بواسطته عد المستعمرات الناتجه باستخدام عدسة مكبرة مع مؤشر أوتوماتيكى يعكس التلامس مع سطح الطبق الى ارقام أو باستخدام عداد يدوى.

1 . 4 . منطقة العمل Work area

يجب توفير Bench فسيح خالى من الشقوق فى غرفة محكمة أو بوضع الجهاز (MF) فى كابينة للحد من التلوث ، السطح الموضوع ع ليه الجهاز (MF) يكون غير منفذ ويطهر قبل أى تحليل تقوم به.

1 . 5 . العينات Samples

تجمع العينات طبقا لما جاء فى Module 1 على ان يتم التحليل مباشرة قدر الامكان حتى لا يحدث تغير فى الأعداد على أن أقصى وقت مسموح به أن يمضى ما بين التجميع والتحليل هو 8 ساعات (6 ساعات للنقل وساعتان للتشغيل) وعندما يكون ذلك غير متاحا تحفظ العينة على درجة حرارة أقل من 4 مئوية ولكن دون تجميد. وفى هذه الحالة فان اقصى وقت مسموح به من وقت الجمع الى التحليل هو 24 ساعة.

1 . 6 . تحضير العينة Sample preparation

تحضر الأطباق المعقمة ويكتب عليها رقم العينة، التخفيف، التاريخ وأي بيانات أخرى قبل التحليل. ويحضر على الأقل طبقان معقمان من الزجاج (65 سم^2) أو بلاستيك (57 سم^2) لكل تخفيف سيتم اختباره. تخلط العينة أو تخفيفاتها جيدا (25 مرة الى أعلى والى أسفل) أو (الى الأمام والخلف). واختياريا يمكن استخدام هزاز كهربى لمدة 15 ثانية لخلط العينة.

1 . 7 . المواد اللازمة للتقدير

1 . 7 . 1 . البيئة المستخدمة فى التقدير و يجب أن تكون البيئة طبقا للطرق القياسية الحديثة وليس طبقا لما هو متوافر من البيئات فى السوق المحلى لئما يجب أن يكون الاختيار طبقا لما أشير اليه من بيئات تعطى أعداد حقيقية (عالية) وذلك طبقا لبرنامج QC/QA والتقدير اما أن يكون:

1. 7 . 1 . 1 . التقدير باستعمال **البيئات العالية فى محتواها من المغذيات** مثل بيئة

Plate count agar (tryptone glucose yeast agar) . 1 . 1 . 1 . 7 . 1

وكانت شائعة الاستعمال فى الماضى. وهذه البيئة لا ينصح باستخدامها الا فى حالة استكمال عمل سابق مثل بحث أو لعمل دراسات مقارنه مع البيئات الأخرى . وذلك لأنها تعطى أعداد من البكتريا أقل من تلك التى تظهر على البيئات المنخفضة فى محتواها من المغذيات والتى سيرد ذكرها فيما بعد.

وتركيب بيئة Plate count agar كالآتى:

Tryptone	5.0 g
Yeast extract	2.5 g
Glucose	1.0 g
Agar	15.0 g
Reagent-grade water	1 L

Adjust pH at 7.0 +/- 0.2 after autoclaving for 15 min.

1 . 7 . 1 . 1 . 2 . باستعمال بيئة **m-HPC agar** وهى تستخدم فقط مع طريقة أغشية الترشيح Membrane Filter method والتى سيرد ذكرها فيما بعد وتركيب البيئة:

Peptone	20 g
Gelatin	25 g
Glycerol	10 mL
Agar	15 g
Reagent-grade water	1 L

تخلط فى ماء التحضير جميع المكونات عدا الجلسرين . يضبط pH عند 7.1 باستعمال الصودا الكاويه (1 نورمال) وتسخن ببط ء الى درجة الغليان فى حمام مائى للذوبان، يضاف الجلسرين ثم تعقم فى الأوتوكلاف على درجة 121 مؤيه لمدة 5 دقائق ويمكن عدم تعقيم البيئة مع الحرص فى الاستخدام لمنع التلوث.

1. 7 . 1 . 2 . التقدير باستعمال **البيئات المنخفضه فى محتواها من المغذيات** مثل:

بيئة **R2A agar** ويمكن استخدامها مع جميع الطرق المستخدمة فى تقدير العدد الكلى للبكتريا (الأطباق المصبوبه Poured plate method– طريقة الزرع السطحى Surface or Spread plate method– طريقة الأغشية الفارزة Membrane filter method). وهى تعطى أعداد أعلى من البيئتان السابقتان . وتركيب البيئة فى حالة عدم توافرها جاهزة هو:

Yeast extract	0.5 g.
Proteose peptone NO.3 or polypeptone	0.5 g.
Casamino acid	0.5 g.
Glucose	0.5 g.
Soluble starch	0.5 g
Dipotassium hydrogen phosphate K_2HPO_4	0.3 g
Magnesium sulfate heptahydrate $MgSO_4\ 7H_2O$	0.05 g
Sodium pyruvate	0.3 g.
Agar	15 g.
Reagent-grade water	1 L.

تضبط حموضة البيئة pH عند 7.2 باستخدام داى بوتاسيوم هيدروجين فوسفات K_2HPO_4 أو بوتاسيوم داى هيدروجين فوسفات $K\ H_2\ PO_4$ قبل اضافة الآجار . تسخن البيئة فى حمام مائى لاذابة الآجار وتعقم عند 121 مئوية لمدة 15 دقيقه.

أو بيئة **NWRI agar or Heterotrophic Plate Count Agar (HPCA)**

ويمكن استخدام هذه البيئة مع جميع طرق تقدير العد الكلى للبكتريا (الأطباق المصبوبه Poured Plate، الزرع السطحى Spread Plate، الأغشية الفارزةMembrane Filter Methods). وهى كبيئة منخفضة فى المغذيات تعطى أعداد عالية من البكتريا عن حالة استخدام ا لبيئات العالية المغذيات. وقد لا توجد هذه البيئة جاهزة التركيب لذا يمكن تحضيرها من مكوناتها التالية:

Peptone	3 g.
Soluble casein	0.5 g.
$K_2\ HPO_4$	0.2 g.
$MgSO_4$	0.05 g.
$FeCl_3$	0.001 g
Agar	15 g.
Reagent-grade water	1 L.

تضبط الحموضة عند pH 7.2 قبل التعقيم فى الأوتوكلاف لمدة 15 دقيقه عند 121 مئويه.

1 . 7 . 2 . أغشية الترشيح Membrane filter معقمة قطر 47 مم وثقوب Bores قطر 47, ميكرون.

1 . 7 . 3 . محاليل التخفيف Dilution solutions يمكن استعمال أحد المحاليل التالية فى التخفيف.

1 . 7 . 3 . 1 . ماء منظم Buffer water لتحضير Stock buffer solution

- اذب 34 جرام بوتاسيوم داى هيدروجين فوسفات ($KH_2 PO_4$) فى 500
- ملل ماء Reagent-grade water ويضبط pH عند 7.2 +/- 0,5 باستخدام محلول نورمال صوديوم هيدروكسيد ويخفف الى 1 بماء Reagent-grade water.
- أضف 1,25 ملل من المحلول السابق (Stock solution) و 5 ملل من محلول كلوريد المغنسيوم (81,1 جرام من $MgCl_2 .6H_2 O$) الى لتر reagent-grade water
- يوزع بكميات 99 +/- 2 ملل أو 9 +/- 0,2 ملل بعد التعقيم لمدة 15 دقيقة.

1 . 7 . 3 . 2 . ماء الببتون Peptone water

- حضر محلول 10% من الببتون فى ماء مقطر.
- خفف الى 1, % واضبط pH عند 6,8 . وزع بكميات 99 +/-2ملل أو +/- 2, ملل بعد التعقيم لمدة 15 دقيقة.
- لا تعلق البكتريا فى أى ماء تخفيف أكثر من 30 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة لأن الموت والنمو من الممكن أن يحدث.

1 . 8 . التحضين Incubation

للتطابق مع برنامج حماية البيئة الأمريكية فى أعمال المراقبة فان تحضين الأطباق يجب أن يتم عند 35 مئوية لمدة 48 ساعة. والا فيختار زمن ودرجة حرارة التحضين طبقا لما هو موافق عليه لمراقبة التغيرات فى نوعية المياه. أعلى أعداد يتحصل عليها بالتحضين عند 20 الى 28 مئوية بعد 5 الى 7 أيام.

خلال فترة التحضين حافظ على الرطوبة داخل الحضانة بحيث لا يكون هناك فقد فى رطوبة البيئة فى الأطباق أكثر من 15 %. ويعتبر ذلك مهما فى حالة فترة التحضين الطويلة. ويمكن توفير ذلك بوضع طبق به ماء فى قاع الحضانة مع مراعاة منع تكون صدأ على جسم الحضانة أو الأرف ولذلك يجب أن تكون من الصلب الغير قابل للصدأ Stainless steel أو الألومنيوم السالب Anodized aluminum. فى حالة الحضانات التى لم تعدل رطوبتها يمكن وضع اطباق البترى المزروعة فى أكياس بلاستيك أو آنية محكمة الغلق.

1 . 9 . عد وتسجيل النتائج Counting and Recording

1 . 9 . 1 . فى طريقة الأطباق المصبوبه أو طريقة الزراعة على سطح البيئة

Poured and Spread plates تعد جميع المستعمرات على الأطباق المختارة بعد انتهاء فترة التحضين. وفى حالة الاضطرار الى تأجيل عملية العد، تحفظ الأطباق عند درجة 5 – 10 مئوية لمدة لا تزيد عن 24 ساعه ولكن لا تجعل ذلك شيئا معتادا. وكذلك تسجل نتائج الأطباق المرجعية Control للتعقيم (من نفس البيئة وتحضن بدون تلقيح أو بتلقيحها بمحلول التخفيف والمستخدم فى عملية التخفيف اذا تم تخفيف العينه) فى تقرير لكل لوط من العينات.

ويتم عد المستعمرات الناتجة اما يدويا وباستعمال وسيلة تكبير موافق عليها مثل عداد المستعمرات Quebec Colony Counter. وفى حالة عدم توافر الجهاز يتم العد باستعمال أية وسيلة متوافرة مماثلة لاعطاء تكبير مع استعمال الاضاءة. وتتوافر وسيلة العد باستعمال عداد اوتوماتيكي، وفيه تستخدم شاشة تليفزيونية مع وجود ماسح الطبق لتكبير الخلايا. واستعماله مقبول اذا تم تقييمه ومقارنة النتائج بالعد اليدوى.

ولحقن الأطباق المعدة، يوضع بها حجم من العينة باستخدام ماصة يدويه أو أوتوماتيكيه بحيث يعطى بعد التحضين ما بين 30 – 300 مستعمرة فى الطبق. وقد يلجأ الى تخفيف العينة تخفيفات متتاليه مع استخدام أكثر من تخفيف فى حقن الأطباق وذلك للحصول على العدد فى الحدود المذكوره.

فى المعتاد أن لا يستخدم للاختبار اكثر من 2 ملل من العينه، على أنه فى حالة الحصول على أقل من 30 مستعمرة باستخدام 2 ملل من العينه يكتب العدد المتحصل عليه فعلا بصرف النظر عن القاعدة المذكوره (30-300). بهذا الاستثناء ، يؤخذ فى الاعتبار أى طبق يعطى عدد ما بين 30 -300 فى تقدير العدد. وتحسب الأعداد وتسجل النتيجه على صورة عدد المستعمرات / ملل من العينه Colony forming unit/ ml (cfu/ml).

$$\text{CFU/mL} = \frac{\text{colonies counted}}{\text{Actual volume of sample in dish, mL}}$$

اذا لم يتواجد طبق يعطى ما بين 30-300 مستعمره وتواجد طبق أو أطباق أكثر من 300 مستعمرة فيستعمل فى تسجيل النتيجه العد فى الأطباق ذات العدد الأقرب ما يمكن الى 300 مستعمره. وتحسب الأعداد كما ذكر أعلا ه وتسجل النتيجة أيضا على صورة CFU/ ml.

اذا لم تعطى الأطباق من جميع التخفيفات المختلفة المستعمله أية أعداد من البكتريا تكتب النتيجه أقل من واحد مقسوما على التخفيف فمثلا اذا كان حجم العينه المستخدم 0.01 ملل تكتب النتيجه أقل من 100 وحدة تكوين مستعمرة CFU /ملل.

اذا زاد العدد فى الطبق كثيرا عن 300 مستعمره لا تكتب النتيجة أعداد كبيره لا تعد "To numerous to count" (TNTC). تعد المستعمرات فى سم^2 من الطبق فاذا كانت أقل من 10 / سم^2 تعد المستعمرات فى 13 مربع تكون ممثله لتوزيع المستعمرات فى الطبق (7 مربعات عبر الطبق أفقيا، 6 مربعات عبر الطبق رأسيا مع الحرص فى عدم قراءة العدد فى مربع واحد مرتان) ويضرب حاصل الجمع فى 5 اذا كانت مساحة الطبق 65 سم^2 (الأطباق الزجاجية) ، ويحسب العدد على أساس أن مساحة الطبق 57 سم^2 فى حالة استعمال أطباق بلاستيك. عندما يزيد عدد المستعمرت عن 10 مستعمرات /سم^2 تعد 4 مربعات ويحسب المتوسط فى سم^2 ويضرب فى عامل مناسب لحساب المستعمرات فى الطبق. هذا العامل هو 65 فى حالة استعمال الأطباق الزجاجية ، 57 فى حالة استعمال الأطباق البلاستيكية.

عندما تكون الأطباق مزدحمة بالمستعمرات ويكون العدد أكبر من 100 مستعمرة فى سم^2 ، تسجل النتيجة أكبر من 6500 مقسومة على أقل حجم من العينة مستعمل فى حالة استعمال الأطباق الزجاجية أو أكبر من 7500 مقسومة على أقل حجم استعمل من العينة فى حالة الأطباق البلاستيك. وتسجل النتيجة على صورة وحدة تكوين المستعمرة CFU /ملل.

عند عد المستعمرات المنشورة بواسطة Spreader والمتداخلة على الطبق أو الأطباق المختارة ، عد المستعمرات على أجزاء ممثلة تكون المستعمرات فيها موزعة جيدا.

تعد المستعمرات المنشورة على أنها مستعمرة واحدة فى الحالات التالية: سلسلة من المستعمرات والتى تظهر كأنها ناشئة من تفتيت تجمع من البكتريا Bacterial clump والتى يكون فيها الآجار مختلطا مع العينة؛ الانتشار الناتج كفيلم من النمو بين الآجار وقاع الطبق؛ المستعمرة التى تنشأ على صورة فيلم من المياه عند الحافة أو على سطح الآجار. الحالتان

الأخيرتان تنشا عن تجمع الرطوبة عند نقطة منها ينشأ الانتشار. كثيرا ما تغطى أكثر من نصف الطبق وتعيق الحصول على عدد حقيقى.

تعد كمستعمرات منفردة المستعمرات التى تكون متجاورة جدا ولكنها ليست متلامسة، على ان تكون المسافة بينها على الأقل مساوية لقطر أصغر مستعمرة. عد المستعمرات المتلامسة التى تختلف فى المظهر، مثل الشكل أو اللون كمستعمرات منفردة.

اذا احتوى الطبق على نمو مبعثر أكتب فى التقرير Spreader (Spr). وعندما تكون الأطباق لا يمكن عدها لأنه لم يتم الوصول الى التخفيف المناسب ، سقوط الأطباق، تلوث، أو أن الأطباق المرجعية Control أظهرت أن البيئة ملوثة أو أن التعقيم لم يتم بنجاح يكتب فى التقرير Laboratory accident (LA).

1 . 9 . 2 . طريقة أغشية الترشيح Membrane filter method

عد المستعمرات على أ غشية الترشيح باستعمال ستريوسكوبيك ميكروسكوب Stereoscopic microscope بقوة تكبير 10 الى 15 مرة. يفضل وضع الطبق مائل بزاوية 45 درجة على مسرح الميكروسكوب ويضبط مصدر الضوء رأسيا على المستعمرات. أفضل كثافة للمستعمرات على غشاء الترشح 20 الى 200. اذا كانت المستعمرات صغيرة ولكنها ليست مزدحمة فان حدود أكبر من السابقة تعتبر مقبولة.

عد كل المستعمرات على غشاء الترشيح عندما يكون هناك أقل أو يساوى مستعمرتان فى المربع. وعندما يكون هناك ما بين 3 الى 10 مستعمرات فى المربع عد 10 مربعات واحصل على المتوسط لكل مربع . أما اذا كان هناك 10 الى 20 مستعمرة فى المربع عد 5 مربعات واحسب المتوسط / المربع. يضرب المتوسط X 100 ويقسم على حجم العينة للحصول على العدد / ملل. واذا كان هناك أكثر من 20 مستعمرة فى المربع يكتب العدد أكبر من 2000 ويقسم على حجم العينة. يكتب متوسط العدد بتمييز وحدات تلكوين المستعمرات محسوبة.

1 . 10 . حساب وتسجيل الأعداد Computing and Reporting Counts

اصطلاح وحدات تكوين المستعمرة Colony –forming units (CFU) هو وصف للطرق المستخدمة؛ لذلك، تسجل كل الأعداد على صورة وحدات تكوين المستعمرة. ويذكر فى التقرير الطريقة المستخدمة، حرارة التحضين والزمن، والبيئة. مثلا :

CFU/ml, pour plate method, 35^{o} C/48 h, plate count agar.

ولحساب عدد البكتريا لهتيروتروفية CFU/ml، يقسم العدد الكلى للمستعمرات أو المتوسط (اذا تم عمل طبقان من نفس التخفيف) / طبق بنفس الحجم. سجل حجوم العينة المستعملة وعدد المستعمرات على كل طبق تم عده أو حسابه.

اذا كان العدد الناتج مكون من رقمان فيكتب كما هو أما اذا كان ثلاثة أرقام فينظر الى الرقم الثالث اذا كان أقل من 5 يحول الى صفر واذا كان أكبر من 5 يحول الرقم الثانى الى العدد

الأعلى ويكتب الرقم الثالث صفر فمثلا 142 تكتب 140 ، 155 يحول الى 160 أما 35 فيكتب كما هو 35.

1 . 11 . تحليل التحيز Analytical bias

يتجنب عدم الدقة فى العد بسبب عدم الاهتمام، عدم نظافة أجهزة العد وبالتالى حجب الرؤية، أو عدم امكانية تمييز المستعمرات. العاملين فى المعمل والذين لا يستطيعون جعل الفروق بين قراءتان من نفس الطبق فى حدود 5% والفروق نتيجة التحليل بواسطة فرد آخر فى حدود 10% عليهم بحث المسببات وازالتها.

2 . طريقة الأطباق المصبوبة Poured Plate Method

2 . 1 . العينات وتجهيز العينة Samples and sample preparation

سبق تناول ذلك فى الجزئ الأولى من المحاضرات Module 1

2 . 2 . تخفيف العينة Sample dilution

حهز محلول التخفيف كما ذكر فى 1 . 7 . 3

2 . 2 . 1 . اختيار التخفيف Selecting dilution اختار التخفيف على أن يكون العدد الكلى للمستعمرات على الطبق ما بين 30 – 300. مثلا، عندما يكون العد د المتوقع للبكتريا الهتيروتروفية مرتفع الى 3000، حضر الطبق من تخفيف 10^{-2}.

بالنسبة لغالبية عينات مياه الشرب، فان الأطباق المناسبة للعد ربما تنتج عن استعمال املل، و 1, ملل من العينة الغير مخففة و 1 ملل من تخفيف 10^{-2}.

2 . 2 . 2 . قياس حجم العينة Measuring sample volume استعمل ماصة معقمة لنقل الأصل والنقلات التالية من كل زجاجة . اذا تلوثت الماصة قبل اتمام عملية النقل بدل الماصة بأخرى معقمة . استعمل ماصة أخرى للنقل من كل تخفيف . لا تقوم بتحضير التخيفات أو تصب الأطباق فى الشمس المباشرة. خذ الحذر عند أخذ الماصة المعقمة من علبة الماصات، ولمنع التلوث، لا تجعل نهاية الماصة تلمس فوهة الماصات الأخرى عند سحبها من علبة الماصات ، كذلك لا تلامس نهاية الماصة لحواف او رقبة زجاجات التخفيف. عند سحب عينة لا تغمس الماصة أكثر من 2,5 سم أسفل سطح العينة فى زجاجة العينة أو التخفيف.

2 . 2 . 3 . قياس التخفيفات Measuring dilutions

عند اخراج أجزاء العينة، اجعل الماصة بزاوية حوالى 45 درجة وطرف الماصة يلمس قاع الطبق أو داخل رقبة زجاجات التخفيف . ارفع غطاء الطبق بدرجة تسمح بادخال الماصة . اسمح بثانيتين الى أربعة ثوان ليخرج ما فى الماصة. اذا لم تكن الماصة من النوع الذى يخرج كل ما بها طبيعيا، المس بطرف الماصة جزء آخر جاف من قاع الطبق . ليس من المفضل أن يكون بالماصة قطعة قطن وينفخ فيها برفق بالفم لانزال ما بها من متبقى. عند قياس 1, ملل ، دع العينة المخففة تنساب من الماصة حتى يخرج منها 1و ملل. ترفع الماصة بدون أن تلامس الطبق مرة أخرى. يوضع الحجم المناسب من العينة أو تخفيفها فى الطبق المعقم قبل اضافة بيئة الزرع المنصهرة . ولاستعمال أقل من 1و ملل من العينة استعمل سلسلة من التخفيفات ولا تقيس 1, ملل من العينة الأساسية . حضر على الأقل مكرران من الأطباق لك ل تخفيف مستعمل. بعد وضع العينة أو التخفيف منها فى الأطباق، تصب البيئة واخلط برفق وبحرص . لا يجب أن يمر أكثر من 20 دقيقة ما بين وضع العينة فى الطبق وصب البيئة فى الأطباق على العينة.

2 . 3 . اعداد الأطباق Plating

2 . 3 . 1 . صهر البيئة Melting medium

اصهر البيئة الصلبة المعقمة بتعريضها لماء يغلى أو تيار من بخار الماء فى اناء مغطى جزئيا، تجنب التعريض الغير ضرورى للبيئة لمدة طويلة للحرارة المرتفعة اثناء الصهر أو بعده. لا تعيد تعقيم البيئة. اذا تم صهر البيئة على صورة اجزاء استعمل ما تم وصوله لدرجة الانصهار بالترتيب. يتخلص من الآجار المنصهر الذى يحتوى على رواسب.

تحفظ البيئة المنصهرة فى حمام مائى عند 44 – 46 درجة مئوية حتى وقت الاستعمال، ويفضل أن لا تزيد مدة الحفظ فى الحمام أكثر من 3 ساعات. وفى اناء آخر ضع ترمومتر فى مياه وعرض الاناء لنفس درجات الحرارة التى تت عرض لها البيئة سواء عند انصهارها أو حفظها. لا تعتمد على الاحساس باللمس لمعرفة درجة حرارة البيئة المناسبة وذلك عند صب الآجار.

استعمل أى من Plate count agar, R2A agar, or NWRI agar كما ذكر سابقا فى 1 . 7 . 1 . 2 . قبل استعمال لوط جديد من البيئة اختبر مدى مناسبتها.

2 . 3 . 2 . صب الأطباق Pouring plates

حد من عدد العينات التى ستعد فى الاطباق بحيث لا يمر أكثر من 20 دقيقة ويفضل 10 دقائق ما بين تخفيف العينة وصب الأطباق. يصب ما بين 10 – 12 ملل من البيئة المنصهرة والمحفوظة عند درجة ما بين 44 – 46 مئوية فى كل طبق بفتح غطاء الطبق بدرجة تسمح بصب البيئة فيه . بحذر امنع تساقط البيئة خارج دورق البيئة أو داخل غطاء الطبق أثناء الصب. وعند صب البيئة من الدورق أو الانبوبة المحفوظة فى الحمام المائى، جففها بورق ماص أو فوطة وسخن فوهة الدورق قبل الصب . ومع صب كل طبق اخلط البيئة ا لمنصهرة مع العينة فى الطبق وخذ الحذر من انسياب البيئة مع العينة فوق حافة الطبق. حرك الطبق الى الأمام والخلف والى اليمين واليسار ثم مع عقارب الساعة وعكسه . يترك الطبق ليتصلب (خلال 10 دقائق). وبعد تصلبها اقلب الأطباق وضعها فى الحضانة.

2 . 3 . 3 . مرجعية التعقيم Sterility controls

راجع تعقيم البيئة ومياه التخفيف بصب أطباق مرجعية لكل سلسلة من العينات . حضر مرجعيات اضافية لتقدير التلوث بالنسبة للأطباق ، الماصات، وهواء الغرفة.

2 . 4 . التحضين Incubation

2 . 5 . العد، التسجيل، الحسلب والتقرير

Counting, recording, computing, and reporting

3 . طريقة النشر على الأطباق (الفرد السطحى على الأطباق) Spread Plate Method

3 . 1 . الأجهزة المعملية Laboratory apparatus

3 . 1 . 1 . قضبان زجاجية Glass rods

اثن قضبان زجاجية مصقولة Polished قطر 4 مم وبطول 200 مم بالنار بزا وية 45 درجة من بعد 40 مم من أحد الأطراف. عقمها قبل الاستعمال

3 . 1 . 2 . ماصات Pipet

استعمل ماصات زجاجية، 1 ملل، طرفها مستدير Rounded tip. لا تستعمل الماصات البلاستيكية.

3 . 1 . 3 . حضانة أو فرن تجفيف Incubator or drying oven

Fischer Scientific, hand operated, No 08-758 or Lab-Line, motor driven, No. 1580, or equivalent.

3 . 2 . البيئات Media

اذا استعملت بيئة R2A فان أفضل نتائج يتحصل عليها بالتحضين عند 28 مئوية لمدة 7 أيام؛ واذا استعملت بيئة NWRI، فالتحضين يتم عند 20 درجة مئوية لمدة 7 أيام.

3 . 3 . تجهيز الأطباق Preparation of plates

يصب 15 ملل من البيئة المرغوبة فى أطباق بترى معقمة 100 X15 أو 90 X15 ؛ ويترك الآجار ليتصلب . ألاطباق المقلوبة والمغطاه سابقة التجفيف يكون الفقد فى الرطوبة خلال الليل 2 – 3 جرام (انظر الشكلين التاليين والجدول).

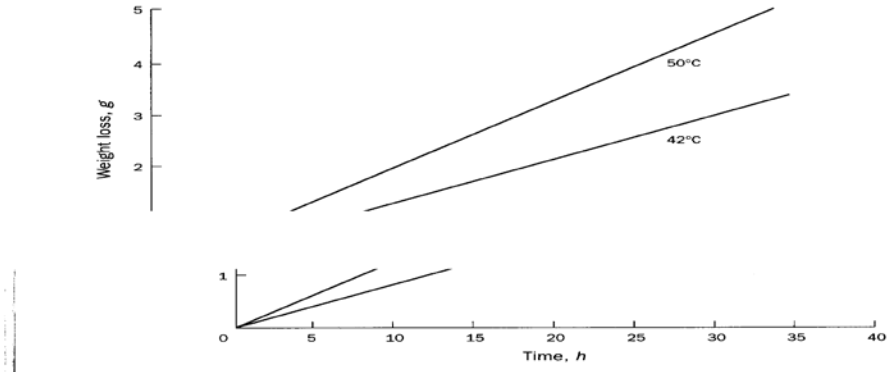
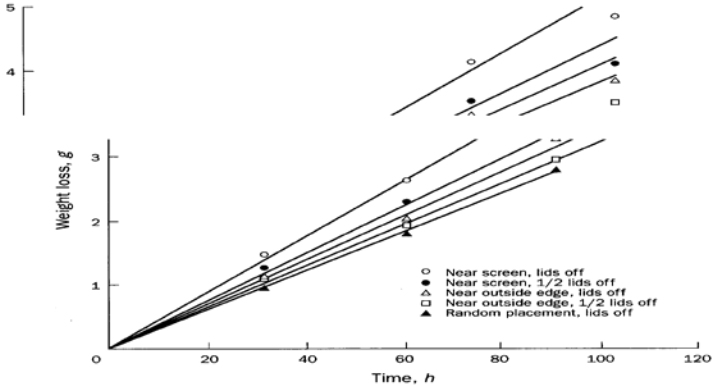


Figure 9215:2. Drying weight loss of 15-mL agar plates stored separately, inverted with lids on. Source: Unpublished data. Water Purification Lab., Chicago Dep. Water.



°C), relative

Figure 9215:3. Weight loss of 25-mL agar plates (100 × 15 mm) dried separately in a laminar-flow hood at room temperature (24 to 2€ humidity (30 to 33%), and air velocity 0.6 m/s. Source: Unpublished data. Alberta Environmental Centre, Vegreville, Alta.

TABLE 9215:I. EFFECT OF TEMPERATURE OF DRYING ON WEIGHT LOSS OF 15-mL AGAR PLATES STORED SEPARATELY*

Temp. °C	Time for Plates to Lose 1 to 4 g of Water (Avg. for 5 Plates) h							
	Plates Inverted with Lids On				Plates Inverted with Lids Removed			
	1 g	2 g	3 g	4 g	1 g	2 g	3 g	4 g
24	32	64	95	125	3.7	7.0	10.5	14.0
37	17	35	51	67	1.7	3.5	5.3	7.0
50	6	12	18	24	0.7	1.3	1.9	2.7
60	4	8	12	16	—	—	—	—

* Referenced in Canada Centre for Inland Waters Manual, Burlington, Ont.

استعمل الأطباق سابقة التجفيف فورا عقب تجفيفها أو خزنها الى اسبوعين فى أكياس بلاستيك محكمة الغلق عند 4 درجة مئوية . وبالنسبة للأطباق سابقة التجفيف والمستعملة فى نفس اليوم، صب 25 ملل آجار فى الطبق ويجفف فى كابينة الأمان Laminar flow عند درجة حرارة الغرفة (24 – 26 درجة مئوية) مع رفع الغطاء للحصول على فقد 2 – 3 جرام .

3. 4 . الطريقة Procedure

حضر تخفيفات العينة كما هو منين فى البنود سابقه الذكر .

ضع 1, - 5, ملل من العينة على سطح أطباق الآجار سابق التجفيف . استعمل قضيب زجاج منحنى معقم، وزع الكمية من العينة على سطح البيئ ة اما بادارة الطبق يدويا أو على قاعدة دوارة. دع الطبق ليتم الامتصاص قبل التحضين.

3 . 5 . التحضين Incubation

3 . 6 . العد، التسجيل، الحساب، والتقرير

Counting, Recording, Computing, and Reporting

4 . طريقة أغشية الترشيح Membrane Filter Method

4 . 1 . الأدوات المعملية Laboratory Apparatus

استعمل أدوات زجاجية وأية أدوات أخرى تتركب من مواد خالية من العوامل التى ربما تؤثر على نمو البكتريا.

4 . 1 . 1 . زجاجات العينات Sample bottles

راجع مذكرات QC/QA

4 . 1 . 2 . زجاجات التخفيف Dilution bottles

راجع مذكرات QC/ QA

4 . 1 . 3 . الماصات والخبار المدرج Pipets and graduated cylinders

راجع مذكرات QC/QA. قبل التعقيم، اغلق بطريقة غير محكمة المخابير باستعمال ورق الومنيوم أو ورق كرافت مقاوم للحرارة وبعد التعقيم احكم غلقها لمنع التلوث.

4 . 1 . 4 . عبوات بيئة الزرع Containers of culture medium

استعمل دوارق من زجاج البوروسليكات. يمكن استعمال أى شكل وأى حجم، ولكن الدوارق المخروطية ذات الغطاء المعدنىن مع التغطية بورق الومنيوم، أو بالغطاء القلاووظ تسمح بالخلط للبيئة المحتوية عليها ومناسبة للتخزين.

4 . 1 . 5 . أطباق الزرع Culture dishes

استعمل أطباق زجاجية من نوع البوروسليكات أو أطباق بلاستيك معقمة، 60 X15 مم، 50 X9 مم، او حجم آخر مناسب. لف عدد مناسب من الأطباق الزجاجية فى ورق الومنيوم (أو علب معدنية) للتعقيم فى الفرن الجاف، أو ورق كرافت قوى عند التعقيم فى الأوتوكلاف.
حضن الأطباق الغير محكمة الغلقسواء كانت زجاجية أو بلاستيك فى اناء محكم به قطعة قماش أو ورق مبللة لمنع
تبخر الرطوبة والتى تؤدى الى جفاف بيئة الزرع وللمحافظة على بيئة رطبة لتوفير أفضل ظروف لظهور المستعمرات .الأطباق البلاستيك سابقة التعقيم ذاتالغطاء المحكم والتى تتمتع بالمواصفات السابقة متوافرة تجاريا ومنتشرة الاستعمال.
يعاد غلق الأكياس البلاستيك المحتوية على الأطباق البلاستيك المعقمةوالتى لم تستعمل للتخزين.

4 . 1 . 6 . وحدات الترشيح Filtration units

وحدات الترشيح من الزجاج، البلاستيك القابل للتعقيم، البورسلين، أو الاستنلس ستيلوالتى تتركب من قمع يثبت على قاعدة بواسطة مشبك أو بقوة مغناطيسية . التصميم يجب أن يسمح بوضع غشاء الترشيح على الجزء المنفذ بدون احتمال لتل ف الغشاء ويسمح لكل المحاليل بالمرور من خلال الغشاء خلال عملية الترشيح . القمع البلاستيكى ذا الشقوق والخدوش العميقة من الداخل يستبعد والقمع الزجاجى الخشن والذى تظهر به قشور يستبعد هو الآخر من الاستعمال.

لف الوحدة (جميعها أو على أجزاء) فى ورق قوى (كرافت) او ورق الومنيوم ، عقم فى الأوتوكلاف وخزن الى وقت الاستعمال . وكبديل يمكن تعريض كل السطوح السابق تنظيفها للأشعة الفوق بنفسجية لمدة دقيقتان وذلك قبل الاستعمال أو لاعادة الاستعمال وبين كل عمليتان للترشيح . والوحدات التى تستخدم فى الحقل يمكن تعقيمها من خلال رشها بالكحول وبعد ذلك تشعل، أو بغمرها فى ماء يغلى، وتبرد الى درجة حرارة الغرفة قبل الاستعمال. لا تشعل الأجزاء البلاستيكية . ويمكن التخلص من الوحدات البلاستيكية التى تستخدم فى الحقل لأنها عادة تستخدم لمرة واحدة.

وللترشيح، توصل الوحدة بدورق ترشيح (بوخنر) 1 لتر أو أية وسيلة أخرى تستقبل ناتج ترشيح 3 – 6 مرات متتالية وبحيث يتوافر Pressure differential (kPa) مقداره 34 – 51 على غشاء الترشيح . صل الدورق بخط تفريغ، وباستعمال طلمبة تفريغ كهربائية، أو طلمبة تعمل على صنبور الماء Water pump ويتولد التفريغ نتيجة تيار الماء ا لمندفع خلالها، ويمكن استعمال أية وسيلة أخرى توفر Pressure differential(kPa) قدره 138 – 207 . صل فلاسكة بنفس الحجم بين دورق الترشيح ومصدر التفريغ كمصيدة للماء المرتد.

4 . 1 . 7 . غشاء الترشيح Membrane filter

استعمل أغشية ترشيح (راجع مذكرة QC/QA) ذات ثقوب تمنع مرور كل البكتريا (حسب نوعية البكتريا التى يراد حجزها). استعمل الأغشية التى خضعت لاختبارات والمصحوبة بشهادات من المصنع على أنها تحجز كل الكائنات التى يتم زراعتها، والثابته فى الاستعمال، خالية من الكيماويات التى يمكن استخلاصها والتى من الممكن أن يكون ل ها تأثير قاتل على البكتريا ، وينتج عنها سرعة ترشي مناسبة (5 دقائق) ولا تؤثر معنويا على pH البيئة (+/- 2, وحدة) ، ولا زيادة فى أعداد المستعمرات المدمجة أو المنتشرة مقارنة بأغشية مرجعية . استعمل أغشية مقسمة بخطوط ولاحظ أن مادة الخطوط لا تسبب تشجيع أو تثبيط لنمو البكتريا (على نفس الخط) عند وضع الغشاء على البيئة المناسبة مع التحضين. يفضل استعمال أغشية حديثة الصنع واذا اضطررت الى التخزين غان المكان لا يجب أن يكون مرتفع الحرارة أو الرطوبة . ولا تخزن أكثر من سنه وبالتالى فام طلبك يكون بناء على الاستعلاك لمدة عام . ويقضل الأغشية سابقة التعقيم وتكون وسيلة التعقيم لا ينتج عنها سمية أو تؤثر على الخواص الكيميائية أو الطبيعية للأغشية (بشهادة من المنتج). واذا كان التعقيم يتم فى المعمل فانه يتم فى الأوتوكلاف عند 121 مئوية ولمدة 10 دقائق. فى نهاية فترة التعقيم يفرغ البخار بسرعة للحد من تكثف البخار على الأغشية.

4 . 1 . 8 . الوسادات الماصة Absorbent pads

راجع مذكرة QC/QA

4 . 1 . 9 . الملقط Forceps

راجع مذكرة /QC

4 . 1 . 10 . الميكروسكوب ومصدر الاضاءة Microscope and light source

راجع مذكرة /QC

4 . 2 . البيئات Media

استعمل بيئة m-HPC agar أو البديل R2A أو NWRI agar.

4 . 3 . تجهيز الأطباق Preparation of plates

وزع 5 ملل من البيئة المعقمة فى أطباق بترى 50 X 9 مم . تترك لتتجمد عند درجة حرارة الغرفة. الأطباق المحضرة ربما تخزن مقلوبة فى أكياس بلاستيك أو وعاء محكم فى الثلاجة لمدة أقصاها اسبوعان.

4 . 4 . حجم العينة Sample size

حجم العينة الذى يتم ترشيحه يختلف حسب نوعية العينة . اختار حجم العينة الذى ينتج عنه ما بين 20 – 200 وحدات تكوين المستعمرة Colony forming units على الغشاء جميعه.

4 . 5 . الطريقة Procedure

رشح الحجم المناسب خلال غشاء معقم بقطر 47 مم وثقوب Pores بقطر 45, ميكرون ومقسم بخطوط، تحت تفريغ . اغسل القمع بمقدار 20 – 30 ملل 3 مرات متتالية من ماء التخفيف المعقم. ضع الغشاء على البيئة فى كبق البترى.

4 . 6 . التحضين Incubation

ضع الأطباق فى صندوق محكم أو أكياس ب لاستيك بها فوطة ورقية مبللة . حضن عند 35 +/- 2و درجة مئوية لمدة 48 ساعة فى حالة استعمال بيئة m-HPCو عند 20 – 28 درجة مئوية لمدة 5 – 7 أيام فى حالة استعمال بيئة R2A agar or NWRI agar

4 . 7 . العد، التسجيل، الحساب، والتقرير

Counting, Recording, Computing, and Reporting

راجع البند 1 . 9 و 1 . 10. وتسجل النتيجة على الصورة التالية

CFU/ml., membrane filter method, time, medium.

5 . العد الكلى المباشر للميكروبات Direct Total Microbial Count

5 . 1 . مقدمة Introduction

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

5 . 2 . Epifluorescence Microscopic Method

5 . 2 . 1 . مناقشة عامة General Discussion

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

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

5 . 2 . 2 . الأجهزة Apparatus

5 . 2 . 2 . 1 . ميكروسكوب Microscope

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

5 . 2 . 2 . 2 . عينية للعد Counting graticule

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

5 . 2 . 2 . 3 . مرشحات Filters وتشمل فلاتراثارة Excitation filters (KP 400 and LP 455) ، شاطر أشعة Beam splitter(LP 510) وفلتر حاجز Barrier filter

(LP 520 using mercury lamp, HBO 50).

5 . 2 . 2 . 4 . خلاط أو جهاز فورتكس Blender or vortex mixer

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

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

5 . 2 . 2 . 7 . سرنجات Syringes 3 ملل لا يعاد استعمالها ويركب عليها فلاتر 2, ميكرون ولا يعاد استخدامها أيضا.

5 . 2 . 2 . 8 . أنابيب اختبار Test tubes زجاجية بغطاء قلاووظ 13 X125 مم.

5. 3 . الدلائل أو الكشافات Reagents

5 . 3 . 1 . محلول فوسفات منظم **Phosphate** buffer أذب 13,6 جرام KH_2PO_4 فى ماء وخفف الى ا لتر . أضبط عند pH 7 ؛ رشح خلال غشاء ترشيح 2, ميكرون.

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

5 . 3 . 3 . فلوركروم **FDluorochrome** 1, % (حجم/ وزن) اكريدين برتقالى فى محلول فوسفات منظم .

5 . 3 . 4 . زيت للعدسة الزيتية منخفض التوهج Immersion oil, low fluorescing

5 . 4 . الطريقة Procedure

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

وزع وخفف عينات من مصادر mesotrophic or eutrophic للحصول على نتائج . اخلط عينهباستعمال خلاط أو فورتكس، وخفف 10/1 فى محلول فوسفات منظم . عينات المياه الرقية ربما لا تحتاج الى تخفيف ولكن الحجوم الكبيرة (أكبر من 100 ملل) ربما يحتاج اليها للحصول على أعداد حقيقية.

ضع 1 ملل من العينة أو تخفيف منها على مرشح بولى كربونات غير متوهج nonfluorescent مدعم بغشاء سليولوزى Cellulosic membrane filter فى Filter holder . باستعمال فلاتر تركب على سرنجة، أضف 1 ملل فلوركروم وانتظر دقيقتان، أضف حوالى 3 ملل محلول منظم من الفوسفات المرشح للسماح بتوزيع أكثر للخلايا . وكبديل، اخلط الفلوركروم مع العينة فى انبولة صغيرة، واسح بالتفاعل، أضف خليط الى Filter holderرشح بالتفريغ (حوالى 13 kPa) . اغسل باستعمال 2 ملل من الفوسفات

المنظم ورشح. أزل مرشح البولى كربونات بملقط وجفف هوائيا لمدة 1 – 3 دقيقة. يمكن قطع الفلتر الى 4 أجزاء ويحفظ اذا لزم. ضع الفلتر المجفف على نقطة من الزبت Immersion oil على شريحة ميكروسكوب نظيفة. أضف نقطة صغيرة من نفس الزيت على سطح الفلتر. بلطف غط الفلتر بغطاء شريحة Cover. يمكن تخزين العينة بضع شهور بدون فقد للتوهج Fluoresence.

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

5 . 5 . الحسابات Calculations

احسب المتوسط لاعداد الخلايا على الفلتر.

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

الفصل الثـــالث

استخدام كشافات التلوث الميكروبية لتقييم سلامة المياه

الفصل الثالث

استخدام كشافات التلوث الميكروبية لتقييم سلامة المياه

1 . مقدمه

ظهرت الحاجة إلى تقدير صلاحية المياه للشرب والاستخدامات الأخرى منذ عام 1855 عندما تم الربط بين ظهور وبائي حمى التيفويد والكوليرا وتلوث المياه بالمخلفات البرازيه (Moore, 1974) ولتأكيد أن نوعية المياه مقبولة من ناحية الصحة العامة، اصبح من الضروري إيجاد طرق بسيطة تعطى نتائج حقيقية وفى نفس الوقت سريعة للكشف عن وتنمية الميكروبات المرتبط تواجدها بالتلوث البرازي. وإذا أخذ في الاعتبار أن الممرضات ليس من السهل الكشف عنها أو زراعتها روتينيا فهى تحتاج الى خبرة عالية لتمييزها وتأكيد تواجدها ولو أضفنا الى ذلك الحاجة الى وقت طويل للكشف عنها كما أن فرصة حدوث عدوى بها أثناء التعامل معها قائما كل ذلك يؤيد أنه ليس من الممكن أن يوصى باستخدام الميكروبات المرضية للكشف عن سلامة مياه الشرب. على ذلك ظهرت وتطورت طرق لتقدير تواجد كائنات برازيه أخرى، بحيث اذا غابت تلك الكائنات التى أطلق عليها الكشافات أو الأدلة، فان احتمال تواجد الكائنات المرضية فى المياه يكون بسيط. هذا المفهوم للكشاف أو الدليل الميكروبى "Indicator organism" ادخل عام 1892 والآن هو أساس وضع المعايير الميكروبية للمياه.

ولازال هناك حالات وبائية معوية وكذلك أمراض انتهازيه "Opportunistic diseases" ناشئة عن ميكروبات متولدة عن المياه "Water-borne microorganisms" بين الشعوب المتقدمة والتى تستخدم تكنولوجيات متقدمة فى المعالجة وبرامج للاختبار معقده. وغياب الكشاف الميكروبى لا يعنى غياب البكتريا الانتهازية أو الفيروسات بصفة قاطعة (EPA, 1986) كذلك الأوليات الطفيلية مثل الجياردیا "Giardia lamblia" (Bellamy et al., 1985 and Lin,1985) والكربتوسبوريديم "Cryptosporidium" (Sterling,

1987)، والتى ربما هى أكثر مقاومة للتطهير. وخصائص نوعية المياه الأخرى مثل العكاره يجب أن تراقب لتاكيد سلامة مياه الشرب.

2. الكشافات أو الأدلة الميكروبية "Indicator Organisms"

2 . 1 . تعريف

فى السنوات الحديثة، أدرك أنه للتنبؤ بالمخاطر الصحية من خلال كائن كشاف أو دليل "Indicator" فانه يلزم أن تتوافر فى ذلك الدليل عدة خصائص (Dutka, 1975) :

- يلزم أن يرتبط بصفة دائمة وعلى وجه الحصر أو القصر مع الكائنات المرضية المعوية.
- يلزم ان تتواجد بأعداد أكبر من الممرضات.
- يجب أن تكون أكثر مقاومة للمؤثرات البيئية المثبطة ويمتد بقائها ل مدة أكبر من الممرضات.
- يجب أن لا تتكاثر فى البيئة.
- يجب أن تتواجد طرق بسيطة، يعول عليها وغير مكلفة للكشف، تنمية وتصنيف الكائن المستخدم ككشاف أو دليل من المعروف أن الممرضات المعوية تسبب أوبئة من الأمراض المعوية وكثيرا ما تنتمى الى عائلةُ Enterobacteriaceae وتشمل السالمونيلا (Salmonella)، الشيجيلا(Shigella) ، اليارسينيا (Yarsinia enterocolitica)، الكليبسيلا (Klebsiella pneumoniae)، الانتيروباكتر(Enterobacter) وايشيريشيا كولاى المنتجة للتوكسين (E.coli enteropathogenic).

وهناك اثنين آخران من الممرضات المعوية هما فبريو كوليرا (Vibrio cholerae) وكامبيلوباكتر(Campylobacter jejuni)(Krieg, 1984). الأمراض المتسببة عن هذه الكائنات تنتشر عن طريق المياه الملوثة بمواد برازيه من الإنسان أو الحيوانات أخرى من ذوات الدم الدافئ . ولكى يكون كائن أو مجموعة كائنات دليل معول علي ه كدليل على امكانية تواجد الممرضات المعوية فى مصدر للماء، فان الدليل يجب أن يكون على وجه القصر أو الحصر من مصدر برازى ويتواجد باستمرار فى المخلفات البرازية الطازجة . الحاجة الى طريقة بسيطة ومعول عليها للكشف والتنمية ادت الى استعمال دلائل من

مجموعات البكتريا والتى تشتمل على الأجناس المحددة المطلوبة . والكائنات المستخدمة كدلائل على التلوث تشمل البكتريا القولونيه (Coliform) ، البكتريا السبحية البرازيه (Fecal streptococci , Enterococci) والبكتريا المختزلة للكبريتيت "Sulfite Reducing Bacteria" مثل كولستريديم بيرفرنجنس (Clostridium perfringens).

3 . بكتريا القولون كدليل على التلوث

3. 1 . مقدمة

فى عام 1885، اكتشف ايشيرش (T.Escherich) جنس من البكتريا يتواجد عالميا فى المواد البرازية الآدميه. هذه البكتريا لا تتواجد فقط بكثافة عالية ولكن كثيرا ما ترتبط ببكتريا التيفويد العصوية (Salmonella typhi). واعطيت تلك البكتريا التى اكتشفها ايشريش اسم ايشيريشيا كولاى

Escherichia coli (Escherich, 1885). وهى جزء مصدره برازى من مجموعة بكتريا القولون أو بكتريا كولى أورجينيز (coli-aerogenes).

بكتريا القولون تنتمى تقسيميا الى عائلة انتيروباكتريسى (Enterobacteriaceae)، وجميعها بكتريا خلاياها عصوية الشكل، لا تكون جراثيم (non-spore-forming)، سالبة لصبغة جرام. بكتريا محددة من هذه العائلة تنتمى الى أجناس (genera) ايشيريشيا (Escherichia)، ستروباكتر (Citrobacter)، كلبسيلا (Klebsiella) وانيتوروباكتر (Enterobacter) وجميعها لها القدرة على النمو فى وجود أملاح الصفراء (Bile salts) أو غيرها من المواد ذات النشاط السطحى (Surface active agents) وهى قادرة على تخمير سكر اللاكتوز عند 35 أو 37 درجة مئوية مع انتاج حامض وغاز والدهيد (Aldehyde) خلال 24-48 ساعة كذلك سالبة للانزيم المؤكسد للسيتوكروم (Cytochrome-oxidase).

اعتمادا على هذه الخصائص، حددت منظمة الصحة العالمية بكتريا القولون على أنها بكتريا عصوية الشكل، لا تكون جراثيم، سالبه لصبغة جرام، قادرة على النمو فى وجود أملاح الصفراء أو غيرها من المواد ذات النشاط السطحى وسالبة لانزيم أكسدة السيتوكروم وقادرة على تخمير سكر اللاكتوز عند 35 أو 37 درجة مئوية مع انتاج حامض، غاز والدهيد خلال 24-48 ساعة (WHO,1985).

وكمجموعة كشفية، فان عدد بكتريا القولون الحية لا ترتبط دائما بتواجد التلوث . أعداد بكتريا القولون المرتفع ة يمكن أ ن تنشأ من تواجد الكلبسيلا (Klebsiella)، ستروباكتر (Citrobacter) وغيرها من لكائنات التى ليست من اصل برازى والتى ليس من الضرورى أن يكون لها أثر سلبى أو مخاطر على الصحة نتيجة استهلاك تلك المياه . وفى دراسة أجريت على مياه بئر وجد (McFeters et al., 1974) أن الوقت اللازم لانخفاض أعداد بكتريا القولون الى النصف بلغ 17 ساعة بينما انخفضت تلك الفترة الى 6 و 7,2 ساعة فى حالة البكتريا المرضية ممثلة فى كلا من السالمونيلا (Salmonella typhi) والكوليرا (Vibrio cholera). هذه البيانات أيدت فعالية بكتريا القولون كدليل على غياب تلك الكائنات المرضية. وظهرت عديد من الحالات تم فيها عزل ممرضات فى غياب بكتريا القولون أو فى تواجد أعداد منخفضة جدا منها . وظهرت حالات وبائية متسببة عن تواجد السالمونيلا و الشيجيلا (Salmonella typhimurium, Shigella flexneri and Shigella Heidelberg) فى المياه مع عدم تواجد بكتريا القولون أو تواجدها باعداد قليلة

(Dutka,1975; Boring et al.,1971; Muller,1964 and Seligman&

Reitler,1965).

وعلى الرغم من أن هذه ا لحالات النادرة من انتشار الأوبئة المشار اليها تتمشى مع ما سبق ذكره بواسطة (McFeters et al., 1974) فلقد افترض أن غياب بكتريا القولون يرجع الى الطريقة التى استخدمت وليست هذه هى الحالة الحقيقية للعينة.

ولأن مجموعة بكتريا القولون الكلية Total coliform هى الدليل الأكثر شمولا حيث تشتمل على الجزء البرازى وكذلك على ايشريشيا كولاى Escherichia coli (شكل 2،1) ووجود مجموعة بكتريا القولون أتخذ كدليل على عدم اتمام عملية التطهير للمياه كما يجب، ولقد اتخذت مجموعة بكتريا القولون الكلية كأساس لمواصفات مياه الشرب فى ال ولايات المتحدة ومعظم الدول المتطورة.

فى عام 1904 اقترح ايخمان Eijkman انتاج غاز من الجلوكوز عند 46 مئوية كاختبار لبكتريا القولون ذات الأصل البرازى Fecal coliform (Eijkman, 1904). العديد من الأجناس التى ورد ذكرها والتى تنتمى الى مجموعة القولون الكلية يمكن ها أن تنتج غاز من

الجلوكوز. وعلى ذلك، حدث تعديل سريع للاختبار واستبدل الجلوكوز باللاكتوز . أما بالنسبة للجزء البرازى من المجموعة فلقد حدث أيضا تعديل فى الاختبار لها باستعمال درجة حرارة 44.5 مئوية فى التحضين.

واليوم، التعريف المقبول لبكتريا القولون البرازية ممثلة بكتريا القولون المقاومة للحرارة والقادرة على النمو مع انتاج حامض وغاز عند 44.5 مئوية. والبكتريا التى تشتمل عليها هذه المجموعة يسود فيها Escherichia coli, Citrobacter freundii, and Klebsirlla pnemonia. على أن عائلة Enterobacteriaceae تشمل بكتريا القولون البرازية والكلية علاوة على جزء لا ينتمى الى مجموعة بكتريا القولون (شكل 2). ومواصفات معظم المياه الطبيعية تعتمد على عدد بكتريا القولون البرازية.

أفضل دليل على التلوث البرازى من مخلفات الانسان والحيوان هو Escherichia coli. فلقد وجد أن براز الانسان والحيوان يمثل Escherichia coli ما بين 90 – 100% من محتواه من البكتريا القولونيه، بينما تنخفض فى الصرف الصحى Sewage الى 59% (WHO, 1985). الى وقت قريب لم تتواجد طرق بسيطة تعطى نتائج حقيقية للكشف، تنمية، وتصنيف ايشيرشيا كولاى . وف عام 1986 ظهرت الاختبارات الحديثة لايشيرشيا كولاى والتى تعتمد على الاختبارات البيوكيميائية سمحت باعلان ونشر المواصفات القياسية اعتمادا على عدد Escherichia coli. على أن اختبارات نوعية مياه التنزه والاستجمام Recreational water تعتمد على الحقيقة أن كل بكتريا القولون البرازية موجبة لاختبار اليورييز ما عدا Eschericia coli. هذه الطريقة تسمح بنمو بكتريا القولون البرازية وبالتالى استعمال اختبار معملى لليورييز (Dufour et al., 1985). نشأ اختبار حديث يرتكز على مقدرة 97% من سلالات E.coli علىى انتاج انزيم بيتا-جلوكيروينيديز

B-glucuronidase والذى يحلل رابطة أورثوجلوكيرونوسيل فى مشتقات جلوكيرونيد

Glucuronosyl-o-bond of glucuronide conjugares مثل 4 ميثيل امبليفيريل-بيتا-دلتا-جلوكيرونيد 4-methyl-umbelliferyl-B-D-glucuronide (MUG). وفى عائلة الانتيروباكتيريسى Enterobacteriaceae نجد أن ايشيرشيا كولاى Escherichia coli وبعض الشيجيلا Shigella والسالمونيلا Salmonella (Feng and Hartman, 1982) والقليل من اليارسينيا Yersinia (Petzel and Hartman, 1985) تنتج الانزيم المشار اليه. وعلى أساس انتاج هذا الانزيم ، نشأت الاختبارات للكشف عن وتنمية ايشيرشيا

كولاى Eschericia coli (Feng & Hartman, 1982; Petzel &Hartman, 1985; Freier &Hartman, 1987)

هذا ومع تعدد طرق تقدير المجموعة الا أنه يجب أن يؤخذ فى الاعتبار أن كل طريقة تستعمل خلال حدود معينة. وللحصول على نتائج فعالة يتطلب الأمر الالتزام بطرق التحكم فى النوعية والتى سبق ذكرها فى مذكرات QC/QA .

3 . 2 . طريقة أنابيب التخمر المتعددة أو العد الاحتمالى لتقدير مجموعة بكتريا القولون

Multiple Tube Fermentation or Most Probable Number Technique for Determination of Coliform Group

عند استعمال هذه الطريقة فان نتائج اختبار مكررات الأنابيب Replicate tubes والتخفيفات تسجل على صورة العدد الأكثر احتمالا Most Probable Number (MPN) للكائن المتواجد.

هذا العدد، يعتمد على نظرية الاحتمالات، وهى تقديلرات لمتوسط كثافة البكتريا (القولون أو غيرها) فى العينة. وكثافة بكتريا القولون المتحصل عليها مع بعض المعلومات الأخرى المتحصل عليها من خلال المسح الهندسى أو الصحى ، يمد بافضل طرق تقييم فعالية المعالجة والنوعية الصحية لمصدر المياه.

دقة كل اختبار تعتمد على عدد الأنابيب المستعملة. وأفضل المعلومات يحصل عليها عن استعمال أكبر حجم من العينة فى حقن الأنابيب بحيث تظهر غاز فى بعض منها أو كلها فى حين أن أضغر حجم من العينه يستعمل فى حقن الأنابيب لا يظهر غاز فى كل الأنابيب أو معظمها. وكثافة البكتريا تقدر من معادلة أو من جدول باستعمال عدد الأنابيب الموجبة فى التخفيفات المتعددة. عدد جزئيات العينة Sample portions المختارة سيحكم بدرجة الدقة فى النتيجة. وجداول العدد الاحتمالى تعتمد على افتراض توزيع بويسون Assumption of a poisson distribution (الانتشار العشوائى). وعلى ذلك ، اذا لم يتم رج العينة بطريقة مناسبة قبل أخذ الجزئيات منها أو اذا وجدت تجمعات من خلايا البكتريا ، فان قيمة العدد الاحتمالى ستكون بعيدة عن الكثافة الحقيقية للبكتريا.

3 . 2 . 1 . المياه من نوعية مياه الشرب Water of Drinking Water Quality

عند تحليل مياه الشرب لتقدير ما اذا كانت النوعية تتطابق مع المواصفات التى وضعتها وكالة حماية البيئة الأمريكية ، يستعمل 10 أنابيب مكررة تحتوى على 10 ملل، 5 مكررات من أنابيب تحتوى على 20 ملل أو زجاجة واحدة تحتوى 100 ملل من العينة. وعند اختبار مياه الشرب يجرى الاختبار التأكيدى على كل الأنابيب أو الزجاجات التى تعطى نمو مع وجود أو عدم وجود نتيجة ايجابية لتكون حامض أو غاز . ويجرى الاختبار الكامل Completed test على ما لا يقل عن 10 % من العينات الموجبة كل 3 شهور. وتعتبر نتيجة EC broth أو EC MUG الايجابية كبديل للنتيجة الايجابية للاختبار الكامل.

وللاختبار الروتينى لمصادر مياه الشرب العامة فان الهدف من الاختبار لبكتريا القولون الكلية هو تقدير كفاءة عمليات المعالجة التى تتم فى المحطة وكذلك سلامة نظام التوزيع . وكذلك يستعمل كمانع لوجود التلوث البرازى. تواجد جزء كبير من بكتريا القولون فى نظام التوزيع ربما يكون غير مرتبط بفشل المعالجة أو البئر المصدر، ولكن مرتبط باستعادة النمو للبكتريا . ولصعوبة التفرقة ما بين استعادة بكتريا القولون للنمو والتلوث الجديدن يفترض أم نواجد بكتريا القولون هو تلوث جديد الا اذا اثبت.

3 . 2 . 2 . المياه الأخرى خلاف مياه الشرب

فى اختبار المياه خلاف مياه الشرب يحقن سلسلة من الأنابيب بتخفيفات متتالية عش رية من المياه (10و 1 و 1, و 01, ...)اعتمادا على كثافة بكتريا القولون المحتملة. يجرى الاختبار الكامل أو النهائى على 10% على الأقل من العينات الموجبة على أساس موسمى . والهدف من اختبار المياه خلاف مياه الشرب هو اختبار كثافة التلوث البكتيرى، تقدير مصدر التلو ث، الالزام بنوعية المياه القياسية، أو تقدير حيوية Survival للبكتريا. اختبر عدد كاف من العينات للحصول على نتائج ممثلة . وعموما، فان قيمة المتوسط للنتائج من عدد من العينات يعطى قيمة يكون فيها يتدنى الاختلاف من عينة الى أخرى .

3 . 2 . 3 . العينات الأخرى

فى حالة اختبار المواد الصلبة أو شبه الصلبة يتم عمل تخفيف وزنم حجم من محلول منظم أو ماء البيتون 1,% ويتم الخلط باستعمال خلاط بسرعة منخفضة (8000 لفة فى الدقيقة) لمدة 1 – 2 دقيقة ومنه يتم عمل التخفيفات المتتالية بسرعة حتى لا يحدث ترسيب.

4 . الطريقة التخمر القياسية لتقدير بكتريا القولون الكلية

Standard Total Coliform Fermentation Technique

4 . 1 . المرحلة الافتراضية Presumptive Phase

استعمل بيئة Lauryl tryptose broth فى المرحلة الافتراضية لاختبار الأنابيب المتعددة. اذا كانت البيئة مبردة بعد التحضير والتعقيم، تترك على درجة حرارة الغرفة (20 مئوية) خلال الليل وقبل الاستعمال. يتخلص من الانابيب التى يظهر بها نمو أو فقاعات أو كلاهما.

4 . 1 . 1 . تركيب بيئة مرق اللوريل تربتوز :

Tryptone ……	..20	g
Lactose ……	. 5	g
Dipotassxium hydrogen phosphate …… ….	2.75	g
Potassium dihydrogen phosphate …….	2.75	g
Sodium chloride …… …	5	g
Sodium lauryl sulphate ……	.0.1	g
Reagent-grade water ……	1	L

أضف المكونات الى الماء واخلط جيدا، سخن للذوبان. pH يجب أن يكون 6,8 +/- 2, بعد التعقيم. قبل التعقيم وزع البيئة بكميات كافية فى أنابيب التخمر ويكون بكل انبوبة انبوبة درهام مقلوبة وتكون حجم البيئة يغطى نصف الانبوبة أو ثلثاها على الأقل بعد التعقيم وكبديل اهمل وضع انبوبة درهام وأضف 01, جرام / اللتر من برومو كريزول بيربل الى البيئة للكشف عن انتاج حموضة والذى يعتبر دليل على ايجابية هذا الاختبار. وتغطى الانبوبة بغطاء معدنى أو بلاستيكى مقاوم للحرارة.

حضر اللوريل بتركيز بحيث لا يؤثر اضافة 100 ملل، 20 ملل ، أو 10 ملل على تركيز مكونات البيئة

9221:I. Preparation of Lauryl Tryptose Broth

Inoculum *mL*	Amount of Medium in Tube *mL*	Volume of Medium + Inoculum *mL*	Dehydrated Lauryl Tryptose Broth Required *g/L*
1	10 or more	11 or more	35.6
10	10	20	71.2
10	20	30	53.4
20	10	30	106.8
100	50	150	106.8
100	35	135	137.1
100	20	120	213.6

4 . 1 . 2 . الطريقة

رتب الأنابيب فى صفوف من 5 أو 10 أنابيب فى حامل أنابيب. عدد الصفوف وحجم العينة يعتمد على نوعية وخصائص المياه المختبرة. لمياه الشرب استعمل 5 أجزاء من العينة كل 20 ملل، 10 كل 10 ملل، أو زجاجة واحدة 100 ملل، وللمياه الغير مستعملة فى الشرب استعمل 5 أنابيب لكل تخفيف (10، 1، 1, ملل أو غيرها)

لعمل التخفيفات وقياس حجم العينات المخففة اتبع ما ذكر سابقا. رج العينة والتخفيفات جيدا حوالى 25 مرة. لقح كل انبوبة فى المجموعة بحج متكرر من العينة . اخلط العينة مع البيئة بالهز برفق.

حضن الأنابيب الملقحة أو الزجاجات عند 35 +/- 5, مئوية . وبعد 24 ساعة +/- 2 ساعة اختبر الأنابيب أو الزجاجات لوجود نمو، غاز، تفاعل حامضى (لون أصفر)، اذا لم يكن هناك غاز أو حامض ، أعد التحضين ,اعد الكشف فى نهاية 48 ساعة +/- 3 ساعة. سجل النتيجة.

ارتاج تفاعل حامضى أو غاز فى الأنابيب أو الزجاجات خلال 48 ساعة +/- 3 ساعة يدل على التفاعل الافتراضى الموجب. النابيب الموجبة يجرى لها الاختبار التأكيدى.

غياب تكون الغاز أو الحموضة فى نهاية التحضين يدل على النتيجة السلبية للاختبار.

أكد الأنابيب أو الزجاجات التى أظهرت غياب الغاز وغياب الحموضة ولكن أثبتت أن هناك نمو.

4 . 2 . المرحلة التأكيدية Confirmed phase

4 . 2 . 1 . بيئة الزراعة : استعمل بيئة مرق البريلينت جرين لاكتوز بيل للتخمر فى أنابيب للمرحلة التأكيدية وتركيبها كما يلى

Peptone ……..	10	g
Lactose …….	10	g
Oxgall ……..	20	g
Brillient green ……...	0.0133	g
Reagent grade water ……1		L

أضف الكونات الى الماء واخلط جيدا، سخن لاذابة الكونات واضبط pHبحيث يكون 7،2 +/- 2, بعد التعقيم. قبل التعقيم وزع فى أنبيب وبهاانبوبة درهام مقلوبة ، كمية من البيئة كافية لتغطى نصف الى ثلثى انبوبة درهام بعد التعقيم . غطى الأنابيب بأغطية معدنية أو بلاستيك مقاوم لحرارة التعقيم.

8 . 2 . 2 . الطريقة Procedure : كل الأنابيب الايجابية أو الزجاجات التى أعطت نتيجة ايجابية فى المرحلة الافتراضية Presumptive phase (أية كمية من الغاز- عكارة- حامض) خلال 24 +/- 2 ساعة (أو قبل ذلك وينصح بالفحص بعد 18 +/- 1 ساعة للايجابية) من التحضين يتم اجراء الاختبار التأكيدى . واذا ظهرت أنابيب ايجابية أخرى عند 48 +/- 3 ساعة من التحضين يجرى لها هى الأخرى الاختبار التأكيدى.

هز برفق الأنابيب الايجابية من المرحلة الافتراضية (حامض وغاز) لتعليق النمو من الكائنات فى الأنابيب. باستعمال لوب معقم (قطر فتحتها 3 – 3,5 مم) انقل لوب واحدة أو أكثر من المزرعة من كل انبوبة ايجابية الى انبوبة بريلينت جرين (يمكن استعمال ناقل خشبى

Applicator معقم بغمسه لمسافة 2,5 سم على الأقل فى المزرعة ووضعه فى بيئة البريلينت جرين ثم ازالته). ويكرر ذلك بالنسبة لكل الأنابيب الايجابية من المرحلة الافتراضية.

حضن انابيب البريلينت جرين عند 35 مئوية +/- 5, درجة ، تكون غاز فى انبوبة درهام بعد فترة تحضين (من 6 +/- 1 سلعة الى 24 +/- 2 ساعة) وخلال 48 ساعة +/- 3 ساعة تعتبر تلك الأنابيب ايجابية للاختبار التأكيدى . احسب العدد الاحتمالى من الأنابيب الايجابية من بيئة البريلينت جرين.

4 . 2 . 3 . الطريقة البديلة : تستخدم تلك الطريقة بالنسبة للمياه الملوثة ومياه الصرف الصحى.

اذا كانت كل الأنابيب فى المرحلة الافتراضية ايجابية لتخفيفين متتالين من العينة المختبرة يتم اجراء الاختبار التأكيدى للانابيب الايجابية من الأنابيب المحقونة بالكمية الأقل من العينة والموجبة جميعها الى جا نب الأنابيب الايجابية من الصف الثالث (المحقونة بكمية أقل من العينة) ويتم عليها ما تم سابقا.

4 . 2 . 4 . المرحلة الكاملة أو النهائية Complete phase

يجرى هذا الاختبار كبيانات للتحكم فى الجودة على 10% على الأقل من الانابيب الايجابية من المرحلة السابقة. يتم حقن انابيب بريلينت جرين لبكتريا القولون الكلية و مرق EC أو بيئة مرق EC with MUG لايشيريشيا كولاى (كلاهما يتم التحضين عند 44,5 درجة مئوية) والنتيجة الايجابية فى الحالات الثلاث تدل على أن الاختبار النهائى ايجابى . وايجابية أنابيب

البرينت جرين فقط دل على الايجابية لبكتريا القولون الكلية (انظر الشكل التالى)

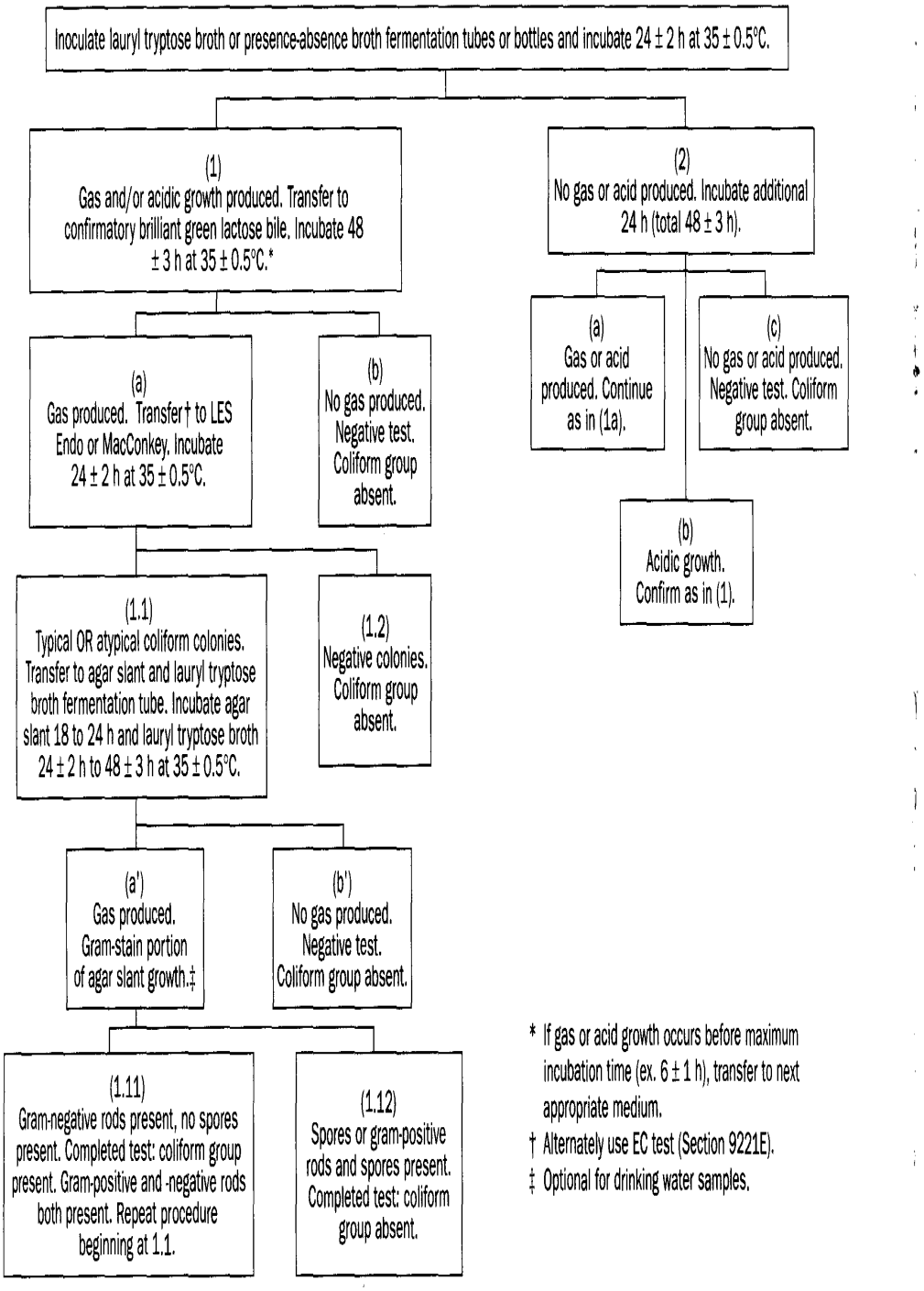


Figure 9221:1. Schematic outline of presumptive, confirmed, and completed phases for total coliform detection.

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 …… 3,3 g

Potassium dihydrogen phosphate …….. 1.0 g

Sodium chloride …….. 3,7 g

Sodium desoxycholate ……0,1 g

Sodium lauryl sulphate …… . 0,05 g

Sodium sulfite …… 1,6 g

Basic fuchsin …….. 0,8 g

Agar …… 15.0 g

Reagen grade water …… 1 L

اضف الكونات الى 1 لتر ماء وأضف 20 ملل ايثانول 95 %. سخن الى قرب الغليان لاذابة المكونات ثم اخرجها من حمام الماء وبرد الى 45 – 50 درجة مئوية . لا تعقم فى الأوتوكلاف. pH النهائى 7,2 +/- 2,. وزعها 5 – 7 ملل فى أطباق 60 مم. فى حالة استعمال أطباق أخرى مختلفة الحجم ضع كمية من البيئة بيحيث يكون عمق البيئة 4 – 5 مم.

احفظ الأطباق بحيث لا تعرض الأطباق الى أشعة الشمس، برد فى الظلام، يفضل حفظها فى أكياس بلاستيك محكمة الغلق لخفض الفقد فى الرطوبة . لا تزيد مدة الحفظ عن اسبوعان أو يتخلص منها بمجرد الاحساس بفقد الرطوبة ، تغير فى اللون أو التلوث.

MacConkey agar

Peptone ……..	17	g
Proteose peptone ……..	3	g
Lactose ……	10	g
Bile salts ……..	5	g
Sodium chloride ……	1,51	g
Agar ……	13,5	g
Neutral red …….	0,03	g
Crystal violet …….	0,001	g
Reagent grade water …… ..	1	L

أضف المكونات الى الماء واخلط جيدا، سخن الى الغليان لا ذابة المكونات . عقم فى الاوتوكلاف لمدة 15 دقيقة عند 121 مئوية. لطف الحرارة Temperعقب التعقيم وصب البيئة فى أطباق .

pH البيئة يجب أن يكون 7,1 +/- 2و بعد التعقيم.

Nutrient agar

Pesptone ……. .. 5 g

Beef extract …… 3 g

Agar ……15 g

Reagent grade water …… 1 L

أضف المكونات الى الماء ، اخلط جيدا وسخن للذوبان . pH يجب أن يكون 6,8 +/- 2, بعد التعقيم.قبل التعقيم وزع البيئة فى أنابيب بقلاووظ . بعد التعقيم أمل الأنابيب لتعطى سطح منحنى Slant . اغلق الأنابيب باحكام بعد أن تبرد وخزنها فى مكان بارد محمى.

Gram stain reagents (يراجع Module 2)

4 . 2 . 4 . 1 الطريقة

أ . فى ظروف معقمة ازرع على سطح طبق LES Endo agar أو MacConkey agar كل انبوبة موجبة من البريلينت جرين فور ظهور الغاز بها باستعمال لوب 3 مم أو ابرة منحنية قليلا (لا يؤخذ الريم على سطح الانبوبه، تغمس اللوب الى العمق ويخطط الطبق للحصول على مستعمرات متباعدة). حضن على 35 مئوية +/- 5, درجة لمدة 24 +/- 2 ساعة.

ب . المستعمرات التى تنشأ على LES Endo agar تكون نموذجية Typical(قرمزية الى أحمر قاتم مع اللمعة المعدنية) أو غير نموذجية Atypical (قرمزية، أحمر، أبيض، أو عديمة اللون بدون اللمعة المعدنية) بعد تحضين 24 ساعة. المستعمرات المخمرة للاكتوز النموذجية والتى تنشأ على بيئة الماكونكى تكون حمراء وربما تكون محاطة بمنطقة معتمة أو ترسيب املاح الصفراء . من كل طبق التقط مستعمرة أو أكثر من بكتريا القولون النموذجية تكون منعزلة ، وفى حالة عدم تواجد تلك المستعمرات التقط مستعمرات أقرب ما يمكن للشكل المشار اليه وكل مستعمرة تلقح فى انبوبة تخمر من مرق لوريل تريبتوز وعلى س طح آجار مغذى مائل Nutrient agar وتحضن 24 ساعة عند 35 مئوية. حضن على 35 +/- 5و

درجة مئوية لمدة 24 +/- 2 ساعة وافحصها لتكن غاز وأعد الفحص اذا كانت سالبة عند 48 +/- 3 ساعة. ويجرى الصبغ بجرام من انبوبة الآجار المغذى (يمكن عدم اجراء تلك الخطوة فى حالة مياه الشرب).

تكون غاز فى انبوبة مرق اللوريل تربتوز خلال 48 +/- 3 ساعة واعطاء خلايا سالبة لجرام، غير متجرثمة ، عصوية تعتبر موجبة للاختبار التكميبى وتؤكد وجود أعضاء من مجموعة القولون.

4 . 3 . حساب كثافة البكتريا Estimation of Bacterial Density

4 . 3 . 1 . دقة اختبار أنابيب التخمر Precision of fermentation tube test

اذا لم يتم اختبار عدد كبير من جزئيات العينة ، فان دقة اختبار أنابيب التخمر تكون منخفضة. مثلا، اذا أختبر 1 ملل من زجاجة تحتوى على خلية واحدة من بكتريا القولون /ملل، فان حوالى 37 % من الأنابيب المحتوية عل‌ى 1 ملل من العينة من المتوقع أن تنتج نتائج سلبية نتيجة للتوزيع العشوائى للبكتريا فى العينة، كل املل من العينة. وعندما يكون هناك 5 أنابيب كل منها به 1 ملل من العينة فانه النتيجة السلبية تحت تلك الطروف فان التوقع أن تكون النتائج سلبية بالكامل لا يزيد عن 1%.

وبالتالى يكون هناك حرص عند استنتاج المغزى الصحى لنتائج الاختبار لبكتريا القولون والمتحصل عليها من بضع انابيب قليلة من كل تخفيف من العينة، خاصة عندما يكون عدد العينات من نقطة معينة محدود.

8 . 3 . 2 . حساب وتسجيل العدد الأكثر احتمالا Computing and Recording of MPN

لحساب كثافة بكتريا القولون يعبر عنها فى صورة عدد أكثر احتمالا MPN . قيم العدد الأكثر احتمالا ، لسلسلة من نتائج الزرع، تتضح فى الصفحة التالية.

وتلك الجداول تشتمل على 95 % حدود ثقة Cofidence limits لكل قيمة مقدرة من قيمة العدد الأكثر احتمالا المقدرة. اذا كان حجم العينة المستعملة من تلك الموجودة فى الجداول، سجل النتيجة منسوبة الى عدد النتائج الايجابية والسلبية فى السلاسل كعدد أكثر احتمالا / 100 ملل أو سجل النتيجة كوجود أو غياب بكتريا القولون الكلية أو البرازية (P/A) .

حجم العينه التى تظهر فى الجداول فى الصفحه التاليه

TABLE 9221:II. MPN INDEX AND 95% CONFIDENCE LIMITS FOR VARIOUS COMBINATIONS OF POSITIVE AND NEGATIVE RESULTS WHEN FIVE 20-mL PORTIONS ARE USED

No. of Tubes Giving Positive Reaction Out of 5 of 20 mL Each	MPN Index/ 100 mL	95% Confidence Limits (Approximate)	
		Lower	Upper
0	<1.1	0	3.0
1	1.1	0.05	6.3
2	2.6	0.3	9.6
3	4.6	0.8	14.7
4	8.0	1.7	26.4
5	>8.0	4.0	Infinite

TABLE 9221.III. MPN INDEX AND 95% CONFIDENCE LIMITS FOR VARIOUS COMBINATIONS OF POSITIVE AND NEGATIVE RESULTS WHEN TEN 10-mL PORTIONS ARE USED

No. of Tubes Giving Positive Reaction Out of 10 of 10 mL Each	MPN Index/ 100 mL	95% Confidence Limits (Approximate)	
		Lower	Upper
0	<1.1	0	3.0
1	1.1	0.03	5.9
2	2.2	0.26	8.1
3	3.6	0.69	10.6
4	5.1	1.3	13.4
5	6.9	2.1	16.8
6	9.2	3.1	21.1
7	12.0	4.3	27.1
8	16.1	5.9	36.8
9	23.0	8.1	59.5
10	>23.0	13.5	Infinite

TABLE 9221.IV. MPN INDEX AND 95% CONFIDENCE LIMITS FOR VARIOUS COMBINATIONS OF POSITIVE RESULTS WHEN FIVE TUBES ARE USED PER DILUTION (10 mL, 1.0 mL, 0.1 mL)

Combination of Positives	MPN Index/ 100 mL	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
0-0-0	<2	—	—
0-0-1	2	1.0	10
0-1-0	2	1.0	10
0-2-0	4	1.0	13
1-0-0	2	1.0	11
1-0-1	4	1.0	15
1-1-0	4	1.0	15
1-1-1	6	2.0	18
1-2-0	6	2.0	18
2-0-0	4	1.0	17
2-0-1	7	2.0	20
2-1-0	7	2.0	21
2-1-1	9	3.0	24
2-2-0	9	3.0	25
2-3-0	12	5.0	29
3-0-0	8	3.0	24
3-0-1	11	4.0	29
3-1-0	11	4.0	29
3-1-1	14	6.0	35
3-2-0	14	6.0	35
3-2-1	17	7.0	40
4-0-0	13	5.0	38
4-0-1	17	7.0	45
4-1-0	17	7.0	46
4-1-1	21	9.0	55
4-1-2	26	12	63
4-2-0	22	9.0	56
4-2-1	26	12	65
4-3-0	27	12	67
4-3-1	33	15	77
4-4-0	34	16	80
5-0-0	23	9.0	86
5-0-1	30	10	110
5-0-2	40	20	140
5-1-0	30	10	120
5-1-1	50	20	150
5-1-2	60	30	180
5-2-0	50	20	170
5-2-1	70	30	210
5-2-2	90	40	250
5-3-0	80	30	250
5-3-1	110	40	300
5-3-2	140	60	360
5-3-3	170	80	410
5-4-0	130	50	390
5-4-1	170	70	480
5-4-2	220	100	580
5-4-3	280	120	690
5-4-4	350	160	820
5-5-0	240	100	940
5-5-1	300	100	1300
5-5-2	500	200	2000
5-5-3	900	300	2900
5-5-4	1600	600	5300
5-5-5	≥1600	—	—

مرتبط أساسا بالمياه النهائية . ويبين قيم العدد الأكثر احتمالا لنتائج ايجابية وسلبية عند اختبار خمسة من 10 ملل، وخمسة 1 ملل، خمسة 1, ملل. عندما تكون التخفيفات المتتالية مختلفة عن تلك الموجودة فى الجدول، اختار قيم العد الأكثر احتمالا الجدول السابق للعدد من النابيب الموجبة واحسب طبقا للمعادلة التالية:

$$\text{MPN value (from table) X } \frac{10}{\text{Largest volume tested in dilution Series used for MPN determination}} = \text{MPN / 100ml}$$

عنداستعمال أكثر من 3 تخفيفات فى سلسلة متدرجة من التخفيف، استعمل نتائج 3 فقط منها فى حساب العد الأكثر احتمالا . لاختيار الثلاث تخفيفات لاستعمالها فى تقديلا العد الأكثر احتمالا، اختار أعلى التخفيفات التىتعطى نتائج ايجابية فى كل الخمس اجزاء من العينة المختبرة والتخفيفان التاليان الناجحان الأعلى فى التخفيف. استعمل نتائج لهذه الحجوم الثلاثة فى حساب ا لعدد الأكثر احتمالا . وفى المثال المبين أسفل (الجدول التالى) ، الثلاث تخفيفات المختارة تظهر بخط سميك . فى حالة C اختار الثلاث تخفيفات الأولى بحيث تكون الأنابيب الايجابية فى التخفيفات الوسطى.

وفى حالة مثل الموجود أسفل أسفل (مثال d) فان الأنابيب الايجابية تتواجد فى تخفيف أعلى من الثلاث المختارة طبقا للقاعدة وفى حالة e استخدم الثلاث قيم الأولى

عندما يراد تلخيص نتائج با لنسبة لمجموعة متسلسلة على صورة قيمة واحدة يحسب المتوسط.

الجدول التالى يظهر الثلاث التخفيفات المختارة . اذا تحصل على قراءات بعيدة الاحتمال بنسبة تزيد على 1% فانها دليل أن هناك خطأ فى الطريقة أو أن الافتراض الاحصائى والذى تحته حسبت قيمة العدد الاحتمالى لم يتحقق. واذا كانت هناك قراءات للأنابيب الموجبة لا تتواجد فى الجدوب فانه يمكن حسابها من المعادلة التالية:

Example	1 mL	0.1 mL	0.01 mL	0.001 mL	Combination of positives	MPN Index /100 mL
a	5/5	5/5	2/5	0/5	5-2-0	5000
b	5/5	4/5	2/5	0/5	5-4-2	2200
c	0/5	1/5	0/5	0/5	0-1-0	20

In *c*, select the first three dilutions so as to include the positive result in the middle dilution.

$$\text{MPN/100 mL} = \frac{\text{no. of positive tubes} \times 100}{\sqrt{\left(\text{mL sample in negative tubes} \times \text{mL sample in all tubes}\right)}}$$

والجداو

ل لقيم العدد الأكثر احتمالا وكذ1لك المعادلة السابقة يمكن استعمالها لتقدير أية مجموعة أخرى خلاف بكتريا القولون.

اختبار التواجد – عدم التواجد لبكتريا القولون Presence-Absence (P-A) Coliform Test

اختبار التواجد-عدم التواجد لمجموعة بكتريا القولون هى تطوير لطريقة العدد الأكثر احتمالا . تبسيط، باستعمال حجم كبير واحد (100 ملل) فى زجاجة زرع للحصول على معلومات نوعية عن تواجد أو غياب بكتريا القولون، ضبطت على نظرية أنه لا بد من غياب بكتريا القولون فى 100 ملل من عينة مياه الشلرب . واختبار التواجد- عدم التواجد يوفر ايضا الفرصة لزراعة وعزل اللائل البكتيرية الأخرى (بكتريا القولون البرازية، ايروموناس، ستافيلوكوكى، سيدوموناس، السبحيات البرازية، والكلوستريديم) وعلى نفس الأساس النوعى وليس الكمى. وهناك مميزات أخرى تشمل امكانية اختبار عدد كبير من العينات فى وحدة الوقت. اجريت دراسات مقارنة بطريقة أغشية الترشيح Membrane filtration أظهرت أن اختبار التواجد –الغياب ربما تعطى أقصى فرصة لكشف تواجد بكتريا القولون فى وجو د العديد من البكتريا الأخرى والتى ربما تتفوق فى النمو على بكتريا القولونوتسبب مشاكل فى الكشف عنها.

اختبار التواجد- الغياب وضع للاستعمال فى الاختبار الروتينى للعينات المجمعة من نظام التوزيع أو محطات معالجة المياه . عندما تنتج العينات المجمعة من موقع معين نتائج ايجابية لاختبار التواجد-الغياب لبكتريا القولون، فانه ربما ينصح بأن تقدر كثافة بكتريا القولون فى عينات متكررة. والمعلومات الكمية ربما تظهر مدى التلوث.

1 . المرحلة الافتراضية Presumptive phase

1 . 1 . بيئة الزرع Culture media

P-A broth

Beef extract …….. 3 g

Peptone …… 5 g

Lactose …… 7.46 g

Tryptose …… 9.83 g

Dipotassium hydrogen phosphate …… .. 1.35 g

Potassium dihydrogen phosphate …… 1.35 g

Sodium chloride …….. 2.46 g

Spdium lauryl sulphate …….. 0.05 g

Bromocresol purple ……0.0085 g

Reagent grade water …… 1 L

تحضر البيئة ثلاثية التركيز (القوة) عند اختبار 100 ملل من العينة. تذاب بيئة مرق التواجد-الغياب فى الماء بدون تسخين، تستعمل وسيلة تقليب. توزع 50 ملل من البيئة المحضرة فى زجاجات بغطاء قلاووظ 250 ملل. وضع داخل كل زجاجة انبوبة تخمر (درهام) غير ضرورى. عقم فى الاوتوكلاف لمدة 12 دقيقة عند 121 مئوية ومدة بقاء البيئة فى الأوتوكلاف لا يجب أن تزيد عن 30 دقيقة. pH يجب أن يكون 6,8 +/- 2و بعد التعقيم.

وعند تعقيم البيئة بالترشيح تستعمل بيئة سداسية التركيز. وزع 20 ملل من البيئة السداسية التركيز فى زجاجات معقمة 250 ملل .

Lauryl tryptose broth (see 8. 1 . 1).

1 . 2 . الطريقة Procedure

رج العينة بشدة حوالى 25 مرة ولقح 100 ملل فى زجاجة بيئة التواجد- الغياب. اخلط جيدا بقلب الزجاجة مرة أو مرتين للحصول على توزيع تام للبيئة ثلاثية التركيز خلال العينة . حضن عند 35 +/- 5, درجة مئوية وافحص بعد 24 ساعة و 48 ساعة للتفاعل الحامضى.

1 . 3 . تفسير النتائج Interpretation

تكون لون أصفر فى البيئة عند تواجد الظروف الحامضية تتواجد بعد تخمر اللاكتوز . اذا تكون غاز أيضا ، هز الزجاجة برفق سوف يظهر رغوة او فوران . أية كمية من الغاز مع/أو حامض يعتبر الاختبار موجب ويحتاج الى التأكيد.

2 . مرحلة التأكيد Confirmed phase

2 . 1 . بيئة الزراعة : استعمل بيئة مرق البرلينت جرين لاكتوز أملاح الصفراء فى أنابيب

2 . 2 . الطريقة Procedure انقل كل المزارع الموجبة (التى أعطت حامض أو حامض وغاز) الى بيئة البريلينت جرين وتحضن عند 35 +/- 5و درجة مئوية .

2 . 3 . تفسير النتائج Interpretation انتاج الغاز فى أنابيب البريلينت جرين بعد 48 +/- 3 ساعات يؤكد وجود بكتريا القولون . يكتب التقرير على صورة اختبار التواجد /الغياب (موجب أو سالب) لبكتريا القولون فى 100 ملل من العينة.

2 . 4 . الاختبار المكمل Completed test

الفصل الرابع

طريقة بكتريا القولون البرازيه

الفصل الرابع

طريقة بكتريا القولون البرازية

Fecal Coliform Procedure

اختبارات الحرارة المرتفعة Elevated temperature tests تستخدم لتفرقة مجموعة بكتريا القولون البرازية من مجموعة بكتريا القولون الكلية . الاختبار يمكن اجراؤه بطريقة الأنابيب المتعددة. والطريقة باستعمال بيئة مرق A 1 هى طريقة تجرى فى خطوة واحدة.

اختبار بكتريا القولون البرازية باستعمال بيئة EC استعملت فى الدراسات على مياه الشرب، تلوث المجارى المائية، المياه الخام، نظم معالجة المخلفات السائلة ، مياه الاستحمام، مياه البحروعمليات مراقبة نوعية المياه . وتستخدم بيئة A 1 فى اختبار مصادر المياه، مياه البحر، والمخلفات السائلة المعالجة.

1 . الاختبار لبكتريا القولون البرازية باستخدام بيئة EC

FecalColiform Test (EC medium)

اختبار بكتريا القولون البرازية يستعمل لتفرقة الجزء من بكتريا القولون الكلية الذى ينتمى لبكتريا القولون البرازية . استعمل كطريقة سريعة لاختبار مياه المحاريات ، المخلفات السائلة المعالجةShellfish بيئةA 1 كاختبار مباشر.

1 . 1 بيئة EC وتركيبها:

Tryptose or trypticase ……. 20 g

Lactose …….. 5 g

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

Dipotassium hydrogen phosphate …… . 4 g

Potassium dihydrogen phosphate…… 1.5 g

Sodium chloride ……. 5 g

Reagent-grade water ……1 L

تضاف المكونات الى المياه، تخلط جيدا، تسخن لتذوب. pH يجب أن يكون 6,9 +/- 2, بعد التعقيم. قبل التعقيم وزع فى أنابيب تخمر، كل واحدة بها انبوبة درهام مقلوبة ، كمية من البيئة كافية لتغطى الأنبوبة المقلوبة أو على الأقل جزئيا بعد التعقيم . سد الأنابيب بغطاء معدنى أو بلاستيكى مقاوم لحرارة التعقيم.

2 . الطريقة Procedure

ارسل انابيب الاختبار الفرضى Presumptive testالتى تظهر نتيجة ايجابيةً بان يكون فى أنابيب درهام أية كمية من الغاز، نمو، أو حموضة خلال 48 ساعة من التحضين لاجراء اختبار بكتريا القولون البرازية.

2 . 1 . هز أنابيب الاختبار الفرضى برفق أو الزجاجات التى أظهرت غاز، نمو، أو حموضة . استخدم لوب قطر فتحتها 3 – 3,5 مم لنقل النمو من كل انبوبة أو زجاجة موجبة

2 . 2 . حضن الأنابيب الملقحة (EC) فى حمام مائى عند 44,5 +/- 2و درجة مئوية لمدة 24 +/- 2 ساعة.

ضع كل أنابيب مرق EC الملقحة فى الحمام المائى خلال 30 من الانتهاء من حقنها. احرص على أن يكون فى الحمام المائى كمية من المياه تكفى لتغطية مست وى البيئة فى الأنابيب المحضنة.

2 . 3 . تفسير النتائج انتاج الغاز مع النمو فى بيئة مرق EC خلال 24 +/- 2 ساعة أو أقل يعتبر الاختبار موجب لبكتريا القولون البرازية . الفشل فى انتاج غاز (مع وجود نمو قليل أو معدوم) يعتبر التفاعل سالب. اذا استعملت الأنابيب المتعددة ، يحسب MPN من عدد أنابيب ECالموجبة وتقرأ من الجداول السابقة . وعند استعمال انبوبة واحدة من اختبار Presumptive تذكر النتيجة على صورة وجود أو غياب لبكتريا القولون البرازية.

3. اختبار يكتريا القولون البرازية المباشر

Fecal-coliform Direct Test (A-1 medium)

3 . 1 . البيئة

تستخدم بيئة مرق A1، ليس هناك مرحلة افتراضية Presumptive phase. وتركيب بيئة A 1

كما يلى:

Lactose ……. 5 g

Tryptose …….. …… 20 g

Sodium chloride ……. …….. 5 g

Salicin ……. 0.5 g

Polyethylene glycol p-isooctyl phenyl ether (Tween 100) …… 1 ml

Reagent-grade water ……... 1 L

سخن لاذابة المكونات الصلبة، اضف توين X 100 ، واضبط pH عند 6,9 +/- 1,. . قبل التعقيم وزع البيئة فى أنابيب تخمير بها انابيب درهام مقلوبة بكمية تكفى لغمر انبوبة درهام

على الأقل جزئيا بعد التعقيم . غط الأنابيب بأغطية معدنية أو بلاستيك مقاوم لحرارة التعقيم . عقم لمدة 10 دقائق فى الأوتوكلاف عند 121 درجة مئوية. خزن الأنابيب فى الظلام عند درجة حرارة الغرفة بحيث لا تتعدى فترة التخزين 7 أيام. تجاهل تكون راسب .

حضر البيئة بتركيز مضاعف حتى يمكن استعمال 10 ملل من العينة بحيث لا يتأثر تركيز البيئة باضافة العينة.

3 . 1 . الطريقة

لقح الأنابيب من بيئة A 1 كما ذكر سابقا حضن لمدة 3 ساعات عند 35 +/- 5و درجة مئوية ثم انقل الأنابيب الى حمام مائى عند 44,5 +/- 2و درجة مئوية وحضن لمدة 21 +/- 2 ساعة.

3 . 2 . تفسير النتائج

انتاج الغاز فى الأنابيب خلال 24 ساعة أو أقل يعتبر علامة على أن الأنبوبة ايجابية للاختبار لبكتريا القولون البرازية. احسب العدد الأكثر احتمالا MPN من عدد الأنابيب الايجابية .

طريقة أغشية الترشيح لمجموعة بكتريا القولون

Membrane Filter Technique of the Coliform Group

1 . مقدمة

طريقة أغشية الترشيح يمكن استعمالها مع حجوم كبيرة نوعا ما من العينات، وعادة تنتج نتائج أكثر حقيقة من طربقة الدد الأكثلا احتما لاز طريقة أغشية الترشيح مفيدة جدا فى مراقبة مياه الشرب وعديد من نوعيات المياه الكبيعية . ومع ذلك، فان طريقة أغشية الترشيح لها بعض المحدوديات، خاصة عند اختبار المياه ذات العكارة العالية أو أعداد البكتريا التى لا تنتمى الى مجموعة بكتريا القولون Noncoliform (background) . وعند استخدام طريقة أغشية الترشيح سابقا، كان من المرغوب اجراء اختبارات من التى يستخدمها المعمل فى نفس الوقت مع طريقة الأغشية ثبات امكانية تطبيقها وللمقارنة.

2 . تعريف Definition

بالنسبة لطريقة أغشية الترشيح فان مجموعة بكتريا القولون عرفت على أنها تلك الاهوائية اختيارا ، سالبة لجرام، غير مكونة للجراثيم ، عصوية الشكل والتى تنتج مستعمرات حمراء بلمعة ذهبية Mettalic (golden) sheen خلال 24 ساعة عند 35 مئوية على بيئة الاندو Endo medium والتى تحتوى على سكر اللاكتوز . بعض أعضاء مجموعة بكتريا القولون ربما تنتج مستعمرات بلون أحمر قاتم Dark red ، مخاطية Mucoid أو ذات نواه Nucleated دون اللمعة المعدنية. وهذه تصنف على أنها مستعمرات بكتريا القولون ولكنها غير مثالية Atypical. وعنج اختبار مزارع بكتريا القولون المنقاة Purified cultures فانها تكون سالبة لانزيم سيتوكروم أكسيديز Cytochrome oxidase negative وموجبة لانزيم B-galactosidase. وبصفة عامة ، فانه فى تلك الطريقة MF تعتبر المستعمرات ذات اللون الأحمر الوردى Pink الغير مخاطية Nunmucoid، الزرقاء، البيضاء، أو عديمة اللون والتى ينقصها اللمعان فانها تعتبر ليست من بكتريا القولون.

3 . التطبيق Application

العكارة المتسببة عن وجود الطحالب ، الجزيئات أو أى مواد متداخلة ربما لا تسمح باختبار حجم من العينة كافى لانتاج نتائج معنوية . والتقديرات المنخفضة لبكتريا القولون ربما تتسبب عن وجود البكتريا الأخرى والتى لا تنمى لبكتريا القولون، أو عم وجود مواد سامة .

طريقة أغشية الترشيح قابلة للتكبيق لاختبار المياه المالحة Saline water، **ولكن ليس للمخلفات السائلة التى اجرى عليها معتاجة مبدئية** متبوعة بمعالجة بالكلور بسبب العكارة عند استخدام حجوم كبيرة من العينات أو مخلفات سا ئلة تحتوى على معادن سامة أو مواد عضوية سامة مثل الفينولات . وللكثف عن تواجد بكتريا القولون الكلية المضارة total Stressed coliforms فى مياه الشرب المعالجة وناتج المعالجة الثانوية من المخلفات السائلة المعالجة بالكلور فان الطريقة صممت للكشف عن تواجد تلك المجموعة (ستناولها فى Module 4).

وحجم العينة اللازم اختباره فى حالة مياه الشربالمرشحة هو 100 ملل. ولاغراض المراقبة الخاصة، مثل حل مشاكل نوعية المياه أو تصنيف بكتريا القولون فى التركيزات المنخفضة من خلال خطوات المعالجة، ربما يكون من المرغوب اختبار 1 لتر من العينة. اذا كانت المواد المعلقة تمنع ترشيح اللتر من العينة خلال مرشح واحد، تقسم العينة الى الى أجزاء صغيرة ، 250 ملل مثلا للتحليل. وتجمع اعداد الترشيح (مقارنة الجداول التالية) والنتائج بالنسبة لتقييم نوعية المياه بتلك الطريقتين متماثلتان ولكن الأعداد الاحصائية بطريقة الأغشية أكثر دقة من طريقة العدد الأكثر احتمالا.بكتريا القولون الناتجة عن المرشحات المستخدمة لترشيح العينة ليكون لديتا العدد/اللتر. وأحجام أصغر من العينات تكون لازمة فى حالة مياه المتنزهات Recreational water أو مصدر المياه Source water أو المخلفات السائلة والتى تحتوى على أعداد عالية من بكتريا القولون. والدراسات المقارنة ما بين طريقة لمرشحات الغشائية وطريقة العدد الأكثر احتمالا أظهرت زيادة دقة طريقة أغشية الترشيح (مقارنة الجداول التالية) والنتائج بالنسبة لتقييم نوعية المياه بتلك الطريقتين متماثلتان ولكن الأعداد الاحصائية بطريقة الأغشية أكثر دقة من طريق ولكن الأعداد الاحصائية بطريقة الأغشية أكثر دقة من طريقة العدد الأكثر احتمالا

TABLE 9222:II. CONFIDENCE LIMITS FOR MEMBRANE FILTER COLIFORM RESULTS USING 100-mL SAMPLE

Number of Coliform Colonies Counted	95% Confidence Limits	
	Lower	Upper
0	0.0	3.7
1	0.1	5.6
2	0.2	7.2
3	0.6	8.8
4	1.0	10.2
5	1.6	11.7
6	2.2	13.1
7	2.8	14.4
8	3.4	15.8
9	4.0	17.1
10	4.7	18.4
11	5.4	19.7
12	6.2	21.0
13	6.9	22.3
14	7.7	23.5
15	8.4	24.8
16	9.2	26.0
17	9.9	27.2
18	10.7	28.4
19	11.5	29.6
20	12.2	30.8

TABLE 9221.III. MPN INDEX AND 95% CONFIDENCE LIMITS FOR VARIOUS COMBINATIONS OF POSITIVE AND NEGATIVE RESULTS WHEN TEN 10-mL PORTIONS ARE USED

No. of Tubes Giving Positive Reaction Out of 10 of 10 mL Each	MPN Index/ 100 mL	95% Confidence Limits (Approximate)	
		Lower	Upper
0	<1.1	0	3.0
1	1.1	0.03	5.9
2	2.2	0.26	8.1
3	3.6	0.69	10.6
4	5.1	1.3	13.4
5	6.9	2.1	16.8
6	9.2	3.1	21.1
7	12.0	4.3	27.1
8	16.1	5.9	36.8
9	23.0	8.1	59.5
10	>23.0	13.5	Infinite

الطريقة القياسية لبكتريا القولون باستخدام أغشية الترشيح

Standard Total Coliform Membrane Filter Procedure

1 . الأدوات المعملية Laboratory apparatus

للتحليل بأغشية الترشيح استعمل أدوات زجاجية وأي أجهزة أخرى تكون مصنوعة من مواد خالية من المواد السامة والتى ربما تؤثر على نمو البكتريا.

1 . 1 . زجاجات العينات Sampling bottles (QA/ QC Notes**)**

1 . 2 . زجاجات التخفيف Dilution bottles (QA/ QC Notes**).**

1 . 3 . الماصات والمخابير المدرجة Pipets and graduated cylinders QA/QC (Notes) قبل التعقيم ، يغطى السلندرات بورق كرافت أو الومونيوم وتكون التغطية غير محكمة، وبعد التعقيم مباشرة احكم التغطية.

1 . 4 . أوعية بيئة الزرع Containers of culture medium

1 . 5 . أطباق الزرع Culture dishes

1 . 6 . وحدات الترشيح Filtration units

1 . 7 . أغشية الترشيح Membrane filter

1 . 8 . الوسادة الماصة Absorbent bads

1 . 9 . الملاقط Forceps

1 . 10. الميكروسكوب ومصدر الاضاءة Microscope and light source

2. المواد وبيئات الزرع Materials and Culture Media

لا تلجأ الى تحضير البيئة من مكوناتها طالما البيئة الجاهزة متوافرة على نطاق تجارى. خزن البيئة التى تم فتح عبوتها فى مجفف. أنظر QC/QA للتحكم فى نوعية البيئة.

اختبر كل لوط جديد من البيئة باستعمال اللوط القديم المقبول كمرجع (QC/QA) . مع كل لوط جديد من بيئة من نوع الاندو Endo type تحقق Verify على الأقل من 10% من مستعمرات بكتريا القولون المتحصل عليها من العينات الطبيعية أو عينات بها اضافات معروفة، لمقارنة اللوطات المختلفة للبيئة وقدرتها على الاستخلاص Recovery .

قبل الاستعمال، اختبر كل عملية تحضير Batch للبيئة التى ستستخدم مع M F باستخدام مزرعة معروف أنها تعطى نتيجة ايجابية وأخرى معروف أنها تعطى نتيجة سلبية . اختبر تلوث بكتريا القولون عند بداية ونهاية كل سلسلة من الترشيح بترشيح 20 – 30 ملل من محلول التخفيف أوالشطف خلال المرشح. اذا ظهر تلوث فى المرجعيات Controls ارفض أية نتائج واطلب عينة أخرى.

2 . 1. بيئة LES Endo agar

2 . 2 . بيئة M-Endo

Tryptone or polypeptone ……..10 g

Thiopeptone or thiotone …… 5 g

Casitone or trypticase …… 5 g

Yeast extract …… 1,5 g

Lactose …… 12,5 g

Sodium chloride …… 5 g

Dipotassium hydrogen phosphatr …… ……. 4,375 g

Potassium dihydrogen phosphate …… 1,375 g

Sodium lauryl sulphate …… 0,05 g

Sodium desoxycholate …… 0.1 g

Sodium sulfite …… 2,1 g

Basic fuchsin …… 1,05 g

Agar …… 15 g

Reagent-grade water …… 1 L

تحضير الآجار- تضاف المكونات الى 1ذ لتر ماء يحتوى على 20 ملل 90% كخحول ايثايل. سخن الى قرب الغليان لاذابة الآجار، وترفع وتبرد الى 45 – 50 درجة مئوية. وزع

كميات 5 – 7 ملل فى الأطباق الزجاج أو بلاستيك قطر 60 مم. اذا استعملت اطباق بأقطار مختلفة يراعى وضع كمية من البيئة تعطى نفس السمك . لا تعقم البيئة فى الاوتوكلاف. pH النهائى 7,2 +/- 2,. من العادى وجود راسب .

برد البيئة النهائية فى الظلام ويستبعد الغير مستعمل من البيئة بعد اسبوعين.

تحضير المرق_ حضر كما ذكر سابقا مع عدم اضافة الآجار ، وزع البيئة السائلة (2 ملل لكل طبق) على الوسائد الماصة (ارجع الى خصائصها QA/QC) وباحتراس يزال الزائد من البيئة . المرق قد يكون به رواسب ولكنها لا تتداخل مع كفاءة البيئة اذا كانت الوسائد الماصة يشهد لها بأنها خالية من الكبريتات أو أى مواد سامة بتركيزات يمكن أن تقضى على نمو البكتريا. المرق المبرد ربما يخزن الى 4 أيام.

3 . العينات (راجع QA/QC)

4 . تعريف بكتريا القولون

البكتريا التى تنتج مستعمرات حمراء مع لمعة ذهبية (معدنية) Metallic sheen خلال 24 ساعة من التحضين على 35 درجة مئوية على بيئة من نوع الاندو تعتبر عضومن مجموعة بكتريا القولون. اللمعة قد تغطى المستعمرة كلها أو قد تظهر على مركز المستعمرة فقط أو على الحواف . هذا التعريف لبكتريا القولون يعتمد على انتاج الألدهيدات من تخمر اللاكتوز . وبينما هذه الخاصية البيوكيماوية هى جزء من طريق عملية التمثيل الغذائى لانتاج الغاز فى اختبار العدد الأكثر احتمالا، فان بعض الاختلاف فى اللمعان للمستعمرات يلاحظ بين سلالات بكتريا القولون. وعلى ذلك، فان هذا الاختلاف البسيط فى تحديد الدليل لا يذكر على أنه خطير لتغيير مغزاه من ناحية الصحة العامة، خا صة اذا اجريت دراسات مناسبة لايجاد العلاقة بين النتائج المتحصل عليها بطريقة أغشية الترشيح والأخرى المتحصل عليها بطريقةانابيب التخمر المتعددة.

5 . الطريقة Procedure

5 . 1 . اختيار حجم العينة : يحكم حجم العينة بكثافة البكتريا المتوقعة. فى تحليل مياه الشرب يحكم حجم العينة بالعكارةن أو بنمو البكتريا التى لا تنتمى الى بكتريا القولون على البيئة (الجدول التالى) . وللأغراض التنظيمية، 100 ملل هو الحجم الرسمى.

TABLE 9222:I. SUGGESTED SAMPLE VOLUMES FOR MEMBRANE FILTER TOTAL COLIFORM TEST

	Volume (X) To Be Filtered *mL*							
Water Source	100	50	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001
Drinking water	X							
Swimming pools	X							
Wells, springs	X	X	X					
Lakes, reservoirs	X	X	X					
Water supply intake			X	X	X			
Bathing beaches			X	X	X			
River water				X	X	X	X	
Chlorinated sewage				X	X	X		
Raw sewage					X	X	X	X

الحجم الأمثل من العينة سينتج 20 – 80 مستعمرة من بكتريا القولون وليس أكثر من 200 مستعمرة من كل الأنواع على سطح المرشح الغشائى . تحليل مياه الشرب بترشيح من 100 الى 1000 ملل، أو بترشيح مكررات من عينات صغيرة الحجم مثل اثنان كلا 50 ملل أو 4 كلا 25 ملل. حليل المياه الأخرى بترشيح 3 حجوم مختلفة (مخففة أو غير مخففة) ، يعتمد على كثافة البكتريا المتوقعة . فى حالة ترشيح أقل من 10 ملل من العينة (مخففة أو غير مخففة) أضف حوالى 10 ملل محلول تخفيف معقم الى قمع الترشيح قبل الترشيح أو انقل الحجم من العينة الى زجاجة تخفيف ورشح ناتج التخفيف جميعه . هذه الزيادة فى حجم المياه يساعد على انتظام توزيع معلق البكتريا على سطح الفلتر .

5 . 1 . وحدات الترشيح المعقمة Sterile filtration units

استعمل وحدات ترشيح معقمة فى بداية كل سلسلة من الترشيحات المتتالية كحد أدنى من الحيطة لمنع التلوث . سلسلة الترشيح تعتبر معترضة اذا مرت فترة 30 دقيقة أو أكثر بين عمليات الترشيح المتتالية. واذ1ا حدث ذلك عامل عملية الترشيح التالية على الرغم من انتمائها الى عملية سابقة على أنها عملية جديدةوبالتالى عقم كل الجهاز (راجع QALQC).

5 . 2 .ترشيح العينة Filtration of sample

باستعمال ملقط معقم ، ضع مرشح غشائى معقم Sterile membrane filter (السطح المقسم الى أ على) على الجزء المدعم المنفذ من الجهاز . بحرص ضع الجزء المتحرك من القمع على الجزء الحامل للفلتر وثبته جيدا مع مراعاة عدم السماح بوجود أى تسريب . رشح العينة تحت تفريغ جزئى . مع بقاء الفلتر فى مكانه اغسل السطح الداخلى للقمع من خلال ترشيح 3 دفعات كل مل بين 20 – 30 ملل من محلول التخفيف المعقم . وكبديل، اشطف القمع بتيار من محلول التخفيف المعقم من زجاجة غسيل Washing bottle مع الاحتراس من التلوث خلال الاستعمال. الشطف بين العينات يمنع من انتقال التلوث . مع انتهاء الشطف النهائى وعملية الترشيح اوقف التفريغ، افتح وزل القم ع، والتقط الفلتر الغشائى بملقط معقم.، وضعه على البيئة المختارة بحركة دائرية لمنع حجز الهواء بين الفلتر والبيئة وهذا يمنع انتقال البيئة الى الخلايا على سطح الفلتر. اغلق الطبق واقلبه وحضن لمدة 22-24 ساعة عند 35 +/- 5, درجة مئوية.

فى حالة استخدام البيئة السائلة، ضع الوسادة الماصة Filter pad فى الطبق وشبعها باستعمال 2 ملل من البيئة (M-Endo) وباحتراس ازل الزائد من البيئة ولم يمتص (بالتجفيف). ضع الفلتر المحضر مباشرة على الوسادة المشبعة بالبيئة، اقلب الطبق، وحضن عند 35 +/- 5, درجة مئوية لمدة 24 ساعة.

تمييز المستعمرات سواء فى حالة استخدام البيئة فى صورة صلبة أو سائلة ربما بفقد أو يتعذر اذا حضنت المزارع أكثر من 24 ساعة.

بعد عشر عينات اختبر تعقيم مياه الشطف بترشيح 100 ملل واختبارها كمصدر للتلوث بنحضين أطباقها تحت نفس ظروف تحليل العينة.

لعينات المياه التى تستعمل فى اغراض أخرى خلاف الشرب وبسبب وجود أعداد كبيرة من بكتريا القولون يجب تعقيم وحدة الترشيح بعد كل عينة. وكبديل، استعمل محلول منظم Buffer rinseلشطف الوحدة بعد ازالة الفلتر ومنع نقل التلوث بين العينات.

3 . 5 .طريقة التخصيب البديلة Alternative enrichment technique

ضع وسادة ماصة معقمة فى غطاء طبق بترى معقم وشبعها بحوالى 2 ملل من بيئة مرق لوريل تربتوز محضر كما ذكر مسبقا ضع المرشح الغشائى الذى رشحت عليه العينة على الوسادة الماصة ولا تقلب الطبق وحضن لمدة 1,5 الى 2 ساعة عند 35 +/- 5, درجة مئوية فى جو رطوبته 60% على الأقل.

اذا استعمل بيئة اندو آجار، ازل الفلتر من على سطح الوسادة الماصة بعد التحضين وضعه بحركة دائرية على سطح بيئة اندو آجار مع الحرص بعدم السماح بوجود هواء بين الفلتر والبيئة.

أما اذا استعملت البيئة السائلة ، فانه يتم وضع وسادة جديدة فى الطبق وتشبع بالبيئة M-Endoثم يزال الفلتر من على الوسادة القديمة ويقلب الطبق ويحضن تحت نفس ظروف استخدام البيئة الصلبة.

سواء استخدمت البيئة الصلبة أو السائلة اقلب الأطباق وحضن لمدة 20 الى 22 ساعة عند35 +/- 5, درجة مئوية.

5 . 4 . العد Counting

لعد المستعمرات على سطح المرشحات الغشائية استعمل قوة تكبير 10 – 15 مرة من خلال

Wide-field dissecting microscope or other optical devices

مع استعمال لمبة فلورسنت بيضاء كمصدر للضوء وتوجه الاضاءة حتى ترى أوضح صورة . مستعمرات بكتريا القولون المثالية لها لون قرنفلى Pink الى أحمر قاتم مع لمعان معدنى على السطح. ز عد كلا من المستعمرات المثالية وغير المثالية Typical and atypical. المنطقة اللامعة ربما تختلف فى الحجم من نقط فى حجم رأس الدبوس الى كل سطح المستعمرة. مستعمرات بكتريا القولون غير المثالية يمكن أن تكون ذات لون أحمر قاتم، مخاطية Mucoid أو ذات نواة دون لمعان. عامة المستعمرات القرنفلية، الزرقاء، البيضاء أو عديمة اللون والتى يغيب عنها اللمعان تعد على أنها ليست بكتريا القولون. عدد كل المستعمرات (بكتريا القولون وغيرها) على بيئة الاندو ليس له علاقة بعدد البكتريا الكلى فى العينة الأصلية. العدد العالى من البكتريا الغير قولونية ربما يتداخل مع نشوء أقصى أعداد من بكتريا القولون. تبريد المزارع (بعد 22 ساعة تحضين) مع العدد المرتفع من البكتريا الغير قولونية لمدة 5, الى 1 ساعة قبل العد ربما يمنع الاحتشاد ويساعد على تمييز اللمعان

Deter spread of confluence while aiding sheen discernment.

عينات المياه المطهرة أوناتج المخلفات السائلة المعالجة ربما يحتوى على كائنات مضارة Stressed organisms والتى تنمو ببطء وتنتج أقصى لمعان فى 22 – 24 ساعة. الكائنات من المصادر الغير مطهرة ربما تنتج اللمعان بعد 1ذ6 – 18 ساعة، ويبهت اللمعان بعد 24 – 30 ساعة.

5 . 5. التحقق من بكتريا القولون Coliform verification

على فترات، ربما تظهر المستعمرات اللامعة المثالية عن نمو بكتريا لا تتبع بكتريا القولون والمستعمرات غير المثالية (مستعمرات لونها أحمر قاتم أو مستعمرات ذات نواة دون لمعان) ربما تكون بكتريا القولون. ويفضل أن يتحقق من كل نوعيات المستعمرات المثالية وغير المثالية عن طريق مسح الفلتر الغشائى أو التقاط على الأقل 5 مستعمرات مثالية وخمسة

مستعمرات غير مثالية من مزرعة فلتر غشائى. وفى حالة المياه الأخرى خلاف مياه الشرب، كحد أدنى، تحقق من 10 مستعمرات لامعة (وممثلات للمستعمرات الغير مثالية والمختلفة فى مظهرها) من عينات المياه الموجبة شهريا (QA/QC notes). اعتمادا على الحاجة ونوعية العينة، ربما تطبق المعامل مقاييس متشددة (مثلا، التحقق من مستعمرة واحدة من كل نوع Typeمثالى أو غير مثالى من مزرعة من الترشيح الغشائى، تحقق من 10% من العينات الموجبة). أضبط الاعداد بناء على نتيجة التحقق.

5 . 6 . 1. اختبارات التحقق Verification tests

5 . 6 . 1 . 1 . تخمر اللاكنوز- انقل نمو من كل مستعمرة أو امسح غشاء الترشيح باستعمال Swab قطن (فى حالة اختبار التواجد والغياب فى عينات مياه الشرب) وضعها فى مرق لوريل سلفات، وحضن عند 35 +/- 5, درجة مئوية لمدة 48 ساعة\. انتاج غاز فى مرق اللوريل سلفات والتأكيد فى مرق بريلينت جرين لاكتوز (راجع بند 8 . 2) وخلال 48 ساعة تحقق من المستعمرة كبكتريا القولون. ومن الممكن زرع البيئتان فى نفس الوقت والتحقق من انتاج الغاز فى كلاهما. واضافة حقن أنابيب EC broth والتحضين عند 44,5 +/- 2, درجة مئوية لمدة 24 ساعة يعطى نتيجة عن وجود بكتريا القولون البرازية، وحقن انابيب من نفس البيئة مضاف اليها MUG والتحضين تحت نفس الظروف السابقة يعطى نتيجة عن وجود ايشيرشيا كولاى.

5 . 6 . 1 . 2 . بديل عن التحقق من بكتريا القولون_ استعمل تلك الطريقة لعزل مستعمرات على أغشية الترشيح. اذا شك بأن المزرعة مختلطة أو اذا كانت المستعمرات المفصولة أقل من 2 مم، ازرع من النمو على بيئة M-Endo أو ماكونكى آجار لتأكيد نقاء المزرعة أو اجرى اختبار انابيب التخمر.

5. 6 . 1 . 3 . الاختبار السريع-التحقق من المستعمرات باستعمال اختبار التفاعل للسيتوكروم أكسيديز وبيتا جالاكتوسيديز الموجب خلال 4 ساعات تحضين للانبوبة أو طريقة اختبار البقعة Spot test .

5 . 6 . 1 . 4 . نظم الاختبار المتعدد Commercial multi-test systems

تحقق من المستعمرة بزرعها للتنقية . اختار مستعمرة معزولة جيدا، احقنها فى نظام الاختبار المتعدد لمجموعة Enterobacteriaceae والتى تشمل اختبارات تخمر اللاكتوز و / أو بيتا جالاكتوسيديز وسيتوكروم أكسيديز.

6 . حساب كثافة بكتريا القولون Calculation of Coliform Density

احسب العدد، باستعمال المرشحات الغشائية التى بها 20 – 80 مستعمرة كوليفورم وليس أكثر من 200 مستعمرة من كل الأنواع لكل مرشح غشائى باستعمال المعادلة:

$$\text{بكتريا القولون الكلية / 100 ملل} = \frac{\text{عدد مستعمرات بكتريا القولون} \times 100}{\text{حجم العينة المرشحة ملل}}$$

اذا لم تتواجد مستعمرات لبكتريا القولون يكتب التقرير أقل من 1 من بكتريا القولون/ 100 ملل.

ولعد التحقق طبق المعادلة التالية:

$$\text{نسبة بكتريا القولون المتحقق منها} = \frac{\text{عدد المستعمرات}}{\text{العدد الكلى لمستعمرات الكوليفورم المعرضة للتحقق}} \times 100$$

6 . 1 . المياه من نوعية مياه الشرب

نظم EPA تحتم خلو المياه من بكتريا القولون / 100 ملل فان ذلك يتطلب تقدير كثافة بكتريا القولون فى عينات متكررة . هذا مهم اذا كانت بكتريا القولون مستوطنة نظام التوزيع . المعلومات الكمية تعطى مؤشر عن مدى حدث التلوث.

المياه الجيدة محتواها من بكتريا القولون يكون أقل ما يمكن. لذلك ، تعد كل مستعمرات بكتريا القولون ولا يؤخذ فى الاعتبار الحد الأدنى المذكور سابقا (20 مستعمرة) وتستعمل المعادلة لمعرفة كثافة بكتريا القولون.

اذا كان النمو مغطى لكل مسطح الفلتر الغشائى أو جزء منه والمستعمرات غير محددة تكتب النتيجة نمو طاغ مع وجود بكتريا القولون أو عدم وجودها

Confluent growth with (or without) coliform

اذا كان العدد الكلى لبكتريا القولون وغيرها يزيد عن 200 على سطح المرشح الغشائى أو اذا كانت المستعمرات محددة لعدها تكتب النتيجة أعداد كبيرة جدا لعدها too numerous to count Confluent or TNTC على الترتيب.

فى مياه الشرب، وجود بكتريا القولون دون لمعان ربما تؤطد عن طريق نقل قليل من المستعمرات الى انبوبة ملاق بريلينت جرين مع الصفراء أوكبديل تؤخذ Swap من سطح المرشح الغشائى وتوضع فى انبوبة مرق بريلينت جرين مع الصفراء وتحضن عند 35 +/- 5, درجة مئوية لمدة 48 ساعة وانتاج غاز معناه وجود بكتريا القولون.

وعدم الحصول على نتيجة يحتم الحصول على عينة أخرى من نفس الموقع خلال 24 ساعة.

للاقلال من الازدحام على سطح المرشح الغشائى نتيجة ترشيح 100 ملل، قسم العينة على 4 أغشية ترشيح مثلا واجمع النتائج على المرشحات الغشائية المستخدمة.

6 . 2 . المياه خلاف مياه الشرب Water of other thsan drinking water

اذا كانت الأعداد الظاهرة يمكن عدها وكان قد استعمل فى تحليل 100 ملل من العينة 2 مرشح غشائى وتم ترشيح 50 ملل من كلا منهما وظهر على الأول 3 مستعمرات والثانى 5 مستعمرات فان العدد الكلى يكون 8 مستعمرة / 100 ملل .

وفى حالة الحصول على نتيجة من ترشيح 10 ملل، 1 ملل، 1, ملل – 40 ، 9، وأقل من واحد من مستعمرات بكتريا القولون فان الحساب يتم على اساس نتيجة 10 ملل وهى 40 فيكون العدد/ 100 ملل 400 . واذا كان العدد الكلى للبكتريا على هذا المرشح أكبر من 200 تكتب النتيجة أكبر من أو تساوى 100/400 ملل.

6 . 3 . Statistical reliability of membrane filter results

جدول ص 10– 71

تأخر التحضين لبكتريا القولون الكلية

Delayed-Incubation Total Coliform Procedure

تطوير طريقة المؤشحات الغشائية القياسية يسمح بنقل العينة بعد ترشيحها الى مكان النعنل للتحليل وبالتالى يتم نقل المرشح الغشائى الى البيئة المتخصصة والتحضين واكمال الاختبار . هذا الاختبار الخاص بتأخير التحضين يمكن استعماله عند ما لا يكون عمليا استخدام الطرق التقليدية, ويمكن استعماله أيضا (أ) عندما لا يمكن حفظ العينة على درجة الحرارة المطلوبة أثناء النقل (ب) عندما يكون الوقت اللازم لعملية النقل أطول من الوقت المسموح به (ج) عندما يكون مكان أخذ العينة نائى عن منطقة المعمل . أجريت دراسات باستخدام مياه مالحة ومياه عذبة ووجد أن نتائج طريقة التأخير فى التحضين مماثلة لنتائج الاختبار الفورى للعينة . اكمال الاختبار لبكتريا القولون بنقل غشاء الترشيح من بيئة النقل الى LES Endo والتحضين عند 35 +/- 5, درجة مئوية لمدة 20 – 22 ساعة وعد المستعمرات المثالية Typicalوالغير مثالية Atypical.

بيئة النقل صممت لتسمح ببقاء بكتريا القولون حية ولكن لا تنتج مستعمرات مرئية خلال النقل. المواد الموجودة فى بيئة النقل تقتل البكتريا الأخرى المصاحبة لبكتريا القولون ولكن لا تقتلها هى ذاتها الى وقت نقلها الى بيئ ة اجراء الاختبار فى المعمل . ويجدر الاشارة الى أن طرق الاختبار للعينة بعد وصولها المعمل من الممكن أن يتم باتباع الطرق العادية أو باتباع الكرق البديلة التى سيأتى ذكرها.

1 . الأدوات

أطباق بترى بلاستيكية محكمة للمرشحات الغشائية أو زجاجية معقمة وملفوفة فى فيلم بلاستيك.

وحدة ترشيح فى الحقل تعقم بين العينات اذا كانت معدنية (كحول ميثيل ويشعل ثم يطفأ لتكوين فورمالدهيد أو يكتفى بغليانها فى الماء) أو لا يعاد استخدامها اذا كانت من البلاستيك .

ويمكن استخدام الأشعة الفوق بنفسجية فى التعقيم اذا توافر مصدر للتيار الكهربى . ويمكن ايجاد وسيلة للتفريغ باستخدام طلمبة يدوية.

2 . المواد وبيئة النقل

2 . 1 . M-Endo methods

2 . 1 . 1 . M-Endo preservative medium : حضر بيئة M-Endo كما سبق ، بعد تبريدها الى تحت 45 درجة مئوية أضف 3,48 جرام بنزوات الصوديوم /لتر . اخلط جيدا ووزعها 5 – 7 ملل فى أطباق صغيرة واحفظها فى الثلاجة ويهمل مالم يستعمل منها بعد 96 ساعة.

2 . 1 . 2 . محلول صوديوم بنزوات : أذب 12 جرام بنزوات صوديوم فى كمية من الماء Reagent-grade water واكملها الى 100 ملل. عقم فى الاوتوكلاف أو بالترشيح خلال مرشح غشائى 22, ميكرون ولا يستعمل بعد 6 شهور من تحضيره.

2 . 1 . 3 . سيكلوهكساميد Cyclohexamide اختياريا أضف سيكلوهكساميد الى بيئة M-Endo المضاف اليها البنزوات. ويضاف للتخلص من الفطر والخميرة فى حالة اعتياد تلويثها للعينة. أضف السيكلوهكساميد بواقع 50 مجم/100 ملل من البيئة. خزن محلول السيكلوهكساميد فى الثلاجة ويتخلص من المتبقى بعد 6 شهور.

2 . 2 . M-ST method

M-ST holding medium

Sodium dihydrogen phosphate ……جرام, 1
Dipotassium hydrogen phosphate .....جرام 3
Sulfanilamid ..... 1 جرام
Ethanol 95% ……. 10مل
Tris aminomethane ……..……3جرام
Reagent-grade water……..1 لتر
ر

أذب المكونات فى الماء. عقم فى الأوتوكلاف لمدة 15 دقيقة عند 121 مئوية . pH النهائى يجب أن يكون 8,6 +/- 2,. وزع بواقع 2 ملل على الوسادة الماصة Absorbent pad ويمكن حفظها فى الثلاجة مدة 96 ساعة.

3 . الطريقة

ضع الوسادة الماصة المعقمة فى طبق معقم وشبغها ببيئة Selected coliform holding med.

يزال غشاء التوشيح بعد انتهاء الترشيح ويوضع على سطح الوسلدو المشبعة السابقة وغلق الطبف باحكام . وفى حالة استخدام الأطباق الزجاجية يحكم غلق الطبق باستخدام شريط لاصق. يرسل الطبق أو اللأطباق بعد وضعها فى صندوق محكم وترسل الى المعمل للتحليل . يمكن أن تتحمل العينة 72 ساعة دون حدوث نمو.

بعد وصول الأطباق الى المعمل يرفع غشاء الترشيح ويوضع على بيئة M-Endo or LES-Endo وتحضن على 35 +/- 5و درجة مئوية لمدة 20 – 22 ساعة.

سجل وقت أخذ العينة، وقت وصولها، وقت اختبارها فى المعمل . احسب النتيجة وسجل الوقت الدى مر قبل اختبار العينة فى المعمل.

طريقة أغشية الترشيح لتقدير بكتريا القولون البرازية

Fecal Coliform Membrane Filter Procedure

بكتريا القولون البرازية ربما يتم تقديرها باستخدام الأنابيب المتعددة Multiple-tube procedure أو باستخدام طريقة أغشية الترشيح technique Membrane filte.
ويتم التحضين على درجة 44,5 +/- 2, درجة مئوية لمدة 24 ساعة. ولأهمية ضرورة التحضين عند تلك الدرجة فان الأطباق يتم وضعها فى أكياس بلاستيك غير منفذة للماء ويستخدم حمام مائى وتحضن الأطباق تحت سطح الماء . ويمكن استخدام أية حضانة تحقق الاشتراطات السابقة.

1 . المواد وبيئة الزرع

M-FC medium . 1 . 1

يستخدم فى التحضير البيئة الجاهزة ولا يلجأ الى تحضير البيئة من مكوناتها كالما توجد البيئة جاهزة تجاريا. وتركيب البيئة كالتالى:

Tryptose or Biosate …… 10 g

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

Yeast extract …… .. 3 g

Sodium chloride ……. 5 g

Lactose …… 12,5 g

Bile salt No, 3 or bile salt mixture …… …….1,5 g

Aniline blue …… 0,1 g

Agar (optional) ……15 g

Reagent-grade water …….. 1 L

تضاف المكونات الى ا لتر ماء مضاف اليه 10 ملل من محلول 1 % Rosalic acid مذاب فى 2, نورمال صودا كاوية. سخن لقرب الغليان وبرد الى أقل من 50 درجة مئوية. لا تعقيم للبيئة فى الأوتوكلاف. اذا استخدم الآجار توزع البيئة فى أطباق بترى 50 12X مم بكمية 5 – 7 ملل وتترك لتتصلب . pH النهائى 7,4 +/- 2, . البيئة النهائية تحفظ فى الثلاجة فى أكياس محكمة للمحافظة على الرطوبة، ويتخلص من البيئة السائلة الغير مستعملة بعد 96 ساعة فى حالة البيئة السائلة واسبوعان فى حالة اضافة آجار.

بختبر كل لوط من البيئة مقارن باللوط السابق المقبول (QC/QA) ويعمل تخفيف من مزرعة E,coli ويرشح حجم مناسب ليعطى 20 – 60 مستعمرة على الفاتر .ومع كل لوط تحقق من 10 مستعمرات أو أكثر متحصل عليها من عينات طبيعية مختلفة، لتأكيد عدم وجود نتائج ايجابية غيلا حقيقية False positive. لمعظم العينات تستخدم بيئة M-FC بدون Rosalic acid مع اعتبار أن ليس هناك تداخل من الخلفية البكتيرية. وهذا التداخل يتوقع فى حالة اختبار Storm water.

قبل الاستخدام يختبر كل Batch من البيئة لكفاءته باستخدام مز رعة ايجابية واخرى سلبية. ويختبر للتلوث فى نهاية وبداية كل سلسلة من الترشبح بامرار 20 – 30 ملل من محلول الشطف المعقم وفى حالة وجود تلوث تهمل النتائج للعينات المتأثرة بالتلوث ويعاد طلب عينات.

1 . 2 . أطباق الزرع Culture dishes

تستخدم الأطباق البلاستيكية الحكمة الغلق حتى لا يفقد رطوبة من البيئة ويلف كل طبق فى كيس بلاستيك محكم الغلق حتى لا تنفذ منه المياه بتحضينه تحت سطح الماء.

1 . 3 . الحضانه Incubator

التخصص فى اختبار بكتريا القولون البرازية يرجع الى استخدام حرارة التحضين . استخدام حضانة هوائية فى التحضين ر بما يترتب عليعا مشاكل نتيجة طبقات الحرارة فى الحضانة، انخفاض معدل انتقال الحرارة من هواء الحضانة الى البيئة، والتغير فى حرارة الحضانة مع كل عملية فتح لها طوال اليوم . ولذلك فان استخدام حضانة مائية (حمام مائى) هو ما ينصح به بالنسبة لهذا الاختبار الشديد الحساسية ويكون مغطى بغطاء جمالون لتقليل الفقد فىالحرارة وفى المياه.

2 . الطريقة Procedure

2 . 1 . اختيار حجم العينة اختار حجم العينة بالاسترشاد بالجدول التالى :

والحجم المختار يعطى ما بين 20 – 60 مستعمرة بكتريا قولونية يرازية على الفلتر.

TABLE 9222:III. SUGGESTED SAMPLES VOLUMES FOR MEMBRANE FILTER FECAL COLIFORM TEST

	Volume (X) To Be Filtered mL							
Water Source	100	50	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001
Lakes, reservoirs	X	X						
Wells, springs	X	X						
Water supply intake		X	X	X				
Natural bathing waters		X	X	X				
Sewage treatment plant			X	X	X			
Farm ponds, rivers				X	X	X		
Stormwater runoff				X	X	X		
Raw municipal sewage					X	X	X	
Feedlot runoff					X	X	X	
Sewage sludge						X	X	X

عندما تكون كثافة البكتريا غير معروفة ، رشح عدة حجوم أو تخفيفات للحصول على كثافة يمكن عدها. احسب التخفيف والحجم المتوقع أن يعطى عد معقول على الفلتر واختار كميتان أخرتان تمثل عشر وعشرة أضعاف الحجم المختار .

2 . 2 . ترشيح العينة Filtration of sample اتبع نفس الطريقة والاحتيا طات المشار اليها فى الاختبار لبكتريا القولون الكلية.

2 .3. تحضير طبق الزرع Preparation of culture dish ضع وسادة ماصة فى كل طبق وشبعها بحوالى 2 ملل من لبيئة (M-FC). ضع بطريقة معقمة الفلتر الذى تم ترشيح العينة من خلاله على الوسادة واتخذ الاحتياطات المشار اليها مسبقا. ويمكن استعمال البيئة المضاف اليها الآجار بدلا من الوسادة الماصة.

2 . 4 . التحضين Incubation توضع الاطباق فى كيس بلاستيك غير منفذ للمياه واغلقه باحكام ويحضن تحت سطح الماء فى الحمام المائى عند 44,5 +/- 2, درجة مئوية لمدة 24 +/- 2 ساعة. يراعى وضع كل الأطباق المستعملة خلال 30 دقيقة من الترشيح.

2 . 5 . العد Counting بكتريا القولون البرازيةعلى بيئة M-FC تأخذ درجات مختلفة من اللون الأزرق. بكتريا القولون الغير برازية تأخذ لون رمادى- كريم. قليل من مستعمرات بكتريا القولون الغير برازية سوف ترى على بيئة M-FC بسبب حرارة التحضين المرتفعة ووجود Rosalic acid ز استعمل للعد قوة تكبير 10 -15 باستخدام Binocular wide field.

2 . 6 . التحقق Verification تحقق من المستعمرات الزرقاء المثالية وأية مستعمرات غير مثالية Atypical رمادية الى خضراء .

2 . 7 . حساب كثافة البكتريا القولونية البرازية احسب عدد المستعمرات فى المجال المحدد 20 – 60 مستعمرة ويلاحظ أن الأعداد المسموح بها فى حالة بكتريا القولون الكلية 20 – 80 ويرجع ذلك لكبر حجم الخلية على بيئة M-FC.

تأخر التحضين للبكتريا القولونية البرازية

Delayed-Incubation Fecal Coliform Procedure

الطريقة مشابهة لطريقة البكتريا القولونية الكلية Total coliformز تستعمل فى حالة عدم امكان عمل الاختبار فى الحقل أو اذا كان هناك حالة خاصة ينصح فيها بأنه سيتم التحقق من المستعمرات. ترشح العينة ويوضع الفلتر على بيئة M-ST وترسل الى المعمل لاجراء الاختبار بنقل الفلتر الى بيئة M-FC والتحضين على 44,5 +/- 2, درجة مئوية لمدة 24 +/- 2 ساعة وتعد مستعمرات البكتريا القولونية البرازية . وبيئة M-ST تحافظ على حيوية البكتريا القولونية البرازية ولا تسمح لها بالنمو وتكوين المستعمرات ويمكن أن تستمر حيويتها على تلك البيئة لمدة 3 أيام والتأثير ضئيل.

جميع الخطوات بعد ذلك هى الخطوات العدية السابق ذكرها بالنسبة لبيئة M-FC.

الفصل الخامس

مجموعتى البكتريا السبحيه البرازيه والكريات المعويه ككشاف للتلوث

الفصل الخامس

مجموعتى البكتريا السبحيه البرازيه والكريات المعويه ككشاف للتلوث

FECAL STREPTOCOCCUS and ENTEROCOCCUS GROUPS

أولا: مجموعة البكتريا السبحيه Fecal Streptococcus Group

مجموعة البكتريا السبحية البرازيه تتكون من عدد من الأجناس genus للنوع species ستربتوكوكس مثل :

S. faecium, S. avium, S. bovis, S. equinus, S. faecali andS. gallinarum.

الكل يعطى نتيجة إيجابية مع Lance field's Group D antisera وتم عزلها من براز الحيوانات ذات الدم الدافئ warm-blooded animals.

تحت الأنواع

S. faecalis subspecies (variety) liquefaciens, and S. faecalis var. zymogenes

تتميز بمقدرتها على إسالة الجيلاتين وتحليل كرات الدم الحمراء.

مكان تواجد fecal streptococci هوالمعده والأمعاء gastrointestinal tract.
والأجناس الشائعة فى الانسان هى S. faecalis and S. faecium

وبالمثل فان S. bovis, S. equines snd S. avium غير مقتصر وجودها على الحيوان بالرغم من أنها عادة ما تكون متواجده بكثافة عالية فى براز الحيوانات . بعض أجناس البكتريا السبحية تسود فى أجناس محددة من الحيوانات وغير متواجده فى غيرها، ولكن ليس من الممكن تفرقة مصدر التلوث البرازى اعتمادا على اجناس البكتريا السبحيه.

استخدمت البكتريا السبحية البراز يه مع بكتر يا القولون البرازيه لتفرقة التلوث الآدمي عن التلوث من الحيوانات ذات الدم الدافئ . النسبة بين بكتريا القولون البرازيه / البكتريا السبحية البرازيه تكون أكبر من 4 فى حالة ما اذا كان مصدر التلوث آدمى، فى حين ما اذا كانت النسبة بينهما أقل من 7 ., يكون مصدر التلوث غير آدمى. على أن هذه النسبة محل تساؤل حيث أنه من المعروف أن مدة بقاء أجناس البكتريا السبحية حيه Survival مختلفه فنجد أن S. bovis and S. equinus تموت بسرعه عقب خروجها الى البيئة المائيه بينما S. faecalis and S. faecium تبقى حيه لمدة طويله. كذلك فان تأثير تطهير مخلفات الصرف الصحى يؤثر على تلك النسبه بين مؤشرات التلوث مما قد يجعل الاستنتاج عن مصدر التلوث غير صحيح . بالاضافة الى أن طريقة الكشف على البكتريا السبحية هى الأخرى عامل مؤثر فنجد أن استخدام بيئة KF مع طريقة الأغشية الفارزه Membrane Filter يعطى نتيجة ايجابية خادعة بنسبه تتراوح ما بين 10 – 90 % فى حالة المياه المالحة والعذبه . وعلى ذلك فانه لا يجب اتخاذ النسبة المذكورة بين بكتريا القولون البرازيه والبكتريا الشبحية البرازية كأساس للتفرقة بين التلوث الآدمى والحيوانى.

ثانيا: مجموعة البكتريا الكرويه المعويه Enterococcus Group

هى تحت مجموعه من مجموعة البكتريا السبحيه البرازيه وتشمل: S. faecalis, S. faecium, S. gallinarum, and S. avium
وتفرق على أساس مقدرتها على النمو فى وجود 6.5 % ملح طعام ، النمو عند pH 9.6 وعند كلا من درجتى حراره 10 ، 45 مئويه. وتستخدم كدليل على التلوث فى مياه المتنزهات Recreational water وتشمل شواطئ الاستحمام العذبة والمالحة (الخطوط الاسترشاديه هى 33 / 100 ملل فى المياه العذبه ، 35 / 100 ملل فى المياه المالحة) والأساس هو المتوسط لخمسه عينات على الأقل خلال الشهر ذلك خلال موسم استخدام الشاطئ فى الاستحمام.

اختيار طريقة الاختبار:

تستخدم طريقة العد الاحتمالى MPN فى حالة اختبار المخلفات السائله الخام والمعالجة بالكلور كذلك الرواسب Sediments ويمكن استعمالها أيضا فى اختبار المياه العذب ه والمالحه.

طريقة الأغشية الفارزه Membrane Filter تستخدم أيضا فى حالتى المياه العذبه والمالحه ولكن لا تستخدم فى حالة المياه عالية العكاره.

طريقة الأنابيب المتعدده Multiple-Tube Technique أو العد الاحتمالى MPN

أ. الاختبار المبدئى Presumptive Test

باستخدام بيئة Azide dextrose broth - التحضين على 35 +/- 5,. لمدة 24 +/- 2 ساعه واذا لم تشاهد عكاره فى قاع الأنبوبه تنتشر مع الرج تزاد مدة التحضين الى 48 ساعه +/- 3 ساعات.

ب. الاختبار التأكيدى Confirmed Test

باستخدام بيئة Pfizer selective enterococcus (PSE) agar - الأنابيب الايجابية للاختبار المبدئى تخطط على البيئة التأكيديه وتحضن على 35 مئويه لمدة 24 ساعه. المستعمرات البنيه المائله الى اللون الأسود مع وجود هاله بنية حولها ربما تنقل الى أنابيب من بيئة

Brain Heart Infusion Broth + 6.5 % NaCl والنمو عند التحضين على 45 مئويه يدل على أن المستعمرات تنتمى الى enterococcus group ومن عدد الأنابيب الايجابية يقدر عددها الاحتمالى .

تقدر البكتريا السبحية البرازيه من عدد الأنابيب الايجابيه فى اختبار MPN التى أعطت نتيجة ايجابيه على البيئة التأكيديه وتكون النتيجة مميزه بالع د الاحتمالى / 100 ملل.

ثانيا: طريقة الأغشية الفارزه

أ. بيئة mE agar for enterococci

ببتون	10 جرام
كلوريد صوديوم	15 جرام
مستخلص خميره	30 جرام
اسكيولين	1 جرام
اكتيديون (سيكلوهيكساميد)	5.,. جرام
صوديوم آزيد	15 .,. جرام
آجار	15 جرام
ماء Reagent grade	ا لتر

بعد التحضير والتعقيم تبرد البيئة الى 46 درجه مئويه ويضاف 0.25 جرام من Nalidixic acid مذاب فى 5 ملل من الماء ويضاف بضع قطرات من ايدروكسيد الصوديوم عشر عيارى لاذابة المضاد لحيوى. يضاف15 ., جرام تى تى سى ويخلط جيدا ليذوب. تصب لبيئة فى أطباق صغيرة وتترك لتتصلب. درجة الحموضة النهائيه تكون 0.2 -/+7.1 تحفظ الأطباق المصبوبه فى الظلام داخل الثلاجه وتصلح لمدة شهر. وهذه البيئة صالحة لاختبار مياه الاستحمام العذبه والمالحه.

- **EIA substrate**

Esculin	1 g
Ferric citrate	0.5 g
Agar	15 g
Reagent grade water	1 liter

pH 7.1 +/- 0.2 قبل التعقيم . تسخن للاذابه وتعقم وتبرد الى 46 مئويه وتصب فى أطباق وتترك لتتصلب وتحفظ فى الظلام عند 2 – 10 مئويه ويمكن استعمالها خلال شهر.

- **m-Enterocccus agar for fecal streptococci**

Tryptone	20 g.
Yeast extract	5 g.
Glucose	2 g.
Dipotassium hydrogen phosphate	4 g.
Sodium azide	0.4 g.
Triphenyl tetrazolium chloride (TTC)	0.1 g.
Agar	1o g.
Reagent water	1 Liter

يسخن لاذابة المكونات ، لا تعقم فى الأوتوكلاف ، توزع فى أطباق صغيره وتترك لتتصلب ، لا تحفظ وتحضر حديثا كل مره. وهذه البيئة تصلح لاختبار المياه العذبة والمالحه.

- **Brain – heat infusion Broth**

Infusion of calf brain	200 g.
Infusion of beef heart	250 g.
Proteose peptone	10 g.
Sodium chloride	5 g.
Disodium hydrogen ohosphate	2.5 g.
Reagent grade water	1 L

pH 7.4 بعد التعقيم.

- **Brain heart infusion agar**

تحضر باضافة آجار الى البيئة السابقه، تصب فى أنابيب مائله.

- **Bile esculin agar**

Beef extract	3g.
Peptone	5 g.
Oxgall	40 g.
Esculin	1 g.
Ferric citrate	0.5 g.
Agar	15 g.
Reagent grade water	1 L

يسخن لاذابة المكونات. توزع فى أنابيب وبعد تغقيمها توضع مائلة لتتصلب على صورة مائله ويمكن صبها بعد تعقيمها فى أطباق. لا تزيد مدة التعقيم عن 15 دقيقه حتى لا يصبح لونها قاتم. الحموضة النهائية بعد التعقيم 6.6 +/-2, . وتحفظ عند 4-10 مئويه.

الطريقه:

mE method

يختار حجم العينه ويرشح خلال membrane filter وينقل الى سطح البيئه (20 – 60 مستعمره على سطح membrane). يحضن غلى درجة 41 +/- نصف درجه. بعد 48 ساعة تحضين ينقل الفلتر الى EIA يحضن غلى درجة 41 +/- نصف درجه لمدة 20 دقيقة. تعد المستعمرات ذات اللون القرمزى الى أحمر على أنها الكريات المعويه enterococci وهى تكون راسب بنى الى أسود فى خلف المستعمره.

m-enterococcus method

يختار حجم العينه ويرشح خلال membrane filter وينقل الى سطح البيئه وتترك الأطباق 30 دقيقه قبل ادخالها الحضانه عند 35 مئويه +/- نصف درجه ولمدة 48 ساعة. تعد المستعمرات الحمراء فاتحة أو قاتمه وتكون تابعة enterococci.

التفرقه:

تنقل المستعمره الى سطح brain heart infusion agar وتحضن لمدة 24 – 48 ساعة على 35 مئويه. تنقل مستعمرة منفصله الى Brain heart infusion broth والى شريحتين زجاجيتان . تحضن أنابيب Brain heart infusion broth عند 35 مئويه لمدة 24 ساعة. ويضاف فوق أكسيد الأيدروجين 3% الى الفيلم على الشريحة اذا تكونت فقاقيع يكون الاختبار موجب وه1ا دليل على أن المستعمرة ليست من البكتريا السبحية البرازيه. أما اذا كان الاختبار سالب فيعمل سبغة جرام للفيلم على الشريحة الثانيه. المفروض أن Fecal streptococci، Enterococci موجبه لجرام وتكون كرويه مزدوجة أو فى سلاسل. ينقل لوب من Brain heart infusion broth الى كلا من:

Bile esculin agar ويحضن عند 35 مئوية لمدة 48 ساعة

Brain heart infusion broth ويضن عند 45 مئوية لمدة 48 ساعة

Brain heart infusion broth مضاف اليه 6.5 % ملح طعام والتحضين عند 35 مئوية لمدة 48 ساعة.

كتاليز -، جرام + كرويه على Bile esculin agar وعند 45 مئويه فى Brain heart infusion broth يدل على أن المستعمرة تنتمى الى Fecal streptocci group. النمو عند 45 مئويه فى وجود 6.5% ملح الطعام يدل على أن المستعمرة تنتمى الى enterococcus group

الفصل السادس

المواصفات القياسية لمياه الشرب

الفصل السادس

المواصفات القياسية لمياه الشرب

Drinking Water Standards

نظم الولايات المتحدة

فى عام 1977 أختيرت النظم القومية الأوليه لمياه الشرب الشرب National Interim Drinking Water Primary Regulationsلوضع جميع النظم العامة لمياه الشرب . وبصفة عامة فان الآبار الخاصة هى الوحيدة التى لم تنظم وذلك لأنها لا تخدم 15 وصلة خدميه أو تخدم على الأقل 25 شخص يوميا لمدة 60 يوما فى العام. ولتأكيد الأمان لجميع مياه الشرب يجب أن تستعمل نفس النظم الأولية المشار اليها كخطوط استرشادية بالنسبة للآبار . وبناء على النظم المشار اليها حدد أقصى مستوى للملوثات Maximum Contaminany Level (MCL) وهو أعلى تركيز مسمح به من ملوث معين فى مياه الشرب . بعض هذه التركيزات وضعت لمنع المشاكل الصحية التى تنشأ عن ترك يز عالى من ملوثات مختلفة خلال مدة طويلة من الوقت . ومع ذلك، فان وجود الملوثات الميكروبيولوجيه استعملت كدليل على وجود التلوث وامكانية حدوث مشاكل صحية منها . وبلتالى اختبرت مياه الشرب لبكتريا القولون الكلية Total coliform لتدل على التلوث الحديث.

أ. عند استعمال طريقة العد الاحتمالى Most Probable Number (MPN) فان أقصى مستوى للتلوث MCLs يكون:

- لا تتواجد بكتريا القولون فى اكثر من 10% من جزئية 10 ملل من العينات المختبرة فى الشهر
- اذا كانت العينات المختبرة خلال الشهر أقل من 20 فلا يسمح بأكثر من عينه واحدة تعطى نتيجة ايجابية بالنسبة الأجزاء الثلاث المستعمله من العينة فى تقدير MPN.

- لا يسمح بأكثر من 5 % من العينات تعطى نتيجة ايجابية فى الثلاثة اجزاء المستخدمة من العينة فى تقدير MPN وذلك اذا كانت العينات المختبرة 20 أو أكثر خلال الشهر.

ب. عند استعمال طريقة الترشيح خلال ا لأغشية الفارزة Membrane filtration (MF) فان أقصى مستوى للتلوث يكون:

- وحدة واحدة من وحدات تكوين المستعمرات Colony Forming Unit (CFU) فى كل 100 ملل من العينه كمتوسط للغينات المختبرة خلال شهر.
- يسمح بعينة واحدة تعطى 4 وحدات من وحدات تكوين المستعمرات (CFU) فى 100 ملل من العينة وذلك اذا كان عدد العينات أقل من 20 عينة خلال الشهر.
- اذا كانت العينات المختبرة 20 أو أكثر خلال الشهر يسمح 5% من العينات تعطى 4 وحدات من وحدات تكوين المستعمرات (CFU) فى كل 100 ملل من العينه .
- فى عام 1985عدلت المواصفات الأمريكية بعد ذلك بأن ه لا يسمح بتواجد بكتريا القولون الكلية Total coliform فى أى عينه من مياه الشرب.

الخطوط الاسترشادية لمنظمة الصحة العالمية World Health Organization Guidelines

يجب خلو مياه الشرب من بكتريا القولون البرازية Fecal coliform وذلك عند اختبار 100 ملل من العينة وذلك بالنسبة لكل مصادر المياه سواء كانت توزع خلال مواسيرأو أية وسيلة أخرى معالجة أو غير معالجة . أما بالنسبة لبكتريا القولون الكلية Total coliform فانها يجب أن تكون غائبة فى 100 ملل من العينة المختبرة المعالجة والموزعة خلال مواسير ويسمح عرضيا بتواجد مستعمرتان فى كل 100 ملل. بالنسبة للمياه التى لا توزع خلال مواسير يمكن السماح بتواجد 10 من وحدات تكوين المستعمرات فى كل 100 ملل من العينة. تكرارية تواجد أعداد عالية من بكتريا القولون يعنى الحاجة الى مصدر بديل يتوفر فيه حماية أكثر من التلوث. الفشل فى

تحقيق خاصية غياب بكتريا القولون الكلية والبرازية فى مصادر مياه الطوارىء يعنى الحاجة الى غليان الماء.

مياه الشرب المعبأة Bottled Water

يجب أن تكون جودة مياه الشرب المعبأة ميكروبيولوجيا على الأقل مماثلة لجودة مياه الشرب الغير معبأة. بالاضافة الى ذلك، يجب أن تعالج المياه المعبأة بحيث أن يمنع نمو الكائنات الدقيقة الانتهازية مثل بكتريا سيدوموناس ايريوجينوزا Pseudomonas aeruginosa.

معايير نوعية مياه التنزه والاستجمام

Recreational Water Quality Criteria

معايير نوعية مياه التنزه والاستجمام (ملامسة الجسم تماما) تم مراجعتها من قبل وكالة حماية البيئة الأمريكية (US EPA)عام 1986 اعتمادا على دراسات أجريت (Cabelli, 1983; and Dufour, 1984). ولقد أظهرت هذه الدراسات على وجود علاقة قوية بين مستوى بكتريا القولون فى المياه وانتشار الأمراض بين الذين يستخدمون تلك المياه فى الاستحمام. ولقد ذكرت وكالة حماية البيئة الأمريكية الدراسات التى أظهرت علاقة أقوى بين مجموعة بكتريا الانتيروكوكى enterococci عن بكتريا القولون البرازية خاصة بالنسبة لأمراض القناة الهضميه سواء بالنسبة للسباحة فى مياه مالحة أو مياه عذبة . ولقد وجد أن تلك العلاقة بين ا نتشار الأمراض وبكتريا ايشيريشيا كولاى Escherichia coli بالتحديد متساوية مع العلاقة بمجموعة بكتريا انتيروكوكى خاصة بالنسبة للمياه العذبة وليس فى حالة مياه البحر. ولقد حددت المواصفات للمياه العذبة والمالحة بالآتى (EPA, 1986):

فى حالة المياه العذبة :

- عدد ايشيريشيا كولاى يساوى أو أقل من 126 / 100 ملل
- عدد مجموعة انتيروكوكى يساوى أو أقل من 33/ 100 ملل

فى حالة المياه المالحة (البحر) : عدد مجموعة انتيروكوكى يساوى أو أقل من 35 / 100 ملل.

ولقد حددت طريقة الكشف عن كلا الدليلين باستخدام الأغشية الفارزة Membrane Filter (076-85-4/600 EPA).

REFERENCES

Heterotrophic Plate Count

- American Public Health Association. 1985. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 16th ED.American Public Health Association, Washington, D.C. 10005, 1267 pp.
- Brazos, B.J. and O'Connor, J.T. 1988. Relative contributions of regrowth and aftergrowth to the number of bacteria in a drinking water distribution system, pp. 433-467 in Technology Conference Proceedings, WQTC-15, Issues and Answers for Today's Water Quality Professional,American Water Works Association, Denver, Colorado.
- Buck, J.D. 1979. The plate count in aquatic microbiology. Pp.19-28 in Costerton, J.W. and Colwell, R.R. (editors), Native Aquatic Bacteria: Enumeration, Activity, and Ecology, ASTM STP 695, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.
- Buck, J.D. and Cleverdon, R.C. 1960. The spread plate as a method for the enumeration of marine bacteria. Limnology and Oceanography 5: 78-80.
- Camper, A.K., LeChevallier, M.W., Broadway, S.C., and
- McFeter, G.A. 1986. Bacteria associated with granular activated carbon particles in drinking water. Applied and
- Environmental Microbiology 52: 434-438.
- Clark, D.S. 1971. Studies on the surface plate method of counting bacteria. Canadian Journal of Microbiology 17: 943-946.
- Colbourne, J.S. 1985. Materials usage and their effects on the microbiological quality of water supplies. Journal of Applied Microbiology 59:47S-59S, Symposium Supplement.
- Donlan, R.M. and Pipes, W.O. 1987. Pipewall biofilm in Drinking water mains.pp. 436-660 in Technology Conferenc Proceed-ings.

WQIC-14. 1986, Advances in Water Analysis and Treatment. American Water Works Association, Denver, Colorado.

- Fiksdal, L., Vik, E.A., Mills, A., and Staley, J.T. 1982. Nonstard methods for enumerating bacteria in drinking water. Jour. American Water Works Association 74:313-
- 318.
- Fronk-Leist, C.A. and Love, O.T.,jr. 1984. Evaluating the quality of water treated by redwood slat tower aerators. pp, 253-264 in Technology Conference Pro-ceedings, WQTC-11, 1983, Water Quality and Treatment: Advances in Laboratory Technology, American Water Works Association, Denver, Colorado.
- Fujioka, R., Kungskulniti, N., and Nakasone, S. 1986.
- Evaluation of the presence-absence test for coliforms and the membrane filtration method for heterotrophic bacteria. Pp. 271-283, in Technology Conference Proceedings, WQTC-13, 1985, Advances in Water Analysis and Treatment, American Water Works Association, Denver, Colorado.
- Geldreich, E.E. 1974. Is the total counts necessary? Pp. VII-1-VII-8 in Technology Conference Proceedings. WQTC- 1973, Water Quality, American Water Works Association, Denver, Colorado.
- Geldreich, E.E. 1988. Coliform non-compliance nightmares in water supply distribution systems. Pp. 55-74. in WaterQuality: A Realistic Prespective. Seminar/Workshop, Ann Arbor, Michigan, February, 1988. Sponsored by The Univ. of Michigan College of Engineering, Michigan Section of the American Water Works Association, Michigan Water Pollution Control Association and Michigan Department of Public Health.
- Gibbs, R.A. and Hayes, C.R. 1988. The use of R2A medium and the spread plate method for the enumeration of the heterotrophic bacteria in drinking water. Letters in Applied Microbiology 6: 19-21.
- Goulder, R. 1976. Evaluation of media for counting viable bacteria in estuaries.Journal of Applied Bacteriology 41: 351-355.
- Green, B.L., Taylor R.H., and Geldreich, E.E. 1982. The SPC Sampler a simple procedure for monitoring the bacteriologic quality of water. pp. 125-133 in Technology

- Conference Proceedings, wQTC-9, 1981, Advances in Laboratory Techniques for Quality Control, American Water Works Association, Denver, Colorado.
- Hutchinson, M. and Ridgway, J.W. 1977. Microbiological aspects of drinking water . pp. 179-218 in Skinner, F.A.and Shewan, J.M. (editors), Aquatic Microbiology, Society for Applied Bacteriology Symposium Series No. 6, Academic Press, London, New York, San Francisco.
- Klein, D.A. and Wu, S. 1974. Stress: a factor to be considered in heterotrophic microorganisms enumeration from aquatic environments. Applied Microbiology 27: 427-431.
- Koch, R. 1912. Uber die neuen Untersuchungsmethoden Nachweis der Microkosmen in Roden, Luft und Wasser,
- Rerinted in Ges. Werke von R. Koch 1:274-284. Berlin.
- LeChevallier, M.W., Seidler, R.J., and Evans, T.M. 1980.Enumeration and characterization of standard plate count bacteria in chlorinated and raw water supplies. Applied and Environmental Microbiology 40: 922-930.
- LeChevallier, M.W., Babcock, T.M., and Lee, R.G. 1987.Examination and characterization of distribution system biofilms. Applied and Environmental Microbiology 53:2714-2724.
- LeChevallier, M.W., Cawthon, C.D., and Lee, R.G. 1988.Inactivation of biofilm bacteria. Applied and Environ-mental Microbiology 54: 2492-2499.
- Lombardo, L.R., West, P.R., and Holbrook, J.L. 1986. A Comparison of various media and incubation temperatures used in the heterotrophic plate count analysis. Pp. 251-270 in Technology Conference Proceeding, WQTC-13, 1985, Advances in Water Analysis and Treatment, American Water Works Association, Denver, Colorado.
- McLeod, B.W. and Zimmerman, J.A. 1987. Selected effects on distribution water quality as a result of conversion to chloramines. Pp. 619-636 in Technology Conference Proceedings, WQTC-14, 1986, Advances in Water Analysis and Treatment, American Water Works Association, Denver, Colorado.

- Maul, A., Block, J.C., and El-Shaarawi, A.H. 1985. Statistical approach fpr comparison between methods of bacterial enumeration in drinking water. Journal of Microbiological Methods 4: 67-77.
- Maul, A., El-Shaarawi, A.H., and Block, J.C. 1985a. Hetero-trophic bacteria in water distribution systems. I. Spatial and temporal variation. The Science of the Total Environment 44: 201-214.
- Maul, A., El-Shaarawi, A.H., and Block, J.C. 1985b. Heterotrophic bacteria in water distribution systems. II. Sampling design for monitoring. The Science of the Total Environment 44: 215-224.
- McNew, G.L. 1938. Dispersion and growth of bacterial cells suspended in agar. Phytopathology 28: 387-401.
- Means, E.G., Hanami, L., Ridgway, H.F., and Olson, B.H. 1981. Evaluating mediums and plating techniques for enumerating bacteria in water distribution systems. Jour.
- American Water Works Association 73: 585-590.
- Nagy, L.A. and Olson, B.H. 1986. Occurrence and significance of bacteria, fungi and yeasts associated with distribution pipe surfaces. Pp. 213-238 in Technology Conference Proceedings. WQTC-14, 1985, Advances in Water Analysis and Treatment American Water Works Association, Denver, Colorado.
- Olson, B.H. and Hanami, L. 1981. Seasonal variation of bacterial populations in water distribution systems. Pp. 137-150 in Technology Conference Proceedings, WQTC-8, 1980. Advances in Laboratory Technniques for Quality Control, American Water Works Association, Denver, Colorado.
- Olson, B.H. and Nagy, L.A. 1984. Microbiology of potable water. Advances in Applied Microbiology30: 73-132.
- Prescott, S.C., Winslow, C-E.A., and McCrady, M. 1950.Water Bacteriology, 6th edition, John Wiley and Sons, Inc., New York. 368 pp.Reasoner, D.J. and Geldreich, E.E. 1980. Significance of pigmented bacteria in water supplies. Pp. 187-196 in Technology Conference Proceedings, WQTC-7, 1979, Advances in Laboratory Techniques for Quality Control, American Water Works Association, Denver, Colorado.

- Reasoner, D.J. and Geldreich, E.E. 1979. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Abstract N 7, p. 180, Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology, American Society for Microbiology, Eashington, D.C.
- Reasoner, D.J. and Geldreich, E.E. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Applied Environmental Microbiology 49: 1-7.
- Reasoner, D.J., Blannon, J.C., and Geldreich, E.E. 1987.
- Microbiological characteristics of third faucet point-of-use devices. Journal American Water Works Association 79: 59- 66.
- Reasoner, D.J., Blannon, J.C., Geldreich, E.E., and Barnick, J. 1989. Non-photosynthetic pigmented bacteria in a potable water treatment and distribution system. Applied and Environmental Microbiology 55: 912-921.
- Ridgway, H.F., Kelly, A., Justice, C., and Olson, B.H. 1983. Microbial fouling of reverse osmosis membranes used in advanced wastewater treatment tech-nology: chemical, bacteriological, and ultrastructural analyses. Applied and Environmental Microbiology 45: 1066-1084.
- Ridgway, H.F., Justice, C.A., Whittaker, C., Argo, D.G., and Olson, B.H. 1984. Biofilm fouling of RO membranes-its nature and effect on treatment of water for reuse. Jour.
- American Water Works Association 76: 94-102.
- Ridgway, J.W. 1978. The role of plate counts in the Surveillance of potable water. Paper No.3 in Bacteriological problems in Water Supply. A Water Research Seminar,May 18, 1978, Madmenham Laboratory, Henley Road, Madenham, P.O 16, Marlow, Bucks, SL7 2HD.
- Roszak, D.B. and Colwell, R.R. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. Microbiological Reviews 51: 365-379.
- Scoenen, D. 1986. Microbial growth due to materials used in drinking water systems. Pp. 627-647 in Rehm, H.J and Reed, G. (editors), Biotechnology (Volume 8), VCH Verlagsgellschaft, Weinheim, Germany.

- Silley, P. 1985. Evaluation of total-count samples against the traditional pour plate method for enumeration of total viable counts of bacteria in a procees wate system.
- Letters in Applied Microbiology 1:41-43.
- Stapert, E.M., Sokolski, W.T., and Northam, J.I. 1962. The factor of temperature in the better recovery of bacteria from water by filtration. Canadian Journal of Microb-iology 8: 809-810.
- Stetzenbach, L.D., Kelley, L.M., and Sinclair, N.A. 1986. Isoltion, identification And growth of well-water bacteria. Groundwater 24: 6-10.
- Taylor, R.H. and Geldreich, E.E. 1979. A new membrane filter procedure for bacterial counts in potable water and swimming pool samples. Jour American Water Works Association 71: 402-405.
- Taylor, R.H., Allen, M.J., and Geldreich, E.E. 1983. Standard plate count: a comparison of pour plate and spread plate methods. Jour American Water Works Association 75: 35- 37.
- United State Environmental Protection Agency 1975. Interim Primary Drinking Water Standards. Federal Register 40: 11990-11996, Washington,D.C.
- VanSoestbergen, A.A. and Lee, C.H. 1969. Pour plates or Streak plates. Applied Microbiology 18: 1092-1093.
- Water Research Center. 1976, Deterioration of bacteriological quality of water during distribution. Notes on Water Research No. 6, October.

1. References on Poured Plate Method

- Breed, R. S. & Dotterer, W. D. 1916. The number of colonies allowable on satisfactory agar plates. Tech. Bull. 53, New York Agricultural Experiment Sta. Butterfield, C.T. 1933. The selection of a dilution water for Bacteriol-ogical examinations. J. Bacteriol. 23: 355; Pub. Health Rep. 48: 681.

- Archambault, J., Curot, J. & McCrady, M.H. 1937. The need of uniformity of conditions for counting plates (with suggestions for a standard colony counter). Amer. J. Pub. Health 27: 809.
- Richard, O.W. & Heun, P.C. 1945. An improved dark-field Quebec colony counter. J. Milk Technol. 8: 253.
- Berry, J.M., Mcneill, D.A. & Witter, L.D. 1969. Effect of
- delays in pourplating on bacterial counts. J. DairySci. 52:
- 1456.
- Geldreich, E.E., Nash, H.D., Reasoner, D.J. & Taylor, R.H. 1972. The necessity of controlling bacterial populations in potable waters: Community water supply. J. Amer. Water Works Assoc. 64: 596.
- Geldreich, E.E.1973. Is the total count necessary? Proc. 1st Annu. AWWA Water Quality Technol. Conf. Dec. 3-4, 1973. Cincinnati, Ohio. P. VII-1. American Water Works
- Assoc., Denver, Colo.
- Ginsburg, W. 1973. Improved total count techniques. Proc. 1st Annu. AWWA Water Quality Technol. Conf. Dec. 3-4, 1973. Cincinnati, Ohio. P. VIII-1. American Water Works Assoc., Denver, Colo.
- Dutka, B.J., Chau, A.S.Y.& Coburn, J. 1974. Relationship of heterotrophic bacterial indicators of water pollution and fecal sterols. Water Res. 8: 1047.
- Klein, D.A. & Wu, S. 1974. Stress : a factor to be considered in heterotrophic microorganism enumeration from aquatic environments. Appl. Microbiol. 37:429.
- Geldreich, E.E., Nash, H.D., Reasoner, D.J. & Taylor, R.H. 1975. The necessity for controlling bacterial populations in potable waters: Bottled water and emergency water supplies. J. Amer. Water Works Assoc. 67: 117.
- Bell, C.r., Holder-Franklin, M.A. & Franklin, M. 1980. Heterotrophic bacteria in two Canadian rivers.-I. Seasonal
- variation in the predominant bacterial populations. Water
- Res. 12: 449.
- Means, E.,G., Hanami, L., Ridgway, G.F.& Olson, B.H. 1981. Evaluating medium and plating techniques for

- Enumerating bacteria in water distribution systems. J. Amer. Water Works Assoc. 73:585.
- American Public Health Association. 1993. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 16th ed. Amrican Public Health Assoc., Washington, D.C.
- Reasoner. D.J. & Geldreich, E.E. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Appl. Environ. Microbiol. 49:1.

References on Spread Plate Method

- Buck, J.D. & Cleverdon, R.C. 1960. The spread plate as a method for the enumeration of marine bacteria. Limnol. Oceanogr. 5 : 78.
- Clark, D.S. 1967. Comparison of pour and surface plate methods for determination of bacterial counts. Can. J. Microbiol. 13: 1409.
- Van Soestbergan, A.A. & Lee, C.H. 1969. Pour plates or streak plates. Appl. Microbiol. 18: 1092.
- Clark, D.S. 1971. Studies on the surface plate method of counting bacteria. Can. J. Microbiol. 17: 943.
- Gilchrist, J.E., Campbell, J.E., Donnelly, C.B., Peller, J.T.& Delaney, J.M. 1973. Spiral plate method for bacterial determination> Appl. Microbiol. 25: 244.
- Ptak, D.M. & Ginsburg, W. 1976. Pour plate vs. streak plate method. Proc. 4th Annu. AWWA Water Quality Technol. Cof., Dec. 6-7, 1976. San Diego, Cal., p. 2B-5. American Water Works Assoc., Denver, Colo.
- Dutka, B.J., ed. 1978. Methods for microbiological analysis of waters, wastewaters and sediments. Island waters directorate, Scientific Operation Div., Canada Center for Inland Waters, Burlington, Ont.
- Kaper, J.B., Kills, A.L. & Colwell, R. R. 1978. Evaluation of the accuracy and precision of enumerating aerobic heterotrophs in water samples by the spread method. Appl. Environ. Microbiol. 35: 756.
- Young, M. 1979. A modified spread plate technique for the determination of concentrations of viable heterotrophic bacteria. STP 673:41-51, American Soc. Testing & Materials, Philadelphia, Pa.
- Geldreich, E.E. 1981. Current status of microbiological water quality criteria. ASM News 47: 23.
- Taylor, R.H., Allen, M.J. & Geldreich, E.E. 1981. Standard plate count: A comparison of pour plate and spread plate methods. Proc. 9th Annu. AWWA Water Quality Technol. Conf., Dec. 6-9, 1981. Seattle, Eash., p. 223. American Water Works Assoc. Denver, Colo.

References on Determination of total count by membrane filter method

- Clark, H.F., Geldreich, E.E., Jeter, H.I., & Kabler, P.W. 1951. The membrane filter in sanitary bacteriology. Pub. Health Rep. 66: 951.
- Stopert, E.M., Sokoski, W.T. & Northam, J.T. 1962. The factor of temperature in the better recovery of bacteria freom water by filtration. Can. J. Microbiol. 8: 809.
- Taylor, R.H. & Geldreich, E.E. 1979. A new membrane filter procedure for bacterial counts in potable water and swimming pool samples. J. Amer. Water Works Assoc. 71: 402.
- Clark, J.A. 1980. The influence of uncreasing number of non-indicator organisms upon the detection of indicator organisms by the membrane filter and presence-absence tests. Can. J. Microbiol. 20: 827.
- Dutka, B.J. ed. 1981. Membrane filtration, Applications, Techniques, and Problems. Marcel Dekker, Inc., New York N.Y. and Basel, Swizerland.
- Hoadley, A.W. 1981. Effect of injury on the recovery of bacteria on membrane filters. In B.J. Dutka, ed. Membrane Filtration, Applications, Techniques, and Problems. P. 413. Marcel Dekker, Inc., New York N.Y. and Basel, Swizerland.

References on Epifluorescence microscopic method

- Hobbie, J.E., Daley, R.J. & Jasper, S. 1977. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. Appl. Environ.Microbiol. 33: 1225.
- Sierack, M.E., Joenson, P.W. & Sieburth, J. McH. 1985. Detection, enumeration, and sizing of planktonic bacteria by image-analyzed epifluorescence microscopy. Appl, Environ, Microbiol. 49: 799.

American Society For Testing And Materials. 1987. Standard test method for enumeration of aquatic bacteria by epifluorescence microscopy

counting procedure. ASTM D4455-85. Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.02, Water. American Soc. Testing & Materials, Philadelohia, Pa.

References on MPN method for coliform group.

- Sierman, V.B.D. 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
- Geldreich, E.E. 1975. Handbook for evaluating water bacteriological laboratories. 2nd ed. EPA-670/9-75-006. US Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio.
- Evans, T.M., Waarvick, C.E., Seidler, R.J. & LeChevallier, M,W. 1981. Failure of most probable number technique to detect coliforms in drinking water and raw water supplies. Appl. Environ. Microbiol. 41: 130.
- Seidler, R.J., Evans, T.M., Kaufman, J.R. , Waarvick, C.E. & LeChevallier, M.W. 1981. Limitations of standard coliform enumeration techniques. J. Amer. Water Works Assoc. 73: 538.

References on Coliform determination by MPN method:

- Woodward, R.L. 1957. How probable is the most probable number? J. Amer\. Water Works Assoc. 49: 1060.
- McCarthy, J.A. , Thomas, H.A. & Delaney, J.E. 1958. Evaluation of the reliability of coliform density tests. Amer. J. Pub. Health 48: 1628.
- US. Environmental Protection Agency, 1989. National primary drinking water regulations: analytical techniques: coliform bacteria; final rule. Federal Register 54 (35) 29998 (July 17, 1989).
- De Man, J.C. 1977. MPN tables for more than one test. European J. Appl. Microbiol. 4: 307.

References on P/A test for coliform

- Clark, J.A. & VLassoff, L.T. 1973. Relationships among pollution indicator bacteria isolated from raw water and distribution systems by the presence-absence (P-A) test. Health Lab. Sci. 10:163.
- Clark, J.A. 1980. The influence of increasing number of nonindicator organisms upon the detection of inducator organisms by the membrane filter and presence-absence tests. Can. J. Microbiol., 26:827.
- Clark, J.A., Burger, C.A. & Sabatinos, L.E. 1982. Characterization of indicator bacteria in municipal raw water., drinking water and new main water samples. Can. J. Microbiol. 28: 1002.
- Jacobs, N.J., Zeigler, W.L., Reed, F.C., Stukel, T.A. & Rice, E.W. 1986. Comparison of membrane filter, multiple-fermentation-tube, and presence-absence techniques for detection total coliform in community weater systems. Appl. Environ. Microbiol. 51:1007.
- Reice, E.W., Geldreich, E.E. & Read, E.J. 1989. The presence-absence coliform test for monitoring drinking water quality. Publ. Health Rep. 104: 54.

References on determination of fecal coliform by A1 medium:

- Geldreich, E. E., Clark, H.F., Kabler, P.W., Hoff, C.B., & Bordner, R.H. 1958. The coliform group. II,. Reactions in EC medium at 45^{o} C. Appl. Microbiol. 6: 347.
- Geldreich, E.E., Bordner, R.H., Hoff, C.B., Clark, H.F. & Kabler, P.W. 1962. Type distribution of coliform bacteria in the feces of warm blooded animals. J. Water Pollut. Control Fed. 34: 295.
- Geldreich, E.E. 1966. Sanitary significance of fecal coliforms in the environment. FWPCA Publ. WP-20-3 (Nov.) U.S. Dep. Interior. Washington, D.C.
- Andrews, W.H. & Presnell, M.W. 1972. Rapid recovery of Escherichia coli from estuarine water. Appl. Microbiol. 23: 521.

- Olson, B.H. 1978. Enhanced accuracy of coliform testing in seawater by a modification of the most-probable number method. Appl. Microbiol. 36: 438.
- Strandridge, J.H. & Delfino, J.J. 1981. A-1 medium: Alternative technique for fecal coliform organism enumeration in chlorinated wastewaters. Appl. Environ. Microbiol. 42: 918.

Trferences on MF Procedure for Coliform Group

- Clark, H.F., Geldreich, E.E., Jeter, H.I. & Kabler, P.W. 1951. The membrane filter in sanitary bacterialogy. Publ. Health Rep. 66: 951.
- Kabler, P.W. 1954. Water examination by membrane filter and MPN procedures. Amer. J.Pub. Health 44: 379.
- McCarthy, J.A., Delaney, J.E. & Grasso, R.J. 1961. Measuring coliforms in water. Water,Water Sewage Works `08: 238.
- Lin, S. 1973. Evaluation of coliform test for chlorinated secondary effluents. J. Water Pollut. Cpntrol Fed., 45: 498. Environmental Protection Agency (EPA). 1986. Test Methods for Escherichia coli and Enterococci in Water by the Membrane Filter Proced-ure. Environmental Monitoring and Support Laboratory, EPA 600/4-85/076, Cincinnati, OH.
- Bellamy, W.D., Silverman, G.P., Hendricks, D.W. and Logsdon, G.S. 1985. Removing Girdia cysts with Slow Sand Filtration. J. Am. Water Works Assoc., 77:52-60.
- Lin, S.D. 1985. Giardia lamblia and Water Supply. J. Am. Water Works Assoc., 77:40-47.
- Sterling, C.R. 1987. Cryptosporidium, A New Potential Waterborne Pathogen, Annual Meeting of the ASM.
- Schardinger 1982. Uber das Vorkommen Gahrung Errengender Spaltpilze im Trinkwasser und ihre Bedeutung fur die Hygienische Beurthelung Desselben, Wien. Kiln. Wochschr. 5:403-405.
- Dutka, B.J. (1975). Coliforms are an Inadequate Index of Water Quality. J. Environ. Health 36:39-46.
- Krieg, N. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- Escherich, T. 1985). Die Darmbakterien des Naugen-borenen und Sauglings. Med: 515-547.

- World Health Organization (WHO). (1985).Guidelines for Drinking Water Quality, Vol. 1, Geneva.
- McFeters, G.A., et al., 1974. Comparative Survival of Indicator Bacteria and Enteric Pathogens in Well Water. Appl. Environ. Microbiol. 27:823-829.
- Muller, G. 1964. What are the Lesson of the Hamburg Flood for Drinking Water Hygiene Standards? Arch. Hyg. Bakteriol. 148:321-326.
- Seligman, R., and Reitler, R. 1965. Enteropathogens in Water with Low Escherichia coli Titers. J. Am. Water Works Assoc. 57:157 2-1574.
- Eijkman, C. 1904. Die Garungsprobe bei 46^{o} als Hilfsmittel bei der Trinkwasseruntersuchung. Centralbh. Bakteriol. Abt. I, Orig. 37:742-752.
- Dufour, A., Strickland, E.H. and Cabelli, V.J. 1985. Membrane Filter Method for Enumerating Escherichia coli. Appl. Environ. Microbiol., 41:1152-1158.
- Feng, P.C.S. and Hartman, P.A. 1982. Fluorogenic Assays for Immediate Confirmation of Escherichia coli. Appl. Environ. Microbiol., 43:1320-1329.
- Petzel, J.P., and Hartman, P.A. 1985. Monesin-Based Medium for Determination of Total Gram-Negative Bacteria and Escherichia coli. Appl. Environ. Microbiol., 49:925-933.
- Freier, T.A., and Hartman, P.A. 1987. Improved Membrane Filtration Media for Enumeration of Total Coliform and Escherichia coli from Sewage and Surface Waters. Appl. Environ. Microbiol., 53:1246-1250.
- Prescott, S.C., Winslow, A.C., and Macrady, M.H. 1946. Water Bacteriology. P.207-212, John Wiley & Sons, New York.
- Levin, M.A., Fischer, J.R., and Cabelli, V.J. 1975. Membrane Filter Technique for Enumeration of Enterococci in marine Waters. Appl. Microbiol., 30:66-71.
- Mossel, D.A.A. et al. 1973. Microbiological Quality Assurance for Weaning Formula in: The Microbiological Safety of Food. London. Academic Press, pp.70-76.
- Cabelli, V.J. 1083. Health Effects Criteria for Marine Recreational Water: U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, EPA-600/1-80-031.

- Dufour, A.P. 1984. Health Effects Criteria for Fresh Recreational Waters. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, EPA 600/1-84-004.
- EPA. 1986. Ambient Water Quality for Bacteria. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, EPA 440/5-84-002.
- EPA 600/4-85-076. Test Methods for Escherichia coli and Enterococci in Water by the Membrane Filter Procedure, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, EPA 600/4-85-076.
- American Public Health Association (1998). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th Edition.
- Bordner, R. and Winter, J. 1978). Microbiological Methods for Monitoring the Environment: ater and Wastes. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, EPA 600/8-78-017.
- Vial, J. 1977. Bacteriological Analysis of Drinking Water. Commission of the Europe Communities, Luxembourg.
- McFeter, G.A., Cameron, S.C., and LeChevallier, M.W. 1982. Influence of Diluents, Media and Membrane Filters on the Detection of Injured Waterborne Coliform Bacteria. Appl. Envirpn. Microbiol. 43:97-103.
- Evans, T.M., Seidler, R.J., and LeChevallier, M.W. 1981. Impact of Verification Media and Resuscitation on Accuracy of the Membrane Filter Total Coliform Enumeration Technique. Appl. Microbiol. 41:1144-1151.
- LeChevallier, M.W., Cameron, S.C., and McFeter. G.A. 1983. New Medium for Improved Recovery of Coliform Bacteria from Drinking Water. Appl. Environ. Microbiom. 45:484-492.
- Chapman, G.H. 1947. A superior Culture Medium for the Enumeration and Differentiation of Coliforms. J. Bacteriol. 53:504.
- LeChevallier, M.W., Jakanoski, P.E., Camper, A.K. and McFeter, G.A. 1984. Evaluation of m-T7 Agar as a Fecal Coliform Medium. Appl. Environ. Microbiol. 48: 371-375.
- Delaney, J.F., McCarthy, J.A. and Grasso, R.J. 1962. Measurement of E.coli Type 1 by the Membrane Filter. Water Sewage Works 109:288-294.
- Dufour, A.P., Strickland, E.H. and Cabelli, V.J. 1981. Membrane Filter Method for Enumerating Escherichia coli. Appl. Environ. Microbiol. 41:1152-1158.

- Freier, T.A. and Hartman, P.A. 1987. Improved Membrane Filtration Media for Enumeration of Total Coliforms and Escherichia coli from Sewage and Surface Waters. Appl. Environ. Microbiol. 53:1246-1250.
- Levin, M.A., Fischer, J.R. and Cabelli, V.J. 1975. Membrane Filter Techniq-ue for Enumeration of Enterococci in Marine Waters. Appl. Environ. Microbiol. 30:66-71.
- Levin, M.A., and Cabelli, V.J. 1972. Membrane Filter Technique for Enumeration of Pseudomonas aeruginosa. Appl. Environ. Microbiol. 24:864-870.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

ARAB REPUBLIC OF EGYPT
German Technical Cooperation

ميكروبيولوجيا المياه

البرنامج الثالث

أسس الطرق الميكروبيولوجية وتقدير البنود الأساسية

Principals of Microbiological Procedures & Determination of Basic Parameters

الملحقات

Annex

Prof. Helmy Tawfik El-Zanfaly
National Research Center

June 2008

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

Annex 1

الملحق الأول

LAB 3: OBTAINING PURE CULTURES FROM A MIXED POPULATION

DISCUSSION

As stated in Lab 2, microorganisms exist in nature as mixed populations. However, to study microorganisms in the laboratory we must have them in the form of a pure culture, that is, one in which all organisms are descendants of the same organism.

Two major steps are involved in obtaining pure cultures from a mixed population:

1. First, the mixture must be diluted until the various **individual microorganisms become separated** far enough apart on an agar surface that after incubation they form visible **colonies isolated from the colonies of other microorganisms**. This plate is called an **isolation plate**.

2. Then, an isolated colony can be aseptically **"picked off"** the isolation plate (see Fig. 1) and **transferred** to new sterile medium (see Fig. 3). After incubation, all organisms in the new culture will be descendants of the same organism, that is, a **pure culture**.

Animation showing a portion of a single colony being "picked off."

A. STREAK PLATE METHOD OF ISOLATION

The most common way of separating bacterial cells on the agar surface to obtain isolated colonies is the streak plate method we used in Lab 2 to inoculate a petri plate. It provides a simple and rapid method of diluting the sample by mechanical means. As the loop is streaked across the agar surface, more and more bacteria are

rubbed off until individual separated organisms are deposited on the agar. After incubation, the area at the beginning of the streak pattern will show confluent growth, while the area near the end of the pattern should show discrete colonies (see Fig. 2).

B. THE POUR PLATE AND SPIN PLATE METHODS OF ISOLATION

Another method of separating bacteria is the pour plate method. With the **pour plate method**, the bacteria are mixed with melted agar until evenly distributed and separated throughout the liquid. The melted agar is then poured into an empty plate and allowed to solidify. After incubation, discrete bacterial colonies can then be found growing both on the agar and in the agar.

The **spin plate method** involves diluting the bacterial sample in tubes of sterile water, saline, or broth. Small samples of the diluted bacteria are then pipetted onto the surface of agar plates. A sterile, bent-glass rod is then used to spread the bacteria evenly over the entire agar surface (see Fig. 4) in order to see isolated colonies (see Fig. 5). In Lab 4 we will use this technique as part of the plate count method of enumerating bacteria.

C. USE OF SPECIALIZED MEDIA

To supplement mechanical techniques of isolation such as the streak plate method, many **special-purpose media** are available to the microbiologist to aid in the isolation and identification of specific microorganisms. These special purpose media fall into four groups: selective media, differential media, enrichment media, and combination selective and differential media.

1. Selective media

A selective medium has agents added which will **inhibit the growth of one group of organisms while permitting the growth of another**. For example, **Columbia CNA agar** has the antibiotics colistin and nalidixic acid added which inhibit the growth of gram-negative bacteria but not the growth of gram-positives. It is, therefore, said to be selective for gram-positive organisms, and would be useful in separating a mixture of gram-positive and gram-negative bacteria.

2. Differential media

A differential medium contains additives that **cause an observable color change in the medium when a particular chemical reaction occurs**. They are useful in differentiating bacteria according to some biochemical characteristic. In other words, **they indicate whether or not a certain organism can carry out a specific biochemical reaction** during its normal metabolism. Many such media will be used in future labs to aid in the identification of microorganisms.

3. Enrichment media

An enrichment medium contains additives that **enhance the growth of certain organisms**. This is useful when the organism you wish to culture is present in relatively small numbers compared to the other organisms growing in the mixture.

4. Combination selective and differential media

A combination selective and differential medium **permits the growth of one group of organisms while inhibiting the growth of another**. In addition, it differentiates those organisms that grow based on whether they can **carry out particular chemical reactions**. For example, Eosin Methylene Blue (EMB) agar is selective

for gram-negative bacteria. The dyes eosin Y and methylene blue found in the medium inhibit the growth of gram-positive bacteria but not the growth of gram-negatives. In addition, it is useful in differentiating the various gram-negative enteric bacilli belonging to the bacterial family Enterobacteriaceae (see Labs 12 & 13). The appearance of typical members of this bacterial family on EMB agar is as follows:

- Escherichia coli: large, blue-black colonies with a green metallic sheen
- Enterobacter and Klebsiella: large, mucoid, pink to purple colonies with no metallic sheen
- Salmonella and Shigella and Proteus: large, colorless colonies
- Shigella: colorless to pink colonies

The color changes in the colonies are a result of bacterial fermentation of the sugar lactose while colorless colonies indicate lactose non-fermenters. Fermentation reactions will be discussed in more detail in Lab 8.

There are literally hundreds of special-purpose media available to the microbiologist. Today we will combine both a mechanical isolation technique (the streak plate) with selective and selective-differential media to obtain pure cultures from a mixture of bacteria. In future labs, such as 12 - 16, which deal with the isolation and identification of pathogenic bacteria, we will use many additional special-purpose media.

Return to Menu for Lab 3

MEDIA

One plate of each of the following media: Trypticase Soy agar, Columbia CNA agar, and EMB agar.

ORGANISMS

A broth culture containing a mixture of one of the following gram-positive bacteria and one of the following gram-negative bacteria:

- Possible gram-positive bacteria:
  - Micrococcus luteus. A gram-positive coccus with a tetrad or a sarcina arrangement; produces circular, convex colonies with a yellow, water-insoluble pigment on Trypticase Soy agar.
    - Micrococcus luteus growing on TSA
    - Close up of Micrococcus luteus growing on TSA
  - Staphylococcus epidermidis. A gram-positive coccus with a staphylococcus arrangement; produces circular, convex, non-pigmented colonies on Trypticase Soy agar.
    - Staphylococcus epidermidis growing on TSA
    - Close up of Staphylococcus epidermidis growing on TSA
- Possible gram-negative bacteria:
  - Escherichia coli. A gram-negative bacillus; produces irregular, raised, non-pigmented colonies on Trypticase Soy agar.
    - Escherichia coli growing on TSA
  - Enterobacter aerogenes. A gram-negative bacillus; produces irregular raised, non-pigmented, possibly mucoid colonies on Trypticase Soy agar.

- Enterobacter aerogenes growing on TSA

During the next three labs you will attempt to obtain pure cultures of each organism in your mixture and determine which two bacteria you have. **Today** you will try to separate the bacteria in the mixture in order to obtain isolated colonies; **next lab** you will identify the two bacteria in your mixture and pick off single isolated colonies of each of the two bacteria in order to get a pure culture of each. The **following lab** you will prepare microscopy slides of each of the two pure cultures to determine if they are indeed pure.

PROCEDURE (to be done in pairs)

1. First attempt to obtain isolated colonies of the two organisms in your mixture by using mechanical methods on an all-purpose growth medium, Trypticase Soy agar. Streak the mixture on a plate of Trypticase Soy agar using one of the two streaking patterns illustrated in Lab 2, Fig. 4 and Fig. 5.

Animation showing how to streak an agar plate for isolation.

2. Streak the same mixture for isolation (see Fig. 4 and Fig. 5) on a plate of Columbia CNA agar (selective for gram-positive bacteria).

- Micrococcus luteus growing on Columbia CNA agar.
- Staphylococcus epidermidis growing on Columbia CNA agar.

3. Streak the same mixture for isolation (see Fig. 4 and Fig. 5) on a plate of EMB agar (selective for gram-negative bacteria and differential for certain members of the bacterial family Enterobacteriaceae).

- Escherichia coli growing on EMB agar.
- Enterobacter aerogenes growing on EMB agar.

4. Incubate the three plates **at 37°C** until the next lab period.

Trypticase Soy agar
Observations
Conclusions
Columbia CNA agar
Observations
Conclusions
EMB agar
Observations
Conclusions

Return to Menu for Lab 3

RESULTS

1. Observe isolated colonies on the plates of Trypticase Soy agar, Columbia CNA agar, and EMB agar. Record your observations and conclusions.

2. Using any of the three plates, **pick off a** single isolated colony **of each of the two organisms in your original mixture and aseptically transfer them to separate plates of Trypticase Soy agar** (see Fig. 3). When picking off single colonies, **remove the top portion of the colony without touching the agar surface itself** to avoid picking up any inhibited bacteria from the surface of the agar. Use your regular plate-streaking pattern to inoculate these plates and incubate **at 37°C** until the next lab period. These will be your pure cultures for Lab 5 (Direct and Indirect stains).

Animation showing a portion of a single colony being "picked off."

PERFORMANCE OBJECTIVES FOR LAB 3

After completing this lab, we will be able to complete the following objectives:

DISCUSSION

1. Given a mixture of a gram-positive and a gram-negative bacterium and plates of of Columbia CNA, EMB, and Trypticase Soy agar, describe the steps you would take to eventually obtain pure cultures of each organism.
2. Define: selective medium, differential medium, enrichment medium, and combination selective-differential medium.
3. State the usefulness of Columbia CNA agar and EMB agar.
4. Describe how each of the following would appear when grown on EMB agar:

    a.Escherichia coli

    b. Enterobacter aerogenes

    c. Salmonella

PROCEDURE

1. Using the streak plate method of isolation, obtain isolated colonies from a mixture of microorganisms.

2. Pick off isolated colonies of microorganisms growing on a streak plate and aseptically transfer them to sterile media to obtain pure cultures.

RESULTS

1. When given a plate of Columbia CNA agar or EMB agar showing discrete colonies, correctly interpret the results.

Annex 2

الملحق الثـــانى

Dilution Theory – Page 2:

More Dilution Plating

John L's Bacteriology Pages >
Selected General Topics > Dilution Theory:

Dilution Theory per se:
• Page 1 – Dilution Plating
• Page 2 – More Dilution Plating
• Page 3 – The MPN Method

Supplementary Pages:
• Five-Tube MPN Table
• Practice Set 1 (Plating)
• Practice Set 2 (Plating&MPN)

A quick review of highlights from the previous page ("Dilution Theory–Page 1"):

- Inoculating plates from increasing dilutions (decreasing concentrations) of a sample is equivalent to plating successively smaller amounts of the sample.
- We treat the units **grams** and **milliliters** as equivalents. This is done **for convenience**. One ml of water does indeed weigh one gram and vice versa. In real life however, the same may not apply to other things – especially solid samples.
- We need to have "countable" plates – having preferably between 30 and 300 colonies.

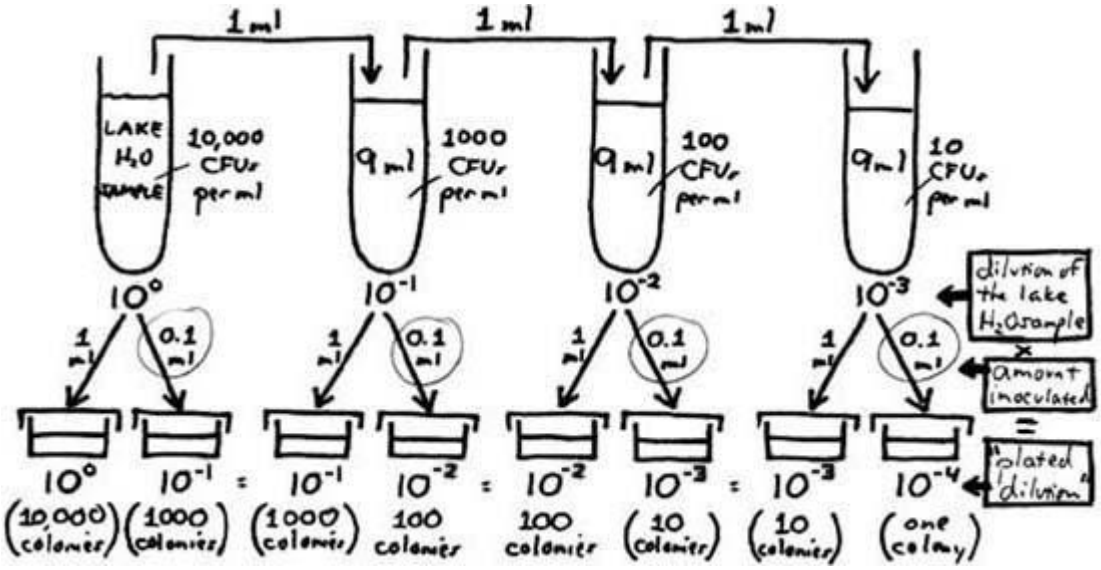
On this page:

- Inoculating other than 1.0 ml into/onto our plates.
- Using handy dilution formulas which introduce the terms "plated dilution" and "dilution factor." We note the fact that the **actual amount of original, undiluted sample plated** is the "**plated dilution**" and vice-versa.
- Checking your answer!

When we inoculate plates already containing medium (the usual case in our lab courses), we find that it would take too long for a one ml inoculum to soak into the medium. So, we generally plate **0.1 ml** from each dilution made. For each plate, you can readily see that we are then inoculating **one-tenth the number of CFUs** there would have been in a one ml inoculum.

In the following diagram, we have built on the last illustrated example given on Page 1 by adding inoculations of 0.1 ml from each of the dilutions into respective plates. (The numbers of

colonies in parentheses are either "too many" or "too few" for counting – remembering our "30-300 rule" above.)



Instead of the letters we labeled our plates with previously, we have labeled each plate with the **dilution** it represents – as if **one ml** had been inoculated from that dilution. **For example**, a plate inoculated with one ml of a 10^{-2} dilution would have the same label (10^{-2}) as a plate inoculated with 0.1 ml of a 10^{-1} dilution, as they are equivalent plates. This value (10^{-2}) has been traditionally called the "**plated dilution**." (A more fitting term we have come up with – and may officially substitute some day – is "**virtual dilution**"!)

Remembering our discussion on Page 1, you can see that the value of the "plated (virtual) dilution" is equivalent to the actual amount (in ml or g) of undiluted sample that is being plated out. For example, a plate labeled "10^{-2}" represents 10^{-2} ml or gram of sample being inoculated onto the plate.

A quick example problem: Suppose you inoculate a plate with 0.1 ml of a 10^{-1} dilution of a sample of milk. After incubation, you find that 80 colonies have arisen on the plate. How may CFUs were there per ml of the milk?

Solution: As plating **0.1 ml of a 10^{-1} dilution** is the equivalent of plating **1 ml of a 10^{-2} dilution** which is in turn equivalent to plating **10^{-2} ml of the original, undiluted sample** of milk, then you could say that there would have been 80 CFUs per 10^{-2} ml of the sample, and – proportionately – there would have been **10^2 times as many** CFUs (i.e., 8000 or 8.0 X 10^3) **per ml** of the undiluted milk sample.

Looking at the problem this way:
IF 80 colonies arise from plating 0.01 ml of the milk,
THEN there were 8.0 X 10^3 CFUs per one ml of the milk.

From the foregoing explanation and examples, one can figure out the concentration of CFUs (i.e., the number of CFUs per ml or gram of the sample) in **any dilution and plating problem** – by knowing **just three things** about our setup and results:

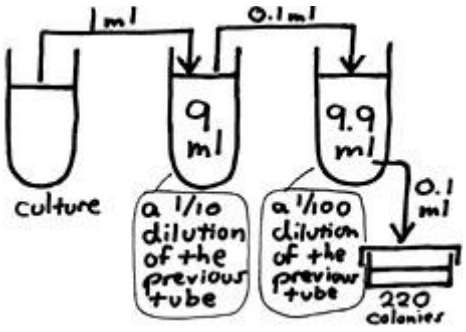
- The COLONY COUNT
- The AMOUNT INOCULATED into the plate that was counted
- The DILUTION OF THE SAMPLE from which the inoculation was made

Often it is handy to utilize **formulas** to work out dilution problems. In Bacteriology 10, we show continuously that the following set of formulas always work (if they are used properly). We could use one "universal" formula, but we have traditionally used these: the first (already used above) to find what portion of our sample is being analyzed (expressed as our so-called plated or virtual dilution) and the second to inflate our colony count **proportionately**, resulting in the number of CFUs that were in one gram or ml of the original, undiluted sample. (Don't just take our word for it. Spend a little time here and see how ultimately we can always come up with the number of CFUs **per one ml or one gram** of the undiluted sample.)

dilutions made	**X**	**amount inoculated**	**=**	**"plated dilution"**
dilution factor (simply the inverse of the plated dilution)	**X**	**# colonies**	**=**	**# CFUs/ml**(or gram) of the original undiluted sample

SOME EXAMPLES:

I. **The following is a sample problem from Bacteriology 102 worked out with the formulas:** One ml of a bacterial culture was pipetted into a 9 ml dilution blank. One-tenth ml of this dilution was pipetted into a 9.9 ml dilution blank. From this dilution, one-tenth ml was plated with 25 ml of culture medium. 220 colonies arose after incubation. How many colony-forming units were present per ml of the original culture? (Does the amount of medium in the plate matter in the calculations?)



dilutions made	**X**	**amount inoculated**	**=**	**"plated dilution"**
1/10 X 1/100	**X**	1/10	=	1/10,000 or 10^{-4}
dilution factor	**X**	**# colonies**	**=**	**# CFUs/ml**
10^4	**X**	220	=	2.2 X 10^6

You can also look at the problem this way: If 220 colonies arose from plating (the equivalent of) 10^{-4} ml of the culture, then (proportionally) there would have been 220 X 10^4 or 2.2 X 10^6 CFUs **per one ml** of the culture. **This is the reasoning behind the second of the two dilution formulas.**

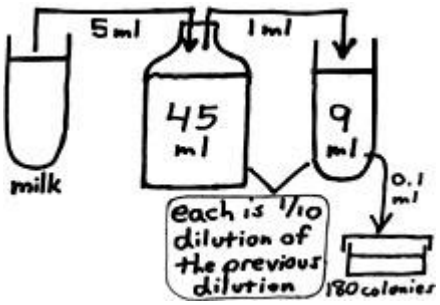
II.

When <u>checking your answer</u>, which you can always do as follows for such problems: Start with the sample which you have determined to contain 2.2 X 10^6 CFUs per ml. Then, see if you wind up with the stated number of colonies on the plate, after making the specified dilutions in which the number of CFUs per ml is sequentially reduced.

- The first, 1/10 dilution contains 2.2 X 10^5 CFUs **per ml**.
- The second, 1/100 dilution contains 2.2 X 10^3 CFUs **per ml**.
- As **0.1 ml** of the second dilution was inoculated into the plate, we would expect the number of CFUs in the inoculum to then be 2.2 X 10^2 which is 220, the number of colonies we counted on the plate.

III. **Here is a problem where we start out with something other than 1 ml or 1 gram of sample being diluted:** Five ml of milk were pipetted into 45 ml of diluent. One ml of this dilution was pipetted into 9 ml of diluent. From this dilution, 0.1 ml was plated. After incubation, 180 colonies were counted. Determine the number of colony-forming units per ml of the original milk sample.

A 1/10 dilution is achieved when 5 ml of sample are added to 45 ml of diluent. Remember that a **1/10 dilution** can be made in a variety of ways – as long as there is **one part of sample added to 9 parts of diluent**. Even if we had a dilution we could not so reduce – e.g., something like 3 grams of hamburger added to 80 ml of diluent which would result in a 3/83 dilution – we can still simply "plug it into" the formula and we could wind up with the answer. And remember that the formulas will always give the answer as no. of CFUs per one ml (or one gram) no matter what amount we start with. Wouldn't this problem have the same answer if we had put 1 ml of milk into 9 ml of diluent?



dilutions made	**X**	**amount inoculated**	=	**"plated dilution"**
1/10 X 1/10	**X**	1/10	=	1/1000 or 10^{-3}

dilution factor	**X**	**# colonies**	=	**# CFUs/ml**
10^{3}	**X**	180	=	1.8 X 10^{5}

As for the above problem, you can look at this one as follows: If 180 colonies arose from plating (the equivalent of) 10^{-3} ml of the milk, then (proportionally) there would have been 180 X 10^{3} or 1.8 X 10^{5} CFUs **per one ml** of the original, undiluted milk sample.

IV. **For a problem presented on the previous page (as no. III) in which <u>no dilutions</u> were made, we can still work it out with the formulas:** Five ml of an undiluted spring water sample were added to a petri dish to which 15 ml of melted Plate Count Agar were then added. Fifty colonies were counted after incubation. How many CFUs were present per ml of the original, undiluted spring water sample?

dilutions made	**X**	**amount inoculated**	=	**"plated dilution"**
1	**X**	5	=	5

dilution factor	**X**	**# colonies**	=	**# CFUs/ml**
1/5	**X**	50	=	10

V. Note that when there are no dilutions, we indicate "1" – not zero! – for the dilutions made. As always, the "dilution factor" is the <u>inverse</u> of the so-called "plated dilution" (according to how we defined our terms), and the "plated dilution" always represents the amount of sample being plated.

Dilution Theory / Supplementary Pages:

A Five-Tube MPN Table

John L's Bacteriology Pages >
Selected General Topics > Dilution Theory:

Dilution Theory per se:
• Page 1 – Dilution Plating
• Page 2 – More Dilution Plating
• Page 3 – The MPN Method

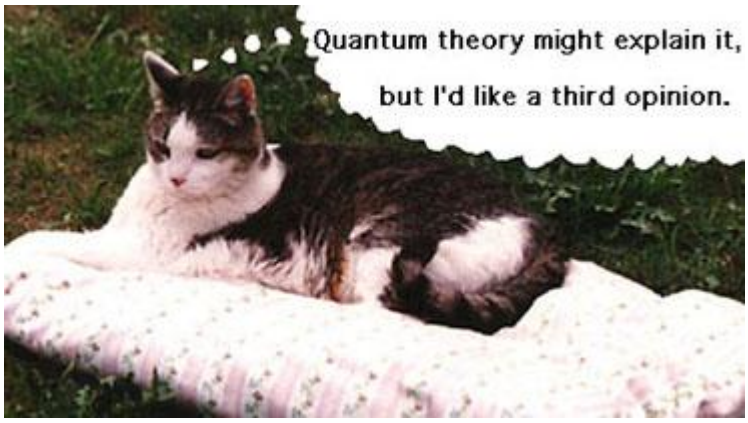
Supplementary Pages:
• Five-Tube MPN Table
• Practice Set 1 (Plating)
• Practice Set 2 (Plating&MPN)

At the right is a 5-tube MPN table, taken from the **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 15th edition (1980) and adapted for use to determine the most probable number of positive organisms per inoculum of the middle set of tubes. The same rules apply as previously stated in that the actual amount of sample inoculum decreases ten-fold with each succeeding set of tubes – which can be accomplished by (for example) making one ml inoculations from decimally-increasing dilutions as in the following example.

As an example problem: Suppose 5 tubes of an all-purpose medium are each inoculated with **1 ml** of a 10^{-2} dilution of a water sample, and 5 more are likewise inoculated from a 10^{-3} dilution as are 5 more from a 10^{-4} dilution. If the results show 5 positives for the first set of tubes, 3 for the second and 1 for the last, the 5-3-1 combination matches with the MPN value of 1.1 which, according to the table, means that there would be (on the average) approximately 1.1 positive organisms per ml of the 10^{-3} dilution. Therefore, the number **per ml** of the original, undiluted water sample would be 1.1 X 10^{3}. Remember that such a value is really a rough estimate.

No. of Tubes Positive in			MPN in the inoculum of the middle set of tubes
first set	middle set	last set	
0	0	0	‹0.01
0	0	1	0.02
0	1	0	0.02
0	2	0	0.04
1	0	0	0.02
1	0	1	0.04
1	1	0	0.04
1	1	1	0.06
1	2	0	0.06
2	0	0	0.05
2	0	1	0.07
2	1	0	0.07
2	1	1	0.09
2	2	0	0.09
2	3	0	0.12

Lower and upper 95% confidence limits listed for each combination of positive results in Standard Methods can be different by ten-fold or more.



© 2000, John Lindquist

Return to the Main MPN Page.

Page last modified on 5/19/01 at 4:00 PM, CDT.
John Lindquist: new homepage, complete site outline.
Department of Bacteriology, U.W.-Madison

3	0	0	0.08
3	0	1	0.11
3	1	0	0.11
3	1	1	0.14
3	2	0	0.14
3	2	1	0.17
4	0	0	0.13
4	0	1	0.17
4	1	0	0.17
4	1	1	0.21
4	1	2	0.26
4	2	0	0.22
4	2	1	0.26
4	3	0	0.27
4	3	1	0.33
4	4	0	0.34
5	0	0	0.23
5	0	1	0.31
5	0	2	0.43
5	1	0	0.33
5	1	1	0.46
5	1	2	0.63
5	2	0	0.49
5	2	1	0.7
5	2	2	0.94

5	3	0	0.79
5	3	1	1.1
5	3	2	1.4
5	3	3	1.8
5	4	0	1.3
5	4	1	1.7
5	4	2	2.2
5	4	3	2.8
5	4	4	3.5
5	5	0	2.4
5	5	1	3.5
5	5	2	5.4
5	5	3	9.2
5	5	4	16
5	5	5	›24

USGS science for a changing world

Water Resources--Office of Water Quality

This document is also available in pdf format:

Ch7_1.3.pdf

7.1.3
IDENTIFICATION AND ENUMERATION METHODS

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

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

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

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

hours at 44.5 ± 0.2°C on m-TEC medium.

- E. coli are defined as the organisms that produce a blue fluorescent margin around a darker colony center within 4 hours when incubated at 35 ± 0.5°C on NA-MUG medium after primary culturing as total coliform bacteria on m-Endo medium.
- The fecal streptococci are defined as the organisms that produce red or pink colonies within 48 ± 2 hours when incubated at 35.0 ± 0.5°C on KF medium.
- Enterococci are defined as the organisms that produce pink to red colonies with a black or reddish-brown precipitate after primary culture for 48 to 50 hours at 41.0 ± 0.5°C on m-E medium followed by incubation for 20 minutes at 41.0°C on EIA medium.

7.1.3.A
PREPARATION OF MEDIA AND REAGENTS

MF analysis requires the use of several types of media and reagents, the types being dependent on the indicator. The necessary media and reagents include sterile buffered water, agar- or broth-based selective and differential growth media, and media and reagents for additional biochemical identification.

Sterile buffered water (buffer) is used to dilute samples and to rinse the membrane-filtration apparatus and utensils. **Purchase sterile buffered water from the Quality of Water Service Unit (QWSU).** It is provided in 250-mL bottles and in 99-mL dilution bottles. There are two types: phosphate buffer to be used for total and fecal coliform, and fecal streptococci tests; and saline buffer to be used for E. coli and enterococci tests. Buffer exceeding the expiration date should not be used. When sterile buffered water is not obtained from the QWSU, it can be prepared ahead of time and sterilized by autoclaving. Preparation instructions for sterile buffered water are described in Britton and Greeson (1989, p. 18) and Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (American Public Health Association and others, 1992, p. 9-17).

Culture media for enumeration of fecal indicator bacteria should be purchased in kits from the QWSU. The QWSU provides instructions for media preparation with each kit. Otherwise, dehydrated media can be purchased from scientific suppliers. Guidelines for storage of media and reagents are as follows:

- Store media kit (supplied by QWSU) and dehydrated, commercially prepared media in a desiccator. Store other reagents in a dust-free laboratory cabinet (not in a field vehicle).
- Label all media with the date received, date opened, and preparer's initials. Discard media and reagents with an expired shelf life.
- Refrigerate reagents when necessary. Use buffered dilution water immediately after opening; discard any remainder. Storing an opened bottle is not recommended.
- Mark all plates to identify the media type, the preparation date, and the preparer.
- Store prepared petri dishes upside down in a plastic bag before use and refrigerate.

7.1.3.B
PREPARATION, HOLDING TIMES, AND SPECIFICATIONS FOR CULTURE MEDIA

The preparation of selective and differential culture media for indicator bacteria is an important part of analysis. Adhering to proper preparation, storage, and holding-time requirements will help ensure the quality of the analysis. Instructions for the preparation of 100 mL of primary culture media for five MF tests and additional confirmation media or broth for three MF confirmation tests are described in section 7.1.5, entitled "Instructions for Media Preparation."

Quality control. Supplies of dehydrated media purchased from the QWSU or through catalogs have been quality-control tested. Media prepared fresh by the analyst must also be quality-control tested. If sterile buffered water is prepared in the laboratory, quality-control procedures must be used to ensure it will provide a suitable medium for transfer of bacteria from samples to filters. **Sterile buffered water should be tested for sterility by use of blanks of 100 mL, processed along with each set of samples.** Quality-control procedures applicable to microbiological testing

can be found in the 18th edition of "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (American Public Health Association and others, 1992, p. 9-7 to 9-13).

7.1.3.C
MEMBRANE FILTRATION PROCEDURE

After collecting the sample and selecting the appropriate sample volumes, label the petri dishes with the station number (or other identifiers), the volume of sample filtered, date, and time. Select those sample volumes that are anticipated to yield one or two plates in the ideal colony count range. General information on the concentrations of fecal indicator bacteria in surface water and contaminated surface water is given in table 7.1-1.

A suitable work area inside the field vehicle and out of direct sunlight and wind is best.

- Before and after processing the samples, clean countertops in field vehicles with an antibacterial cleaning solution; for example, a 7-percent phenolic solution, 50 to 70 percent isopropyl or ethyl alcohol; 5 percent bleach; or a 7-percent ammonia solution.
- Preheat incubators for at least 2 hours before beginning analysis, according to specifications for each test (table 7.1-5). Portable heater-block incubators must not be left on in closed, unventilated vehicles when the outside temperature is less than 15°C or greater than 37°C.

  Technical Note: Review past analyses for the site to help determine the number of sample volumes to be filtered. Where past analyses of samples from a site have shown a small variation in the number of fecal indicator bacteria, the filtration of as few as three or four different sample volumes may suffice. However, where past analyses have shown the variation to be large or where the variation is not known, the filtration of five or more different sample volumes is recommended.

Table 7.1–5. Incubation times and temperatures for fecal indicator tests

[m-Endo, total coliform media; ±, plus or minus; °C, degrees Celsius; NA-MUG, *E. coli* confirmation media (nutrient agar-4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide; m-FC, fecal coliform media; m-TEC, *E. coli* media; KF, fecal streptococcus media; m-E, enterococcus media; EIA, enterococcus confirmation media]

Test (media)	Incubation time and temperature
Total coliform bacteria (m-Endo)	24 ± 2 hours at 35.0 ± 0.5°C
Escherichia coli (NA-MUG)	4 hours at 35± 0.5°C after primary culture on m-Endo media
Fecal coliform bacteria (m-FC)	24 ± 2 hours at 44.5 ± 0.2°C
Escherichia coli (on urea substrate broth after primary culture on m-TEC media)	First resuscitate for 2 hours at 35.0 ± 0.5°C, and then incubate for 22 to 24 hours at 44.5 ± 0.2°C After 22 to 24 hours, transfer filter to urea substrate broth for 15 to 20 minutes before counting
Fecal streptococci (KF media)	48 ± 2 hours when incubated at 35.0 ± 0.5°C
Enterococci (m-E and EIA)	48 to 50 hours at 41.0 ± 0.5°C on m-E medium. Transfer filter to EIA medium for 20 minutes at 41.0°C before counting

The steps required for membrane filtration are depicted in figure 7.1-2 (pages 28 and 29) and listed below. Quality-control samples must be collected as part of the filtration procedure (see Technical Note, step 16).

Steps to follow when filtering samples and making colony counts are listed below (and summarized in fig. 7.1-2):

1. Select sample volumes (table 7.1-6) to result in at least one filter having colonies in the ideal counting range. The ideal range and number of sample volumes to filter depend on the test and the expected bacterial concentrations. Record on the petri dish and on the record sheet the site name, date, time of sample collection, and sample volume. Record the time of sample processing on the record sheet. Also label equipment and procedure blanks and other quality-control samples.

2. Assemble filtration equipment by inserting the base of the filter-holder assembly into a flask. Vacuum is supplied by use of a hand-held pump, vacuum, or battery-operated peristaltic pump. If flame sterilization was used, rinse the inside of the filtration apparatus with sterile buffered water to remove any residue of formaldehyde.

3. Sterilize stainless steel forceps by immersing tips in a small bottle or flask containing 70 or 90 percent ethanol; then pass forceps through the open flame of an alcohol burner. Allow alcohol to burn out and allow the forceps to cool for several seconds to prevent heat damage to the membrane filter. Resterilize forceps before each use. Return cooled forceps to alcohol container between transfers. **Do not set forceps on the countertop.**

Table 7.1–6. Recommended sample volumes for membrane filtration analyses based on ideal colony count and concentration range

[<, less than; col/100 mL; colonies per 100 milliliters; mL, milliliters]

Ranges of observed fecal indicator concentrations					
<1 to 60,000 col/100 mL		<1 to 80,000 col/100 mL		<1 to 200,000 col/100 mL	
Ideal counting ranges for number of colonies per membrane filter					
20–60 colonies		20–80 colonies		20–100 colonies	
Sample volume (mL)[1]	Added as (mL)[2]	Sample volume (mL)[1]	Added as (mL)[2]	Sample volume (mL)[1]	Added as (mL)[2]
100	100	100	100	100	100
30	30	25	25	20	20
10	10	6.0	6.0	5.0	5.0
3.0	3.0	1.5	1.5	1.0	1.0
1.0	1.0	0.4	4.0 of 1:10 dilution	0.25	2.5 of 1:10 dilution
0.3	3.0 of 1:10 dilution	0.1	10 of 1:100 dilution	0.05	5.0 of 1:100 dilution
0.1	10 of 1:100 dilution				

[1]All sample volumes less than 1.0 mL require dilution in a 99-mL bottle.

[2]Sample volumes smaller than those indicated may be needed when bacterial concentrations are greater than those listed.

4. Remove the sterilized funnel from the filtration apparatus. Always hold the funnel in one hand while placing or removing the membrane filter. (Placing the funnel on anything but the filtration apparatus might result in contamination of the funnel.)
    - Using sterile forceps, place a sterile, gridded membrane filter (47-mm diameter) on top of the filter base, grid-side up. Be sure to use the correct pore-size membrane filter for the test procedure (table 7.1-7).
    - Carefully replace and secure the filter funnel on filter base. Avoid tearing or creasing the membrane filter.

- Rinse funnel with 100 mL of sterile buffered water before filtering sample volumes to obtain a filtration assembly equipment blank (filter blank).
- Filter sample in order of smallest to largest sample volume.

5. If the sample volume is less than 1.0 mL, prepare dilutions with sterile buffered water in a 99-mL dilution bottle and transfer appropriate volume of dilution to the membrane filter (fig. 7.1-3 and table 7.1-8).

a.

When preparing dilutions, use a sterile pipet to measure each sample volume.

b.

After each sample-volume transfer, close and shake the dilution bottle vigorously at least 25 times.

c.

Filter diluted samples within 20 minutes after preparation. Keep dilution bottles out of sunlight and do not transfer dilute sample volumes with pipets used to transfer concentrated volumes.

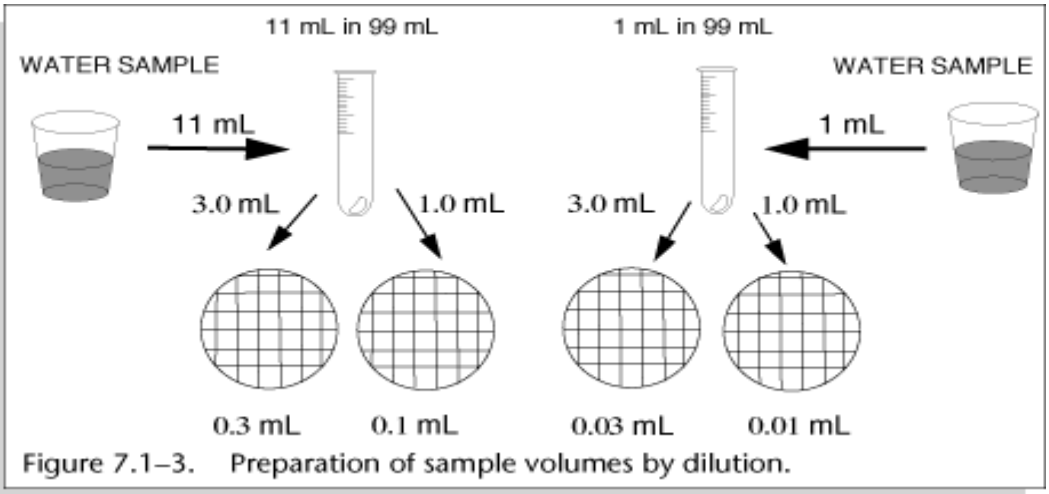


Figure 7.1–3. Preparation of sample volumes by dilution.

6. Shake the sample vigorously at least 25 times before each sample volume is withdrawn in order to break up particles and ensure an even distribution of indicator bacteria in the sample container. Proceeding from smallest to largest sample volume, deliver the sample volume to the membrane filter by use of a pipettor or pipet bulb with a valve for volume control.
    - Allow the pipet to drain, and touch the tip to the inside of the funnel to remove remaining sample. Pipets of the TD (to deliver) type will have a small amount of liquid left in the tip after dispensing the liquid.
    - **If the volume of sample to be filtered is 10 mL or more--**transfer the sample with a sterile pipet or graduated cylinder directly into the funnel.
    - **If the volume of sample to be filtered is between 1.0 and 10.0 mL**--pour about 20 mL of sterile buffered water into the funnel before pipetting the sample to facilitate distribution of bacteria on the membrane filter. Refer to table 7.1-6 for appropriate sample volumes for each test.

Table 7.1–8. Preparation guidelines for dilution of samples to volumes less than 1.0 milliliter for fecal indicator bacteria analysis

[mL, milliliter]

Dilution factor	Volume (mL) of sample added to 99 mL sterile dilution water	To obtain this dilution, filter this volume
1:10	11.0 mL of original sample	1.0 mL of 1:10 = 0.1 mL 3.0 mL of 1:10 = 0.3 mL
1:100	1.0 mL of original sample	1.0 mL of 1:100 = 0.01 mL 3.0 mL of 1:100 = 0.03 mL
1:1,000	1.0 mL of 1:10 dilution	1.0 mL of 1:1,000 = 0.001 mL 3.0 mL of 1:1,000 = 0.003 mL

7. Apply vacuum with a hand, peristaltic, or vacuum pump. To avoid damage to bacteria, do not exceed a pressure of about 5 lb/in^2 (25 cm of mercury).
8. Rinse inside of funnel twice with 20 to 30 mL of sterile buffered water while applying vacuum. If a graduated cylinder was used, rinse the cylinder with sterile buffered water and deliver rinse water to the filtration apparatus.

9. Remove the funnel and hold it in one hand. Do not set the funnel on the countertop. Remove the membrane filter with sterile forceps. Release the vacuum. Releasing the vacuum after removing the filter prevents backflow of sample water onto the filter. Unnecessarily wet filters promote confluent growth of colonies and poor results. Replace funnel on filter base.
10. Open petri dish and place membrane filter grid side up on medium by use of a rolling action, starting at one edge. Avoid trapping air bubbles under the membrane filter. If air is trapped, use sterile forceps to remove the membrane filter and roll it onto the medium again. **Do not expose prepared plates to direct sunlight.**

Do not pipet by mouth.

11. Close petri dish by pressing top firmly onto bottom. Invert the petri dish. To avoid growth of interfering microorganisms, incubate within 20 minutes.
12. Continue to filter the other sample volumes in order, from smallest to largest volume. Record on the field forms the volumes filtered and time of processing.
13. After filtrations are complete, place a sterile, gridded-membrane filter on the funnel base and rinse the funnel with 100 mL of sterile buffered water to obtain a procedure blank.
14. After the sample volumes and blanks have been filtered, place the inverted petri dishes in a preheated aluminum heater-block or water-bath incubator. Incubate at the prescribed times and temperatures (table 7.1-5). Wash, then flame sterilize or autoclave filtration apparatus. Wash countertop between each sample and wash hands with bacteriocidal soap.
15. After incubation, remove the petri dishes from the incubator. Count and record on the field forms, for each sample volume filtered, the number of typical colonies (table 7.1-9). Recount until results agree within 5 percent. Recounting is done by turning the plate 90 degrees to obtain a slightly different angle. Count by use of a preset plan (a side-to-side pattern along grid lines is suggested) (fig. 7.1-4). **Make the counts with the aid of 5 to 15 magnifications and a fluorescent illuminator placed as directly above the filter as possible.**

- For total coliform colonies, enhance sheen production by removing filters from media and placing them on absorbent pads to dry for at least 1 minute before counting.
- If the optional NA-MUG test is done for E. coli, transfer the total coliform filter onto NA-MUG plates and incubate for 4 hours at 35°C. Afterward, count under a long-wave ultraviolet light in a completely darkened room (U.S. Environmental Protection Agency, 1991b).
- For E. coli and enterococci, additional biochemical tests are required by use of confirmation media. For E. coli, transfer the filter to a filter pad saturated with urea-phenol reagent; count only yellow colonies after 15 to 20 minutes at room temperature (U.S. Environmental Protection Agency, 1985).
- For enterococci, transfer the filter to EIA media after incubation for 20 minutes at 41°C; count colonies from the underside of the plate placed over a fluorescent illuminator.

16. Check quality-control blanks for colony growth, and report results on the field forms.
    - The presence of colonies on blanks indicates that results of the bacterial analyses bracketed by positive blanks are suspect and should not be reported.
    - It is not valid to subtract colony counts on blanks from results calculated for samples.

TECHNICAL NOTE: It is necessary to collect equipment, filter, and procedure blanks. The equipment and filter blanks measure the effectiveness of sterilization. One or more colonies on this type of blank indicates inadequate sterilization of either the equipment or the buffered water. The procedure blank measures the effectiveness of the analyst's rinsing technique. One or more colonies on the procedure blank indicates either inadequate rinsing or contamination of equipment or buffered water during sample processing.

Table 7.1–9. Test (media type), ideal colony count, and typical colony color, size, and morphology for indicator bacteria colonies

[m-Endo, total coliform media; mm, millimeters; NA-MUG, nutrient agar-4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide; m-FC, fecal coliform media; m-TEC, *E. coli*. media; KF, fecal streptococcus media; m-E, enterococcus media; EIA; enterococcus confirmation media]

Test (media type)	Ideal count range (colonies per filter)	Typical colony color, size, and morphology
Total coliform bacteria (m-Endo)	20–80	Colonies are round, raised, and smooth; 1 to 4 mm in diameter, and red with a golden-green metallic sheen.
Escherichia coli After primary culture as total coliform colonies on m-Endo (NA-MUG)	None given but much fewer in number than total coliforms on same filter	Colonies are cultured on m-Endo media as total coliform colonies. After incubation on NA-MUG, colonies have blue fluorescent margins with a dark center. Count under a long-wave ultraviolet lamp in a completely darkened room.
Fecal coliform bacteria (m-FC)	20–60	Colonies are round, raised, and smooth with even to lobate margins; 1 to 6 mm in diameter, and light to dark blue in whole or part. Some may have brown or cream colored centers.
Escherichia coli (m-TEC)	20–80	Colonies are round, raised, and smooth; 1 to 4 mm in diameter, yellow to yellow brown; may have darker raised centers.
Fecal streptococci (KF media)	20–100	Colonies are small, raised, and spherical; about 0.5 to 3 mm in diameter; glossy pink or red in color.
Enterococci (m-E and EIA)	20–60	Colonies are round, smooth, and raised; 1 to 6 mm in diameter; pink to red with a black or reddish-brown precipitate on underside.

17.

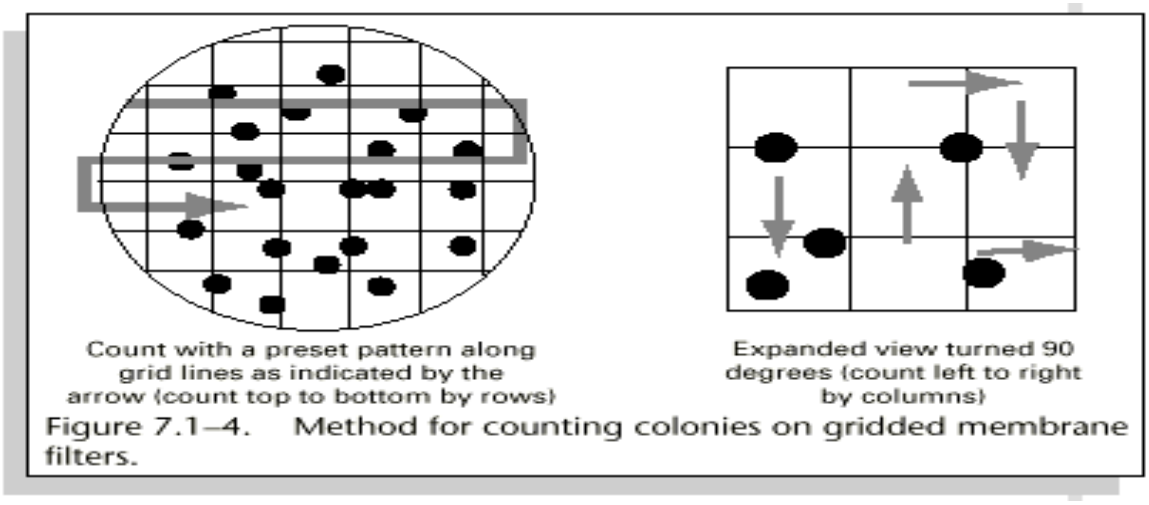


Figure 7.1–4. Method for counting colonies on gridded membrane filters.

18.
19. Calculate the number of colonies per 100 mL of sample as shown in section 7.1.4, "Calculation and Reporting of Fecal Indicator Bacteria."
20. Put all plates to be discarded in an autoclavable bag. Freeze or chill the plates to be discarded until they can be autoclaved in the laboratory. Autoclave all cultures at 121°C for a minimum of 30 minutes before discarding.

Quality control. In addition to blanks, collect and analyze samples in duplicate at a minimum frequency of 5 percent (1 in every 20 samples). Periodically purchase and analyze a pure culture containing Escherichia coli or Enterococcus faecalis (formerly Streptococcus faecalis to ensure that the test procedure is acceptable.

PROCEDURE

1. Preheat incubator, prepare work areas.
2. Select sample volumes. If needed, prepare dilutions for filtration of sample volumes less than 1.0 mL. (Tables 7.1–6 and 7.1–8; and figure 7.1–3.)
3. Label petri dishes.
4. Assemble, and if not sterile, sterilize filtration apparatus.

PROCEDURE

5. Place sterile filter on filtration apparatus using sterile forceps.

TECHNICAL NOTE: a small hand pump is preferred over a syringe as a vacuum source.

PROCEDURE

6. Shake sample 25 times and deliver to filtration apparatus by use of graduated cylinder or pipet. Add 20 mL sterile buffered water to filtration apparatus before filtering sample volumes less than 10 mL.

Figure 7.1–2. Steps in membrane-filtration procedure (taken from Millipore, 1973, and published with permission).

PROCEDURE

7. Apply vacuum, and afterwards, rinse filtration apparatus and cylinder twice with sterile buffered water.

PROCEDURE

8. Sterilize forceps and remove filter. Replace funnel on filtration apparatus.

PROCEDURE

9. Roll filter onto media in petri dish. Place inverted petri dish in incubator.

PROCEDURE

10. Repeat steps 4–9 for each sample volume in order of the smallest to the largest volume. A filter blank is processed before each sample. Filter a procedure blank after every 20 samples or once per day or at each site, according to study objective. Filter a duplicate sample after every 20 samples or at each site, according to study objective. Use a hand pump instead of a syringe.

Figure 7.1–2—Continued. Steps in membrane-filtration procedure (taken from Millipore, 1973, and published with permission).

Annex 3

الملحق الثـــالث

Streak Method for Agar Plates

The streak plate is used primarily for isolating microorganisms in pure culture from specimens or samples containing mixed flora. Obtaining isolated colonies on plates allows colonial morphology and hemolytic reactions to be examined, and biochemical / serological testing to be performed.

1. With a sterile inoculating loop, streak a loopful of the sample across the surface of an agar plate. The four-quadrant streak is the most common, and accomplished by streaking and rotating the plate in four sections, one quarter at time, slightly overlapping the original streak area. The fourth quadrant contains the greatest dilution of microorganisms, and usually provides isolated colonies for further testing.

2. Incubate plates under favorable growth conditions.

3. Examine plates for isolated colonies.

Spread Plate Technique

The spread plate technique is used for enumerating microorganisms.

1. Drop 0.1 mL aliquots from serial dilutions onto the surface of an agar plate.

2. Aseptically spread inoculum across the surface using a bent glass rod or sterile inoculating loop. By spreading the suspension over the plate, a dilution gradient is established to provide isolated colonies.

3. Incubate plates agar inverted in appropriate conditions.

4. Count colonies and calculate the number of microorganisms in the original suspension.

Pour Plate Technique

The pour plate technique is also used for enumeration of microorganisms in a particular sample. In this technique, test samples or suspensions of microorganisms are mixed with molten agar (45-50°C). The agar is allowed to solidify, trapping the bacteria at separate discrete positions within the matrix of the medium. While the medium holds bacteria in place, it is soft enough to permit growth of bacteria and the formation of discrete isolated colonies.

1. Perform serial dilution of sample.

2. Aseptically pipette microorganism dilutions into labeled petri dishes.

3. Add melted agar that has been cooled to approximately 44–45°C.

4. Mix well by slightly rotating plate with bacteria and agar mixture.

5. Allow the agar to solidify, trapping bacteria at separate discrete positions within the medium.

6. Incubate plates in a favorable environment.

7. Count the number of colonies and calculate the number of microorganisms in the original sample.

Streak / Stab Method for Agar Tubes

Tubed media may be in the form of solid agar slants, semisolids, or broths. Depending on the type of medium used and the purpose of the inoculation, use an inoculating loop or needle.

1. For agar slants, place the loop at the base of the tube surface and draw it up the agar surface while moving it from side to side.

2. For semisolid media, insert the loop into the medium to approximately one-fourth of its depth. If testing motility, use an inoculating needle and stab it in the center of the agar tube to the bottom. Draw the needle out carefully, keeping it straight.

Media Inoculation

Inoculation of Broth Media

Broth media are generally used as enrichments, general cultivation and sterility testing.

1. Aseptically inoculate appropriate broth media with the sample or specimen using sterile pipette, syringes or forceps.

2. Incubate inoculated broth at the appropriate atmospheric conditions, temperature, and time.

3. Examine broth for any signs of growth including, turbidity with or without gas bubbles, “puff-ball” appearance, hemolysis (in blood cultures), pellicle formation and precipitate on the bottom of the tube or bottle.

Membrane Filtration Method

The membrane filtration method is used to test large volume of liquid samples, including water and filterable beverages.

1.Pass the sample through a sterile membrane filter enclosed in a filtration assembly and attached to a vacuum source.

2.After filtering the sample, carefully remove the filter with sterile forceps and apply it to the surface of an agar plate or pad saturated with a broth medium. Avoid trapping air bubbles by using a rolling action. (The media used depends on the type of microorganism being tested.)

3.Invert plates and incubate under appropriate conditions.

4.Count colonies and calculate the most probable number.

4-2 Viable plate counts

(12513 Reads)

Table of Contents| Chapter Article List| Printable Version | Printable Chapter

[Prev] | [Next]

Viable plate counts

One of the most common methods of determining cell number is the viable plate count. A sample to be counted is diluted in a solution that will not harm the microbe, yet does not support its growth (so they do not grow during the analysis). In most cases a volume of liquid (or a portion of solid) from the sample is first diluted 10-fold into buffer and mixed thoroughly. In most cases, a 0.1-1.0 ml portion of this first dilution is then diluted a further 10-fold, giving a total dilution of 100-fold. This process is repeated until a concentration that is estimated to be about 1000 cells per ml is reached. In the spread-plate technique some of the highest dilutions (lowest bacterial density) are then taken and spread with a sterile glass rod onto a solid medium that will support the growth of the microbe. It is important that the liquid spread onto the plate soaks into the agar. This prevents left over liquid on the surface from causing colonies to run together and the need for dry plates restricts the volume to 0.1 ml or less. A second method for counting viable bacteria is the pour plate technique, which consists of mixing a portion of the dilution with molten agar and pouring the mixture into a petri plate. In either case, sample dilution is high enough that individual cells are deposited on the agar and these give rise to colonies. By counting each colony, the total number of colony forming units (CFUs) on the plate is determined. By multiplying this count by the total dilution of the solution, it is possible to find the total number of CFUs in the original sample.

Books

The little Book module manual

Virtual Microbiology

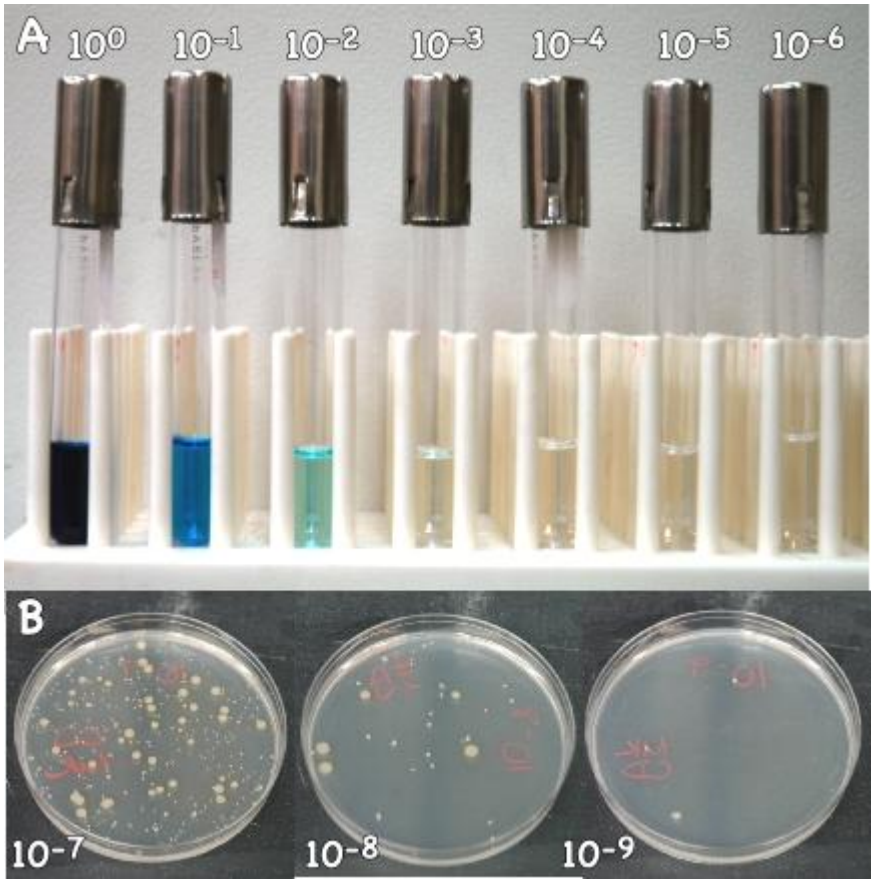
Through the microscope: A look at all things small

Textbook Table of Contents

- Introduction & History
- Bacterial Structure
- Bacterial Growth
- Control of Growth
- Bacterial Nutrition
- Classification
- Metabolism
- Regulation of Metabolism
- Genomics and Genetics
- Archaeal Diversity
- Bacterial Diversity
- Animal Immunity
- Treatment and

Prevention
- Bacterial Pathogens
- Viral Pathogens
- Host-Microbe Interactions
- Central Dogma
- Comments

Figure 4-1 Dilution plating and viable plate counts



(A) A demonstration of a decimal series of dilutions. The 10^0 sample is a concentrated solution of methylene blue. A 0.2 ml portion of this was added to 1.8 ml (1:9 ratio) of 0.85% saline to create the 1:10 dilution. After mixing, 0.2 ml of the 10^{-1} dilution was added to a second tube containing 1.8 ml to create the 10^{-2} dilution. This was continued to generate the dilution series.
(B) A series of pour plates demonstrating the appearance of a viable plate count. The 3 plates show a 10^{-7}, 10^{-8}, and 10^{-9} dilution of a natural sample. Note how the number of colony forming units decreases 10 fold between the plates.

One major disadvantage of the viable plate count is the assumption that each colony arises from one cell. In species where cells grow together in clusters, a gross underestimation of the true population results. One example of this are species of Staphylococcus, which is known to form

clumps of microorganisms in solution. Each clump is therefore counted as one colony. This problem is why the term CFUs per ml is used instead ofâ bacteria per mlâ for the results of such an analysis. It is a constant reminder that one colony does not equal one cell. Great care must also be taking during dilution and plating to avoid errors. Even one error in dilution can have large effects on the final numbers. The rate at which bacteria give rise to an observable colony can also vary. If too short an incubation time is used, some colonies may be missed. The temperature of incubation and medium conditions must also be optimized to achieve the largest colonies possible so that they are easily counted. Finally, this technique takes time. Depending on the organism, one day to several weeks might be necessary to determine the number of CFUs that were present when the experiment started. Such information may no longer be useful for many experiments.

Despite its shortcomings, the viable plate count is a popular method for determining cell number. The technique is sensitive and has the advantage of only counting living bacteria, which is often the important issue. Any concentration of microorganism can be easily counted, if the appropriate dilution is plated. It is even possible to concentrate a solution before counting, as is often done in water analysis, where bacterial populations are usually at low density. The equipment necessary for performing viable plate counts is readily available in any microbiology lab and is cheap in comparison to other methods. Finally, by using a selective medium it is possible to determine the number of bacteria of a certain class, even in mixed populations. These advantages have made viable plate counts a favorite of food, medical, aquatic and research laboratories for the routine determination of cell number.

[Prev] | [Next]

Table of Contents| Chapter Article List| Printable Version | Printable Chapter

Items in the microbiology textbook are copyright, Timothy Paustian© 1999-2006.

Annex 4

الملحق الرابع

Microbiology and Bacteriology

The world of microbes

May 28, 2007 - 06:15 PM

2-4 Streak plates

(13392 Reads)

Table of Contents| Chapter Article List| Printable Version | Printable Chapter

[Prev] | [Next]

The streak plate method is a rapid and simple technique of mechanically diluting a relatively large concentration of microorganisms to a small, scattered population of cells. The goal is to obtain isolated colonies on a large part of the agar surface, so that desired species can then be brought into pure culture. Proper streaking of plates is an indispensable tool in microbiology. In most cases a closed inoculating loop is used for streaking plates. The wire loop should not be badly oxidized or pitted or it will fail to dilute the inoculum and will scratch the surface of the agar. Streak plates can be made from a broth culture, an agar slant or from an agar plate. It is sometimes convenient to suspend a bit of growth from a solid surface in sterile saline and use this as a source of inoculum. Resuspension of colonies or cultures grown on solid surfaces dilutes the culture and makes streak plating easier. A loopful of inoculum is transferred from the source and put on the agar surface. When using a large inoculum (a turbid culture or growth from a solid surface), a small spot is spread during the initial transfer. If the inoculum is from a lightly turbid suspension, the first phase of the streaking pattern is begun. Several basic patterns are illustrated in Figure 2-3. The three-phase streaking pattern is recommended for beginners because it is most likely to give satisfactory results with suspensions having a wide range of microbial density.

Books

The little Book module manual

Virtual Microbiology

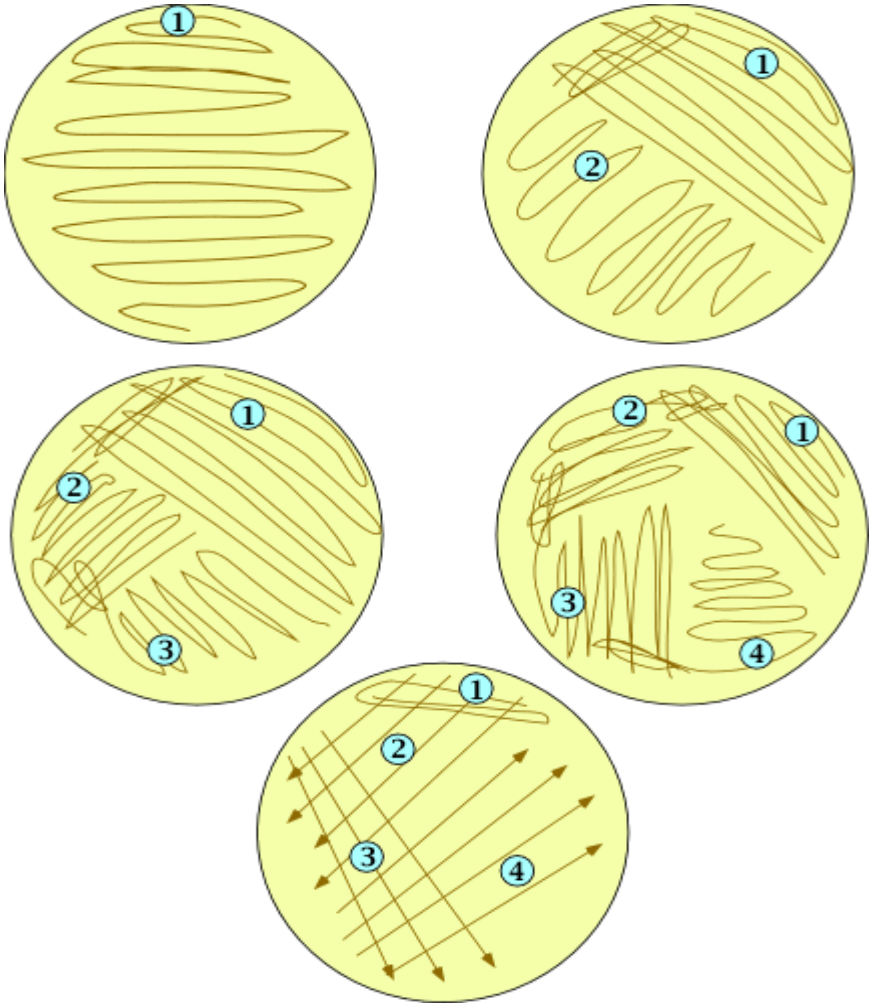
Through the microscope: A look at all things small

Textbook Table of Contents

- Introduction & History
- Bacterial Structure
- Bacterial Growth
- Control of Growth
- Bacterial Nutrition
- Classification
- Metabolism
- Regulation of Metabolism
- Genomics and Genetics
- Archaeal Diversity
- Bacterial Diversity
- Animal Immunity
- Treatment and Prevention
- Bacterial Pathogens
- Viral Pathogens
- Host-Microbe

Interactions
- Central Dogma
- Comments

Figure 2-3 Streaking patterns



There are a number of different methods for mechanically diluting microbes on a streak plate. The most common method is spreading microbes across a plate as shown in the first four figures. As the concentration of microbes increases so do the number of phases. Irrespective of the number of phases, loop is flamed between each one. The fifth plate shows an alternative method, where the streaks are not continuous, but are a series of parallel lines. foobar

Choosing a streaking pattern is a matter of individual preference and depends upon the number of microorganisms in the sample. Figure 2-3 demonstrates the most common patterns, but they

are not the only methods. The object of any streaking pattern is the continuous dilution of the inoculum to give many well isolated colonies. For multi-phase streaking it is crucial to flame the loop before starting the next phase. Note the slight overlap into the previous phase to pick up a small inoculum. To streak a plate...

1. Flame the loop to sterilize it and let cool.
2. Position the plate so that the spot of inoculum is nearest the hand not holding the loop (the opposite hand).
3. Lift the plate lid with the opposite hand; just enough to get the loop inside and touch the loop to the inoculum spot. It is often helpful to treat the inoculating loop as if it were a pencil - steadying the loop by resting the heel of the hand against the lab bench.
4. Move the loop back and forth across the spot and then gradually continue toward the center of the plate as you sweep back and forth. Use a very gentle and even pressure.
5. When creating each phase, do not worry about keeping each pass across the plate separate from previous ones.
6. When about 30% of the plate has been covered by the first streaking phase, remove the loop and flame sterilize it.
7. Repeat the above procedure for the second phase, but this time pick up some inoculum by crossing into the first phase 2-3 times and then not passing into it again (Figure 2-3).
8. Repeat as necessary for the third and fourth phases. After streaking the plate, flame sterilize the loop before setting it down.

Figure 2-4 demonstrates the technique of streak plates in a movie.

[Prev] | [Next]

Table of Contents| Chapter Article List| Printable Version | Printable Chapter

Items in the microbiology textbook are copyright, Timothy Paustian© 1999-2006.

Annex 5

الملحق الخامس

Basic Pure Culture Techniques

1- Aseptic technique

Trying to study this **mixed population** is often difficult and in the tradition of the scientific method; researchers dissect a system and study each piece in isolation. For microorganisms this means separating the organisms and getting them into pure culture. **A pure culture** is defined as a growth of microorganisms (a culture) that contains one cell type. It is essential in microbiology to be able to obtain and preserve pure cultures. Over 100 years ago, **Robert Koch** devised methods to achieve this goal and the methods he developed are essentially still used today. The protocols used to maintain pure cultures are a major part of aseptic technique.

The goals of aseptic technique are two-fold. **The first objective is** to obtain pure cultures and secondly to prevent cross-contamination. Microorganisms in culture must not escape into the environment, and microbes in the environment must not get into the cultures we are studying. It is essential that aseptic technique be understood and practiced correctly. Contaminated cultures are worthless for diagnosis or for doing research on, because it is unclear what microbe is performing any action that is being observed.

Aseptic methods commonly used are flame sterilization, tube transfer, streak plates, spread plates and pour plates. Flame sterilization is an easy method to insure sterile transfer of a culture from a source to a growth medium. Tube transfer is useful for moving inocula from one tube to another. Mechanical dilution by making streak plates is the preferred method for obtaining a pure culture of a microorganism. Finally, spread plates and pour plates are common methods for enumerating microorganisms and are sometimes useful for obtaining isolated **colonies** .

2 - Flame sterilization and tube transfer

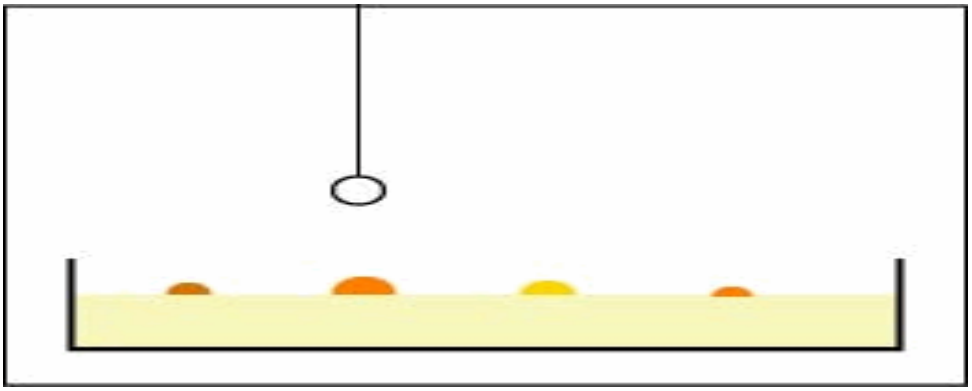
Flame sterilization is a very quick simple method of killing microorganisms on an inoculating loop or needle. The loop or needle is held **inside a flame for a few seconds** to bring it to redness and then **cooled**. Once cool, the loop or needle can be used for various culture manipulations. **Make sure that the area that contacts the culture is flamed to redness. Also, be patient and**

let the loop cool down, this usually takes about 15-30 seconds. Learning this technique is essential to everything else you do in microbiology.

Transfer of culture from agar plates to tubes, or from tube to tube, is a common, simple procedure. It is important to perform these transfers in a consistent and rapid manner. The following protocols have been found effective.

To transfer a culture from an agar plate to a broth or agar slant:

1. Place the Bunsen burner in front of you and assemble all necessary equipment with in arms reach. Position everything so that you will not burn yourself while trying to inoculate your tubes.
2. Label the tube of broth or agar to be inoculated with identifying marks. The culture, the date, and your initials for example. Place it in a rack in front of you.
3. Holding the inoculating loop handle, flame the entire wire to redness.
4. When the wire cools (about 15-30 seconds) remove the lid of the plate with your other hand and obtain an inoculum by removing a small portion of the surface growth on the agar plate. In most cases you will be picking an isolated colony. Choose a well isolated one. Do not dig into the agar. Replace the lid of the plate immediately.



5. Hold the tube to be inoculated with the free hand. Remove the cotton plug or cap of the tube with the little finger of the hand holding the needle holder. If a cotton-plugged tube is used, the mouth of the tube should be passed briefly through the flame to singe off dust and lint particles. (Dust or lint may fall into the tube and contaminate the medium.)
6. Introduce the inoculum into the tube, and streak gently the surface of the agar medium in the tube.
7. When inoculating a tube of broth, rub the wire against the glass just above the fluid level and then tip the tube slightly to wash the inoculum into the broth. The wire should not be rattled against the sides of the tube to shake an inoculum into the broth; this is unnecessary and may create a dangerous aerosol.
8. Replace the cap or plug (the latter after reflaming the mouth of the tube).
9. Flame the inoculating wire again to redness, slowly to avoid spattering. Put the loop holder down after the wire cools.

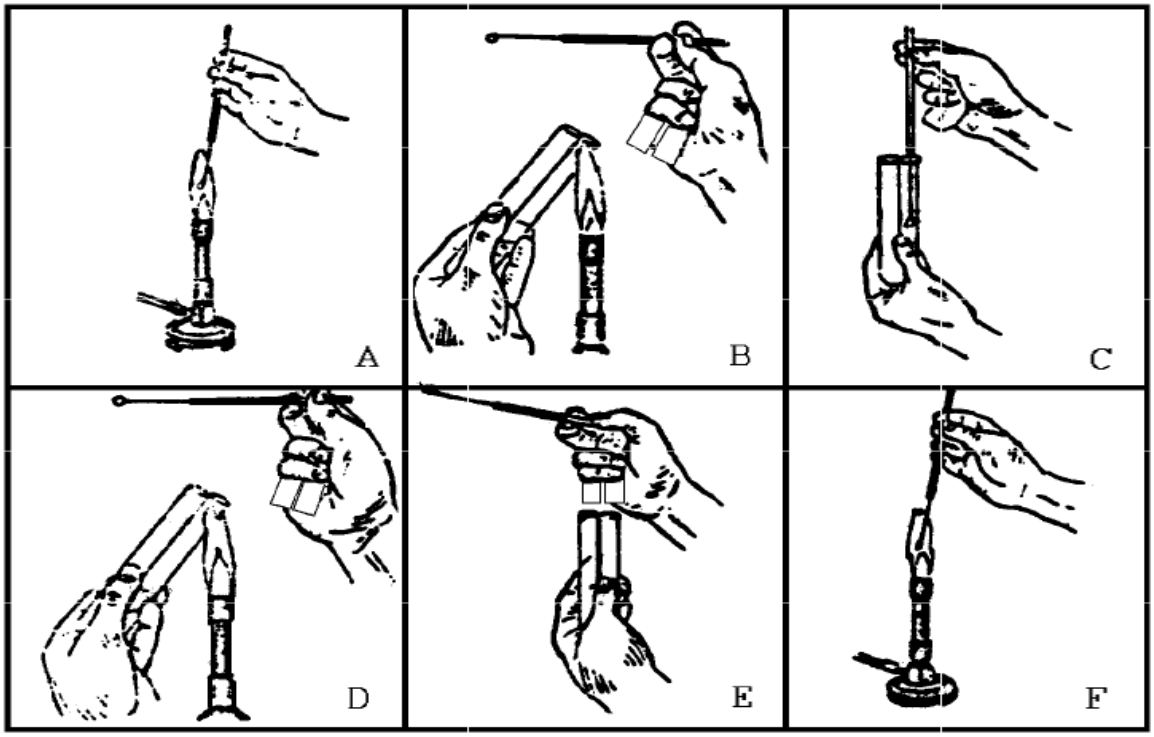
The standard method for transferring microbes from one medium to another. Each of the steps is described in the text.

In tube to tube transfers by loop or straight wire, both the tube containing the inoculum source and the tube to be inoculated are usually in the hand at the same time.

The tubes are positioned in the hand as shown in the Fig B-E. Plugs and caps can be loosened by twisting them.

1. The needle holder is taken in the other hand and the wire flamed and allowed to cool (Fig. A).
2. The plugs or caps are removed with the last two fingers of the hand holding the inoculating wire leaving the thumb and index finger free to hold and to manipulate the loop holder with the second finger as a guide and support. Flame the tops of the tubes.
3. Immerse the inoculating wire into the broth culture or scrape the wire across a portion of surface growth on an agar slant to obtain inoculum. Make the transfer from one tube to the other (Fig. C).
4. Flame the tubes (Fig. D).
5. Return the plugs or caps to the tubes (Fig. E).
6. Flame the inoculating wire to sterilize it (Fig. F).

An easy procedure which prevents hand fatigue and the danger of dropping the tubes is illustrated in the following Figure:



3. Making a medium - You try it

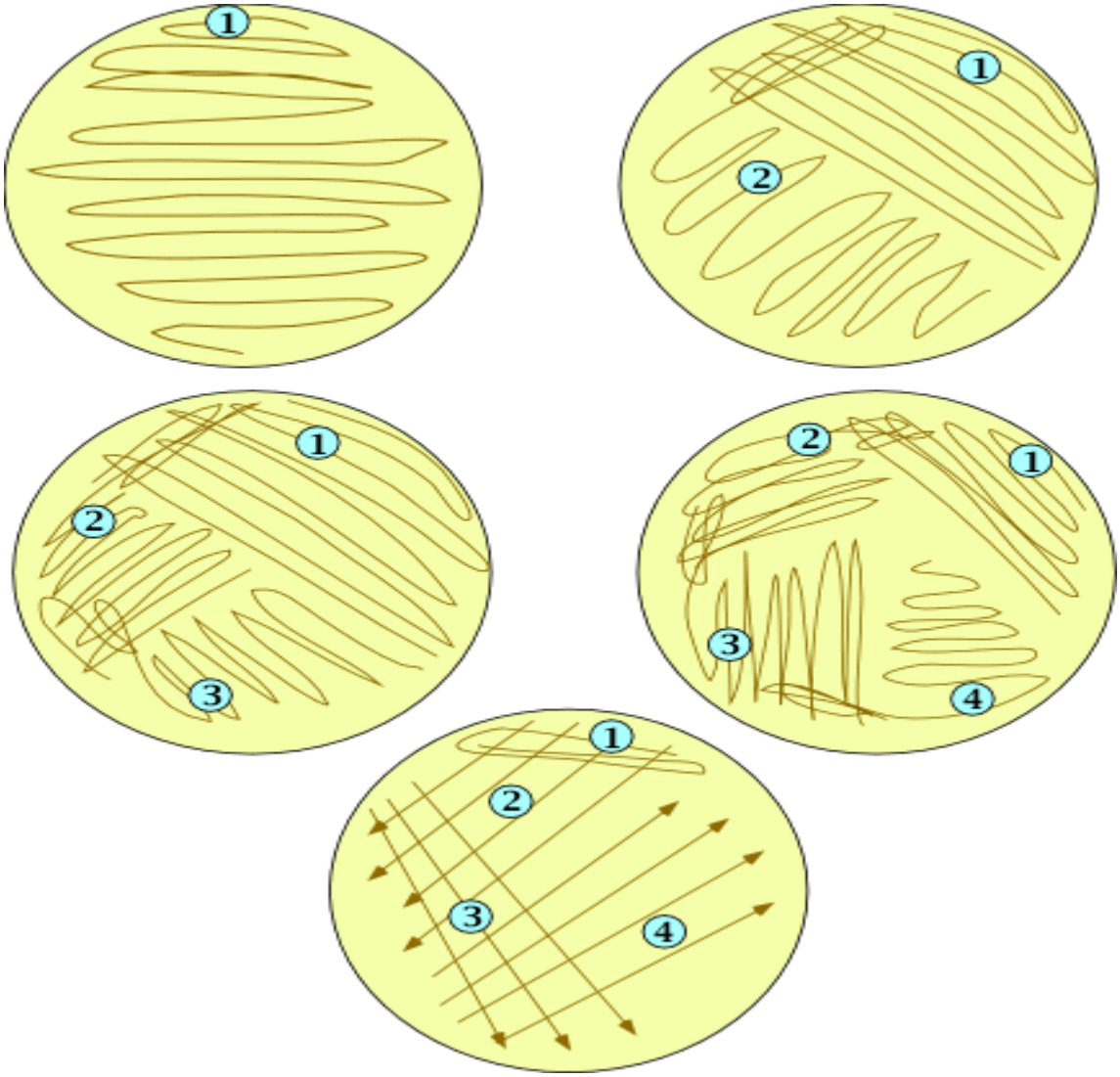
Making medium is as simple as cooking and a crude medium can be made in almost any kitchen with a few utensils and a source of heat. Below is described the production of a chicken broth **medium** that will grow many common microorganisms. Simply boiling a medium once, may kill most vegetative cells, but does not kill endospores. However, autoclaving is carried out usually (some time autoclaving is not necessary as mentied in preparation procedure) to ensure that all spores have been killed.

1. Add 250 ml (or the desired quantity needed) of reagent grade water into a glass container or some other vessel that can stand boiling water. The container should be something you can cover. Glass bottles **that can stand boiling** or canning jars work well.
2. To this water add, the defined amount of the stock broth medium, and stir until dissolved. Cover loosely so that steam can escape, but dust and dirt cannot enter.
3. Heat in already heated water bath until the media just begins to boil, adjust the pH if it is necessary and according to the directions from the manufacturer.

4. Autoclave the broth medium under pressure, temperature for the time defined by he manufacturer.
5. Place the medium in a warm place overnight to insure sterilization (no turbidity).

4- Streak plates

The streak plate method is a rapid and simple technique of mechanically diluting a relatively large concentration of microorganisms to a small, scattered population of cells. The goal is to obtain isolated colonies on a large part of the agar surface, so that desired species can then be brought into pure culture. Proper streaking of plates is an indispensable tool in microbiology. In most cases a closed inoculating loop is used for streaking plates. The wire loop should not be badly oxidized or pitted or it will fail to dilute the inoculum and will scratch the surface of the agar. Streak plates can be made from a broth culture, an agar slant or from an agar plate. It is sometimes convenient to suspend a bit of growth from a solid surface in sterile saline and use this as a source of inoculum. Resuspension of colonies or cultures grown on solid surfaces dilutes the culture and makes streak plating easier. A loopful of inoculum is transferred from the source and put on the agar surface. When using a large inoculum (a turbid culture or growth from a solid surface), a small spot is spread during the initial transfer. If the inoculum is from a lightly turbid suspension, the first phase of the streaking pattern is begun. Several basic patterns are illustrated in **the** following figure. The three-phase streaking pattern is recommended for beginners because it is most likely to give satisfactory results with suspensions having a wide range of microbial density.



There are a number of different methods for mechanically diluting microbes on a streak plate. The most common method is spreading microbes across a plate as shown in the first four figures. As the concentration of microbes increases so do the number of phases. Irrespective of the number of phases, loop is flamed between each one. The fifth plate shows an alternative method, where the streaks are not continuous, but are a series of parallel lines.

Choosing a streaking pattern is a matter of individual preference and depends upon the number of microorganisms in the sample. Last Figure demonstrates the most common patterns, but they are

not the only methods. The object of any streaking pattern is the continuous dilution of the inoculum to give many well isolated colonies. For multi-phase streaking it is crucial to flame the loop before starting the next phase. Note the slight overlap into the previous phase to pick up a small inoculum. To streak a plate:

1. Flame the loop to sterilize it and let cool.
2. Position the plate so that the spot of inoculum is nearest the hand not holding the loop (the opposite hand).
3. Lift the plate lid with the opposite hand; just enough to get the loop inside and touch the loop to the inoculum spot. It is often helpful to treat the inoculating loop as if it were a pencil - steadying the loop by resting the heel of the hand against the lab bench.
4. Move the loop back and forth across the spot and then gradually continue toward the center of the plate as you sweep back and forth. Use a very gentle and even pressure.
5. When creating each phase, do not worry about keeping each pass across the plate separate from previous ones.
6. When about 30% of the plate has been covered by the first streaking phase, remove the loop and flame sterilize it.
7. Repeat the above procedure for the second phase, but this time pick up some inoculum by crossing into the first phase 2-3 times and then not passing into it again.
8. Repeat as necessary for the third and fourth phases. After streaking the plate, flame sterilize the loop before setting it down.

5- Spread plates and dilution plating

An absolute requirement for a microbiologist is to be able to determine the concentration of microorganisms in a given sample. Various particle-counting devices, spectrophotometric methods and microscopic techniques have been used to count cells. However, one drawback to these methods is that they count dead as well as living cells. The most common method of enumerating viable cells is the plate-count method. Diluting microorganisms and placing them into **petri plates** (or plates) for incubation is another essential technique for working with microorganisms.This method suffers from some problems. First, only those organisms which can grow on the medium, and at the temperature and atmospheric conditions of incubation, will divide

and develop into colonies. Second, each colony may not represent the progeny from one cell, as two or more cells (those in clusters, chains or otherwise close to one another) can give rise to one colony. For these reasons the counts obtained from the plate-count method are given as the number of colony-forming units (CFU's) per ml (or gram) rather than the number of cells per ml (or gram). Despite these drawbacks, the plate-count method is a powerful means by which concentrations of viable organisms may be estimated. Also, if it is desirable to count a specific subgroup of microorganisms in a sample, selective media or special incubation conditions can often be used to encourage the growth of only this class of organism. As microbial quantitation involves the use of **pipettes** (or **micropipettes**) in preparing dilutions and inoculating plates, the beginning microbiologist must become familiar with their use.

Due to the possibility of ingesting pathogens and toxic liquids, mouth-pipetting is forbidden in the laboratory! Pipettes are filled and subsequently emptied by the use of propipettes or other pipette bulb. Pay close attention to the demonstration of their use.

Important Safety Consideration: When fitting the pipette and pipette bulb together, use very gentle pressure!! Do not jam these items together! (Force is usually not the answer, a good general rule to live by in this lab and in life for that matter.) The glass pipette will probably break and possibly cause severe injury. Handle the pipette only at the top inch or so.

For volumes of 5 ml of less, micropipettes are often the tool of choice. Instruments are available that are capable of dispensing 5 ml all the way to less than 1 µl (one one-millionth of a liter). Micropipettes have made it possible to miniaturize many experiments and greatly decrease the cost of running them. They are also easy to use and can dispense volumes quickly, increasing the number of experiments that can be performed in a set amount of time. Micropipettes are the tool of choice for small volumes.

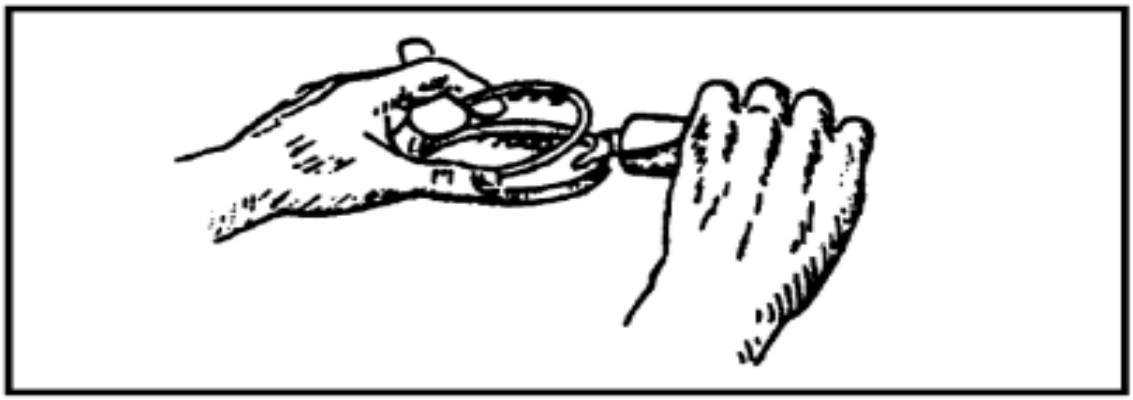
---

2 - 6 Pour Plates

A practical and common laboratory technique used in isolating pure cultures or enumerating the living microorganisms in water, milk, foods, and other materials is the pour plate technique.

To aseptically transfer liquid into a pour plate, raise one side of a Petri plate lid only just enough to allow access of the sample (from a tube or pipette). Transfer a known amount of the sample to the dish and cover immediately with the lid. Then pour 15-20 ml of sterile agar culture medium which has been melted and cooled to 45-50°C into the plate as shown in **Figure 2-5** [13]. The inoculum and medium are mixed by gentle rotation ten times in one direction and ten times in the other direction. The agar must be allowed to solidify completely before the plates are inverted for incubation. After incubation both surface and subsurface colonies will be observed.

Figure 2-5 Pour plates



Pour plates allow the addition of larger amounts of liquid (1-5 ml) to an agar dish. The sample is added to the bottom of a sterile Petri plate. Molten agar is then added to the plate aseptically. It is important to only open the cover enough to allow the pouring of the agar. This prevent contamination from the environment.

Figure 2-6 [14] is a movie demonstrating the pour plate technique.

Links

[1] http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/index.php?module=Book&func=displayarticle&art_id=26

[2] http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/index.php?module=Book&func=displayglossary#colonies

[3] http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/index.php?module=Book&func=displayfigure&book_id=3&fig_number=1&chap_number=2

[4] http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/index.php?module=Book&func=displayfigure&book_id=3&fig_number=2&chap_number=2

[5] http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/index.php?module=Book&func=displayglossary#tyndal

ization
[6]
http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/index.php?module=Book&func=displayfigure&book_id=3&fig_number=3&chap_number=2
[7]
http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/index.php?module=Book&func=displayfigure&book_id=3&fig_number=3&chap_number=2
[8]
http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/index.php?module=Book&func=displayfigure&book_id=3&fig_number=4&chap_number=2
[9]
http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/index.php?module=Book&func=displayglossary#petri%20plates
[10]
http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/index.php?module=Book&func=displayarticle&art_id=101
[11]
http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/index.php?module=Book&func=displayglossary#pipettes
[12]
http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/index.php?module=Book&func=displayglossary#micropipettes
[13]
http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/index.php?module=Book&func=displayfigure&book_id=3&fig_number=5&chap_number=2
[14]
http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/index.php?module=Book&func=displayfigure&book_id=3&fig_number=6&chap_number=2

4-6 Direct particle counts

(9069 Reads)

Table of Contents| Chapter Article List| Printable Version | Printable Chapter

[Prev] | [Next]

Counting chambers

The most direct method of counting microorganism is by the use of a microscope and a slide with special chambers of known volume. These slides allow the counting of a small number of cells in a small volume and extrapolating the result to determine the population. An example of such a device is shown in Figure 4-10. A culture is placed on the slide marked with precise grids. The number of cells present in each grid is counted and an average determined. Conversion using a formula gives the number of cells per milliliter in the culture. This method is rapid, a result can be known in just a few minutes, and is easy to perform. However, it is impossible to distinguish living cells from dead ones. If this distinction is important, direct microscopic counts are not the solution. Finally, cultures containing less than 1 million cells per ml are actually too dilute for direct counts since there will be too few cells in the very small volume that is actually examined under the microscope for an accurate count

Figure 4-10 The Petroff-Hauser counting chamber

Books

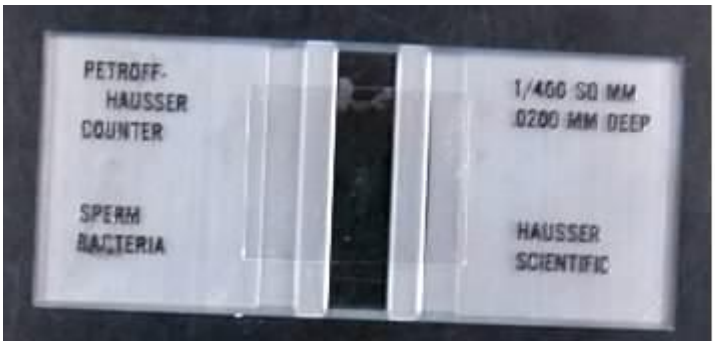
The little Book module manual

Virtual Microbiology

Through the microscope: A look at all things small

Textbook Table of Contents

- Introduction & History
- Bacterial Structure
- Bacterial Growth
- Control of Growth
- Bacterial Nutrition
- Classification
- Metabolism
- Regulation of Metabolism
- Genomics and Genetics
- Archaeal Diversity
- Bacterial



The center of the slide contains a precisely machined grid, with each square (1/20 mm x 1/20 mm) having a known area. The coverslip also rests above the slide a known distance (typcially 1/50 of a mm). Since each of these dimenstions is known, it is possible to calculate the number of cells in each square and pluggin it into a formula. On the left of the figure is a photograph of a Petroff-Hauser slide. On the right is a grid at 100 x magnification showing the size of the squares.

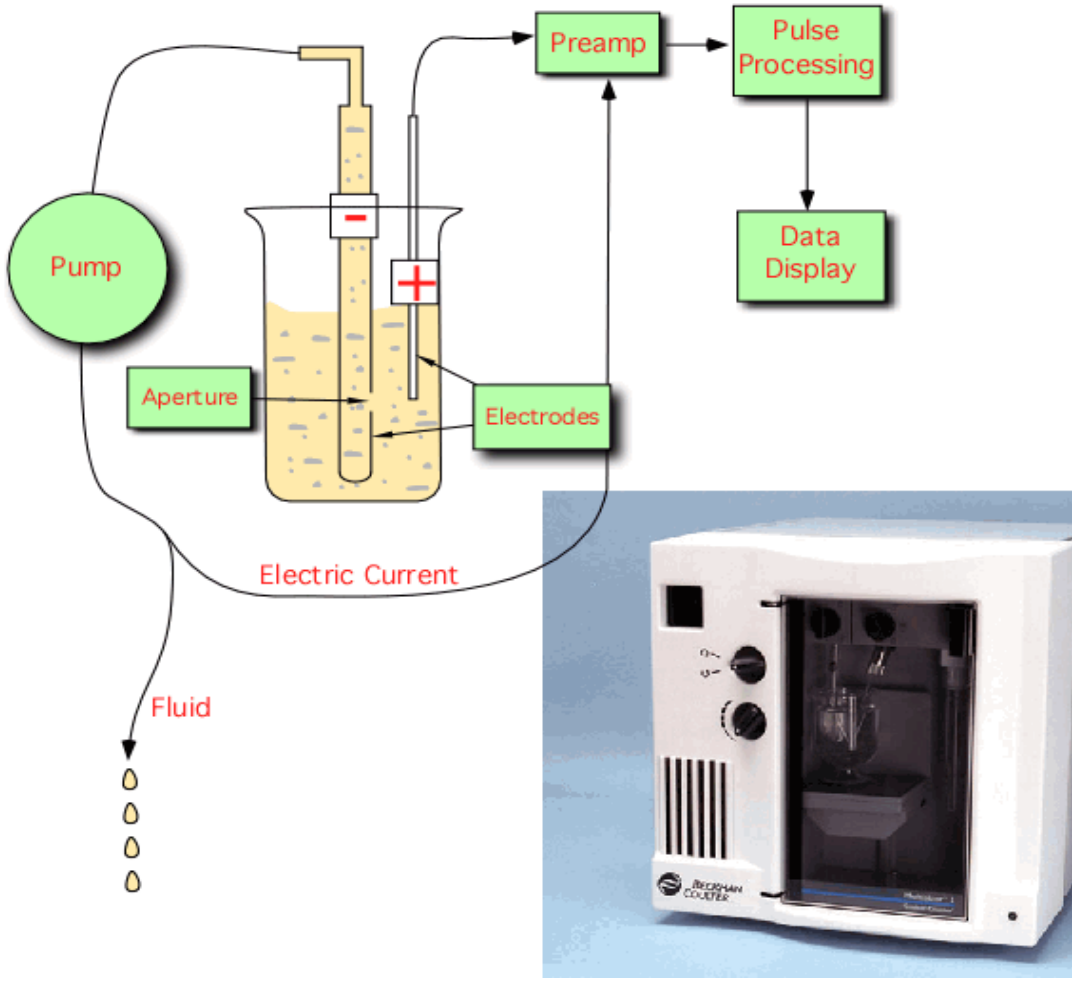
a picture of the petroff-hauser cell counter and then what it looks like on a slide.

Electronic particle counters

Electronic particle counters are useful if the number of bacteria in a sample needs to be counted on a routine basis. The method is based on the property that nonconductive particles, such as bacteria, will cause a disruption in an electric field as they pass through it. A Coulter counter is a type of electronic particle counter in which there is a small opening between electrodes through which suspended particles pass, see Figure 4-11. In this sensing zone, each particle displaces its own volume of electrolyte, causing a current pulse. The pulse is noted and recorded as one particle count. By precisely controlling the rate at which solution passes through the opening, it is possible to get exact, reproducible counts at a rate of up to several thousand bacteria per second. Coulter counters are highly dependent upon particle size and those dependent upon changes in current are near their detectable limits with microorganisms. Particle counters that use light diffraction as a means of sizing and counting particles are also manufactured and can detect particle less than 1 µm in diameter.

Diversity
- Animal Immunity
- Treatment and Prevention
- Bacterial Pathogens
- Viral Pathogens
- Host-Microbe Interactions
- Central Dogma
- Comments

Figure 4-11 The coulter counter



A picture of a Coulter Counter. The diagram at the right demonstrates the opening that the microbes must pass through during counting. When microbes pass through the aperture the electrical potential across the electrodes is distrubes, which the dataprocessing system records as a count. In the lower right is an actual picture of a Multisizer™ 3 by Beckmann instruments that uses the Coulter counter priciple.

The advantage of this method is the simplicity of its operation and it reproducibility. As in microscopic counts, the machine cannot distinguish between living or dead cells or even between dust and bacteria. Any reasonably sized particle in the solution will be counted. There is also the expense of buying the counter, which can cost many thousands of dollars.

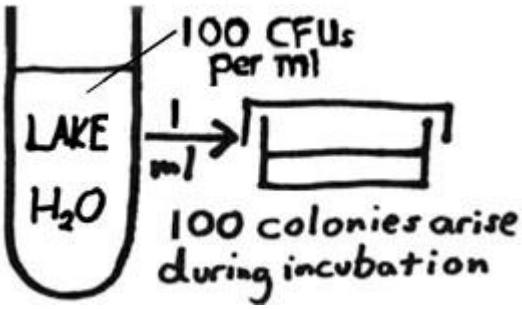
Dilution Theory – Page 1:

Dilution Plating

John L's Bacteriology Pages >
Selected General Topics > Dilution Theory:

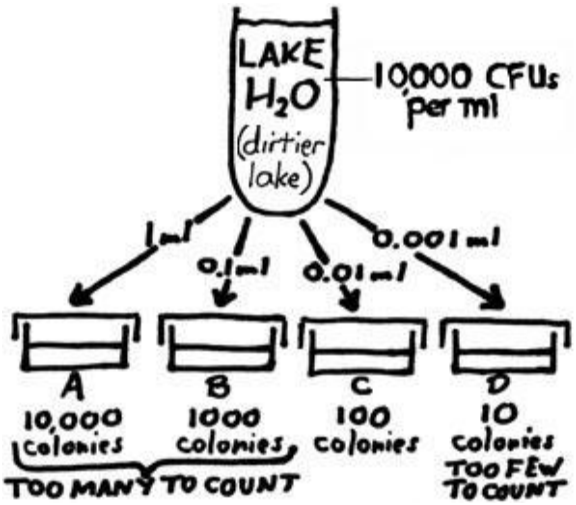
Dilution Theory per se:
• Page 1 – Dilution Plating
• Page 2 – More Dilution Plating
• Page 3 – The MPN Method

Supplementary Pages:
• Five-Tube MPN Table
• Practice Set 1 (Plating)
• Practice Set 2 (Plating&MPN)



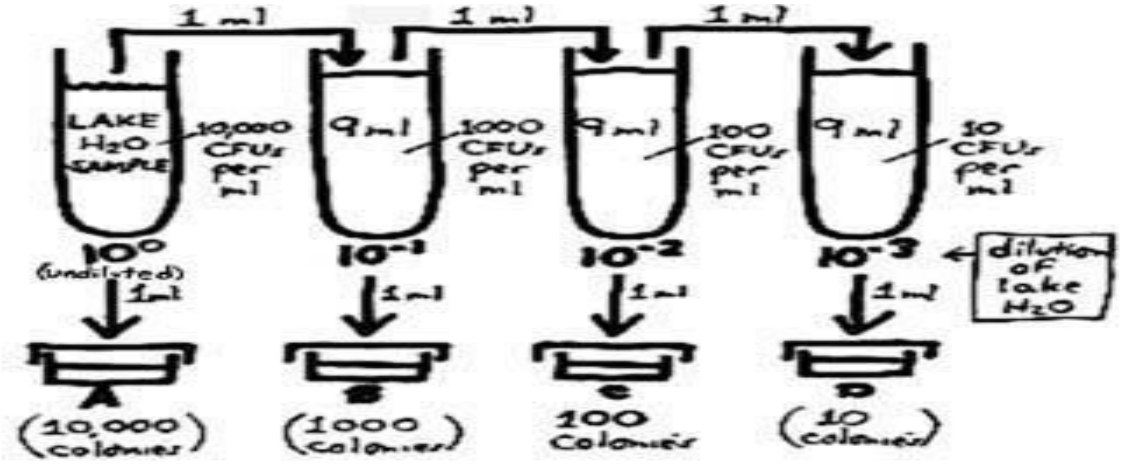
In **quantitative microbiology**, we are concerned with determining the **concentration of colony-forming units (CFUs) in our sample** – i.e., the number of CFUs per ml or per gram of the sample. For example, if we were to plate out **one ml** of a lake water sample and then – after incubation of the plates – find that **100 colonies** have arisen, we would then conclude that there were **100 CFUs per ml** of the lake water.

More realistically (as with most of our area lakes), the concentration of CFUs in the water could have been considerably greater. Counting the colonies on a plate inoculated with one ml of water may be impossible. **We would like to have "countable" plates – containing between 30 and 300 colonies.** If fewer than 30, we run into greater statistical inaccuracy. If greater than 300, the colonies would be tedious to count and also would tend to run together.



We may try to plate out smaller and smaller amounts, as in the example shown at right. With this new lake water sample, a countable plate (Plate C: 100 colonies) is achieved with the inoculation of 0.01 ml of sample. Figuring out the number of CFUs per ml of the sample would go like this: Whatever the **number of CFUs in the inoculum** of Plate C (**one-hundreth of a ml** of the sample), there would be **one hundred times as many CFUs in one ml** of the sample. So, if 100 CFUs are determined to be in the 0.01 ml inoculum, then 100 X 100 CFUs would be present in one ml; the final answer is **10,000 CFUs/ml** of the sample.

Two drawbacks to this procedure: It is difficult with our equipment to dispense amounts smaller than 0.1 ml. Also, the smaller the amount tested, the less representative it is of the sample.



So we now get into "dilution theory" to accomplish the equivalent of plating out succeedingly smaller amounts of sample. Making serial decimal dilutions (i.e., successive **1/10 dilutions**, each made by **adding one part of inoculum to 9 parts of diluent**) and inoculating one ml into each of the plates, we can construct a plating procedure (shown at right) that is **equivalent to the above**.

Illustrating how the concentration of CFUs decreases according to how these cell suspensions are diluted: We determined above that the **sample contains 10,000 CFUs per ml**. Taking out one ml and inoculating it into a 9 ml dilution blank (the second tube) would put the **10,000 CFUs into a total of 10 ml** which is equivalent to **1000 CFUs per ml of the 1/10 dilution of the sample**. The density of CFUs continues to decrease ten-fold with each subsequent dilution.

Counting 100 colonies in Plate C, note how we can work back to a concentration of 10,000 CFUs per ml of the sample. So, by inoculating 1 ml of a 10^{-2} dilution into the plate which is subsequently counted, we are theoretically doing the equivalent of plating 10^{-2} ml (i.e., 0.01 ml) of the lake water sample. (**Scientific notation** is reviewed here.)

IF **100 colonies** arise from plating **one ml** of a **1/100 dilution** of the lake water,
THEN there were **10,000 CFUs** (from **100 X 100**) per **one ml** of the **undiluted** water sample.

Compare the solution just obtained with the previous solution where Plate C was inoculated with 0.01 ml of sample:

IF **100 colonies** arise from plating **0.01 ml** of the water sample,
THEN there were **10,000 CFUs per one ml** of the water sample.

SOME MORE EXAMPLES:

I. For **Bacteriology 102** students, the above setup is applicable to Experiment 1, Period 2 where we plated one ml of a 10^{-2} (i.e., 1/100) dilution of lake water. In Period 3 – after

incubation of the plates – if we were to find 75 colonies on our plate, we could determine the CFUs per ml of the sample (at the time of Period 2) as follows:

IF **75 colonies** arise from plating **one ml** of a **1/100 dilution** of the lake water, THEN there were **7,500 CFUs** (**from 75 X 100**) per **one ml** of the **undiluted** water sample.

II. As we used a 10^{-4} (i.e., 1/10,000) dilution of **soil** in the same experiment, we could figure out the CFUs per gram of the soil the same way, remembering that **we consider milliliters and grams to be equivalent**:

IF **75 colonies** arise from plating **one ml** of a **1/10,000 dilution** of the soil, THEN there were **750,000 CFUs** (from **75 X 10,000**) **per one gram** of the **undiluted** soil sample.

III. **Consider this problem, the likes of which we often give in quizzes and on problem sets: Five ml** (not one!) of an undiluted spring water sample were added to a petri dish to which 15 ml of melted Plate Count Agar were then added. After mixing, the plate was allowed to solidify and then was incubated appropriately. After incubation, **50 colonies** were counted. How many CFUs were present **per one ml** of the original, undiluted spring water sample?

Here's the solution (and note the careful use of correct terminology): If 50 colonies arise from plating 5 ml of the sample, then there were 10 CFUs per one ml of the sample.

In working through this problem, consider the special bit of extraneous information thrown in – i.e., the amount of medium in the plate. Wouldn't you expect the same

answer if you used a different amount of melted Plate Count Agar, say 20 or 25 ml? So, you should still wind up with the answer being 10 CFUs per ml of the water sample.

On occasion, we unfortunately see an answer of more CFUs in one ml then there would have been in 5 ml! This can happen if one does not think through the setup of the problem and then treats the addition of sample to medium as a dilution. On the next page is the same problem worked out with our formulas.

Annex 6

الملحق السادس

LAB 3: OBTAINING PURE CULTURES FROM A MIXED POPULATION

DISCUSSION

As stated in Lab 2, microorganisms exist in nature as mixed populations. However, to study microorganisms in the laboratory we must have them in the form of a pure culture, that is, one in which all organisms are descendants of the same organism.

Two major steps are involved in obtaining pure cultures from a mixed population:

1. First, the mixture must be diluted until the various **individual microorganisms become separated** far enough apart on an agar surface that after incubation they form visible **colonies isolated from the colonies of other microorganisms**. This plate is called an **isolation plate**.

2. Then, an isolated colony can be aseptically **"picked off"** the isolation plate (see Fig. 1) and **transferred** to new sterile medium (see Fig. 3). After incubation, all organisms in the new culture will be descendants of the same organism, that is, a **pure culture**.

Animation showing a portion of a single colony being "picked off."

A. STREAK PLATE METHOD OF ISOLATION

The most common way of separating bacterial cells on the agar surface to obtain isolated colonies is the streak plate method we used in Lab 2 to inoculate a petri plate. It provides a simple and rapid method of diluting the sample by mechanical means. As the loop is streaked across the agar surface, more and more bacteria are rubbed off until individual separated organisms are deposited on the agar. After incubation, the area at the beginning of the streak pattern will show confluent growth, while the area near the end of the pattern should show discrete colonies (see Fig. 2).

B. THE POUR PLATE AND SPIN PLATE METHODS OF ISOLATION

Another method of separating bacteria is the pour plate method. With the **pour plate method**, the bacteria are mixed with melted agar until evenly distributed and separated throughout the liquid. The melted agar is then poured into an empty plate and allowed to solidify. After incubation, discrete bacterial colonies can then be found growing both on the agar and in the agar.

The **spin plate method** involves diluting the bacterial sample in tubes of sterile water, saline, or broth. Small samples of the diluted bacteria are then pipetted onto the surface of agar plates. A sterile, bent-glass rod is then used to spread the bacteria evenly over the entire agar surface (see Fig. 4) in order to see isolated colonies (see Fig. 5). In Lab 4 we will use this technique as part of the plate count method of enumerating bacteria.

C. USE OF SPECIALIZED MEDIA

To supplement mechanical techniques of isolation such as the streak plate method, many **special-purpose media** are available to the microbiologist to aid in the isolation and identification of specific microorganisms. These special purpose media fall into four groups: selective media, differential media, enrichment media, and combination selective and differential media.

1. Selective media

A selective medium has agents added which will **inhibit the growth of one group of organisms while permitting the growth of another**. For example, **Columbia CNA agar** has the antibiotics colistin and nalidixic acid added which inhibit the growth of gram-negative bacteria but not the growth of gram-positives. It is, therefore, said to be selective for gram-positive organisms, and would be useful in separating a mixture of gram-positive and gram-negative bacteria.

2. Differential media

A differential medium contains additives that **cause an observable color change in the medium when a particular chemical reaction occurs**. They are useful in differentiating bacteria according to some biochemical characteristic. In other words, **they indicate whether or not a certain organism can carry out a specific biochemical reaction** during its normal metabolism. Many such media will be used in future labs to aid in the identification of microorganisms.

3. Enrichment media

An enrichment medium contains additives that **enhance the growth of certain organisms**. This is useful when the organism you wish to culture is present in relatively small numbers compared to the other organisms growing in the mixture.

4. Combination selective and differential media

A combination selective and differential medium **permits the growth of one group of organisms while inhibiting the growth of another**. In addition, it differentiates those organisms that grow based on whether they can **carry out particular chemical reactions**. For example, Eosin Methylene Blue (EMB) agar is selective for gram-negative bacteria. The dyes eosin Y and methylene blue found in the medium inhibit the growth of gram-positive bacteria but not the growth of gram-negatives. In addition, it is useful in differentiating the various gram-negative enteric bacilli belonging to the bacterial family Enterobacteriaceae (see Labs 12 & 13). The appearance of typical members of this bacterial family on EMB agar is as follows:

- Escherichia coli: large, blue-black colonies with a green metallic sheen
- Enterobacter and Klebsiella: large, mucoid, pink to purple colonies with no metallic sheen
- Salmonella and Shigella and Proteus: large, colorless colonies
- Shigella: colorless to pink colonies

The color changes in the colonies are a result of bacterial fermentation of the sugar lactose while colorless colonies indicate lactose non-fermenters. Fermentation reactions will be discussed in more detail in Lab 8.

There are literally hundreds of special-purpose media available to the microbiologist. Today we will combine both a mechanical isolation technique (the streak plate) with selective and selective-differential media to obtain pure cultures from a mixture of bacteria. In future labs, such as 12 - 16, which deal with the isolation and identification of pathogenic bacteria, we will use many additional special-purpose media.

MEDIA

One plate of each of the following media: Trypticase Soy agar, Columbia CNA agar, and EMB agar.

ORGANISMS

A broth culture containing a mixture of one of the following gram-positive bacteria and one of the following gram-negative bacteria:

- Possible gram-positive bacteria:
  - Micrococcus luteus. A gram-positive coccus with a tetrad or a sarcina arrangement; produces circular, convex colonies with a yellow, water-insoluble pigment on Trypticase Soy agar.
    - **Micrococcus luteus growing on TSA**
    - **Close up of Micrococcus luteus growing on TSA**
  - Staphylococcus epidermidis. A gram-positive coccus with a staphylococcus arrangement; produces circular, convex, non-pigmented colonies on Trypticase Soy agar.
    - **Staphylococcus epidermidis growing on TSA**
    - **Close up of Staphylococcus epidermidis growing on TSA**
- Possible gram-negative bacteria:
  - Escherichia coli. A gram-negative bacillus; produces irregular, raised, non-pigmented colonies on Trypticase Soy agar.
    - **Escherichia coli growing on TSA**
  - Enterobacter aerogenes. A gram-negative bacillus; produces irregular raised, non-pigmented, possibly mucoid colonies on Trypticase Soy agar.
    - **Enterobacter aerogenes growing on TSA**

During the next three labs you will attempt to obtain pure cultures of each organism in your mixture and determine which two bacteria you have. **Today** you will try to separate the bacteria in the mixture in order to obtain isolated colonies; **next lab** you will identify the two bacteria in your mixture and pick off single isolated colonies of each of the two bacteria in order to get a pure

culture of each. The **following lab** you will prepare microscopy slides of each of the two pure cultures to determine if they are indeed pure.

PROCEDURE (to be done in pairs)

1. First attempt to obtain isolated colonies of the two organisms in your mixture by using mechanical methods on an all-purpose growth medium, Trypticase Soy agar. Streak the mixture on a plate of Trypticase Soy agar using one of the two streaking patterns illustrated in Lab 2, Fig. 4 and Fig. 5.

Animation showing how to streak an agar plate for isolation.

2. Streak the same mixture for isolation (see Fig. 4 and Fig. 5) on a plate of Columbia CNA agar (selective for gram-positive bacteria).

- **Micrococcus luteus** growing on Columbia CNA agar.
- **Staphylococcus epidermidis** growing on Columbia CNA agar.

3. Streak the same mixture for isolation (see Fig. 4 and Fig. 5) on a plate of EMB agar (selective for gram-negative bacteria and differential for certain members of the bacterial family Enterobacteriaceae).

- **Escherichia coli** growing on EMB agar.
- **Enterobacter aerogenes** growing on EMB agar.

4. Incubate the three plates **at 37°C** until the next lab period.

Return to Menu for Lab 3

RESULTS

1. Observe isolated colonies on the plates of Trypticase Soy agar, Columbia CNA agar, and EMB agar. Record your observations and conclusions.

Trypticase Soy agar	
Observations	
Conclusions	
Columbia CNA agar	
Observations	
Conclusions	
EMB agar	
Observations	
Conclusions	

2. Using any of the three plates, **pick off a** single isolated colony **of each of the two organisms in your original mixture and aseptically transfer them to separate plates of Trypticase Soy agar** (see Fig. 3). When picking off single colonies, **remove the top portion of the colony without touching the agar surface itself** to avoid picking up any inhibited bacteria from the surface of the agar. Use your regular plate-streaking pattern to inoculate these plates and incubate **at 37°C** until the next lab period. These will be your pure cultures for Lab 5 (Direct and Indirect stains).

Animation showing a portion of a single colony being "picked off."

Return to Menu for Lab 3

PERFORMANCE OBJECTIVES FOR LAB 3

After completing this lab, the student will be able to complete the following objectives:

DISCUSSION

1. Given a mixture of a gram-positive and a gram-negative bacterium and plates of of Columbia CNA, EMB, and Trypticase Soy agar, describe the steps you would take to eventually obtain pure cultures of each organism.

2. Define: selective medium, differential medium, enrichment medium, and combination selective-differential medium.

3. State the usefulness of Columbia CNA agar and EMB agar.

4. Describe how each of the following would appear when grown on EMB agar:

a. Escherichia coli
b. Enterobacter aerogenes
c. Salmonella

PROCEDURE

1. Using the streak plate method of isolation, obtain isolated colonies from a mixture of microorganisms.

2. Pick off isolated colonies of microorganisms growing on a streak plate and aseptically transfer them to sterile media to obtain pure cultures.

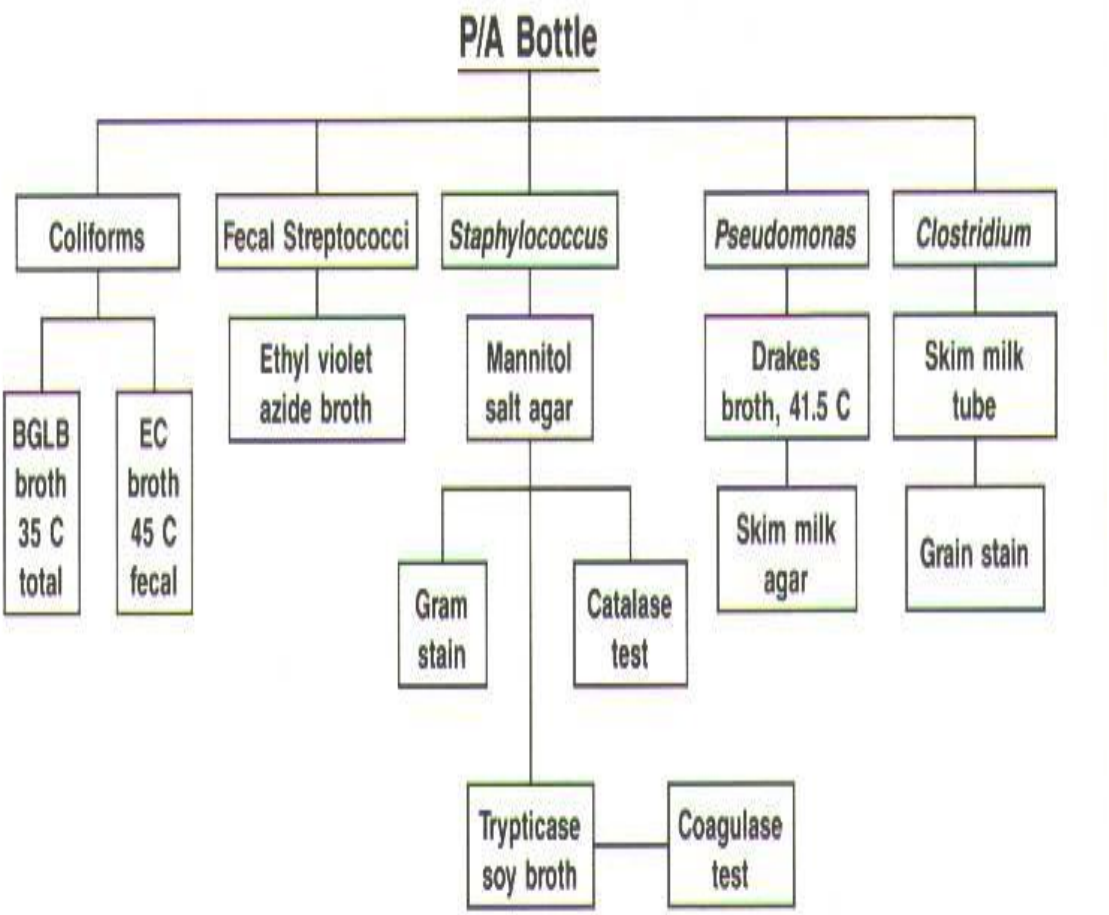
RESULTS

1. When given a plate of Columbia CNA agar or EMB agar showing discrete colonies, correctly interpret the results.

Annex 7

الملحق السابع

FIGURE 9:


P/A Bottle
Coliforms
Fecal Streptococci
Staphylococcus
Pseudomonas
Clostridium
BGLB broth 35 C total
EC broth 45 C fecal
Ethyl violet azide broth
Mannitol salt agar
Drakes broth, 41.5 C
Skim milk tube
Gram stain
Catalase test
Skim milk agar
Grain stain
Trypticase soy broth
Coagulase test

Annex 8

الملحق الثـــامن

Pseudomonas Aeruginosa
By Murali Putty, EMLab™ Analyst

Pseudomonas aeruginosa is a gram-negative, aerobic rod measuring 0.5 to 0.8 µm belonging to the bacterial family Pseudomonadaceae. Like other Pseudomonads, P. aeruginosa secretes a variety of pigments, including pyocyanin (blue-green), fluorescein (yellow-green and fluorescent), and pyorubin (red-brown). P. aeruginosa is often preliminarily identified by its pearlescent appearance and grape-like odor in vitro.

Pseudomonas aeruginosa is widespread in nature, inhabiting soil, water, plants and animals (including humans). Identification of P. aeruginosa often includes identifying the production of both pyocyanin and fluorescein. Its optimum temperature for growth is 37°C, and it is able to grow at temperatures as high as 42°C. Pseudomonas aeruginosa has very simple nutritional requirements. It is often observed "growing in distilled water" which is evidence of its minimal nutritional needs. It is tolerant to a wide variety of physical conditions. P. aeruginosa is capable of growth in diesel and jet fuel, where it is known as a hydrocarbon utilizing microorganism (or "HUM bug"), causing microbial corrosion. It is resistant to high concentrations of salts and dyes, weak antiseptics, and many commonly used antibiotics. These natural properties of the bacterium undoubtedly contribute to its ecological success.

Figure 1: Pseudomonas aeruginosa on Trypic Soy Agar (TSA).
Copyright © 2007 Environmental Microbiology Laboratory, Inc.

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen, causing urinary tract infections, respiratory system infections, dermatitis, soft tissue infections, bacteremia, bone and joint infections, gastrointestinal infections and a variety of systemic infections, particularly in patients with severe burns and in cancer and AIDS patients who are immunosuppressed. Pseudomonas aeruginosa is primarily a nosocomial pathogen; its infection is a serious problem in patients hospitalized with cancer, cystic fibrosis and burns. The case fatality rate in these patients is 50 percent. According to the Centers for Disease Control (CDC), the overall incidence of P. aeruginosa infections in the US hospitals averages 0.4 percent (4 per 1000 discharges), and the bacterium is the fourth most commonly isolated nosocomial pathogen accounting for 10.1 percent of all hospital-acquired infections. The most commonly encountered infection outside hospitals is otitis externa ("Swimmer's ear"), of which P. aeruginosa causes 35-70%. They also cause eye infections ranging from perulent conjunctivitis to iridocyclitis, keratitis and iritis, corneal ulcer and panophthamitis. It is also a cause of "hot-tub rash" (dermatitis), caused by lack of proper, periodic attention to water quality.

Figure 2: Pseudomonas aeruginosa in Pseudomonas Isolation Agar.
Copyright © 2007 Environmental Microbiology Laboratory, Inc.

P. aeruginosa isolates may produce three colony types. Natural isolates from soil or water typically produce a small, rough colony. Clinical samples, in general, yield one or another of two smooth colony types. One type has a fried-egg appearance, which is large, smooth, with flat edges and an elevated appearance. Another type, frequently obtained from respiratory and urinary tract secretions, has a mucoid appearance, which is attributed to the production of alginate slime. The smooth and mucoid colonies are presumed to play a role in colonization and virulence.

Like most environmental bacteria, P. aerugionosa lives predominantly in slime-enclosed biofilms adherent to available surface from which it periodically releases (free-swimming) cells. Most Pseudomonas infections are both invasive and toxinogenic. The ultimate Pseudomonas infection may be seen as composed of three distinct stages: (1) bacterial attachment and colonization; (2) local invasion; (3)

disseminated systemic disease. The slime-protected cells of P. aeruginosa produce remarkably few clinical symptoms while they are in the process of progressively colonizing inert surfaces and tissue surfaces within the host. The lipopolysaccharide layer helps the cell adhere to host tissues and prevents leukocytes from ingesting and lysing the organism. Lipases and exotoxins then procede to destroy host cell tissue which then leads to the complications associated with infection.

Only a few antibiotics are effective against Pseudomonas, including fluoroquinolones, gentamicin and imipenem, and even these antibiotics are not effective against all strains. The best way to reduce the spread of P. aeruginosa is to use good aseptic technique especially on hospital instruments and when in contact with patients. The combination of gentamicin and carbenicillin is frequently used to treat severe Pseudomonas infections.

References:

1. Murray, P.R., E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover & R.H.Yolken (eds) 1995. Manual of Clinical Microbiology, 6th edition, pp. 510-515, ASM, Washington, D.C.

2. Baltch, A.L and R. P. Smith (eds) (1994) Pseudomonas Aeruginosa: Infections and Treatment. Marcel Dekker, Inc., New York, NY.

3. Wikipedia

4. Pseudomonas Genome Database

5. Todar's Online Textbook of Bacteriology

6. Pseudomonas Aeruginosa Infections

7. Topics in Infectious Diseases Newsletter: August 2001

ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY LABORATORY, INC.
TOLL-FREE: 866.888.6653 | www.EMLab.com | info@EMLab.com

The data and other information contained in this newsletter are provided for informational purposes only and should not be relied upon for any other purpose. Environmental Microbiology Laboratory, Inc. hereby disclaims any liability for any and all direct, indirect, punitive, incidental, special or consequential damages arising out of the use or interpretation of the data or other information contained in, or any actions taken or omitted in reliance upon, this newsletter. Images included in this newsletter are property of Environmental Microbiology Laboratory, Inc., unless otherwise specified.

Appendix B: Medium Formulations & Preparation

Asparagine/Acetamide Broth: Media for *P. aeruginosa* by MPN

Formulation of Asparagine Broth

Asparagine, DL	3.0g
Dipotassium hydrogen phosphate	1.0g
Magnesium sulfate, heptahydrate	0.5g
Distilled water	1L

Preparation

Dissolve the ingredients in distilled water and adjust pH to 6.9 to 7.2. Sterilize.

Formulation of Acetamide Broth

Acetamide	10.0g
Sodium chloride	5.0g
Dipotassium hydrogen phosphate	1.39g
Potassium dihydrogen phosphate	0.73g
Magnesium sulfate, heptahydrate	0.5g
Phenol red	0.012g
Distilled water	1L

Preparation

Dissolve the ingredients in distilled water and adjust pH to 6.9 to 7.2. Sterilize.

m-E/Esculin Iron Agar: Media for Enterococci

Formulation of m-E

Peptone	10.0g
Sodium chloride	15.0g
Esculin	1.0g
Yeast extract	30.0g
Actidione	0.050g
Sodium azide	0.150g
Agar	15.0g
Distilled water	1L
Additional Ingredients	
Nalidixic acid	0.21g
Triphenyl tetrazolium chloride	0.15g

Preparation

Dissolve original ingredients in distilled water and autoclave for 15 minutes at 121°C. Add additional ingredients and adjust pH to 7.1 ±0.1. Pour 3.5 mL into 50 mm plates.

Formulation of Esculin Iron Agar

Esculin	1.0g
Ferric citrate	0.5g
Agar	15.0g
Distilled water	1L

Preparation

Adjust pH to 7.1 ± 0.1. Autoclave at 121°C for 15 minutes. Pour in 3.5 mL amounts into 50 mm plates.

m-PA: Medium for *Pseudomonas aeruginosa* by MF

Formulation

	Levin's	Standard Methods
L-lysine hydrochloride	5.0g	5.0g
Sodium chloride	5.0g	5.0g
Yeast extract	2.0g	2.0g
Xylose	2.5g	1.25g
Sodium thiosulfate	6.8g	5.0g
Sucrose	12.5g	12.5g
Lactose	12.5g	12.5g
Phenol red	0.08g	0.08g
Ferric ammonium citrate	0.8g	0.8g
Magnesium sulfate, heptahydrate	0	1.5g
Agar	15.0g	15.0g
Distilled water	1L	1L
Antibiotic		
Sulfapyridine (Nutritional Biochemicals)		0.176g
Kanamycin(Bristol-Myers)		0.0085g
Nalidixic acid(Cal Biochemicals)		0.037g
Actidione(Upjohn)		0.15g

Preparation

Dissolve all ingredients except antibiotics in distilled water. Autoclave at 121°C for 15 minutes. Cool to 55 to 60°C. Adjust pH to 7.1 ± 0.1 for *Standard Methods* formulation. Adjust pH to 6.5 for Levin's formulation. Add the antibiotics and mix. Pour 3 mL into 12 by 50 mm plates.

m-T7: Medium for total and fecal coliforms

Formulation

Protease Peptone no. 3 (Difco)	5.0g
Yeast extract	3.0g
Lactose	20.0g
Tergitol 7 (25% solution)	0.4 mL
Polyoxyethylene ether W-1	5.0g
Bromthymol blue	0.1g
Bromcresol purple	0.1g
Agar	15.0g
Distilled water	1L

Preparation

Dissolve all ingredients in distilled water. Autoclave at 121°C for 15 minutes. Adjust the pH to 7.4±0.2. Selectivity can be enhanced with the aseptic addition of 0.1mg per liter of penicillin g after autoclaving.

m-TEC: Medium for enumerating *E. coli*

Formulation

Protease peptone No. 3 (Difco)	5.0g
Yeast extract	3.0g
Lactose	10.0g
Sodium chloride	7.5g
Dipotassium hydrogen phosphate	3.3g
Potassium dihydrogen phosphate	1.0g
Sodium lauryl sulfate	0.2g
Sodium desoxycholate	0.1g
Bromcresol purple	0.08g
Agar	15.0g
Distilled water	1L

Preparation

Dissolve ingredients by stirring. Sterilize by autoclaving at 121°C for 15 minutes. Pour 4 mL into 10 by 50 mm plates. The pH of the medium is 7.3 ± 0.1.

m-TMM: Medium for total coliforms and *E. coli*

Formulation

Tryptone	5.0g
Yeast extract	2.5g
Lactose	10.0g
Bromcresol purple	0.080g
Dipotassium phosphate	3.3g
Potassium phosphate	1.0g
MUG (4-methylumbelliferyl -ß-D-glucuronide)	0.100g
Monesin (in 10 mL of 95% ethanol)	0.038g
Tergitol 7	0.25 mL
Agar	15.0g
Distilled water	1L

Preparation

Dissolve the ingredients in distilled water. Autoclave for 15 minutes at 121°C. The final pH is 7.2. Pour 3 mL into sterilized 47 mm plates.

Annex 9

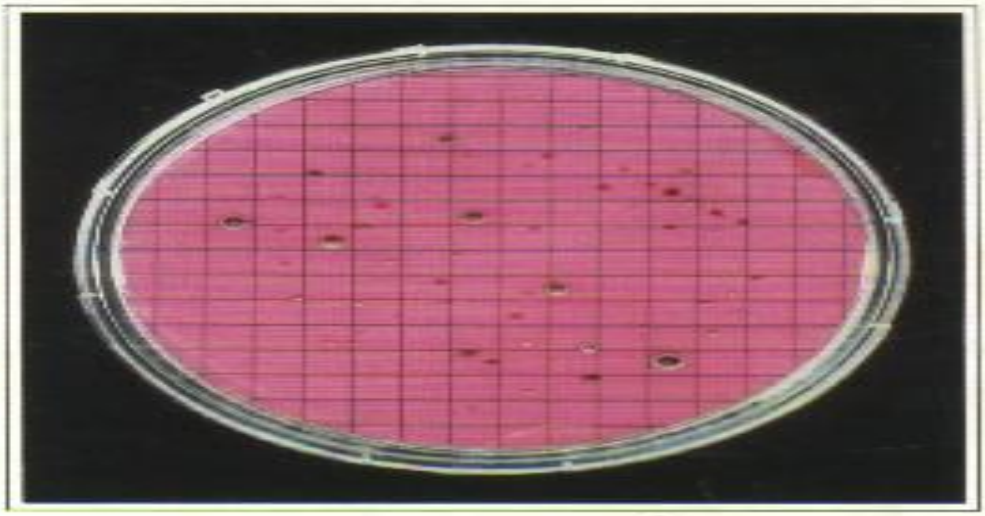
الملحق التاسـع

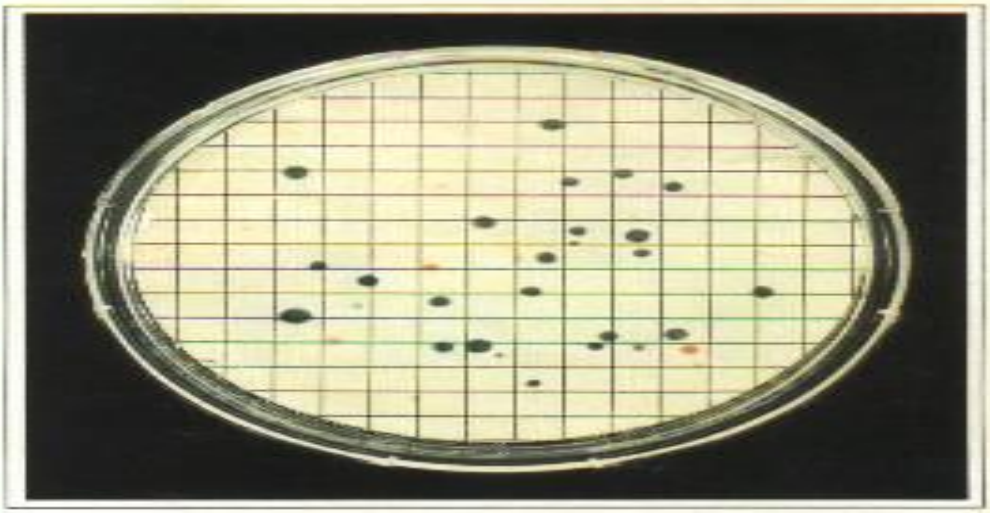
TABLE 5:

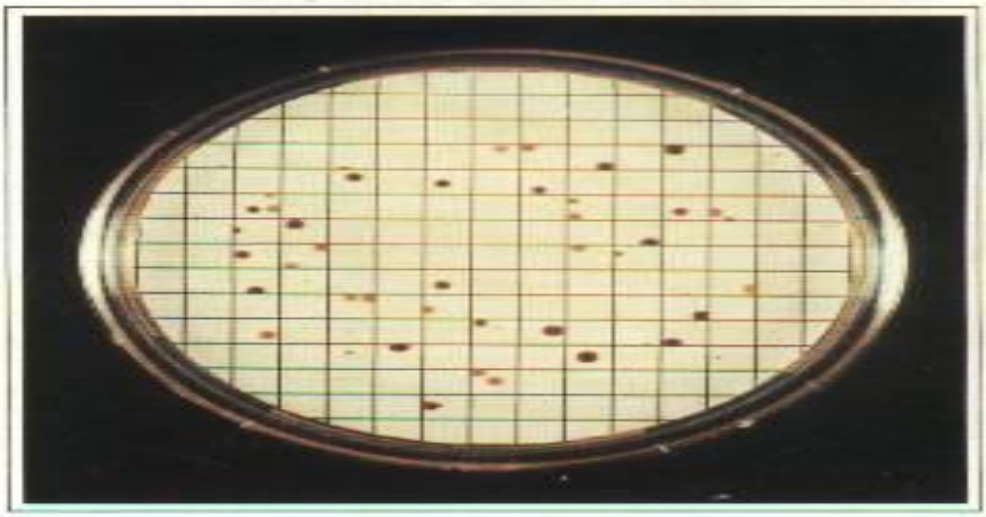
Suggested Sample Volumes for Membrane Filter Fecal Coliform Test*

	Volume to be Filtered mL						
Water Source	100	50	10	1	0.1	0.01	0.001
Lakes, reservoirs	X	X					
Wells, springs	X	X					
Water supply intake		X	X	X			
Natural bathing waters		X	X	X			
Sewage treatment plant, secondary effluent			X	X	X		
Farm ponds, rivers				X	X	X	
Storm water runoff				X	X	X	
Raw municipal sewage					X	X	X
Feedlot runoff					X	X	X

*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 16th ed., page 898







Membrane Filtration Method: Fecal Coliforms

BIOL/CSES 4644

Virginia Polytechnic Institute and State University

Introduction

The membrane filter (MF) technique is highly reproductible, can be used to test relatively large volumes of sample, and yields numerical results more rapidly than the multiple-tube procedure. The membrane filter technique is extremely useful in monitoring drinking water and a variety of natural waters. However, the MF technique has limitations, particularly when testing waters with high turbidity or noncoliform (background) bacteria. For such waters or when the membrane filter technique has not been used previously, it is desirable to conduct parallel tests with the multiple-tube fermentation technique to demonstrate applicability and comparability.

As related to the membrane filter technique, the coliform group may be defined as comprising all aerobic and many facultative anaerobic, gram-negative, nonspore-forming, rod-shaped bacteria that develop a red colony with a metallic sheen within 24h at 35^{o}C on an Endo-type medium containing lactose. Some members of the total coliform group may produce a dark red or nucleated colony without a metallic sheen. When verified these are classified as atypical coliform colonies. When purified cultures of coliform bacteria are tested they produce a negative cytochrome oxidase (CO) and positive Beta-galactosidase (ONPG) reaction. Generally, all red, pink, blue, white, or colorless colonies lacking sheen are considered non-coliforms by this technique.

Fecal Coliform Membrane Filter Procedure

Fecal coliform bacterial densities may be determined either by the multiple-tube procedure or by a membrane filter (MF) technique. If the MF procedure is used for chlorinated effluents, demonstrate that it gives comparable information to that obtained by the multiple-tube test before accepting it as an alternative. The MF procedure uses an enriched lactose medium and incubation temperature of 44.5 +/- 0.2^{o}C for selectivity and gives 93% accuracy in differentiating between coliforms found in the feces of warm-blooded animals and those from other environmental sources. Because incubation temperature is critical, submerge waterproofed (plastic bag enclosures) MF cultures in a water bath for incubation at the elevated temperature or use an appropriate, accurate solid heat sink incubator. Alternatively, use an equivalent incubator that will hold the 44.5^{o}C temperature within 0.2^{o}C (throughout the chamber), over a 24-h period, while located in an environment of ambient air temperatures ranging from 5^{o}C to 35^{o}C.

1. Materials and Culture Medium

a. M-FC medium: The need for uniformity dictates the use of dehydrated media. Never prepare media from basic ingredients when suitable dehydrated media are available. Follow manufacturer's directions for rehydration. Commercially prepared media in liquid form (sterile ampule or other) also may be used if known to give equivalent results.

b. Culture Dishes: Use tight-fitting plastic dishes because the MF cultures are submerged in a water bath during incubation. Enclose groups of fecal coliform cultures is plastic bags or seal individual dishes with waterproof (freezer) tape to prevent leakage during submersion.

c. Incubator: The specificity of the fecal coliform test is related directly to the incubation temperature. Static air incubation may be a problem in some types of incubators because of potential heat layering within the chamber and the slow recovery of temperature each time the incubator is opened during daily operations. To meet the need for greater temperature control use a water bath, a heat-sink incubator, or a properly designed and constructed incubator giving equivalent results. A temperature tolerance of 44.5 +/- 0.2^{o}C can be obtained with most types of water baths that also are equipped with a gable top for the reduction of heat and water losses. A

circulating water bath is excellent but may not be essential to this test if the maximum permissible variation of 0.2^{o}C in temperature can be maintained with other equipment.

2. Procedure

a. Selection of sample size: Use sample volumes that will yield counts between 20 and 60 fecal coliform colonies per membrane. When the bacterial density of the sample is unknown, filter several decimal volumes to establish fecal coliform density. Estimate volume expected to yield a countable membrane and select two additional quantities representing one-tenth and ten times this volume, respectively.

b. Filtration of sample: Follow the same procedure and precautions as described above.

c. Preparation of culture dish: Place a sterile absorbent pad in each culture dish and pipet approximately 2 mL M-FC medium, prepared as directed above, to saturate pad. Carefully remove any excess liquid from the culture dish. Place prepared filter on medium-impregnated pad.

As a substrate substitution for the nutrient-saturated absorbent pad, add 1.5% agar to M-FC broth.

d. Incubation: Place prepared cultures in waterproof plastic bags or seal petri dishes, submerge in water bath, and incubate for 24 +/- 2h at 44.5 +/- 0.2^{o}C. Anchor dishes below the water surface to maintain critical temperature requirements. Place all prepared cultures in the water bath within 30 min after filtration. Alternatively, use an appropriate, accurate solid heat sink or equivalent incubator.

e. Counting: Colonies produced by fecal coliform bacteria on M-FC medium are various shades of blue. Pale yellow colonies may be atypical E.coli; verify for gas production in mannitol at 44.5^{o}C. Nonfecal coliform colonies are gray to cream-colored. Normally, few nonfecal coliform colonies will be observed on M-FC medium because of selective action of the elevated temperature and addition of rosolic acid salt reagent. Elevating the temperature to 45.0 +/- 0.2^{o}C may be useful in eliminating environmental Klebsiella from the fecal coliform population. Count

colonies with a low power (10-15 magnifications) binocular wide-field dissecting microscope or other optical device.

3. Calculation of Fecal Coliform Density

Compute the density from the sample quantities that produced MF counts within the desired range of 20 to 60 fecal coliform colonies. This colony density range is more restrictive than the 20 to 80 total coliform range because of larger colony size on M-FC medium. Record densities as fecal coliforms per 100 mL.

Compute the count by the following equation:

(total) Coliform colonies/100mL = (coliform colonies counted x 100) / (mL sample filtered)

For verified coliform counts, adjust the initial count based upon the positive verificationpercentage and report as "verified coliform count per 100 mL."

Percentage verified coliforms =
(number of verified colonies) / (total number of coliform colonies subjected to verification) x 100.

The plate in the upper left shows typical dark blue fecal coliform colonies on a membrane filter after incubation on M-FC agar. The plate in the lower center (purple) is M-FC agar before use, and the plate in the upper right (blue) is a control plate streaked with an E.coli culture.

4. Bibliography

Geldreich, E.E., H.F.Clark, C.B.Huff and L.C.Best. 1965. Fecal-coliform-organism medium for the membrane filter technique.J.Amer. Water Works Assoc. 57:208.

Green, B.L., W. Litsky and K.J.Sladek. 1980. Evalutation of membrane filter methods for enumeration of faecal coliforms from marine waters. Mar. Environ. Res. 67:267

Greenberg, A.E., L.S. Clesceri, and A.D.Eaton(eds). 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Amer.Public Health Assoc. Washington, D.C.

Sartory, D.P. 1980. Membrane filtration faecal coliform determinations with unmodified and modified M-FC medium. Water SA 6:113.

Rychert, R.C. and G.R.Stephenson. 1981. Atypical Escherichia coli in streams. Appl. Environ. Microbiol. 41:1276.

Pagel, J.E., A.A.Qureshi, D.M.Young and L.T.Vlassoff. 1982. Comparison of four membrane filter methods for fecal coliform enumeration. Appl. Environ. Microbiol. 43:787.

Return to Water Testing Webpage.

Drinking Water System for the Children's Dormito

Mae Nam Khun, Thailand

Background

With the dormitory and septic system complete, the Seattle University EWB club returned to Mae Nam Khun in August 2007 to install a drinking water treatment system. Although the treatment system was not part of the original plan, it was a logical step for a

holistic project solution. This was particularly evident when the 2006 EWB-team witnessed large amounts of sediment in the water supply after a recent storm.

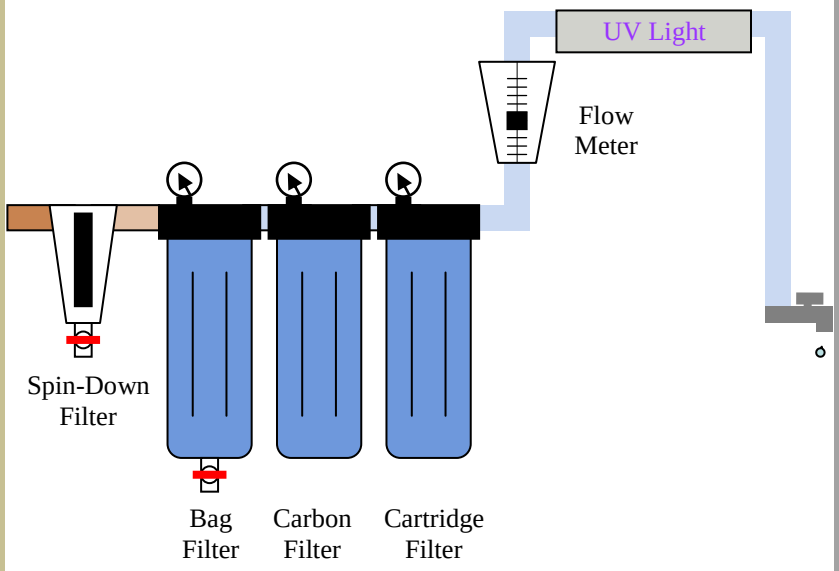
Previous investigations in MNK by the California Polytechnic State University at San Luis Obispo found that a 50,000 gallon water tank situated approximately 300 feet in elevation above the dormitory area was the source for the water distribution system. The existence of pressurized water and electrical power at the site provided good conditions for a modernized yet sustainable drinking water treatment system.

The System

In March 2007, SU-EWB partnered with the Society of Environmental Engineers and Scientists (SEES is an SU student chapter of the Water Environment Federation) to construct a prototype water treatment system which was demonstrated at the SU Student Center on Earth Day 2007.

The system begins with a spin-down sediment filter which removes particles that are 100-microns in diameter or larger. This filter is self-cleaning as trapped particles can be washed away with a turn of a valve. Next, a washable, nylon filter bag removes particles larger than 50-microns in diameter. This is followed by an activated carbon cartridge (similar to a Brita® filter) and finally a washable, 5-micron,

pleated-cellulose cartridge filter which is a required treatment step prior to disinfection with ultraviolet light. In the event that distribution system pressure is lost, water can be supplied to the system by a backup submersible pump that can be immersed in a nearby stream.

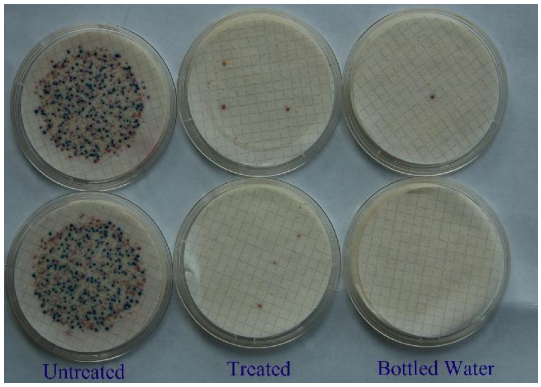


Implementation

In August 2007, an SU-EWB team consisting of faculty (Phil Thompson, Wes Lauer, Pierre Gehlen) and students (Ryan Daudistel ’08, Chris Stoll ’08) installed the system in MNK with the help of Bangkok resident and SU alumnus Akharint

"Nok" Khuhapinant ('03) and two Chiang Mai University environmental engineering students Vorakorn "Nook" Somkarnsmai and Wanawan "Nan" Pragot. Although the team took all of the necessary supplies with them, they purchased a UV system from L'Analytic Water Work LTD, a local supplier in Chiang Mai (3 hours from MNK). This was done when it was discovered that spare bulbs that had been shipped by courier from the U.S. had been destroyed in transit. The 'shipping experiment' revealed that the annual replacement of the UV bulb would have to be done with local materials, so a local system was installed.

Upon installation, the system was tested for E. Coli and general coliform bacteria using membrane filter test kits. The group also tested the water from a slow sand filter that had been installed 5-months earlier and was being used for drinking water. After 48 hours of incubation, the testing revealed that there were approximately 100 E. Coli per 100-ml sample from the sand filter but the new system had improved the drinking water to near bottled water quality!



The system has a maximum flow rate of 21,600 liters per day. The capital costs for this configuration was about $1000. We estimate the annual operation cost for bulb and cartridge replacement to be $500 or less which would result in a maximum 30-year present value of $9,600 or 0.007 cents (0.0025 baht) per liter of water produced.

Plans for the Future

We hope to get more accurate annual O/M costs by collecting life cycle data through a water system monitoring project with CMU's Environmental Engineering Department. With the guidance of Dr. Patiroop Polchan, CMU students Nan and Nook will continue quarterly biological testing of the system, and they will train additional students who will succeed them upon graduation in June 2008. In addition to monitoring water quality, these students will assist in gathering life cycle information for system components as well as water-borne illness data from the local medical clinic.

In addition, Ms. Lawan Khumyahd from L'Analytic Water Work LTD was a tremendous resource for supplying water system components, and she expressed a desire to help provide materials for replacement or for new EWB water projects in Thailand.

Over the 2007-2008 school year, the EWB and SEES clubs will be making modifications to the system, including the addition solar power and hand pumping. This would enable the system to be a stand-alone unit capable of treating surface water in areas without pressurized water systems or power.

Project Sponsors

This project was sponsored in part by the Associated Students of Seattle University, The Endowed Mission Fund, The College of Science and Engineering and by our generous annual donors.

COLIFORM IN DRINKING WATER

©David B. Fankhauser, Ph.D.,
Professor of Biology and Chemistry
University of Cincinnati Clermont College
Batavia OH 45103

Membrane Filtration

File "Drinking_water.htm" was last modified on 01 Jun 2008.
This page has been accessed times since 13 August 2001.

tap water (left) has no coliform "filtered water" is on the right...

7/20/89, rvsd 6 August 1993, 23 July '95, 22 July '97, 19 July 98, 30 June 99, 17 July 00, 9 Aug 00

Modified from: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 14th Ed, (1975). pages 928-935.

Students can test the drinking water from their homes, school, etc using this protocol. The health standard for drinking water allows no more than 5 coliform per hundred mL. For this reason, bacteria from 250 mL will be collected on a membrane filter, and grown on top of m Endo medium. Coliform bacteria appear as red colonies on this medium. More than 13 colonies with this assay does not meet health standards.
One student in 2001 tested her tap water before and after filtration through a water "purification" device. The image shows two plates , the one on the left is tap water, the plate on the right is water filtered through the filter. Clearly the filter is contributing bacterial load to the water. These devices must be regularly changed and maintained in order to prevent such contamination.

EQUIPMENT AND SUPPLIES:	millipore filtering apparatus:
Sterile 250 mL capped bottles (1/student) sterile 47 mm petri dishes (1 per student) sterile 47 mm memb. filters, 0.45 µm pores sterile 47 mm millipore pads vacuum pump 3 vacuum hoses joined with "T" joint 2 strong hose clamps 1000 mL side arm filter flask m-Endo Broth MF powder sterilized repipet in 250 mL bottle	sintered glass platform in #8 stopper glass cylinder, 300 mL capacity 800 mL beaker with 400 mL EtOH 150 mL beaker with 100 mL EtOH triangle-tipped Tongs forceps with bent tipped blade Bunsen burner protective eye wear

MAKE THESE TWO ILLUSTRATIONS WITH LISTED FEATURES LABELED:
(pay close attention to the location of the valves)

	Vacuum Filtering Apparatus:	Plate Ready for Incubation:
apparatus: note the labeled valves: 	vacuum pump on/off power switch main vacuum line main vacuum line clamp T joint relief valve clamp filter flask #8 stopper screen platform membrane filter glass cylinder, 300 mL cylinder clamp	(exploded view) 50 mm petri dish top 47 mm membrane filter 47 mm pad with 2 mL m-Endo MF 50 mm petri dish bottom

I. COLLECTION OF WATER (Collect the same day as performance of assay):

	Determine the precise name of your water district, record it in your notebook. Run tap water until it is cold (to clear out pipes, at least a minute or so). Fill sterile 250 mL capped bottle with water, rinse several times, finally fill to neck, cap securely, maintaining sterility .

II. PREPARATION OF 50 mL OF MEDIUM (for 20 assays):

	a: For up to 20 determinations, weight out **2.4 g m-Endo Broth MF** powder into 150 mL beaker. b: Add **49 mL dH_20** and **1 mL EtOH**. c: Bring to boil, remove from heat immediately. Using sterile technique, pour into sterilized repipet vessel. Securely screw down repipet to container. Clamp to ring stand for stability.

III. PREPARATION OF PAD:

sterile pad in petri dish: 	add 2.0 mL m-Endo Broth	Label 47 mm top of sterile petri dish with initials, seat number, date & source. Flame off EtOH from bent blade-tipped forceps, pick up sterile pad, place in bottom of sterile petri dish , replace cover. Repipet **2.0 mL m-Endo Broth** sterilely onto pad , replace lid, keep bottom down.

IV. SET UP PLATE: Note: Wear safety goggles, tie back hair, keep flammable materials away from flame.

inadequate head space: 	close relief valve: 	**PRELIMINARY:** Check for adequate head space in the filter flask to contain the water you are about to filter. If inadequate, empty out the flask into the sink, and replace the support platform. If necessary, re-sterilize surface of support platform with EtOH, turn on vacuum briefly to dry, then tightly clamp the main vacuum line. Also, apply vacuum to the platform to remove any water or alcohol remaining from the previous filtrations by closing the relief valve, opening the main valve, then closing the main valve.

open relief valve: 	tongs in alcohol: 	Once the platform is dry: **SET UP MEMBRANE FILTER**: Flame off EtOH from blade forceps
flame off alcohol 	pick up sterile membrane 	pick up sterile membrane filter , (discard the blue spacer discs)
apply to platform 	center the membrane: 	center it on screen platform . Open main vacuum line to hold membrane in place (turn on pump if not on yet).

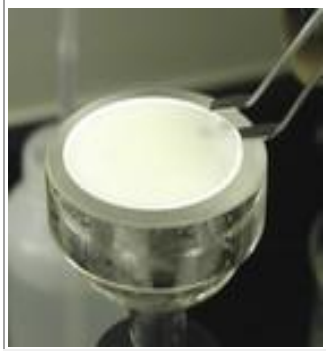
V. THE DANGEROUS STEP: STERILIZING AND FLAMING THE CYLINDER

grasp with fingers, then tongs: 	touch off excess alcohol 	**STERILIZE THE CYLINDER (Dangerous step)**: Ensure that all surfaces of the glass cylinder are immersed in 95% EtOH , pick up with fingers (touch outside of the cylinder only), invert. Grasp cylinder upside down with triangle-tipped tongs (Ekco, for instance) and allow excess EtOH to drip into 800 mL beaker, touching off the last drops on a paper towel.
Pass through flame to ingnite, hold away from people and beakers of alcohol! 	Maybe ignited too soon? 	CAREFULLY flame off the EtOH away from EtOH beakers and other students). It will flame up fairly high, but should burn off in a few seconds. Pass quickly through the flame once more to ensure that all of the EtOH has been removed.
	flaming stopped, grasp with fingers	Grasp the outside of the sterilized cylinder with your fingers. (It should not be too hot if you touched off the EtOH before flaming.)

		SET UP FILTER APPARATUS: Place sterile cylinder centered over the membrane filter and support platform. Clamp in place with spring clamp , vacuum still on.

VI. FILTERING THE WATER AND APPLYING MEMBRANE TO PREPARED PAD:

Pour water into apparatus		**FILTER WATER THROUGH**: Pour your 250 mL water sample into the cylinder , monitoring that it is not leaking at the clamped joint .
the vacuum draws it through	empty all 250 mL into cylinder	The vacuum will draw the water through, and all bacteria which may be in the 250 mL sample will be trapped on the surface of the membrane filter.
unclamp cylinder	remove cylinder	When all of the water has been drawn through, unclamp and remove the cylinder , place it carefully back in the EtOH, top down. (Do not let it drop into the beaker.)

slip tweezers under membrane 	gently lift membrane 	**RELEASE VACUUM ON MEMBRANE FILTER** : Clamp the main vacuum line shut and open the relief valve to release the vacuum in the flask. With sterile, EtOH-free blade forceps, gently lift the edge of the membrane filter and remove from the screen platform . (Caution: the membrane filter is brittle.)
transfer to prepared dish 	slide over edge to drop onto pad 	**TRANSFER MEMBRANE FILTER TO PREPARED PAD** , avoiding bubbles by lowering from one side first. Rest it on far edge of petri dish, slowly pull it across the edge down toward you until . . .
do not let it rest on edge 	centered membrane on pad 	. . . it drops down onto the pad. If done properly, it will be centered on the pad . Ensure that the membrane is completely flat on the pad.

VII. INCUBATION AND CALCULATION OF RESULTS

	INCUBATE the plate without inverting (pad-side down) at 35C for 24 hours. **COUNT THE COLONIES**: Record the total number of colonies, and the number of coliform (red colonies) . Divide by 2.5 to yield the number of bacteria per 100 mL. According to national health standards for drinking water, the number of coliform/100 mL should not exceed 5. Most chlorinated tap water will have no bacteria in 250 mL, as seen on the left membrane in the first of the nest set of pictures. Enter your data in this sequence and format into your notebook, and then into the spreadsheet for the class table in the computer Desk No. Initials Source in detail (water district) Coliform/100 mL
tap water vs. "filtered" water Williamsburg OH water	**TOP:** tap water and "filtered" water from the same home. Note that filters must be changed regularly, or else they become "nesting" places for bacteria. **MIDDLE:** The two water samples shown are both heavily contaminated. **BOTTOM:** For years, Williamsburg had problems with their water, as can be seen in the 8/14/00 sample. We even had a village official tell a student it was against the law for her bring in a sample of her own water to test...

1529 Redoak Dr. Loveland, OH 45140
Clermont County 250mL

Wilkes University
Center for Environmental Quality
Environmental Engineering and
Earth Sciences
Fecal Coliform and Bacterial Testing

Total and Fecal Coliform Bacteria Testing

Fecal COLIFORM BACTERIA

The total and fecal coliform bacteria test is a primary indicator of "potability" , suitability for consumption, of drinking water. It measures the concentration of total coliform bacteria associated with the possible presence of disease causing organisms.

Sources of Fecal Coliform
Potential Health Hazards
Fecal Colifrom Testing
Treatment

SOURCE of Fecal Coliform:

Coliform bacteria are a natural part of the microbiology of the intestinal tract of warm blooded mammals, including man. Coliform bacteria can also be found in soil, other animals, insects, etc. The total coliform group is relatively easy to culture in the lab, and therefore, has been selected as the primary indicator bacteria for the presence of disease causing organisms.

Potential Health Hazards:

Coliform bacteria are not pathogenic (disease causing) organisms, and are only mildly infectious. For this reason these bacteria are relatively safe to work with in the laboratory. If large numbers of coliforms are found in water, there is a high probability that other pathogenic bacteria or organisms, such as Giardia and Cryptosporidium, may be present. The PADEP requires public drinking water supplies to demonstrate the absence of total coliform per 100 mls (about 4 oz) of drinking water. At this time, there are no regulations governing individual water wells. It is up to the private well owner to have his or her water tested.

TESTING:

Approved tests for total coliform bacteria include the membrane filter, multiple tube fermentation, MPN and MMO-MUG ("Colilert") methods. The membrane filter method uses a fine porosity filter which can retain bacteria. The filter is placed in a petri (culture) dish on a pad with growth enrichment media (mEndo) and is incubated for 24 hrs at 35 degrees C. Individual bacteria cells which collect on the filter grow into dome-shaped colonies. The coliform bacteria have a gold-green sheen, and are counted directly from the dish. Since some other bacteria may develop a similar color, a confirmation test using more specific media is required. The confirmation procedure requires an additional 24 to 48 hrs to complete the test for suspected positive total coliform tests.

The MPN (most probable number) method uses a test tube full of media with a smaller inverted test tube inside which captures carbon dioxide gas released from the growth of coliform bacteria. A series of dilutions and replicates are set up, and those producing gas in 24 hrs at 35 degrees C

are counted. A statistical analysis is used to determine the most probable number of bacteria cells present.

Our laboratory uses a number of techniques including the membrane filter method. The sample should be collected in a specially prepared, sterile whirl pack bag for the test to be valid. The bags contain a small amount of sodium thiosulfate to remove any chlorine present, and have been sterilized. Sample collection should be done very carefully and directly into the bottle from the tap to avoid contamination of the bottle from hands or a transfer vessel such as a cup. The sample should be kept cool and delivered to the lab within 6 to 24 hrs for analysis. Total coliform bacteria testing is a relatively inexpensive when compared to the cost for the determination of the concentration or presence of viruses, Giardia, or Cryptosporidium.

TREATMENT:

Bacteria are removed by disinfection and/or filtration. Filtration alone may not be completely effective, but can improve the performance of disinfectants by removing sediment that can shelter the bacteria. Methods of adding chlorine to water include solution feeders for dry chlorine or liquid chlorine or by feeding gas chlorine directly from 100, 150, or 2000 lb. cylinders. Gas chlorination is recommended only for larger systems that can support the services of a trained water treatment plant operator. Chlorine is normally dosed to a concentration sufficient to maintain a free residual of at least 0.2 parts per million (PPM).

Other disinfectants include iodine, ozone, ultraviolet light, and physical methods such as boiling or steam sterilization. Chlorination is still the most common disinfection method in the United States, although recent concerns have been raised about the reaction of chlorine with organic matter in water. Such a reaction can result in the formation of trihalomethanes, which are suspect carcinogenic compounds. For most individual water supply systems, the most common form of treatment is ultraviolet disinfection. For information on water testing, please visit our Homeowner Outreach Webpage.

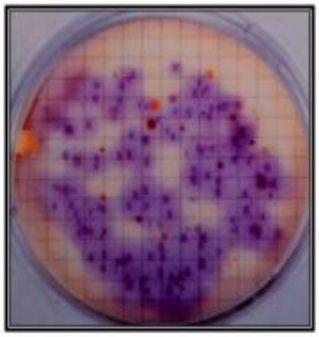
New Ozone Web Page

For More information about the Environmental Quality Center, please contact:

Attn: Mr. Brian Oram, Professional Geologist (PG)
Laboratory Director

Analytical Methods

E. coli colonies remain yellow after the urease test.



Yellow colonies that are not E. coli turn pink to purple after the urease test.

mTEC agar method for Escherichia coli: U.S. Environmental Protection Agency Method 1103.1.
Updated October 2007

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

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

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

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

MEDIA:
The mTEC medium is available commercially in the dehydrated form from Hardy Diagnostics (800/266-

2222, Cat C7741 (500 g)). To prepare urea-phenol substrate, ingredients can be purchased from Fisher Scientific (800/766-7000): phenol red (Cat AC41724-0050 (5 g)) and urea (Cat U15-500 (500 g)). (See preparation instructions (Appendix F)).

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

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

Krackeler Scientific, Inc.
LOGIN BASKET My Account
CHECKOUT My Favorites
HOME BROWSE CATALOG CONTACT US
MSDS / C of A ABOUT US SUPPLIERS
Catalog

Welcome!
You are not logged in.

Search :

All words
Go!
Advanced Search

Login :
Username:

Password:

Login
New User?
Register!

Questions?
800-334-7725 (US)
518-462-4281

Printer Friendly Version

All Categories >> Microbiology Media >> Dehydrated Media

Pall Gelman Microbiological Media

Wide variety of sterile ampule media for common microbiological analyses in clear glass or plastic ampules. Premeasured for maximum efficiency and convenience. 2mL ampules are a practical time-saving aid for culturing microorganisms on membrane filters. Ready to use; no dilutions necessary.

For water analyses, use MF-Endo Broth or M-FC Broth. Total coliform colonies grown using MF-Endo Broth are deep reddish-purple with a metallic green sheen; fecal coliforms grown using M-FC Broth are royal blue. For beverage quality control applications, use M-TGE Broth for total bacteria, or M-Green YM Broth for yeasts and molds. Meet Membrane Filter (MF) Technique Standard Methods requirements with 2mL ampules (requirements referenced in Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1992 APHA, AWWA, WEF, 20th Edition).

2mL wide-mouth glass ampules

Cat.No.	Name	Use	PK
629-68100	M-FC Broth	Fecal coliforms	$36.49 - PK of 20
629-68101	M-FC Broth w/ Rosolic Acid	Fecal coliforms	$36.49 - PK of 20
629-68102	MF-Endo Broth	Total coliforms	$36.49 - PK of 20

2mL plastic ampules

Cat.No.	Name	Use	PK
629-4302	M-FC Broth w/ Rosolic Acid	Fecal coliforms	$64.09 - PK of 50
629-68105	MF-Endo Broth	Total coliforms	$64.08 - PK of 50
629-68106	M-TGE Broth	Total bacteria	$64.09 - PK of 50
629-68107	M-Green YM Broth	Yeast and mold	$64.09 - PK of 50

Total Display Time: 2.39 sec.

Water Quality Testing

How to Do It Simply, Inexpensively and Accurately

BETA VERSION

Summary: A set of downloadable files which will help you learn how to do water testing as simply and inexpensively as possible.

On this page:

- Who needs this information?
- What the packet covers
- System requirements
- Excerpts

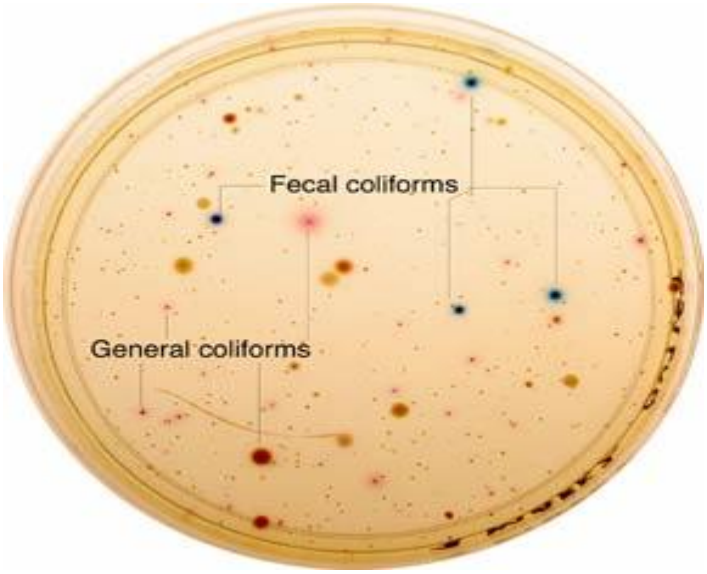
Village women in Mexico monitoring wells for nitrate contamination.

Testing village drinking water with Coliscan Membrane Filtration and Hach presence/ absence tests. The coliform levels from the drinking water well were consistently lower than the purchased bottled water, and frequently zero coloforms per 100 ml, which is a lower level than that frequently found in bottled drinking water in the US.

Testing a spring for electrical conductivity/ Total dissolved solids.

Tap water on right has no general coliforms. Same water after passing through a reverse/ osmosis drinking water filter (left) is positive for general coliforms. It's about to be tested with a UV light to see if it also has fecal colforms (it didn't).

River water in background has 20,000 coliforms per 100 ml, 500 times more than is typically considered safe for swimming. Amazingly, the water from the hand dug shallow well in the foreground had zero.



Photograph of a plate from a local swimming hole showing general and fecal coliform bacteria concentrations (sample size is 5 ml).

Who needs this information?

This information should be especially useful for lay people who have taken an interest in the quality of natural waters or a water system, including water quality activists, surfers, managers of small water systems (particularly those attempting to meet the onerous new clean water act requirements for surface water supplies), rural homeowners, development workers, aid workers and other water guardians who want to learn to test water or improve their existing testing program.

The suppliers of water quality testing supplies seem to assume that users are well-versed in all applicable lab techniques. They also seem to assume that users don't care how much the tests cost, or how much trash is generated.

This packet is designed to give your water quality testing effort a boost by sharing what we've learned about doing cheap, materials-efficient tests that help give an accurate picture of what is going on.

These tests are somewhat, but not too technically involved. If you think you could do high school chemistry lab experiments well if you did them over and over, you'll be fine. Detail orientation and persistence are the keys.

What the packet covers

- How to estimate water flow
- How to test for electrical conductivity (total dissolved solids, or TDS)
- How to test for turbidity (suspended solids, or SS)
- How to test for general and fecal coliform bacteria
- Sources for recommended equipment and materials
- Editable field data entry forms
- Editable computer data entry/ analysis forms
- Examples of hundreds of water samples, showing how they were coded, described, plated, and counted

The examples include samples showing the quality of natural waters, including:

- Oceans, beaches, lagoons, estuaries, surf breaks, and swimming holes
- Beaches
- Rain, tree canopy drip, natural surface runoff
- Groundwater
- Springs, seeps, creeks and rivers
- Natural pools and swimming holes
- Floodwaters

They also include samples from water and wastewater systems, including:

- Spring boxes, raw water pipes, treated water pipes
- Tank inlets, outlets
- The effect of ozone treatment
- Wells
- Ornamental fountains and pools
- Chlorinated water
- Roof runoff
- Harvested rainwater
- Road runoff
- Reverse osmosis tap water
- Raw sewage
- Clarified septic tank effluent
- Constructed wetland effluent
- Greywater

Author: Art Ludwig. Oasis Design, June 2004. 8.5x11, 34 pages, 7 tables. $14.95 for three file set (3.21 mb).

You can download files (or have them e mailed to you) immediately after processing your order.

All files have a 30 day unconditional money back guarantee. If you are not satisfied with the file for any reason, just let us know and your credit charge will be refunded in full (there is no shipping/handling on files).

System and software requirements

All the information is in PDF format and can be viewed/printed with Adobe Acrobat' free reader (download).

Microsoft Word is required to use the editable version of the instructions. Microsoft excel and some idea of how to use it are required to use the editable version of the data entry spreadsheets.

At present there isn't any interpretation of the examples.

This item is new and still somewhat ragged around the edges. We're considering it a "public beta," until we hear back that it is working well for people.

If we'd found it at the start of our water testing program, it would have saved us thousands of dollars of time. Please let us know if you've found it highly useful, incomprehensible, or whatever, using our Feedback page.

Excerpts

Equipment and materials

General and fecal coliform testing materials

Do you need an incubator?

In order to get:

- any results in cold conditions
- best results in hot conditions

- reliable results from the PA tests

you need an incubator. A lab incubator costs several hundred dollars. However, an inexpensive incubator for baby chickens works, if you've got the patience to set the temperature carefully and you keep it away from temperature swings and extremes.

hovabator 1602n incubator weight 4lbs 7.5 x18 x18 $33.95 912 236-0651 fax 234-9978.

A lightweight styrofoam incubator. It has it's own adjustable thermostat and provision for humidifying the interior, which can help keep petri dishes from drying out in arid conditions.

General and fecal coliform levels from 20 to 20,000 per 100 ml¼A cheap and easy test

Use Coliscan® Easygel®.

Coliform Easygel (28001) - Coliform growth medium- 10 tests/set $13.50

Coliscan media have a refrigerated shelf life of 6 months. Frozen, they last a year or more. At room temperature, a couple weeks.

You also need:
1 mL Dropper - # DRP01 Dropper, sterile/individually wrapped -Price: $0.12 ea
or
3 mL Dropper - # DRP03 Dropper, sterile/individually wrapped - Price: $0.14 ea

See Micrology Labs contact info at bottom of next listing.

General and fecal coliform levels from 1 to 100 per 100ml-A somewhat more difficult and time consuming test

Use Coliscan® Membrane filtration kit.

The apparatus is more involved, the materials are still cheap.

Coliscan MF Water Monitoring Kit - # CMFK2:

The kit comes complete. Kit includes: 1 Filtering apparatus, 1 Syringe with hose (vacuum device), 2 Coliscan MF bottles, 20 membrane filters, 20 dishes w/ absorbent pad, 20 3 mL Dropper, 5 filter support pads, Instruction and interpretation guide. $39.50

Coliscan media have a refrigerated shelf life of 6 months. Frozen, they last a year or more. At room temperature, a couple weeks.

1 888 easygel 327-9435 http://www.micrologylabs.com/

Micrology labs is a small operation; you can get people who really know what they are talking about on the phone.

General and fecal coliform levels, presence/ absence in up to 100ml

Presence/Absence Test, with MUG, disposable, twelve pack

Product #: 2401612, $ 40.30

In order to check for fecal coliforms, you also need a UV lamp: Hand-held, battery-operated, long-wave UV lamp. Uses four AA batteries not included.

Product #: 2584600, $ 18.85

800 227-4224 http://www.hach.com/

Electrical conductivity, TDS and Temperature

I like the DiST®5 handheld EC/TDS/Temp meter. It has these featues:

- Adjustable TDS ratio
- Temperature in °C and °F
- Completely waterproof, can be fully immersed in water

- Easy-to-read Custom Dual-level LCD
- Temperature Compensation (BETA B adjustable from 0.0 to 2.4)
- Replaceable Electrode
- Stability Indicator
- Battery Level Indicator
- Automatic calibration
- Auto shut-off

HI98311: DiST® supplied complete with protective cap, 4 x 1.5V batteries and instructions.... $78.00

http://www.automatedaquariums.com/h_98311.htm
Automated Aquarium Systems,™ Inc.
545 South Pacific Street
Tustin, CA 92780 USA
email: sales@automatedaquariums.com
phone/fax: (714) 669-1196

Turbidity

If you have to have EPA reportability, this is the cheapest solution I know of:

2100P Portable Turbidimeter
Features

- Lab Quality Results in a Portable Unit
- Range: 0 to 1000 NTU
- Selectable signal averaging mode compensates for fluctuations in readings caused by movement of large particles in the light path
- Pre-programmed calibration procedure, with microprocessor-controlled adjustment of calibration curve. No potentiometers to adjust
- Electronic zeroing: compensates for electronic and optical offsets. No manual adjustments are required

- Direct digital readout in NTU
- Meets or exceeds USEPA method 180.1 criteria
- Comes with six sample cells, 4 sealed vials of StablCal Primary Standards (<0.1, 20, 100, and 800 NTU), Secondary Gelex Standards, silicone oil and oiling cloth
- Two-year warranty

Product #: 4650000 $ 837.00
800 227-4224 http://www.hach.com/

Air travel with water quality testing materials

Important note:If you're travelling by air with your water test equipment, be sure to take MSDS sheets and a convincing story about how you are a water guardian, not a bioterrorist.

MSDS's are readily obtainable from the manufacturers.

See also:

Fecal coliform measurements
Water test results- Maruata
Slow sand filters
Sewers & water quality
Eco village house
Maruata at the Crossroads (book)
Wild Water Wisdom (article)
Understanding water class
Water central

Customer Satisfaction Survey

Annex 10

الملحق العاشر

WATER ANALYSIS

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

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

METHODS OF EVALUATING FOR BACTERIA

Membrane filter technique: Filtering 100 ml of water through a millipore filter with holes smaller than the bacteria causes the bacteria to be trapped on top of the filter. The filter pad is then placed on special coliform media which allows a colfirm count to be done.
Most probable number: The water sample is diluted and inoculated into a variety of specialized media tubes. The MPN is determined with the help of a standard chart, based on the number of tests that have turned positive.

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

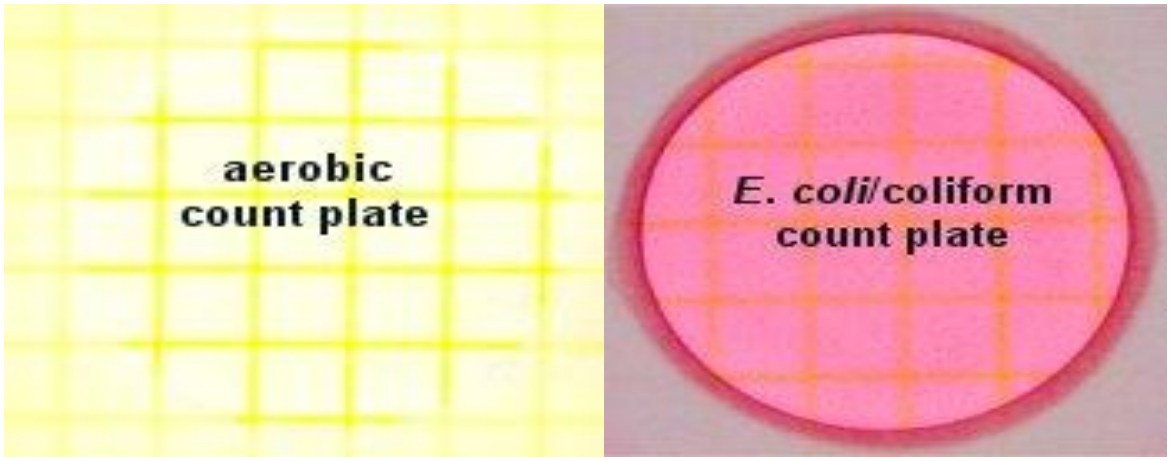
Possible results:

One or more coliform bacteria/100 ml = "does not meet the bacteriological standard purity" specific counts

too numerous to count (TNTC)

confluent growth

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



OBJECTIVES:

Identify coliform bacteria using 3M Petrifilms.

Differentiate between coliforms and fecal coliforms.

Analyze water samples for bacterial counts.

MATERIALS NEEDED: per table

water sample

1 coliform/E. coli count petrifilm

2 aerobic count petrifilms
1 ml pipettes
scissors
2-99 ml phosphate dilution containers
humidified container to incubate petrifilm plates

THE PROCEDURE:

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

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

7. THE COLIFORM COUNT PLATE

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

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

INTERPRETATION:

1. Count the colonies on a Quebec colony counter or other magnified light source (with clear films down).
2. Refer to the INTERPRETATION GUIDE in print form or at the 3M website given above.

3. After counting the clear film covers can be lifted, and the colonies can be used for testing or staining.

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

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

QUESTIONS:

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

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

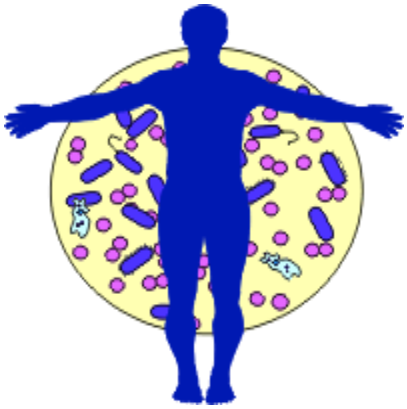
3. Why are coliforms used as indicator organisms for water impurity?

City of Boulder/USGS Water Quality Monitoring

General Information on Fecal Coliform

by Sheila Murphy

TOTAL AND FECAL COLIFORM BACTERIA



The coliform bacteria group consists of several genera of bacteria belonging to the family enterobacteriaceae. These mostly harmless bacteria live in soil, water, and the digestive system of animals. Fecal coliform bacteria, which belong to this group, are present in large numbers in the feces and intestinal tracts of humans and other warm-blooded animals, and can enter water bodies from human and animal waste. If a large number of fecal coliform bacteria (over 200 colonies/100 milliliters (ml) of water sample) are found in water, it is possible that pathogenic (disease- or illness-causing) organisms are also present in the water. Fecal coliform by themselves are usually* not pathogenic; they are indicator organisms, which means they may indicate the presence of other pathogenic bacteria. Pathogens are typically present in such small amounts it is impractical monitor them directly.

Swimming in waters with high levels of fecal coliform bacteria increases the chance of developing illness (fever, nausea or stomach cramps) from pathogens entering the body through the mouth, nose, ears, or cuts in the skin. Diseases and illnesses that can be contracted in water with high fecal coliform counts include typhoid fever, hepatitis, gastroenteritis, dysentery and ear infections. Fecal coliform, like other bacteria, can usually be killed by boiling water or by treating it with chlorine. Washing thoroughly with soap after contact with contaminated water can also help prevent infections.

Fecal coliform, like other bacteria, can usually be killed by boiling water or by treating it with chlorine. Washing thoroughly with soap after contact with contaminated water can also help prevent infections.

Measurement of Fecal Coliform

Bacteria are single-celled organisms that can only be seen with the aid of a very powerful microscope. However, coliform bacteria form colonies as they multiply, which may grow large enough to be seen. By growing and counting colonies of coliform bacteria from a sample of water, it is possible to determine approximately how many bacteria were originally present.

There are several ways coliform bacteria are grown and measured. Methods commonly used include the most probable number (MPN) method and the membrane filter (MF) method.

In the MPN method, a "presumptive test" is performed first. A series of fermentation tubes that contain lauryl tryptose broth are inoculated with the water sample and incubated for 24 hours at 35 □□C. Fermentation tubes are arranged in 3 or more rows, with 5 or 10 tubes per row, with varying dilutions of the samples in the tubes. The fermentation tube contains an inverted tube to trap gases that are produced by the coliform bacteria. After 24 hours, the fermentation tube is examined for gas production. If there is no gas production, the samples are incubated for another 24 hours and reexamined. If gas production is observed by the end of 48 hours, the presumptive test is positive; coliform bacteria are present in the sample. A "confirmed test" is then performed to determine if fecal coliform bacteria are present. For the confirmed test, some of the content of the fermentation tube is transferred with a sterile loop to a fermentation tube containing another broth. The sample is incubated in a water bath at 44.5 □□C for 24 hours. Gas production in the fermentation tube after 24 hours is considered a positive reaction, indicating fecal coliform. Based on which dilutions showed positive for coliform and/or fecal coliform, a table of most probable numbers is used to estimate the coliform content of the sample. The results are reported as most probable number (MPN) of coliform per 100 ml (American Public Health Association, 1998).

The MF method is more rapid than the MPN method, but the results are not as reliable for samples that contain many non-coliform bacteria, high turbidity, and/or toxic substances such as metals or phenols. The water sample is filtered through a sterile membrane filter. The filter is transferred to a sterile petri dish and placed on a nutrient pad saturated with broth. The plates are inverted, placed in watertight plastic bags, and incubated in a water bath at 44.5 degrees C for 24 hours. Colonies produced by fecal coliform bacteria are blue, and are counted using a microscope or magnifying lens. The fecal coliform density is recorded as the number of organisms per 100 ml.

Sometimes the unit of colony producing units per 100 milliliters of water (CPU/100 ml) is used; this is equal to the number of organisms per 100 ml.

Factors Affecting Fecal Coliform

Wastewater and Septic System Effluent

Fecal coliform is present in human waste, so the bacteria goes down the drains in our houses and businesses, and can enter streams from illegal or leaky sanitary sewer connections, poorly functioning septic systems, and poorly functioning wastewater treatment plant (WWTPs) effluent.

Animal Waste

A significant amount of fecal coliform is released in the wastes produced by animals. This can be a serious problem in waters near cattle feedlots, hog farms, dairies, and barnyards that have poor animal keeping practices and waste is not properly contained. In urban areas, fecal coliform can be contributed to surface water by dog, cat, raccoon, and human waste when it is carried into storm drains, creeks, and lakes during storms.

Sediment Load

High amounts of sediment are often related to high concentrations of pathogenic bacteria. The bacteria can attach to sediment particles, escaping invertebrate predators (Murdoch and Cheo, 1996). Fast-running water can carry more sediment, so higher levels of bacteria can occur during high runoff events. Bacteria are much more abundant on soils than in water.

Temperature

Bacteria grow faster at higher temperatures. The growth rate slows drastically at very low temperatures.

Nutrients

High levels of nutrients can increase the growth rate of bacteria.

Water Quality Standards Regarding Fecal Coliform

The U.S. Environmental Protection Agency (EPA) requires all drinking water systems to monitor for total coliforms in distribution systems. The EPA states that no more than 5.0% of samples can test positive for total coliform in a month. (For water systems that collect fewer than 40 routine samples per month, no more than one sample can be total coliform-positive). Every sample that has total coliforms must be analyzed for fecal coliforms. There cannot be any fecal coliforms in drinking water (U.S. EPA Office of Water current drinking water standards).

For treated drinking water, Colorado Department of Public Health and Environment Water Quality Control Division (CDPHE-WQCD) regulations are similar to those of U.S. EPA; there cannot be any fecal coliform in treated drinking water (see CDPHE-WQCD Primary Drinking Water Regulations for more information).

For domestic water supply, CDPHE-WQCD regulations state that fecal coliform count shall not exceed 2000 fecal coliforms per 100 ml (based on geometric mean of representative samples) (see Reg. 31, Basic Standards and Methodologies for Surface Water).

CDPHE-WQCD regulations state that waters used for Class 1 primary contact (including such activities as swimming, rafting, and kayaking) should not have fecal coliform counts above 200 fecal coliforms per 100 ml. Waters used for Class 2 secondary contact (non-primary contact waters, including, but not limited to, fishing and other streamside or lakeside recreation) should not have fecal coliform counts above 2000 fecal coliforms per 100 ml.

Other Information About Fecal Coliform

The fecal coliform group includes all of the rod-shaped bacteria that are non-sporeforming, Gram-Negative , lactose-fermenting in 24 hours at 44.5 □□C, and which can grow with or without oxygen.

Fecal coliform is a type of fecal bacteria. Another type of fecal bacteria is Fecal Streptococcus . Fecal Streptococcus is a group of bacteria normally present in large numbers in the intestinal tracts of warm-blooded animals other than humans.

For information on how drinking water is treated to remove bacteria, see The City of Boulder's water quality fact sheet .

*Some strains of Escherichia coli , which are a type of fecal coliform, can cause intestinal illness. One such strain is E. coli O157:H7, which is found in the digestive tract of cattle. For more information on E.coli O157:H7 and other pathogenic bacteria, see the U.S. FDA Center for Food Safety & Applied Nutrition's "Bad Bug Book" .

Select here for a list references used in the preparation of this information
Select here for general information about other water quality parameters.
Select here for interpretation of Temperature data in the Boulder Creek Watershed

Annex 11

الملحق الحادى عشر

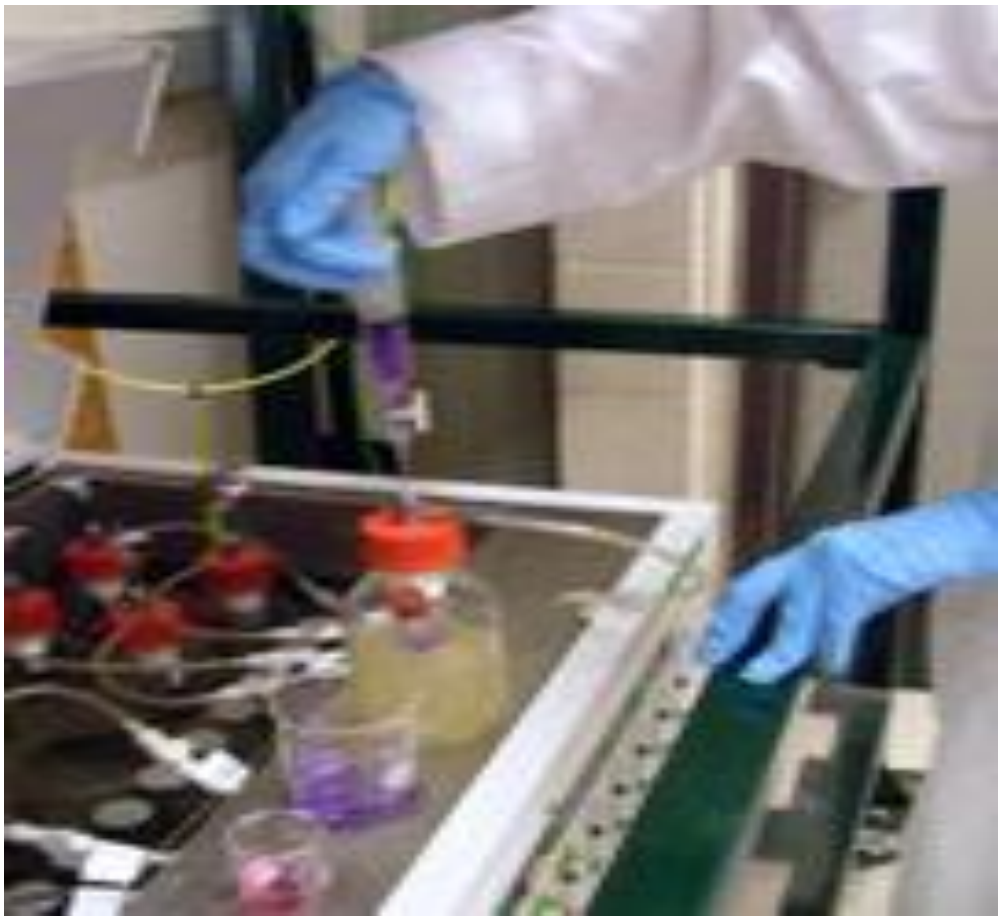
Jump to main content.

Pathogen Equivalency Committee (PEC)

Contact Us **Search:** All EPA This Area Go

- You are here: EPA Home
- Research & Development
- Risk Management Research
- Land
- PEC
- QAPP

Quality Assurance Project Plan (QAPP)



Maintaining a respirometer that measures a sample's oxygen usage.

Table of Contents

- Introduction
- Elements: Analytical Methods Common to Most QAPPs Prepared for Equivalency Recommendations
- Design - Goals and Objectives, Scale, and Scope
- Elements: Quality Assurance & Quality Control Measures
- Design - Pointers on Select Details
- Resources

Introduction

In reviewing Process to Further Reduce Pathogens and Process to Significantly Reduce Pathogens equivalency applications, the Pathogen Equivalency Committee (PEC) will verify that the results submitted in support of a process are statistically significant and were acquired taking into account appropriate quality assurance and quality control measures. (See Tip box below.) In some cases, the PEC may conduct on-site reviews.

A quality assurance project plan (QAPP) should be developed before beginning testing so that the desired quality in sample collection, laboratory analysis, data validation and reporting, and documentation and record keeping is achieved and maintained. A QAPP is a written document that provides a blueprint for the entire project and each specific task to ensure that the project produces reliable data that can be used to meet the project's overall objectives and goals.

TIP

Applicants are now **required** to prepare and submit a quality assurance project plan for the PEC to review **prior to** conducting any research in support of their application for equivalency. Very few exceptions to this requirement will be granted. PEC review and approval of an applicant's project plan prior to data collection will save time and money in the long run by ensuring that the proper data is collected in an appropriate manner and unnecessary data collection is eliminated.

The information required in the application for equivalency recommendation is largely drawn from the QAPP requirements. The extensive overlap between the QAPP and the application is evident in the combined Completeness Checklist below that the PEC uses to evaluate both documents. For this reason, careful preparation of a QAPP will serve as a good head start on the application itself. To assist the applicant in developing such a plan, QAPP Guidelines for Applied Research Projects are provided below. This guidance document contains information on requirements for the project description and objectives, project organization, experimental approach, sampling procedures, testing and measurement protocols, Quality Assurance/Quality Control checks, data reporting, data reduction, data validation, assessments, and references.

An anaerobic digester.

Some basic information on sampling procedures and analytical methods which may be useful in the development of a QAPP are summarized on this page and discussed in greater detail in Chapter 9 (PDF) (11 pp, 601 KB) of EPA/625/R-92/013. A list of quality management tools, including references and training to assist with the development of a QAPP can be found on the EPA's Quality System Web site. The Uniform Federal Policy for Quality Assurance Project Plans (EPA/505/B-04/900A) is another document you may wish to reference. This very thorough document is the result of collaboration between EPA, DoD, and DOE to standardize QAPP requirements and definitions. In addition to consulting these publications, applicants are encouraged to contact a Quality Assurance/Quality Control expert, statistician, or the PEC as they develop their testing plan, to discuss the quality assurance project plan and proposed sampling techniques.

Top of page

Elements: Analytical Methods Common to Most QAPPs Prepared for Equivalency Recommendations

Fecal Coliform (either EPA method is preferred)

- EPA Method 1680 (PDF) (51 pp, 1.11 MB): Fecal Coliforms in Sewage Sludge (Biosolids) by Multiple-Tube Fermentation using Laurel-Tryptose Broth (LTB) and EC Medium
- EPA Method 1681 (PDF) (50 pp, 889 KB): Fecal Coliforms in Sewage Sludge (Biosolids) by Multiple-Tube Fermentation using A-1 Medium
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Methods (18th ed.) 9221 E: Multiple-Tube Fermentation Technique Fecal Coliform Procedure, used in conjunction with Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge, Appendix F: Sample Preparation Fecal Coliforms in Sewage Sludge (Biosolids) by Multiple-Tube Fermentation using A-1 Medium (PDF) (4 pp, 366 KB) (EPA/625/R-92/013) Revised July 2003
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Methods (18th ed.) 9222 D: Membrane Filter Technique Fecal Coliform Procedure, used in conjunction with Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge, Appendix F: Sample Preparation Fecal Coliforms in Sewage Sludge (Biosolids) by Multiple-Tube Fermentation using A-1 Medium (PDF) (4 pp, 366 KB) (EPA/625/R-92/013) Revised July 2003 (acceptable for PSRP equivalencies only)

Salmonella spp.

- EPA Method 1682 (PDF) (48 pp, 1 MB): Salmonella in Sewage Sludge (Biosolids) by Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) Medium
- EPA/625/R-92/013, Appendix G (PDF) (9 pp, 425 KB): Kenner and Clark (1974) Analytical Method for Salmonella sp. Bacteria, used in conjunction with Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge, Appendix F: Sample Preparation for Fecal Coliform Tests and Salmonella sp. Analysis (PDF) (4 pp, 366 KB) (EPA/625/R-92/013) Revised July 2003

Enteric Viruses

- Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge, Appendix H: Method for the Recovery and Assay of Total Culturable Viruses from Sludge (PDF) (16 pp, 355 KB) (EPA/625/R-92/013) Revised July 2003
- **Viable Helminth Ova**

- Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge, Appendix I: Test Method for Detecting, Enumerating, and Determining the Viability of Ascaris Ova in Sludge (PDF) (7 pp, 510 KB) (EPA/625/R-92/013) Revised July 2003

Percent Total and Volatile Solids (either method is acceptable)

- EPA Method 1684: Total, Fixed, and Volatile Solids in Water, Solids, and Biosolids
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Methods 2540 B & E: Total Solids Dried at 103 - 105°C and Fixed and Volatile Solids Ignited at 500°C or Method 2540 G: Total, Fixed, and Volatile Solids in Solid and Semisolid Samples

Optional and Surrogate Indicator Organisms

Specific methods for the analysis of optional and surrogate indicator organisms are not mandatory unlike the organisms used for microbial compliance monitoring of biosolids whose methods (as listed above) are specified by 40 CFR 503.8. However, acceptable protocols for analysis of microbial indicator organisms and specific pathogenic microorganisms have been developed for water, wastewater, soils, foods and other matrixes which have been incorporated into compendiums of industry standard assays or defined as Agency approved methods. Specifically, the references listed below identify methods which may be useful for analysis of biosolids. Caution should be used when selecting and using methods for alternate or surrogate indicator organisms since none of these methods have been subject to multi-laboratory validation studies for sewage sludge or biosolids.

- American Public Health Association, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 21st Edition. 2005. Washington D.C.

- American Public Health Association, Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods 4th Edition. 2001. Washington D.C.
- U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual 8th Edition. 1998. Washington D.C.
- U.S. Environmental Protection Agency, EPA Microbiology Home Page. 2007.

Top of page

Design - Goals and Objectives, Scale, and Scope

Goals and Objectives

Performing membrane filtration for microbial enumeration.

The goals and objectives of a QAPP prepared for the purposes of supporting an equivalency application will have the same standard components. The goal of such a QAPP will be to support

the equivalency of the process in question to a process to further (or significantly) reduce pathogens on a site-specific or national basis.

The objectives will vary depending on the type of equivalency because the criteria for verifying efficiency differ between a process to significantly reduce pathogens and a process to further reduce pathogens. (See the Equivalency Criteria page.) However, regardless of the equivalency type, the data should be defensible in demonstrating that the process is consistently capable of pathogen reduction on par with accepted processes.

Using a pipette to make accurate volumetric measurements.

Scale

Typically, to receive an equivalency recommendation, laboratory work is performed to establish the boundary conditions of all key process variables, and then pilot or full-scale testing is performed to demonstrate successful scale-up. The required elements of a QAPP can be quite different depending on scale. If laboratory-scale testing is to be used, the applicant may find it easier to divide their research into two phases and carry out the work under separate QAPPs, one for the laboratory-scale work and one for the scale-up work.

Planning a pilot-scale study includes some special considerations if one of its goals is to gather data for scaling up the process to a plant scale. The pilot unit should be truly representative of a full-scale operation. (See definitions of scale.) The conditions of the pilot-scale operation should be no more severe than those expected of the full-scale operation. These conditions will likely include for example, degree of mixing, nature of the flow (batch vs. flow though units and degree of short-circuiting in flow through units), vessel sizing, and proportions of the chemicals used. Any substantial departure in process parameters between the pilot-scale and the full-scale systems that has the potential to reduce the effectiveness of the process will invalidate any approvals given and will require a retest at the new condition.

Scope

A-1 broth inoculation tubes from a multiple tube fermentation analysis for fecal coliform density.

As discussed in the Basic Information web page, whether the goal is a site-specific or a national equivalency will also play a role in the overall QAPP design. For site-specific equivalencies work only needs to be performed on sludge collected from one location. For a national equivalency, however, the work must be repeated with significantly varying sludges. This would entail a combination of laboratory studies on a wide variety of sludges followed by scale-up testing using at least one sludge/location. Or if preferred, a mobile pilot-unit could be constructed and used for all testing, eliminating the need for laboratory studies.

Note that the pilot unit must be a true pilot-scale of the final full-scale system for the equivalency recommendation to apply to the full-scale and not just the pilot scale. (See the pilot-scale definition for more discussion on what is considered a true pilot-scale.)

Top of page

Elements: Quality Assurance & Quality Control Measures

- **Quality Assurance Measures** refer to protocols or activities undertaken to assure the reliability of the data collected. These measures generally apply widely to the project as a whole. Examples of quality assurance measures include, but are not limited to the following:
    - Holding times for microbial samples are generally 24 hours or less. A provision for checking holding times and consequences of holding time exceedances should be included.
    - Sample representativeness with respect to sampling and handling procedures can be assured through the use of duplicate sampling. An acceptable range of relative percent difference between a sample and its duplicate (typically 20%) should be set. Data falling outside this range is invalid.
    - Sample representativeness with respect to sample processing and analysis can be assured through replicate analysis. An acceptable range of relative standard deviation among replicate analyzes (typically 10%) should be set. Data falling outside this range is invalid.
    - Calibration and maintenance procedures, schedules, and standards (if applicable) must be specified for all equipment used through the study. For example, temperatures of refrigerators and incubators used should be verified with independent thermometers on a regular basis. Calibration of pH probes should be performed using appropriate standard solution ranges, etc.
- **Quality Control Measures** refer to actions included to assure that defined standards are met in the analysis of data. These measures are generally analyte or method specific and are often defined within the method procedure itself. Not all types of controls are necessary for every analyte. Examples of quality control measures that should be incorporated in a QAPP designed to support process equivalency include, but are not limited to the following:
    - Method blanks to ensure the workspace, handling procedures, and reagents are free from contamination. For example, processing a sample of reagent-grade water along with normal samples when measuring percent total solids. This method blank may not be zero, but should be insignificant compared to the actual samples

(e.g., % solids of the blank should be less than 10% of the lowest measured sample) or the entire data set will be invalid. Some method blanks may be a simple positive or negative. For example, incubation of one MPN tube without inoculation (media control) and one MPN tube after inoculation with pure dilution water when measuring fecal coliform.

- Positive and negative controls establish that the method is working as designed. For these controls, something known to produce the appropriate effect is to be added. For example, inoculating MPN tubes with pure cultures of E. coli and Enterobacter spp. would be a positive and negative control, respectively, for fecal coliform measurement.
- Matrix Spikes are necessary for methods that are known to have low or inconsistent percent recoveries. This includes helminth (Ascaris) ova and enteric viruses, which can have percent recoveries as low as 10-30%. In matrix spikes, known quantities of the analyte are added to the sample. After subtracting out the background level naturally present in the unspiked sample, a percent recovery can be calculated by dividing the measured value by the known spiked value. The matrix will affect the percent recovery so this test must be performed for the untreated and the finished product.

Top of page

Design - Pointers on Select Details

Proper project design and sampling techniques are of utmost importance to producing a successful QAPP. Though not all-inclusive, some important points to consider when planning your QAPP include:

Finished biosolids in a storage shelter.

- Accepted, state-of-the-art techniques for sampling and analyzing sludge should be used to ensure the quality of the data.
- The choice of sampling device should be appropriate for the physical characteristics of the sludge (viscosity and solids content).
- Effort must be made to minimize the possibility of sample contamination.
- The samples should be representative of the random and cyclic variation in sludge characteristics that occur during treatment. Representative samples can be obtained by compiling composite samples over volume, by ensuring that each grab sample or aliquot of a composite sample is as representative as possible of the total stream flow passing the sampling point, by establishing an appropriate frequency of sampling that accounts for variation, and by taking an appropriate number of samples to account for variation.
- A pair of input and output samples of non-batch systems can be drawn simultaneously. However, to ensure that measurements are independent, samples should not be taken on successive days. At least one estimated sludge retention time should separate each successive pair of input and output samples.
- If ambient conditions affect sludge microbial characteristics, sludge should be sampled after treatment under the least favorable conditions.
- Sampling, packaging, and shipping procedures should not alter the sludge character or quality.

- Laboratories providing analytical services should be experienced in the analysis of municipal sludges and biosolids and should be able to demonstrate compliance with analytical quality assurance protocols.
- Field verification and documentation by independent or third-party investigators is desirable.

Top of page

Resources

You will need Adobe Reader to view some of the files on this page. See EPA's PDF page to learn more.

Below are some resources to assist in the development of a successful and useful quality assurance project plan. Two example QAPPs and mock reviews of these QAPPs using the Completeness Checklist are provided. Although neither QAPP pertains to biosolids or, more specifically, the planning of a project to demonstrate Process to Further Reduce Pathogens or Process to Significantly Reduce Pathogens equivalency, the examples and mock reviews do illustrate the type of information that is required in a well-written QAPP.

QAPP Guidelines for Applied Research Projects (PDF) (5 pp, 110 KB) | **508-Compliant Version**
An annotated outline providing specific information on what to include in a well designed quality assurance project plan.

Completeness Checklist (DOC) (8 pp, 263 KB)
This checklist is used by the PEC to review submitted QAPPs and equivalency applications. It is provided to help applicants double-check that all required and applicable elements have been addressed in their QAPP/equivalency application before submittal.

Example QAPP - Biofilm Growth (DOC) (16 pp, 220 KB)
This example QAPP is entitled Growth rate of Biofilm Organisms in a Distribution System.

QAPP Checklist for Biofilm Growth (DOC) (8 pp, 251 KB)
A Completeness Checklist was filled out for the biofilm growth QAPP in a mock review showing the strengths and weaknesses.

Example QAPP - Particulate Nutrients (DOC) (19 pp, 236 KB)
This example QAPP is entitled Analysis of Particulate Bound Nutrients in Storm water.

QAPP Checklist for Particulate Nutrients (DOC) (9 pp, 252 KB)
A Completeness Checklist was filled out for the particulate nutrients QAPP in a mock review showing the strengths and weaknesses.

EPA's Quality System Web site
Additional resources to assist in the development of a quality assurance project plan can be found on this Web site.

Uniform Federal Policy for QAAPs
This document is a useful reference that provides detailed definitions of common QAPP elements.

You will need MS Word Viewer to view some of the files on this page. See About MS Word Viewer EXIT Disclaimer to learn more.

Top of page

Local Navigation

- Pathogen Equivalency Committee Home
- Basic Information
- Equivalency Criteria
- Principal Biosolids Guidance
- Equivalent Processes
- State & Regional Biosolids Coordinator
- How to Apply
- Quality Assurance Project Plan
- Related Links

- Risk Management Research Home

- EPA Home
- Privacy and Security Notice
- Contact Us

Annex 12

الملحق الثـانى عشر

وزارة الصحة والسكان
الوزير

بسم الله الرحمن الرحيم

قرار وزير الصحة والسكان
رقم (٨٥٤) لسنة ٢٠٠٧
بشأن الحدود القصوى للمعايير والمواصفات الواجب توافرها
فى المياه الصالحة للشرب والاستخدام المنزلى.

وزير الصحة والسكان :

بعد الاطلاع على القانون رقم ٢٧ لسنة ١٩٧٨ فى شأن تنظيم الموارد العامة للمياه اللازمة للشرب والاستعمال المنزلى.

وعلى قرار رئيس الجمهورية رقم ٢٧٠٣ لسنة ١٩٦٦ بانشاء اللجنة العليا للمياه.

وعلى قرار رئيس الجمهورية رقم ٢٤٢ لسنة ١٩٩٦ بتنظيم وزارة الصحة والسكان.

وعلى القرار الوزارى رقم ١٠٨ لسنة ١٩٩٥ بشأن المعايير والمواصفات الواجب توافرها فى المياه الصالحة للشرب والاستخدام المنزلى.

وعلى ما أوصت به اللجنة العليا للمياه بجلستها المنعقدة بتاريخ ٢٠٠٧/٥/٧.

وبناء على ما عرضته الادارة المركزية لشئون البيئة.

قـــــــــرر

مادة(١): تخضع المعايير والمواصفات الواجب توافرها فى المياه الصالحة للشرب والاستخدام المنزلى للحدود القصوى الموضحة قرين كل منها بالجداول المرفقة.

مادة(٢): تختص الإدارة المركزية للمعامل بوزارة الصحة والسكان وفروعها بالمحافظات بإجراء الفحوص والتحاليل الخاصة بالمياه المذكورة.

مادة(٣): يكون تنفيذ المعايير وخطط الرصد الذاتى والتفتيش الدورى وفقا لما هو وارد بالملاحق المرفقة بهذا القرار.

مادة(٤): ينشر هذا القرار فى الوقائع المصرية ويعمل به من اليوم التالى لتاريخ نشره، ويلغى كل ما يخالفه من قرارات.

وزير الصحة والسكان
أ.د. حاتم الجبلى

فى: ١٦ /١٠/ ٢٠٠٧

عابدين
القاهرة: ٣ شارع مجلس الشعب. ص.ب: ١١٥١٦ - ت: ٧٩٥٧٠٤٦ - ٧٩٤١٥٠٧(٠٢٠٢) - فاكس: ٧٩٥٣٩٦٦ (٠٢٠٢)

رابعا : المعايير الميكروبيولوجيه : -

مسلسل	نوع الفحص	طريقة القياس المتبعة	الحد الأقصى المسموح به
أ	العدد الكلى للبكتريا	صب الأطباق pored plate method	- لا يزيد عن ٥٠ خلية / ١ سم٣ عند درجة حرارة ٣٧ درجة مئوية لمدة ٢٤ ساعة - لا يزيد عن٥٠ خلية / ١ سم٣ عند درجة حرارة ٢٢ درجة مئوية لمدة ٤٨ ساعة
ب	أدلة التلوث بكتيريا القولون الكلية TOTAL COLIFORM	" MF " أو " MPN "	- يجب ان تكون ٩٥ % من العينات التى يتم فحصها خلال العام خالية تماما من بكتيريا القولون حتى ١٠٠ سم٣ من العينة - كما يجب ألا تحتوى اى عينة من العينات على أكثر من ٢ خلية/ ١٠٠ سم ٣ على الا يتكرر ذلك فى عينتان متتاليتان من نفس المصدر
	بكتريا القولون البرازية " باسيل القولون النموذجى "		- يجب أن تكون جميع العينات خالية من باسيل القولون النموذجى .
	البكتريا السبحية البرازية		- يجب أن تكون جميع العينات خالية من الميكروب السبحى البرازى
ج	الفحص البيولوجى - عند فحص عينات المياه للطحالب - عند فحص عينات المياه ميكروسكوبيا		- يجب ألا يزيد نسبة الميكروسستين عن ١ ميكروجرام / لتر ويتم إجراء هذا التحليل فى حالة ظهور نمو مفاجئ للطحالب الخضراء المزرقة BLUE GRAEEN ALGAE أو وجود أعداد عالية منها . - يجب أن تكون خالية تماما من البروتوزوا الحية وجميع أطوار الديدان المسببة للأمراض

gtz Partner for the Future. Worldwide.

ARAB REPUBLIC OF EGYPT
German Technical Cooperation

ميكروبيولوجيا المياه
البرنامج الثالث

أسس الطرق الميكروبيولوجية وتقدير البنود الأساسية
Principals of Microbiological Procedures & Determination of Basic Parameters

الماده المقدمه
Presentation

Prof. Helmy Tawfik El-Zanfaly
National Research Center

June 2008

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

ميكروبيولوجيا المياه
Microbiology Water

البرنامج الثالث
Module 3

أسس الطرق الميكروبيولوجية وتقدير البنود الأساسية

Principals of Microbiological Procedures & Determination of Basic Parameters

الماده المقدمه
Presentation

Prof. Helmy Tawfik El-Zanfaly
National Research Center

June 2008

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

خطة التدريس للدورة التدريبية فى
مجال ميكروبيولوجيا مياه الشرب
(أسس الطرق الميكروبيولوجية وتقدير البنود الرئيسية)

مقدمة إلى

الشركة القابضة لمياه الشرب و الصرف الصحى

Holding Company for Water and Wastewater

إدارة التدريب Training Unit

إعداد

البرنامج التدريبى للمعامل المركزيه

Prof. Dr. Helmy Tawfik El-Zanfaly
National Research Center

Central Laboratories Training Program
Water Microbiology
GTZ

يونيو ٢٠٠٨

المحتويات

أولا: نظرة عامة على البرنامج التدريبى ميكروبيولوجيا المياه (أسس الطرق الميكروبيولوجية وتقدير البنود الرئيسية)

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

ثانيا: خطة التدريس بالدورة التدريبية ميكروبيولوجيا المياه

دورة(أسس الطرق الميكروبيولوجية وتقدير البنود الرئيسية)

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

أولا: نظرة عامة على البرنامج التدريبى ميكروبيولوجيا المياه (أسس الطرق الميكروبيولوجية وتقدير البنود الرئيسية)

١. الهدف العام للدورة التدريبية

اختبارات مياه الشرب لصلاحيتها للاستهلاك الآدمى هو الوسيلة للتحقق من الصلاحية حتى لا يكون هناك مخاطر على صحة المستهلك . ومن الناحية البيولوجية يتم الاهتمام ببمحتولى المياه من مسببات الأمراض. وبكتريولوجيا من الصعب أن يتم التحليل لجميع مسببات الأمراض لذلك يتم الكشف على ما يسمى بأدلة التلوث البرازى.

وعلى الرغم من أن محتوى المياه العام من البكتريا على صورة العدد الكلى للبكتريا قد يبدو الى أنه ليس له مدلول صحى الا أنه يعطى فكرة عن كفاءة عملية المعالجة ، وحالة نظم توزيع المياه. ولتأثيره على النجاح فى الكشف عن بكتريا الق ولون والتى هى أح أدلة التلوث ولثبوت أهميته بالنسبة لفئات من المجتمع مثل كبار السن ومنخفضى المناعة لذلك أهتم بتقديره.

وكشافات التلوث البرازية مثل بكتريا القولون والبكتريا السبحية البرازية يعتمد النجاح فى الكشف عنها على اتباع الطرق الصحيحة فى الكشف عنها.

ولا يتأتى التقييم الصيح الا باتباع الطرق القياسية فى الكشف عنها وتقدير عددها . ونظرا لأهمية ذلك فان الدورة الحالية تهتم بالتركيز على توضيح الطرق القياسية والاحتياطات اللازم مراعاتها للحصول على النتيجة الصحيحة . وسيتم استعراض الطرق المختلفة الممكن اتباعها وسنصل فى النهاية الى أنسب الطرق الممكن اتباعها لتوحيد طرق اختبار المياه على مستوى المعامل المركزية والتى لها دور اساسى فى عمليات تقييم اداء محطات المعالجة.

٢. **المجموعة المستهدفة**

الميكروبيولوجيين العاملين بالمعامل المركزية لشركات المياه التابعة للشركة القابضة لمياه الشرب والصرف الصحى.

٣. **عدد المتدربين**

يبلغ عدد المتدربين المقدر لحضور دورة ميكروبيولوجيا المياه (التحكم فى الجودة – أجهزة المعمل – العينات) ما بين ٢٠ – ٢٢ متدرب من المعامل المركزية مجزئين على مجموعتان.

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 بجودة مياه الشرب.

- **الشرائح Power point:** التى تعرض أثناء الشرح لإبراز النقاط الرئيسية لكل موضوع فى تسلسل منطقى ولضمان وتثبيت المعلومة لدى المتدرب.

- **المناقشات المفتوحة:** ويديرها المدرب أو المحاضر وتتيح هذة المناقشات الفرصة لتبادل الأراء وتوجبه الأسئلة و الحصول على معلومات جديدة كما إنه يتم من خلالها نقل المعارف والخبرة العملية والنظرية من المدرب إلى المتدربين واصلاح لمفاهيم الغير صحيحة أو غير حديثة لدى المتدربين.

- **دراسة الحالات الواقعية:** وهى تفيد فى عرض المشاكل العملية التى يواجهها المتدربون أو التى سوف يواجهونها فى عملهم و أساليب التغلب عليها بالاسلوب العلمى الصحيح.

- **التدريب العملى:** والذى سيتاح بصورة فردية لكل متدرب باستخدام الطرق القياسية الحديثة لضمان الفهم التام والتطبيق الصحيح من المتدرب للمعلومات والطرق العملية التى تم تدريسها.

- **المراجع العلمية و الكودات و المواصفات:** يتم إعطاء المتدرب المراجع العلمية التى أعتمد عليها والتى يمكن الرجوع إليها لزيادة التعمق فى المجال وكذلك الإشارة ومناقشة الكود الخاص بتشغيل محطات معالجة مياه الشرب والمواصفات الحديثة الحاكمة والمعمول بها فى مصر وعلى المستوى الدولى فى مجال مياه الشرب.

- **فى نهاية الدورة يتم تقييم الحاضرين من خلال اختبار تحريرى فى مواد الدورة.**

٥. **مساعدات التدريب**

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

٦. **قائمة الدورات التدريبية**

سيتم عمل عدد ٤ دورات فى مجال ميكروبيولوجيا المياه ويتم إعادة كل دورة مرتان.

وعنوانين الدورات كالتالى:

- دورة التحكم فى الجودة – أجهزة المعمل – العينات.
- دورة ميكروبيولوجيا المياه السطحية والجوفية.
- دورة أسس التحليلات الميكروبيولوجية وتقدير البنود الأساسية.
- دورة الطرق والبنود الخاصة فى التحليل والمواصفات القياسية لمياه الشرب.

٧. **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.

كما يلزم توفير معمل يتسع لعدد ١٠ – ١٢ متدرب (يمكن عمل ٥ – ٦ مجموعة من شخصين على الأكثر) والمعمل يكون مجهز بالامكانيات من أجهزة وأدوات، أما البيئات والكيماويات وبعض المستلزمات فسيقوم بتوفيرها هيئة gtz. تتم دورتان بتكرارها فى المعمل المركزى بمحطة الفسطاط بالقاهرة ودورتان بمكررها بالمعمل المركزى بشركة مياه البحيرة بدمنهور.

ثانيا: خطة التدريس بالدورة التدريبية

أ. دورة أسس الطرق الميكروبيولوجية وتقدير البنود اللأساسية

محاضر: أ.د. حلمى توفيق الزنفلى

تدريبات عملية: مساعد من هيئة العاملين بالمعمل الذى تتم فيه الدورة وذلك بالتناوب.

١ أهداف الدورة

* أسس طرق التحاليل البكتريولوجية للمياه الخام وتتبع كفاءة مراحل المعالجة ومياه الشرب فى الشبكات

* العد الكلى للبكتريا بطرقه المختلفة (الأطباق المصبوبة – النثر على الأطباق – أغشية الترشيح) وكيف يتم اختيار الطريقة المناسبة وكيفية الحصول على نتائج صحيحة.

*طريقة العد المباشر للكائنات الدقيقة فى المياه.

*طرق تقدير بكتريا القولون الكلية (الأنابيب المتعددة – أغشية الترشيح)

* طريقة التواجد/ الغياب لبكتريا القولون الكلية.

*طرق تقدير مجموعة بكتريا القولون البرازية (الأنابيب المتعددة – أغشية الترشيح).

* التأخر فى التحضين (تقدير مجموعةالقولون الكلية والبرازية).

* الطريقة المباشرة (A).

*طرق تقدير البكتريا السبحية البرازية.

*المواصفات القياسية لمياه الشرب لوكالة حماية البيئة الأمريكية.

*الخطوط الاسترشادية لمنظمة الصحة العالمية.

* شواطىء الاستحمام والاستجمام.

* المواصفات المصرية لمياه الشرب.

٢ موضوعات الدورة

- المقدمة وشرح الهدف من الدورة
- العدد الكلى للبكتريا الهتيروتروفية فى المياه مدلوله واستخداماته
- طريقة الأطباق المصبوبة لتقدير العدد الكلى للبكتريا الهتيروتروفية فى المياه
- طريقة الفرد على سطح الأطباق لتقدير العدد الكلى للبكتريا الهتيروتروفية فى المياه
- طريقة استخدام أغشية الترشيح لتقدير العدد الكلى للبكتريا الهتيروتروفية فى المياه
- طريق الد المباشر لتقدير العدد الكلى للبكتريا الهتيروتروفية فى المياه
- كشافات التلوث
- تقدير بكتريا القولون الكلية (طريقة الأنابيب المتعددة وطريقة أغشية الترشيح)
- طريقة التواجد/ الغياب لتقدير مجموعة القولون الكلية
- تقدير بكتريا القولون البرازية (طريقة الأنابيب المتعددة وطريقة أغشية الترشيح)
- التقدير المباشر لبكتريا القولون البرازية (A1)
- تقدير التحضين المتأخر لبكتريا القولون الكلية والبرازية.
- تقدير مجموعة البكتريا السبحية البرازية (طريقة الأنابيب المتعددة وطريقة أغشية الترشيح)

٣ مدة الدورة

تستغرق الدورة مدة ستة أيام متواصلة و يبدأ العمل يوميا من الساعة الثامنة والنصف صباحا حتى الساعة الخامسة والنصف بعد الظهر، أى مدة تسع ساعات (بواقع خمسة ساعات نظرى وثلاث ساعات عملى) يوميا يتخللها ساعة لتناول المشروبات والغداء.

أ.٤ البرنامج الزمنى للدورة

اليوم	الجلسة	التوقيت	الموضوع	المحتوى
اليوم الأول	التسجيل	٨ – ٨.٣٠	إستقبال و تسجيل المشاركين فى الدورة	
	جلسة الإفتتاح	٨.٣٠ – ١١.٠٠	المقدمة والهدف	• مقدمة عامة • توزيع استمارات التعارف • أهداف الدورة • النتيجة المرجوة • علاقة الدورة بخطط الشركة القابضة
	الجلسة الأولى	١١.٣٠ – ١.٣٠	البكتريا الهتيروتروفية(العد الكلى للبكتريا)	• *تعريفه • *مدلولها واستخداماتها- تقديرها بالطرق المختلفة
	الجلسة الثانية	٢.٣٠ – ٥.٣٠	عملى	• تحضير البيئات • صب الأطباق • تقدير العدد الكلى للبكتريا فى نوعيات مياه مختلفة وبالطرق المختلفة.

اليوم الثانى	**الجلسة الثالثة**	**٨.٣٠ – ١١.٠٠**	**أدلة التلوث بكتريا القولون الكلية**	• **شروط أدلة التلوث** • **تقدير مجموعة بكتريا القولون بالأنابيب المتعددة**
	الجلسة الرابعة	**١١.٣٠ – ١.٣٠**	**طريقة أغشية الترشيح لتقدير بكتريا القولون**	* **طريقة اغشية الترشيح لتقدير مجموعة بكتريا القولون**
	الجلسة الخامسة	**٢.٣٠ – ٥.٣٠**	**عملى**	• **تحضير البيئات اللازمة لتقدير مجموعة بكتريا القولون** • **تجهيز أنابيب البيئة لعمل اختبار تقديلا بكتريا القولون الكلية بطريقة الأنابيب المتعددة .** • **تطبيق لطريقة الأنابيب المتعددة لتقدير بكتريا القولون الكلية (الاختبار المبدئى).**
اليوم الثالث	**الجلسة السادسة**	**٨.٣٠ – ١١.٠٠**	**تابع طرق تقدير بكتريا القولون البرازية**	• **طريقة أغشية الترشيح لتقدير بكتريا القولون البرازية** • **اختبارات verification**
	الجلسة السابعة	**١١.٣٠ – ١.٣٠**	**طريقة التواجد/ الغياب للكشف عن بكتريا القولون الكلية وغيرها الكشف عن بكتريا القولون البرازية بالطريثة المباشرة باستخدام بيئة A 1**	• **طريقة التواجد/ الغياب للكشف عن بكتريا القولون الكلية وغيرها** • **الكشف عن بكتريا القولون البرازية بالطريثة المباشرة باستخدام بيئة A 1**
	الجلسة الثامنة	**٢.٣٠ – ٥.٣٠**	**عملى**	• **عمل الاختبار التأكيدى لجزئية الاختبار المبدئى الموجبة لمجموعة بكتريا القولون الكلية.** • **تطبيق لتقدير بكتريا القولون الكلية والبرازية باستخدام طريقة أغشية الترشيح** • **عمل اختبار التواجد/ الغياب لبكتريا القولون الكلية التقدير المباشر لبكتريا القولون البرازية باستخدام بيئة A1**

اليوم الرابع	**الجلسة التاسعة**	**٨.٣٠ – ١١.٠٠-**	**طرق التأخير فى تحضين بكتريا القولون الكلية والبرازية**	• **طرق التأخير فى تحضين بكتريا القولون الكلية والبرازية**
	الجلسة العاشرة	**١١.٣٠ – ٢.٠٠**	**تقدير البكتريا السبحية البرازية والكريات البرازية**	• **طريقة لأنابيب المتعددة لتقدير البكتريا البرازية والكريات البرازية** • **طريقة أغشية الترشيح لتقدير البكتريا السبحية البرازية والكريات البرازية**
	الجلسة الحادية عشر	**٢.٣٠ -٥.٣٠**	**عملى**	• **فحص نتائج العد الكلى للبكتريا** • **قراءة نتيجة بكتريا القولون الكلية والبرازية من أغشية الترشيح** • **استكمال الاختبار التأكيدى لبكتريا القولون الكلية من الأنابيب المتعددة الموجبة** • **فحص نتائج تقدير بكتريا القولون الكلية واستكمال للاختبارات** • **تقدير بكتريا القولون البرازية من تاتج تقدير بكتريا القولون الكلية بطريقة الأنابيب المتعددة.** • **تقدير البكتريا السبحية البرازية والكريات البرازية بالأنابيب المتعددة وأغشية الترشيح**
اليوم الخامس	**الجلسة الثانية عشر**	**٨,٣٠-١٠.٣**	**طريقة التأخر فى التحضين لتقدير بكتريا القولون الكلية والبرازية**	• **مواصفات وكالة حماية البيئة الأمريكية** • **الخطوط الاسترشادية لمنظمة الصحة العالمية** • **مياه الاستجمام**

	الجلسةالثالثة عشر	**١١.٠٠ – ٢.٠٠**	**عملى**	• **تقدير بكتريا القولون البرازية من ناتج تقدير بكتريا القولون الكلية بطريقة الأنابيب المتعددة** • **نقدير بكتريا القولون الكلية والبرازية مع التأخر فى التحضين**
	الجلسة الرابعة عشر	**٣.٠٠ – ٥.٣٠**	**عملى**	• **قراءة النتائج وتسجيلها ومناقشتها**
اليوم السادس	**الجلسة الثانية عشر**	**٨,٣٠-١٠.٣٠**	**المواصفات القياسية لمياه الشرب**	• **مواصفات وكالة حماية البيئة الأمريكية** • **الخطوط الاسترشادية لمنظمة الصحة العالمية**
	الجلسة الثالثة عشر	**١١.٠٠ -٢.٠٠**	**تابع المواصفات**	• **المواصفات المصرية لمياه الشرب** • **مواصفات مياه الاستجمام**
	الجلسة الرابعة عشر	**٣.٠٠ – ٤.٣٠**	**عملى**	• **قراءة النتائج**

WATER MICRBIOLOGY

module 3

Principles of Microbiological Procedures &Determination of Basic Parameters

Prof. Dr. Helmy T. El-Zanfaly
Gtz, Germany
June 2008

مراقبة نوعية مياه الشرب

البكتريا الهتيروتروفية (العدد الكلى للبكتري)

Total Bacterial Count

Heterotrophic Plate Count

(HPC)

* استعمل عدد البكتريا الهتيروتروفية فى المياه قديما ومنذ بداية الاهتمام بالنواحى الصحية فى مياه الشرب كدليل على نوعية المياه .

* بعد ذلك استخدم العدد الكلى للبكتريا الى جانب عدد بكتريا القولون لمراقبة نوعية مياه الشرب. وفى الولايات المتحدة الامريكية تم وضع الطريقة القياسية لتحديد العدد الكلى للبكتريا باستخدام طريقة عد الأطباق Plate counts procedure

منذ عام ١٨٩٨ (Prescott et al., 1950).

• استمر العمل فى تطوير الطرق القياسية للكشف عن عدد البكتريا لتظهر فى أول طبعة لما يعرف الآن باطرق القياسية لاختبار المياه والمخلفات السائلة

• Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 1905

طرق العد فى الأطباق Poured plate

فى بدايتها استخدم الجيلاتين المغذى والتحضين عند ٢٠ درجة مئوية للحفاظ على صلابة الجيلاتين.

بعد ادخال استعمال الآجار بديلا كمادة مصلبة لبيئة تنمية البكتريا أمكن استخدام حرارة تحضين أعلى من ٢٨ مئوية .

الطبعة الثانية من الطرق القياسية لاختبار المياه والمخلفات السائلة والتى ظهرت عام ١٩١٢ أدخلت التحضين عند ٣٧ مئوية لمدة ٢٤ ساعة لأطباق العد باستخدام بيئة الآجار المغذى Nutrient agar.

أدخل التحضين لأطباق العد البكتيرى عند ٢٠ مئوية لمدة ٤٨ ساعة.

الطبعة السادسة عشر من الطرق القياسية أدخلت تغيرات عديدة فى طريقة العد بالأطباق بادخال: طريقة اغشية الترشيح (MF)

وطريقة الفرد على الأطباق (Spread plate (SP،

واستخدام البيئة المنخفضة فى محتواها من المغذيات Low nutrient medium R2A مع استخدام التحضين عند ٢٠، ٢٨ ، ٣٠ درجة مئوية ومدة تحضين مختلفة لتقدير مستوى العد الكلى للبكتريا الهتيروتروفية (HPC) فى المياه.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

تغيير اسم الطريقة من طريقة عد الأطباق القياسية الى عد الأطباق الهتيروتروفيه
"Heterotrophic Plate Count, HPC
"Standard Plate Count"

عد الأطباق الهتيروترفيه يهتم بعد البكتريا الهوائية والهوائية اختيارا Aerobic and facultative aerobic bacteria المتواجدة فى المياه والقادرة على النمو على مركبات عضوية بسيطة (كربوهيدرات، أحماض أمينية وببتيدات) المتواجدة فى بيئة المزرعة، وتحت ظروف محددة للتحضين من حيث الوقت ودرجة الحرارة.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

استعمالات قياسات عد الأطباق الهتيروتروفية

الهدف من معالجة المياه:

تحقيق الامداد بمياه يتحقق فيها عنصر الأمان بالنسبة للمستهلك باستعمال سلسلة من وحدات المعالجة لخفض مستويات العكارة والملوثات الكيماوية والميكروبية.

وعلى ذلك، وكنتيجة للمعالجة، فان جودة نوعية المياه المعالجة يجب أن تبقى خلال التخزين والتوزيع الى المستهلك.

عد الأطباق الهتيروتروفية HPC وسيلة ذات فائدة فى:

*مراقبة كفاءة عمليات معالجة المياه، شاملة التطهير.

*الحصول على تفاصيل اضافية عن مستويات عد الأطباق الهتيروتروفية والتى من الممكن أن تتداخل مع الكشف عن بكتريا القولون فى عينات المياه التى تختبر لمراقبة التطابق مع المواصفات القياسية (U.S. EPA, 1975) .

*تقييم التغيرات فى نوعية المياه النهائية خلال التوزيع والتخزين، ونظافة نظام التوزيع.

*تقييم النمو الميكروبى على المواد المستعملة فى انشاء عمليات معالجة مياه الشرب ونظم التوزيع.

*قياس استعادة النمو البكتيرى Regrowth أو مخاطر ما بعد النمو After growth فى مياه الشرب المعالجة.

*مراقبة التغيرات فى المجتمع الميكروبى عقب التعديلات فى المعالجة مثل التغير فى نوعية المطهر المستخدم.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

اعتبارات منهجية .

* فى الولايات المتحدة، طريقة الأطباق المصبوبة مع التحضين عند ٣٥ درجة مئوية لمدة ٤٨ ساعة استعملت لعد البكتريا فى مياه الشرب.

*طريقة الفرد على الطباق Spread plate لم تستعمل بكثرة لأنها طريقة غير قياسية حتى ظهورها فى الطبعة السادسة عشر للطرق القياسية عام ١٩٨٥ (APHA, 1985) .

gtz Partner for the Future. Worldwide.

نشأت للامداد بمرونة أكبر فى عد البكتريا MF*طريقة أغشية الترشيح فى مياه الشرب المعالجة. لأنها تسمح بتحليل حجم من العينة أكبر من واحد ملل، والذى هو عامل يحد من استعمال طرق الأطباق المصبوبة و الأطباق المنثورة.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

الأطباق المصبوبة Poured Plates

- بساطة وسهولة الاستعمال
- البكتريا فى البيئات المائية منخفضة المغذيات تعتبر بصفة عامة مضرورة فسيولوجيا Physiologically stressed
- حساسة لضرر ثانوى يتسبب عن الحرارة الناشئة عن صهر الآجار وحفظه عند درجة حرارة ما بين ٤٣ – ٤٦ مئوية .
- استنتج أن طريقة الأطباق المصبوبة PP غير مناسبة لعد البكتريا الهتيروتروفية المضرورة نتيجة تواجدها فالبيئة المائية الفقيرة فى المواد المغذية و الحساسة للحرارة (٤٥ مئوية).

gtz Partner for the Future. Worldwide.

- وكذلك فان البكتريا تكون مغمورة فى الآجار (تحت سطحية) فى طريقة PP والمستعمرات تميل الى الصغر ولا تظهر الخصائص المورفولوجية والتى ربما تكون ذات فائدة فى التصنيف.

- ان أقصى حجم للعينة ممكن اختباره باستخدام طريقة PP ١ملل، وهذا يحد من فائدة الطريقة عندما يكون المطلوب تحليل حجم أكبر وفى حالة المياه المعالجة.

طريقة الفرد أو النشر على الأطباق Streak/Spread Plate Method (SP):

- أكثر صعوبة من طريقة PP
- و تحتاج الى تحضير الأطباق فى وقت سابق - يلزم فحصها لوجود تلوث قبل وضع العينة وزرعها .
- يلزم استعمال ساق زجاجية مثنية معقمة لفرد وتوزيع العينة على سطح الآجار.
- عدم استعمال البيئة عندما تكون كثيرة الرطوبة، أو اذا كانت قد فقدت كمية كبيرة من الرطوبة.

- أن الأطباق السابق تجفيفها والتى تفقد ما بين ٣ – ٤ جرام / ١٥ ملل من البيئة فى الطبق تسمح باستخدام حجم للتلقيح يصل الى ١ ملل دون تأثير على استخلاص البكتريا. ومع ذلك، فان الحجم الذى ينصح به للزرع هو 0.1 – 0.5 ملل.
- وطالما أن البكتريا فى العينة تزرع على سطح بيئة الآجار، فان نموها لا يكون مقيد بكون الآجار محيطا بها. وعلى ذلك، فانه من السهل أن يلاحظ الفروق فى شكل المستعمرة، القوام، الصبغات، الحجم، والخصائص الأخرى.
- وتشترك الطريقتان فى محدودية حجم العينة الممكن اختبارها (لا تزيد عن ١ ملل فى كلتا الحالتان).

•أغشية الترشيح Membrane Filter

طريقة أغشية الترشيح كطريقة لتقدير أطباق عد الهتيروترفيك بكتريا HPC قدمت مرونة كبيرة الى طريقة أطباق العد Plate count procedure لمياه الشرب وذلك من خلال السماح بتحليل حجم من العينة أكبر من ١ ملل.

أغشية الترشيح Membrane Filterالطريقة تسمح بعد تركيزات منخفضة من البكتريا فى مياه الشرب النهائية Finished drinking water ومحدوديتها تعتمد على كمية المياه الممكن مرورها من خلال الغشاء دون انسداد ثقوبه .

مقارنة العد البكتيرى المتحصل عليه باستخدام أغشية الترشيح بتلك المتحصل عليها بطريقة PP أظهرت أن طريقة الأغشية تعطى نتائج مساوية أو أكثر من طريقة PP.

- اختيار البيئة يؤثر بشدة على أعداد البكتريا بالاضافة الى حرارة التحضين وحتى مصدر المياه.
- وباستعمال بيئة m-SPC(والتى تسمى الآن m-HPC) كانت طريقة MF أفضل من طريقة PPلاستخلاص البكتريا من مياه شرب معالجة بالكلور، ولكن ليس هناك اختلاف معنوى بين الطريقتين عند تحليل المياه الخام .

- عند ٢٨ أو ٢٠ درجة مئوية كحرارة تحضين فان طريقة أغشية الترشيح وباستعمال بيئة m-HPC أو R2A تحصل على نتائج لاعداد البكتريا أعلى من استخدام طريقة PP القياسية وذلك عند تحليل مياه الشرب.

- عند درجة ٣٥ مئوية ، كانت نتائج m-HPC مساوية أو أكبر قليلا من نتائج طريقة PP.

*طريقتى SPC , MF وباستخدام بيئتى m-HPC agar and R2A agar لعد البكتريا فى مياه الشرب ووجد أن طريقة PP تستخلص فقط ٨٠ % من البكتريا فى حين أن طريقة MF تستخلص ١٠٠% من البكتريا سواء باستعمال أى من بيئتى m-HPC or R2A

- البيئات ودرجة حرارة وزمن التحضين: عد الأطبق عند ٣٧ مئوية يعتقد أنه يعطى مؤشر عن وجود البكتريا سريعة النمو وتميل الى أنها تنتمى الى النوعيات المرضية والتى ربما تتواجد فى التلوث بمخلفات الصرف الصحى. فى حين أن عد الأطباق Plate count عند ٢٠ مئوية استعمل لعد البكتريا التى تميل الى النشأة البطيئة.

- وبادراك الحاجة لطريقة أغشية الترشيح لتقدير البكتريا فى المياه من نظام التوزيع أدى الى نشأة بيئة، . agar (m-HPC mSPC)

- الرغبة فى تعظيم استخلاص البكتريا وذلك لوضع صورة للبكتريا المتوقع تواجدها فى مياه الشرب المعالجة ادى الى نشأة بيئةR2A

- وعلى عكس بيئة عد الأطباق القياسية Standard plate count media وبيئة m-HPC فان بيئة R2A هى بيئة منخفضة فى محتواها من المغذيات وذلك بالنسبة لتركيز كل مكون من مكوناتها وكذلك المحتوى الكلى، ولكن بها مكونات كثيرة مختلفة من المغذيات.

- طول مدة التحضين عامل هام بالنسبة لبيئة R2A؛ بسبب محتواها من التركيزات المنخفضة من المغذيات، البكتريا فى مياه الشرب تميل الى النشوء أكثر بطئا.

- التحضين لمدة ٥ – ٧ أيام عند ٢٠ أو ٢٨ درجة مئوية تعطى أعلى أعداد من البكتريا على تلك البيئة.

- التحضين عند ٣٥ درجة مئوية يعطى أعداد بكتريا أقل من أى من ٢٨ أو ٢٠ درجة مئوية بصرف النظر عن البيئة المستخدمة.

- تأثير حرارة التحضين وجد أنها هامة جدا للحصول على أقصى أعداد من البكتريا باستعمال أى بيئة .

- اطالة فترة التحضين يصاحبها زيادة فى أعداد البكتريا الهتيروتروفية.

- أقل أعداد من البكتريا يتحصل عليهاعند التحضين على ٣٥ درجة مئوية.

- التحضين على درجة ٢٠ مئوية أعطى أعلى الأعداد على كل البيئات عندما طالت مدة التحضين الى ١٢ – ١٤ يوم. الا أن العدد عند ٢٨ مئوية كان أعلى عن العدد على ٢٠ درجة مئوية من اليوم الثانى الى اليوم السادس .
- ان أفضل بيئة هى R2A مع التحضين على ٢٨ درجة مئوية لمدة ٧ أيام ذلك بالنسبة لتحليل مياه الشرب.
- وفى انجلترا، فان الطريقة القياسية لعد البكتريا الهتيروتروفية هى PP باستعمال بيئة آجار مستخلص الخميرة Yeast extract agar (YEA) والتحضين عند ٢٠- ٢٢ مئوية لمدة ٣ أيام.

- بمقارنة العد بعد ٣ أيام بنظيره بعد ٧ أيام تحضين وجد أن بيئة R2A أعطت ٤ أضعاف أعلى فى العدد عند ٣ أيام، ٨ أضعاف أعلى فى العد عند ٧ أيام من نظيرها بيئة YEA
- طريقة SP أعطت ٧ أضعاف ما أعطته طريقة PP عند كلا من ٣ ، ٧ أيام،
- أعطت بيئة R2A بطريقة SP ٩٣ ، ٢٧ ضعف ما ظهر على بيئة YEA بطريقتى PP و SP على الترتيب.

- استخدام R2A بطريقة SP مع التحضين لمدة ٧ أيام أعطت أعداد ٥٢٠ ضعف أعلى مما ظهر على بيئة YEA وباستخدام PP والتحضين ٣ أيام

- أن طريقة الاختبار فى انجلترا تعطى أعداد قليلة جدا مما قد يخل بقواعد الصحة العامة والتى ترتبط بأعداد البكتريا الهتيروتروية فى مصادر المياه ويجب مراجعة الطريقة المتبعة.

ولا توجد طريقة ولا ظروف تسمح بالحصول على كل أعداد البكتريا التى ربما تتواجد فى المياه .

على الرغم من عد الأطباق يمثل فى أحسن الظروف جزء صغير من كل البكتريا فانه من الأفضل استعمال البيئة التى تعطى أعلى الأعداد لأن أى زيادة فى الجزيئية التى يتم احصائها يزيد من حساسية الطريقة.

*على الرغم من عد الأطباق يمثل فى أحسن الظروف جزء صغير من كل البكتريا فانه من الأفضل استعمال البيئة التى تعطى أعلى الأعداد لأن أى زيادة فى الجزئية التى يتم احصائها يزيد من حساسية الطريقة

استخدام مراقبة البكتريا الهتيروتروفية

عمليات المعالجة

نسب الازالة بالنسبة للمياه الخام (صفر%)؛ تخزين المياه الخام (٥٠ %)؛ التجلط والترسيب (٦٢%)؛ الترشيح الرملى السريع (٩٦%)؛ والتطهير (٩٩% أو أكثر).

- استخدم Cummins and Nash (1979) طريقة الأطباق المصبوبة (PP) القياسية مع التحضين على ٣٥ مئوية لمدة ٤٨ ساعة. وعند استعمال الكلور مع المياه الخام قبل الترويق، انخفض عدد البكتريا الهتيروتروفية فى المنتج النهائى من المياه بمقدار ٨٧,١ %. وعند معالجة المياه الخام المخزنة بالكلور سجل انخفاض مابين ٩٨,٧% و ٩٩%.
- وفى النهاية عند استخدام الكلور ما بين الترويق والترسيب، أو بين التجلط والترسيب والترشيح وجد انخفاض ٩٩,٦% و أكبر من ٩٩,٩٨ % على الترتيب.

* أن المعالجة المبدئية للمياه باستعمال الرمل الخشن ومعدل الترشيح السريع تسبب فى ازالة ٥٠ – ٨٠ % من عدد البكتريا (تحضين عند ٣٧ درجة مئوية) بينما الترسيب البسيط أزال حوالى ٥٠%.

*مصدر المياه يلعب دورا فى استعادة نمو Regrowthالبكتريا فى نظام التوزيع فور فقدان الكلور الحرالمتبقى.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

التخزين والتوزيع

التغيرات فى النوعية البكتريولوجية للمياه المعالجة من وقت دخولها نظام التوزيع حتى وصولها الى المستهلك يمكن تقديرها من خلال استعمال برنامج مناسب لجمع العينات والتحليل للبكتريا الهتيروتروفية HPC.

التغيرات ربما تسبب مشاكل فى الناحية الجمالية Aesthetic للمياه والتى تشمل نشوء الطعم والرائحة، تلون المياه، النمو اللزج، المشاكل الاقتصادية والتى تشمل التآكل فى المواسير وتحلل المواد.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

***أعداد البكتريا تميل الى الزيادة خلال التوزيع وكثافة أعدادها تتأثر ببعض العوامل تشمل النوعية البكتريولوجية للمياه النهائية والتى تدخل نظام التوزيع، الحرارة، مدة البقاء، والمغذيات المتاحة.**

***تواجد البكتريا الملونة Pigmented bacteria فى المياه الخام، المياه خلال مراحل المعالجة ونظام التوزيع.**

*** كلا من بيئتى m-HPC and R2A أظهرا أعداد من البكتريا الهتيروتروفية، وتشمل البكتريا الملونه، أكبر من طريقة Standard PP. وكان التحضين لمدة ٧ أيام هو الأقدر على اظهار البكتريا الملونه.**

* وجد أن هناك علاقة مابين العكارة ومحتوى المياه من البكتريا HPC فعندما تكون العكارة أكبر من 5 NTU تزيد الأعداد فى مياه الشبكات ما بين ١ – ٣ لوغاريتم .

وبتصنيف البكتريا المتواجدة فى الشبكات وجد أن أكثر من ٣٠% منها تنتمى للبكتريا الانتهازية Opportunistic pathogens وحوالى ٣٥ % مضادات Antagonistic لبكتريا القولون. واستنتج أن تقدير أعداد بكتريا HPCمفيد ليدل على وجود البكتريا الانتهازية ، تثبيط بكتريا القولون ، التدهور فى خواص مياه الشرب.

* وجدت Olson and Hanami (1981) وباستعمال Plate count agar وبطريقة SP والتحضين عند ٣٥ مئوية لمدة ٤٨ ساعة أن هناك اختلافات موسمية فى عدد البكتريا الهتيروتروفية وأن الأجناس الشائعة تختلف ما بين المصدر ونقط أخذ العينات من نظام التوزيع وأن العوامل المؤثرة فى تلك الاختلافات قد تكون عوامل طبيعية وكيمائية فى خط التوزيع.

الأجناس الشائعة فى نظام التوزيع مع استعمال الكلور كانت Acinetobacter, Pseudomonas/Alcaligenes, and Flavobacterium.

وحيث لا يستعمل الكلور وجد أن الأجناس الشائعة هى Pseudomonas/Alcaligenes, Acinetobacter, Flavobacterium and Klebsiella.

يجب التفرقة ما بين استعادة النمو Regrowth وهو النمو الناتج عن البكتريا المضارة والحية Injured bacteria من تأثير الكلور أو تلك التى فى حالة سكون Dormancy والتى هى ليست نشطة أو ميته ، أما After growth فهو النمو الناتج عن انفصال البكتريا المعلقة على سطح مواسير التوزيع فى المياه الموزعة .

* وجدت البكتريا الهتيروتروفية بأعداد أقل فى شهور الصيف عن شهور الشتاء (عكس المتوقع) فان ذلك قد يرجع الى زيادة جرعة الكلور المستخدمة صيفا للوقاية من أمراض الصيف

gtz Partner for the Future. Worldwide.

*الفيلم الحيوى ونمو البكتريا على مواد الانشاء

النمو الميكروبى المصاحب لسطوح الخزانات Basins ومواد الانشاءات الأخرى المستعمله فى عمليات المعالجة ومواسير التوزيع ونظم السباكة فى المنازل Household plumbing systems قيمت باستعمال طرق عد البكتريا الهتيروتروفية. وكذلك استعمل عدد البكتريا الهتيروتروفية فى الدراسات البكتريولوجية لأوساط التآكل.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

*البكتريا المكونة للفيلم الحيوى أو الموجودة داخله والملتصقة بالأسطح (كربون منشط – شرائح معدنية) أصعب فى القضاء عليها من البكتريا الحرة وأن الكلورامين (Monochloramine)أقوى فى تأثيره من الكلور الحر أو ثانى أكسيد الكلور Chlorine dioxide .

*ولقد وجد أن امرار مياه محتوية على البكتريا الهتيروتروفيه فى مواسير من PVC وأخرى من الصلب منخفض الكربون فان مياه المواسيرالمصنعة من PVC احتوت على بكتريا بكثافة أكبر من تلك الناتجة من مواسير الصلب.

طرق تقدير العدد الكلى للبكتريا الهتيروتروفية فى المياه

Total Bacterial Count
Standard Plate Count (SPC)
Total Viable Bacterial Count
Heterotrophic Plate Count (HPC)

*يتم تقدير التغيرات خلال مراحل معالجة مياه الشرب المختلفة بالاضافة الى التغيرات التى من الممكن أن تحدث فى نوعية المياه خلال نظام التوزيع Distribution.

*Colony forming units (CFU).

*تختار التوليفة من الطريقة والبيئة التى تنتج أقصى عدد من المستعمرات من خلال التحضين على أنسب درجة حرارة وللفترة الزمنية المناسبة لذلك.

*وللمقارنة بين كفاءة خطوات المعالجة المختلفة يستعمل نفس الطريقة والبيئة.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

اختيار الطريقة Selection of Method

يجب الأخذ فى الاعتبار أن الطرق التى تستخدم فى تقدير العدد الكلى للبكتريا والتى سيرد ذكرها، وعلى تعددها، لا تنجح فى تنمية واظهار العدد الحقيقى للبكتريا المتواجدة فى عينة المياه المختبرة لعدة اعتبارات

* من أهم تلك الاعتبارات، عدم إمكانية توفير الظروف التى تلائم نمو وتكاثرجميع نوعيات البكتريا من حيث التغذية والاحتياج للأكسوجين بالاضافه الى حرارة ومدة التحضين .

gtz Partner for the Future. Worldwide.

*تحت أحسن الظروف فان ما يتم تقديره من أعداد لا يزيد عن ثلث العدد الحقيقى الموجود فى العينه المختبره.

*الاهتمام يكون مركز على عدد البكتريا الحيه ولا يدخل هنا ما يشمله العدد فى بعض الطرق من بكتريا غير حيه.

*ومن المفروض أنه لمعرفة محتوى العينه من البكتريا أن يستبعد أى عامل آخر قد يمثل مصدرا اضافيا خارجى لأعداد من البكتريا، لذلك يراعى أن تكون جميع الأدوات المستخدمة فى التقدير معقمه.

*طريقة الأطباق المصبوبة Pour plate method

*تستوعب حجم من العينة الأصلية أو تخفيف منها يتراوح ما بين ١، ملل الى ٢ ملل . المستعمرات الناتجة صغيرة نسبيا ومضغوطة، وميل المستعمرات الى التعدى على بعضها أقل عن طريقة الزرع على سطح الأطباق Surface growth

*ومن ناحية أخرى فان المستعمرات المغموسة تنمو ببطيء ومن الصعب نقلها وهذا يمثل أحد عيوب الطريقة .

*وهنا حاجة ماسة الى حمام مائى ذا ثرموستات لتلطيف حرارة البيئة Tempering وعلى الرغم من ذلك فامكانية حدوث صدمة حرارية للبكتريا الموجودة فى العينة قائمة وتتسبب فى اضرار للخلايا Injury.

*طريقة الفرد على الأطباقSpread plate method

* جزء من العينة او تخفيف منها على سطح البيئة.

*لا يحتمل أن يحدث منها صدمة حرارية للخلايا والمشار اليها فى الطريقة السابقة، والمستعمرات تتكون على سطح البيئة فى الطبق والتى يمكن تمييزها بسهولة عن فقاعات الهواء والشوائب التى قد تتواجد فى البيئة وتتداخل أو تعيق العد.

*والمستعمرات الناتجة على سطح البيئة هنا يمكن نقلها بسرعة وسهولة الى أى بيئات أخرى لاجراء مزيد من الاختبارات عليها، وطبيعة المستعمرة من حيث الشكل يمكن ملاحظته ومقارنتها بالأوصاف المنشورة

وما يحد استعمال تلك الطريقة هو صغر حجم العينة أو التخفيف منها الممكن استعماله (١، - ٥،.ملل) والذى يحدده قدرة البيئة المستعملة والمحدودة على الامتصاص والتى تتوقف على درجة جفاف البيئة.

ولاتباع هذه الطريقة يلزم توفير البيئات التى ستسعمل وتكون سابقة التجفيف وبالتالى يكون لها القدرة على امتصاص أكبر للعينة المختبرة .

*طريقة أغشية الترشيح Membrane filter method

تتيح طريقة الترشيح بالأغشية اختبار حجوم كبيرة من المياه المنخفضة فى العكارة وهى الطريقة المختارة فى حالة المياه المنخفضة فى محتواها من البكتريا (أقل من ١ الى ١٠٠ وحدة تكوين المستعمرات / ملل (CFU/ml).

- وهذه الطريقة لا ينتج عنها صدمة حرارية ولكن تضيف الى تكاليف اجراء للاختبار ثمن غشاء الترشيح. ومن العيوب الأخرى صغر المساحة المتاحة لنمو المستعمرات، الحاجة الى ضوء منعكس حتى يمكن رؤية المستعمرات على خلفية بيضاء اذا لم يستعمل فلتر ملون أو صبغة، امكانية تلف الخلايا بالضغط الزائد وكذلك امكانية وجود فروق فى نوعية المرشحات.

- الأدوات العامة اللازمة للتقدير
- منطقة العمل Work area
- العينات Samples

تحضير العينة Sample preparation

* تحضر الأطباق المعقمة
* يكتب عليها رقم العينة، التخفيف، التاريخ وأي بيانات أخرى قبل التحليل.
* يحضر على الأقل طبقان معقمان من الزجاج (٦٥ سم٢) أو بلاستيك (٥٧ سم٢) لكل تخفيف سيتم اختباره.
* تخلط العينة أو تخفيفاتها جيدا ٢٥ مرة الى أعلى والى أسفل أو الى الأمام والخلف.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

المواد اللازمة للتقدير

* البيئة المستخدمة فى التقدير يجب أن تكون طبقا للطرق القياسية الحديثة وليس طبقا لما هو متوافر من البيئات فى السوق المحلى كما يجب أن يكون الاختيارطبقا لما أشير اليه من بيئات تعطى أعداد حقيقية (عالية) وذلك طبقا لبرنامج QC/QA .

gtz Partner for the Future. Worldwide.

1. Plate count agar

(tryptone glucose yeast agar)

وكانت شائعة الاستعمال فى الماضى. وهذه البيئة لا ينصح باستخدامها الا فى حالة استكمال عمل سابق مثل بحث أو لعمل دراسات مقارنه مع البيئات الأخرى. وذلك لأنها تعطى أعداد من البكتريا أقل من تلك التى تظهر على البيئات المنخفضة فى محتواها من المغذيات

٢. بيئة m-HPC agar

وهى تستخدم فقط مع طريقة أغشية الترشيح Membrane Filter method.

٣. البيئات المنخفضه فى محتواها من المغذيات

أ-بيئة R2A agar

يمكن استخدامها مع جميع الطرق المستخدمة فى تقدير العدد الكلى للبكتريا.

ب-بيئة NWRI agar or Heterotrophic Plate Count Agar (HPCA)

يمكن استخدام هذه البيئة مع جميع طرق تقدير العد الكلى للبكتريا .

* أغشية الترشيح Membrane filter

* محاليل التخفيف Dilution solutions

١ . ماء منظم Buffer water

٢ . ماء الببتون Peptone water

gtz Partner for the Future. Worldwide.

لحقن الأطباق المعدة

يوضع بها حجم من العينة باستخدام ماصة يدويه أو أوتوماتيكيه بحيث يعطى بعد التحضين ما بين ٣٠ – ٣٠٠ مستعمرة فى الطبق. وقد يلجأ الى تخفيف العينة تخفيفات متتاليه مع استخدام أكثر من تخفيف فى حقن الأطباق وذلك للحصول على العدد فى الحدود المذكوره.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

فى المعتاد لا يستخدم اكثر من ٢ ملل من العينه، على أنه فى حالة الحصول على أقل من ٣٠ مستعمرة باستخدام ٢ ملل من العينه يكتب العدد المتحصل عليه فعلا بصرف النظر عن القاعدة المذكوره (٣٠-٣٠٠).

اذا لم يتواجد طبق يعطى ما بين ٣٠-٣٠٠ مستعمره وتواجد طبق أو أطباق أكثر من ٣٠٠ مستعمرة فتستعمل فى تسجيل النتيجه العد فى الأطباق ذات العدد الأقرب ما يمكن الى ٣٠٠ مستعمره.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

•التحضين Incubation

للتطابق مع برنامج حماية البيئة الأمريكية فى أعمال المراقبة فان تحضين الأطباق يجب أن يتم عند ٣٥ مئوية لمدة ٤٨ ساعة.

والا فيختار زمن ودرجة حرارة التحضين طبقا لما هو موافق عليه لمراقبة التغيرات فى نوعية المياه. أعلى أعداد يتحصل عليها بالتحضين عند ٢٠ الى ٢٨ مئوية بعد ٥ الى ٧ أيام.

خلال فترة التحضين حافظ على الرطوبة داخل الحضانة بحيث لا يكون هناك فقد فى رطوبة البيئة فى الأطباق أكثر من ١٥ %.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

* عد وتسجيل النتائج Counting and Recording

تعد جميع المستعمرات على الأطباق المختارة

فى حالة الاضطرار الى تأجيل عملية العد، تحفظ الأطباق عند درجة ٥ – ١٠ مئوية لمدة لا تزيد عن ٢٤ ساعه.

وكذلك تسجل نتائج الأطباق المرجعية Control للتعقيم

gtz Partner for the Future. Worldwide.

$$CFU/mL = \frac{\text{colonies counted}}{\text{Actual volume of sample in dish, mL}}$$

gtz Partner for the Future. Worldwide.

*يتم عد المستعمرات الناتجة اما يدويا وباستعمال وسيلة تكبير موافق عليها

*الطبق الأمثل يجب أن يحتوى ما بين ٣٠ – ٣٠٠ مستعمرة فى الطبق

*فى حالة الحصول على أقل من ٣٠ مستعمرة باستخدام ٢ ملل من العينه يكتب العدد المتحصل عليه فعلا بصرف النظر عن القاعدة المذكوره (٣٠-٣٠٠). بهذا الاستثناء .

* اذا لم يتواجد طبق يعطى ما بين ٣٠-٣٠٠ مستعمره وتواجد طبق أو أطباق أكثر من ٣٠٠ مستعمرة في

*استعمل فى تسجيل النتيجه العد فى الأطباق ذات العدد الأقرب ما يمكن الى ٣٠٠ مستعمره .

*اذا لم تعطى الأطباق من جميع التخفيفات المختلفة المستعمله أية أعداد من البكتريا تكتب النتيجه أقل من واحد مقسوما على التخفيف فمثلا اذا كان حجم العينه المستخدم ٠.٠١ ملل تكتب النتيجه أقل من ١٠٠ وحدة تكوين مستعمرة CFU /ملل.

*اذا زاد العدد فى الطبق كثيرا عن ٣٠٠ مستعمره لا تكتب النتيجة أعداد كبيره لا تعد (TNTC) "To numerous to count".

* تعد المستعمرات فى سم٢ من الطبق فاذا كانت أقل من ١٠ / سم٢ تعد المستعمرات فى ١٣ مربع تكون ممثله لتوزيع المستعمرات فى الطبق (٧ مربعات عبر الطبق أفقيا، ٦ مربعات عبر الطبق رأسيا مع الحرص فى عدم قراءة العدد فى مربع واحد مرتان) ويضرب حاصل الجمع فى ٥ اذا كانت مساحة الطبق ٦٥ سم٢ (الأطباق الزجاجية) ، ويحسب العدد على أساس أن مساحة الطبق ٥٧ سم٢ فى حالة استعمال أطباق بلاستيك.

*عندما يزيد عدد المستعمرت عن ١٠ مستعمرات /سم٢ تعد ٤ مربعات ويحسب المتوسط فى سم٢ ويضرب فى عامل مناسب لحساب المستعمرات فى الطبق. هذا العامل هو ٦٥ فى حالة استعمال الأطباق الزجاجية ، ٥٧ فى حالة استعمال الأطباق البلاستيكية.

*عندما تكون الأطباق مزدحمة بالمستعمرات ويكون العدد أكبر من ١٠٠ مستعمرة فى سم٢ ، تسجل النتيجة أكبر من ٦٥٠٠ مقسومة على أقل حجم من العينة مستعمل فى حالة استعمال الأطباق الزجاجية أو أكبر من ٧٥٠٠ مقسومة على أقل حجم استعمل من العينة فى حالة الأطباق البلاستيك.

* تعد المستعمرات المنتشرة على أنها مستعمرة واحدة فى الحالات التالية:
سلسلة من المستعمرات والتى تظهر كأنها ناشئة من تفتيت تجمع من البكتريا Bacterial clump والتى يكون فيها الآجار مختلطا مع العينة .

* المستعمرة التى تنشأ على صورة فيلم من المياه عند الحافة أو على سطح الآجار. الحالتان الأخيرتان تنشا عن تجمع الرطوبة عند نقطة منها ينشأ الانتشار. كثيرا ما تغطى أكثر من نصف الطبق وتعيق الحصول على عدد حقيقى.

* تعد كمستعمرات منفردة المستعمرات التى تكون متجاورة جدا ولكنها ليست متلامسة، على ان تكون المسافة بينها على الأقل مساوية لقطر أصغر مستعمرة.

* عد المستعمرات المتلامسة التى تختلف فى المظهر، مثل الشكل أو اللون كمستعمرات منفردة.

* اذا احتوى الطبق على نمو مبعثر أكتب فى التقرير Spreader (Spr). وعندما تكون الأطباق لا يمكن عدها لأنه لم يتم الوصول الى التخفيف المناسب

* سقوط الأطباق، تلوث، أو أن الأطباق المرجعية Control أظهرت أن البيئة ملوثة أو أن التعقيم لم يتم بنجاح يكتب فى التقرير Laboratory accident (LA).

طريقة أغشية الترشيح Membrane filter method

* عد المستعمرات على أغشية الترشيح باستعمال ستريوسكوبيك ميكروسكوب Stereoscopic microscope بقوة تكبير ١٠ الى ١٥ مرة. يفضل وضع الطبق مائل بزاوية ٤٥ درجة على مسرح الميكروسكوب

أفضل كثافة للمستعمرات على غشاء الترشح ٢٠ الى ٢٠٠. اذا كانت المستعمرات صغيرة ولكنها ليست مزدحمة فان حدود أكبر من السابقة تعتبر مقبولة.

عد كل المستعمرات على غشاء الترشيح عندما يكون هناك أقل أو يساوى مستعمرتان فى المربع. وعندما يكون هناك ما بين ٣ الى ١٠ مستعمرات فى المربع عد ١٠ مربعات واحصل على المتوسط لكل مربع.

أما اذا كان هناك ١٠ الى ٢٠ مستعمرة فى المربع عد ٥ مربعات واحسب المتوسط / المربع. يضرب المتوسط X ١٠٠ ويقسم على حجم العينة للحصول على العدد / ملل.

واذا كان هناك أكثر من ٢٠ مستعمرة فى المربع يكتب العدد أكبر من ٢٠٠٠ ويقسم على حجم العينة. يكتب متوسط العدد بتمييز وحدات تكوين المستعمرات محسوبة.

حساب وتسجيل الأعداد

Computing and Report-ing Counts

* Colony –forming units (CFU)

*لحساب عدد البكتريا لهتيروتروفية CFU/ml، يقسم العدد الكلى للمستعمرات أو المتوسط (اذا تم عمل طبقان من نفس التخفيف) / طبق بنفس الحجم. سجل حجوم العينة المستعملة وعدد المستعمرات على كل طبق تم عده أو حسابه.

*اذا كان اعدد الناتج مكون من رقمان فيكتب كما هو أما اذا كان ثلاثة أرقام فينظر الى الرقم الثالث اذا كان أقل من ٥ يحول الى صفر واذا كان أكبر من ٥ يحول الرقم الثانى الى العدد الأعلى ويكتب الرقم الثالث صفر فمثلا ١٤٢ تكتب ١٤٠ ، ١٥٥ يحول الى ١٦٠ أما ٣٥ فيكتب كما هو ٣٥.

تحليل التحيز Analytical bias

* يمنع عدم الدقة فى العد بسبب عدم الاهتمام، عدم نظافة أجهزة العد وبالتالى حجب الرؤية، أو عدم امكانية تمييز المستعمرات.

* العملين فى المعمل والذين لا يستطيعون جعل الفروق بين قراءتان من نفس الطبق فى حدود ٥% والفروق نتيجة التحليل بواسطة فرد آخر فى حدود ١٠% عليهم بحث المسببات وازالتها.

طريقة الأطباق المصبوبة Poured Plate Method

العينات وتجهيز العينة

تخفيف العينة

اختار التخفيف على أن يكون العدد الكلى للمستعمرات على الطبق سيكون ما بين ٣٠ – ٣٠٠. مثلا، عندما يكون العدد المتوقع للبكتريا الهتيروتروفية مرتفع الى ٣٠٠٠ حضر الطبق من تخفيف ٢١٠.

بالنسبة لغالبية عينات مياه الشرب، فان الأطباق المناسبة للعد ربما تنتج عن استعمال املل، و ١، ملل من العينة الغير مخففة و١ ملل من تخفيف ٢-١٠.

قياس حجم العينة

*استعمل ماصة معقمة لنقل الأصل والنقلات التالية من كل زجاجة.

*اذا تلوثت الماصة قبل اتمام عملية النقل بدل الماصة بأخرى معقمة.

*استعمل ماصة أخرى للنقل من كل تخفيف.

*لا تقوم بتحضير التخيفات أو تصب الأطباق فى الشمس المباشرة. خذ الحذر عند أخذ الماصة المعقمة من علبة الماصات، ولمنع التلوث، لا تجعل نهاية الماصة تلمس فوهة الماصات الأخرى عند سحبها من علبة الماصات.

* لا تلامس نهاية الماصة لحواف او رقبة زجاجات التخفيف

*عند سحب عينة لا تغمس الماصة أكثر من ٢,٥ سم أسفل سطح العينة فى زجاجة العينة أو التخفيف.

*عند اخراج أجزاء العينة المسحوبة بالماصة، اجعل الماصة بزاوية حوالى ٤٥ درجة وطرف الماصة يلمس قاع الطبق أو داخل رقبة زجاجات التخفيف.

*ارفع غطاء الطبق بدرجة تسمح بادخال الماصة.

*اسمح بثانيتين الى أربعة ثوان ليخرج ما فى الماصة.

*اذا لم تكن الماصة من النوع الذى يخرج كل ما بها طبيعيا، المس بطرف الماصة جزء آخر جاف من قاع الطبق.

* ليس من المفضل أن يكون بالماصة قطعة قطن وينفخ فيها برفق بالفم لانزال ما بها من متبقى.

*عند قياس ١، ملل ، دع العينة المخففة تنساب من الماصة حتى يخرج منها ١و ملل.

* ترفع الماصة بدون أن تلامس الطبق مرة أخرى.

* يوضع الحجم المناسب من العينة أو تخفيفها فى الطبق المعقم قبل اضافة بيئة الزرع المنصهرة .

* لاستعمال أقل من ١و ملل من العينة استعمل سلسلة من التخفيفات ولا تقيس ١، ملل من العينة الأساسية .

* حضر على الأقل مكرران من الأطباق لكل تخفيف مستعمل. بعد وضع العينة أو التخفيف منها فى الأطباق، تصب البيئة واخلط برفق وبحرص. لا يجب أن يمر أكثر من ٢٠ دقيقة ما بين وضع العينة فى الطبق وصب البيئة فى الأطباق على العينة.

اعداد الأطباق Plating

أ-صهر البيئة Melting medium

*لماء يغلى أو تيار من بخار الماء

*تجنب التعريض الغير ضرورى للبيئة لمدة طويلة للحرارة المرتفعة اثناء الصهر أو بعده. لا تعيد تعقيم البيئة.

* اذا تم صهر البيئة على صورة اجزاء استعمل ما تم وصوله لدرجة الانصهار بالترتيب. يتخلص من الآجار المنصهر الذى يحتوى على رواسب.

*تحفظ البيئة المنصهرة فى حمام مائى عند ٤٤ – ٤٦ درجة مئوية حتى وقت الاستعمال، ويفضل أن لا تزيد مدة الحفظ فى الحمام أكثر من ٣ ساعات.

*لا تعتمد على الاحساس باللمس لمعرفة درجة حرارة البيئة المناسبة وذلك عند صب الآجار.

*قبل استعمال لوط جديد من البيئة اختبر مدى مناسبته

صب الأطباق Pouring plates

* حد من عدد الأطباق التى ستعد فى الاطباق بحيث لا يمر أكثر من ٢٠ دقيقة ويفضل ١٠ دقائق ما بين تخفيف العينة وصب الأطباق.

* يصب ما بين ١٠ – ١٢ ملل من البيئة المنصهرة والمحفوظة عند درجة ما بين ٤٤ – ٤٦ مئوية فى كل طبق بفتح غطاء الطبق بدرجة تسمح بصب البيئة فيه.

*بحذر امنع تساقط البيئة خارج وعاء البيئة أو داخل غطاء الطبق أثناء الصب.

*عند صب البيئة من الدورق أو الانبوبة المحفوظة فى الحمام المائى، جففها بورق ماص أو فوطة وسخن فوهة الدورق قبل الصب.

مرجعية التعقيم

*راجع تعقيم البيئة ومياه التخفيف.

*بالنسبة للأطباق ، الماصات، وهواء الغرفة .

التحضين

العد، التسجيل، الحساب والتقرير

gtz Partner for the Future. Worldwide.

طريقة النشر على الأطباق
(الفرد السطحى على الأطباق)
Spread Plate Method

* الأجهزة المعملية
* قضبان زجاجية
* ماصات
* حضانة أو فرن تجفيف
* البيئات

gtz Partner for the Future. Worldwide.

*يصب ١٥ ملل من البيئة المرغوبة فى أطباق بترى معقمة ١٠٠ X ١٥ أو ٩٠ X١٥ ؛ ويترك الآجار ليتصلب.

*ألاطباق المقلوبة والمغطاه سابقة التجفيف يكون الفقد فى الرطوبة خلال الليل ٢ – ٣ جرام .

*استعمل الأطباق سابقة التجفيف فورا عقب تجفيفها أو خزنها الى اسبوعين فى أكياس بلاستيك محكمة الغلق عند ٤ درجة مئوية.

*وبالنسبة للأطباق سابقة التجفيف والمستعملة فى نفس اليوم، صب ٢٥ ملل آجار فى الطبق ويجفف فى كابينة الأمان Laminar flow عند درجة حرارة الغرفة (٢٤ – ٢٦ درجة مئوية) مع رفع الغطاء للحصول على فقد ٢ – ٣ جرام .

الطريقة

التحضين

العد، التسجيل، الحساب، والتقرير

طريقة أغشية الترشيح

Membrane Filter Method

*الأدوات المعملية

*زجاجات العينات

*زجاجات التخفيف

*الماصات والخبار المدرج

*عبوات بيئة الزرع

*الدوارق المخروطية ذات الغطاء المعدنى مع التغطية بورق الومنيوم، أو بالغطاء القلاووظ تسمح بالخلط للبيئة المحتوية عليها ومناسبة للتخزين.

أطباق الزرع Culture dishes

*استعمل أطباق زجاجية من نوع البوروسليكات أو أطباق بلاستيك معقمة، ٦٠ X١٥ مم، ٥٠ X٩ مم، او حجم آخر مناسب. لف عدد مناسب من الأطباق الزجاجية فى ورق الومنيوم (أو علب معدنية) للتعقيم فى الفرن الجاف، أو ورق كرافت قوى عند التعقيم فى الأوتوكلاف.

*حضن الأطباق الغير محكمة الغلق سواء كانت زجاجية أو بلاستيك فى اناء محكم به قطعة قماش أو ورق مبللة لمنع تبخر الرطوبة.

وحدات الترشيح

*يتوافر Pressure differential (kPa) مقداره ٣٤ – ٥١ على غشاء الترشيح

غشاء الترشيح

* ذات ثقوب تمنع مرور كل البكتريا (حسب نوعية البكتريا التى يراد حجزها).

*استعمل الأغشية التى خضعت لاختبارات والمصحوبة بشهادات من المصنع على أنها تحجز كل الكائنات التى يتم زراعتها، والثابته فى الاستعمال.

*خالية من الكيماويات التى يمكن استخلاصها والتى من الممكن أن يكون لها تأثير قاتل على البكتريا ،وينتج عنها سرعة ترشيح مناسبة

* ولا تؤثر معنويا على pH البيئة (+/- ٢، وحدة) ،
* ولا زيادة فى أعداد المستعمرات المدمجة أو المنتشرة مقارنة بأغشية مرجعية.
* استعمل أغشية مقسمة بخطوط ولاحظ أن مادة الخطوط لا تسبب تشجيع أو تثبيط لنمو البكتريا (على نفس الخط) عند وضع الغشاء على البيئة المناسبة مع التحضين.
* يفضل استعمال أغشية حديثة الصنع واذا اضطررت الى التخزين فان المكان لا يجب أن يكون مرتفع الحرارة أو الرطوبة .

* ولا تخزن أكثر من سنه وبالتالى فام طلبك يكون بناء على الاستهلاك لمدة عام.

* ويفضل الأغشية سابقة التعقيم وتكون وسيلة التعقيم لا ينتج عنها سمية أو تؤثر على الخواص الكيميائية أو الطبيعية للأغشية (بشهادة من المنتج). واذا كان التعقيم يتم فى المعمل فانه يتم فى الأوتوكلاف عند ١٢١ مئوية ولمدة ١٠ دقائق.

* فى نهاية فترة التعقيم يفرغ البخار بسرعة للحد من تكثف البخار على الأغشية.

الوسادات الماصة

الميكروسكوب ومصدر الاضاءة

البيئات

تجهيز الأطباق

*اختار حجم العينة الذى ينتج عنه ما بين ٢٠ – ٢٠٠ وحدات تكوين المستعمرة Colony forming units على الغشاء جميعه.

الطريقة Procedure

رشح الحجم المناسب خلال غشاء معقم بقطر ٤٧ مم وثقوب Pores بقطر ٤٥، ميكرون ومقسم بخطوط، تحت تفريغ. اغسل القمع بمقدار ٢٠ – ٣٠ ملل ٣ مرات متتالية من ماء التخفيف المعقم. ضع الغشاء على البيئة فى كبق البترى.

التحضين Incubation

*ضع الأطباق فى صندوق محكم أو أكياس بلاستيك بها فوطة ورقية مبللة.

*حضن عند ٣٥ +/- ٢و درجة مئوية لمدة ٤٨ ساعة فى حالة استعمال بيئة m-HPC agar أو عند ٢٠ – ٢٨ درجة مئوية لمدة ٥ – ٧ أيام فى حالة استعمال بيئة R2A agar or NWRI

gtz Partner for the Future. Worldwide.

العد، التسجيل، الحساب، والتقرير

gtz Partner for the Future. Worldwide.

العد الكلى المباشر للميكروبات
Direct Total Microbial Count
Epifluorescence Microscopic Method

*هذه الطريقة تعطى عد مباشر للعدد الكلى بسرعة (٢٠ – ٣٠ دقيقة) وبحساسية.

* لا تسمح بالتفرقة بين خلايا البكتريا على أساس التقسيم، نشاط التمثيل الغذائى، أو الحيوية، ولا يمكن تقدير الكتلة Biomass للاختلافات الكبيرة فى حجم الخلايا.

*الطريقة تحتاج الى خبرة الفنى الذى يستطيع التفرقة ما بين الخلايا الميكروبية والرواسب على أساس الشكل.

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

الأجهزة Apparatus

ميكروسكوب Microscope

*مصدر للأشعة الفوق بنفسجية رأسى بحقل مستوى، عدسة زيتية X ١٠٠ لتعطى قوة تكبير كلية X ١٠٠٠ على الأقل.

*عينية للعد Counting graticule

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

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

. خلاط أو جهاز فورتكس Blender or vortex mixer

وحدة ترشيح Filtration unit مناسبة للاستعمال بأغشية ترشيح قطر ٢٥ مم.

أغشية ترشيح Membrane filters من نوع البولى كربونات قطر ٢٥ مم، قطر الثقوب ٢، ميكرون (يكون غير متوهج Nonfluorescent أو يجهز بغمس الغشاء فى [Irgalan black ٢ جرام /اللتر من ٢% حامض خليك] لمدة ٢٤ ساعة .

ويغسل فى الماء ويجفف هوائيا) ؛ سليولوزى قطر ٢٥ مم، قطر الثقوب ٥ ميكرون.

سرنجات Syringes 3ملل لا يعاد استعمالها ويركب عليها فلاتر ٢، ميكرون ولا يعاد استخدامها أيضا.

أنابيب اختبار Test tubes زجاجية بغطاء قلاووظ ١٣ X ١٢٥ مم.

الدلائل أو الكشافات Reagents

* محلول فوسفات منظم Phosphate buffer أذب ١٣,٦ جرام KH2PO4 فى ماء وخفف الى ١ لتر . أضبط عند pH 7 ؛ رشح خلال غشاء ترشيح ٢، ميكرون.

* مثبت Fixative ٥% (وزن/حجم) جلوتارلدهيد فى محلول فوسفات منظم محضر حديثا.

*فلوركروم FDluorochrome ١ ، % (حجم/ وزن) اكريدين برتقالى فى محلول فوسفات منظم .

زيت للعدسة الزيتية منخفض التوهج Immersion oil, low fluorescing

الطريقة

* اجمع العينات.

* أضف ٩ ملل من العينه الى انبوبة اختبار محتوية علة ١ ملل مثبت.

العينة المثبته يمكن تخزينها عند ٤ مئوية حتى ٣ أسابيع بدون نقص معنوى فى أعداد الخلايا.

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

* اخلط عينه باستعمال خلاط أو فورتكس، وخفف ١/١٠ فى محلول فوسفات منظم.

* عينات المياه النقية ربما لا تحتاج الى تخفيف ولكن الحجوم الكبيرة (أكبر من ١٠٠ ملل) ربما يحتاج اليها للحصول على أعداد حقيقية.

* ضع ١ ملل من العينة أو تخفيف منها على مرشح بولى كربونات غير متوهج no fluorescent مدعم بغشاء سليولوزى Cellulosic membrane filter فى Filter holder

* باستعمال فلاتر تركب على سرنجة، أضف ١ ملل فلوركروم وانتظر دقيقتان.

* أضف حوالى ٣ ملل محلول منظم من الفوسفات المرشح للسماح بتوزيع أكثر للخلايا، وكبديل، اخلط الفلوركروم مع العينة فى انبولة صغيرة.

* اسمح بالتفاعل، أضف الخليط الى Filter holderرشح بالتفريغ (حوالى ١٣ kPa) .

* اغسل باستعمال ٢ ملل من الفوسفات المنظم ورشح.

* أزل مرشح البولى كربونات بملقط وجفف هوائيا لمدة ١ – ٣ دقيقة.

* يمكن قطع الفلتر الى ٤ أجزاء ويحفظ اذا لزم.

* ضع الفلتر المجفف على نقطة من الزبت Immersion oil على شريحة ميكروسكوب نظيفة.
* أضف نقطة صغيرة من نفس الزيت على سطح الفلتر.
* بلطف غط الفلتر بغطاء شريحة Cover. يمكن تخزين العينة بضع شهور بدون فقد للتوهج Fluoresence.
* اختبر على الأقل ١٠ مجالات عشوائية مختارة على الفلتر باستعمال ١٠٠ (اذا لم تكن توزيع الخلايا منتظم خفف العينة Xعدسة زيتية وعاود الخطوات).
* يفضل عد ١٠ – ٥٠ خلية فى المجال. عد الخلايا فى ٢٠ مربع على الأقل باستعمال عدسة عينية مقسمة .

Calculations الحسابات

احسب المتوسط لاعداد الخلايا على الفلتر.

عدد الخلايا/ملل=

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

استخدام كشافات التلوث الميكروبية لتقييم سلامة المياه

* ظهرت الحاجة إلى تقدير صلاحية المياه للشرب منذ عام ١٨٥٥ عندما تم الربط بين ظهور وبائي حمى التيفويد والكوليرا وتلوث المياه بالمخلفات البرازيه.

* لتأكيد أن نوعية المياه مقبولة من ناحية الصحة العامة، اصبح من الضروري إيجاد طرق بسيطة تعطى نتائج حقيقية وفى نفس الوقت سريعة للكشف عن وتنمية الميكروبات المرتبط تواجدها بالتلوث البرازي.

•إذا أخذ في الاعتبار أن الممرضات:

ليس من السهل الكشف عنها أو زراعتها روتينيا فهى تحتاج الى خبرة عالية لتمييزها وتأكيد تواجدها.

ولو أضفنا الى ذلك الحاجة الى وقت طويل للكشف عنها كما أن فرصة حدوث عدوى بها أثناء التعامل معها قائما.

* كل ذلك يؤيد أنه ليس من الممكن أن يوصى باستخدام الميكروبات المرضية للكشف عن سلامة مياه الشرب.

• على ذلك ظهرت وتطورت طرق لتقدير تواجد كائنات برازيه أخرى، بحيث اذا غابت تلك الكائنات التى أطلق عليها الكشافات أو الأدلة، فان احتمال تواجد الكائنات المرضية فى المياه يكون بسيط. هذا المفهوم للكشاف أو الدليل الميكروبى "Indicator organism" ادخل عام ١٨٩٢ والآن هو أساس وضع المعايير الميكروبية للمياه.

• ولازال هناك حالات وبائية معوية وكذلك أمراض انتهازيه "Opportunistic diseases" ناشئة عن ميكروبات متولدة عن المياه "Water-borne microorganisms" بين الشعوب المتقدمة والتى تستخدم تكنولوجيات متقدمة فى المعالجة وبرامج للاختبار معقده.

- وغياب الكشاف الميكروبى لا يعنى غياب البكتريا الانتهازية أو الفيروسات بصفة قاطعة كذلك الأوليات الطفيلية مثل الجيارديا "Giardia lamblia"والكربتوسبوريديم "Cryptosporidium"، والتى ربما هى أكثر مقاومة للتطهير.

- خصائص نوعية المياه الأخرى مثل العكاره يجب أن تراقب لتاكيد سلامة مياه الشرب.

الكشافات أو الأدلة الميكروبية "Indicator Organisms"

الدليل "Indicator" يلزم أن تتوافر فيه عدة خصائص:

1. يلزم أن يرتبط تواجده بصفة دائمة مع تواجد الكائنات المرضية المعوية.

2. يلزم ان تتواجد بأعداد أكبر من الممرضات.

3 .يجب أن تكون أكثر مقاومة للمؤثرات البيئية المثبطة ويمتد بقائها فى المياه لمدة أطول من الممرضات.

4. يجب أن لا تتكاثر فى البيئة.

5 . يجب أن تتواجد طرق بسيطة، يعول عليها وغير مكلفة للكشف، تنمية وتصنيف الكائن المستخدم ككشاف أو دليل

بكتريا القولون كدليل على التلوث

فى عام ١٨٨٥، اكتشف ايشيرش (T.Escherich) جنس من البكتريا يتواجد عالميا فى المواد البرازية الآدميه.

(Escherichia coli)

بكتريا القولون تنتمى عائلة (Enterobacteriaceae)، جميعها بكتريا خلاياها عصوية الشكل، لا تكون جراثيم ، سالبة لصبغة جرام. وهى قادرة على تخمر سكر اللاكتوز عند ٣٥ أو ٣٧ درجة مئوية مع انتاج حامض وغاز والدهيد (Aldehyde) خلال ٢٤-٤٨ ساعة كذلك سالبة للانزيم المؤكسد للسيتوكروم (Cytochrome-oxidase).

*بكتريا محددة من هذه العائلة تنتمى الى أجناس (genera)

ايشيريشيا (Escherichia)، ستروباكتر (Citrobacter)، كلبسيلا (Klebsiella) وانتيروباكتر (Enterobacter) لها القدرة على النمو فى وجود أملاح الصفراء Bile salts أو غيرها من المواد ذات النشاط السطحى (Surface active agents)

اعتمادا على هذه الخصائص، حددت منظمة الصحة العالمية بكتريا القولون على أنها بكتريا عصوية الشكل، لا تكون جراثيم، سالبه لصبغة جرام، قادرة على النمو فى وجود أملاح الصفراء أو غيرها من المواد ذات النشاط السطحى وسالبة لانزيم أكسدة السيتوكروم وقادرة على تخمير سكر اللاكتوز عند ٣٥ أو ٣٧ درجة مئوية مع انتاج حامض، غاز والدهيد خلال ٢٤-٤٨ ساعة (WHO,1985).

•وكمجموعة كشفية، فان عدد بكتريا القولون الحية لا ترتبط دائما بتواجد التلوث.

أعداد بكتريا القولون المرتفعة يمكن أ ن تنشأ من تواجد الكلبسيلا (Klebsiella)، ستروباكتر (Citrobacter) وغيرها من لكائنات التى ليست من اصل برازى والتى ليس من الضرورى أن يكون لها أثر سلبى أو مخاطر على الصحة نتيجة استهلاك تلك المياه.

•وظهرت عديد من الحالات تم فيها عزل ممرضات فى غياب بكتريا القولون أو فى تواجد أعداد منخفضة جدا منها.

• وظهرت حالات وبائية متسببة عن تواجد السالمونيلا و الشيجيلا

(Salmonella typhimurium, Shigella flexneri and Shigella Heidelberg)

فى المياه مع عدم تواجد بكتريا القولون أو تواجدها باعداد قليلة (Dutka,1975; Boring et al.,1971; Muller,1964 and Seligman & Reitler,1965).

*ولقد افترض أن غياب بكتريا القولون يرجع الى الطريقة التى استخدمت وليست هذه هى الحالة الحقيقية للعينة.

- ولأن مجموعة بكتريا القولون الكلية Total coliform هى الدليل الأكثر شمولا حيث تشتمل على الجزء البرازى وكذلك على ايشريشيا كولاى Escherichia coli.
- *ولأن وجود مجموعة بكتريا القولون أتخذ كدليل على عدم اتمام عملية التطهير للمياه كما يجب، فقد اتخذت مجموعة بكتريا القولون الكلية كأساس لمواصفات مياه الشرب فى الولايات المتحدة ومعظم الدول المتطورة

*فى عام ١٩٠٤ اقترح ايخمان Eijkman انتاج غاز من الجلوكوز عند ٤٦ مئوية كاختبار لبكتريا القولون ذات الأصل البرازى Fecal coliform (Eijkman, 1904).

ولكن وجد أن العديد من الأجناس التى ورد ذكرها والتى تنتمى الى مجموعة القولون الكلية يمكنها أن تنتج غاز من الجلوكوز.

وعلى ذلك، حدث تعديل سريع للاختبار واستبدل الجلوكوز باللاكتوز، أما بالنسبة للجزء البرازى من المجموعة فلقد حدث أيضا تعديل فى الاختبار لها باستعمال درجة حرارة ٤٤.٥ مئوية فى التحضين.

- **التعريف المقبول لبكتريا القولون البرازية ممثلة ببكتريا القولون المقاومة للحرارة والقادرة على النمو مع انتاج حامض وغاز عند ٤٤.٥ مئوية.**

والبكتريا التى تشتمل عليها هذه المجموعة يسود فيها :

Klebsirlla Escherichia coli, Citrobacter freundii, and pnemoniae

* براز الانسان والحيوان تمثل Escherichia coli ما بين ٩٠ – ١٠٠% من محتواه من البكتريا القولونيه، بينما تنخفض فى الصرف الصحى Sewage الى ٥٩% (WHO, 1985).

*بكتريا القولون البرازية موجبة لاختبار اليوريز ما عدا Eschericia coli.

*نشأ اختبار حديث يرتكز على مقدرة ٩٧% من سلالات E.coli غلى انتاج انزيم بيتا-جلوكيرونيديز B-glucuronidase والذى يحلل رابطة أورثوجلوكيرونوسيل فى مشتقات جلوكيرونيد Glucuronosyl-o-bond of glucuronide conjugares مثل ٤ ميثيل امبليفيريل-بيتا-دلتا-جلوكيرونيد 4-methyl-umbelliferyl-B-D-glucuronide (MUG)

- وفى عائلة الانتيروباكتيريسى Enterobacteriaceae نجد أن ايشيرشيا كولاى Escherichia coli وبعض الشيجيلا ا Shigella والسالمونيلا Salmonella(Feng and Hartman, 1982) والقليل من اليارسينيا Yersinia (Petzel and Hartman, 1985) تنتج الانزيم المشار اليه.
- وعلى أساس انتاج هذا الانزيم ، نشأت الاختبارات للكشف عن وتنمية ايشيرشيا كولاى Eschericia coli (Feng & Hartman, 1982; Petzel &Hartman, 1985; Freier &Hartman, 1987).

gtz Partner for the Future. Worldwide.

طريقة أنابيب التخمر المتعددة أو العد الاحتمالى لتقدير مجموعة بكتريا القولون

Multiple Tube Fermentation or Most Probable Number Technique for Determination of Coliform Group

gtz Partner for the Future. Worldwide.

- عند استعمال هذه الطريقة فان نتائج اختبار مكررات الأنابيب Replicate tubes والتخفيفات تسجل على صورة العدد الأكثر احتمالا Most Probable Number (MPN) للكائن المتواجد. هذا العدد، يعتمد على نظرية الاحتمالات، وهى تقديرات لمتوسط كثافة البكتريا (القولون أو غيرها) فى العينة.
- وأفضل المعلومات يحصل عليها عن استعمال أكبر حجم من العينة فى حقن الأنابيب بحيث تظهر غاز فى بعض منها أو كلها فى حين أن أضغر حجم من العينه يستعمل فى حقن الأنابيب لا يظهر غاز فى كل الأنابيب أو معظمها.

جداول العدد الاحتمالى تعتمد على افتراض توزيع بويسون Assumption of a poisson distribution (الانتشار العشوائى). وعلى ذلك ، اذا لم يتم رج العينة بطريقة مناسبة قبل أخذ الجزئيات منها أو اذا وجدت تجمعات من خلايا البكتريا ، فان قيمة العدد الاحتمالى ستكون بعيدة عن الكثافة الحقيقية للبكتريا.

المياه من نوعية مياه الشرب Water of Drinking Water Quality

عند تحليل مياه الشرب لتقدير ما اذا كانت النوعية تتطابق مع المواصفات التى وضعتها وكالة حماية البيئة الأمريكية ، يستعمل ١٠ أنابيب مكررة تحتوى على ١٠ ملل أو٥ مكررات من أنابيب تحتوى على ٢٠ ملل

أو زجاجة واحدة تحتوى ١٠٠ ملل من العينة.

*يجرى الاختبار التأكيدى على كل الأنابيب أو الزجاجات التى تعطى نمو مع وجود أو عدم وجود نتيجة ايجابية لتكون حامض أو غاز .

*يجرى الاختبار الكامل Completed test على ما لا يقل عن ١٠ % من العينات الموجبة كل ٣ شهور.

* وتعتبر نتيجة EC broth أو EC MUG الايجابية كبديل للنتيجة الايجابية للاختبار الكامل.

* تواجد جزء كبير من بكتريا القولون فى نظام التوزيع ربما يكون غير مرتبط بفشل المعالجة أو البئر المصدر، ولكن مرتبط باستعادة النمو للبكتريا .

المياه الأخرى خلاف مياه الشرب

- فى اختبار المياه خلاف مياه الشرب يحقن سلسلة من الأنابيب بتخفيفات متتالية عشرية من المياه (١٠و ١ و ١، و ٠١، .....)اعتمادا على كثافة بكتريا القولون المحتملة.

* يجرى الاختبار الكامل أو النهائى على ١٠% على الأقل من العينات الموجبة على أساس موسمى.

العينات الأخرى

فى حالة اختبار المواد الصلبة أو شبه الصلبة يتم عمل تخفيف وزنم حجم من محلول منظم أو ماء الببتون ١،% ويتم الخلط باستعمال خلاط بسرعة منخفضة (8000 لفة فى الدقيقة) لمدة ١ – ٢ دقيقة ومنه يتم عمل التخفيفات المتتالية بسرعة حتى لا يحدث ترسيب.

طريقة التخمر القياسية لتقدير بكتريا القولون الكلية
Standard Total Coliform Fermentation Technique

المرحلة الافتراضية Presumptive Phase
استعمل بيئة Lauryl tryptose broth فى المرحلة الافتراضية لاختبار الأنابيب المتعددة.

- اذا كانت البيئة مبردة بعد التحضير والتعقيم، تترك على درجة حرارة الغرفة (٢٠ مئوية) خلال الليل وقبل الاستعمال. يتخلص من الانابيب التى يظهر بها نمو أو فقاعات أو كلاهما .
- وزع البيئة بكميات كافية فى أنابيب التخمر ويكون بكل انبوبة انبوبة درهام مقلوبة وتكون حجم البيئة يغطى نصف الانبوبة أو ثلثاها على الأقل بعد التعقيم. وكبديل اهمل وضع انبوبة درهام وأضف ٠،١ جرام / اللتر من برومو كريزول بيربل الى البيئة للكشف عن انتاج حموضة والذى يعتبر دليل على ايجابية هذا الاختبار .

الطريقة

*رتب الأنابيب فى صفوف من ٥ أو ١٠ أنابيب فى حامل أنابيب. عدد الصفوف.

(حجم العينة يعتمد على نوعية وخصائص المياه المختبرة)

*رج العينة أوالتخفيفات جيدا حوالى ٢٥ مرة.

*لقح كل انبوبة فى المجموعة بحجم متكرر من العينة . اخلط العينة مع البيئة بالهز برفق.

* حضن الأنابيب الملقحة أو الزجاجات عند ٣٥ + /- ٥، درجة مئوية .

*بعد ٢٤ ساعة +/- ٢ ساعة اختبر الأنابيب أو الزجاجات لوجود نمو، غاز، تفاعل حامضى (لون أصفر). وينصح بالفحص بعد ١٨ +/- ١ ساعة للايجابية ، يجرى للأنابيب الموجبة الاختبار التأكيدى (اذا لم يكن هناك غاز أو حامض ، أعد التحضين والكشف مرة أخرى فى نهاية ٤٨ ساعة + /- ٣ ساعة.

* غياب تكون الغاز أو الحموضة فى نهاية التحضين يدل على النتيجة السالبة للاختبار.

* سجل النتيجة الموجبة واحتفظ بالأنابيب .

* يجرى للنتيجة الموجبة الاختبار التأكيدى.

المرحلة التأ كيدية Confirmed phase

بيئة الزراعة :

* استعمل بيئة مرق البريلينت جرين لاكتوز بيل للتخمر فى أنابيب للمرحلة التأكيدية فى أنابيب بها درهام.

*هز برفق الأنابيب الايجابية من المرحلة الافتراضية (حامض وغاز) لتعليق النمو من الكائنات فى الأنابيب.

* باستعمال لوب معقم (قطر فتحتها ٣ – ٣,٥ مم) انقل لوب واحدة أو أكثر من المزرعة من كل انبوبة ايجابية الى انبوبة بريلينت جرين.

*حضن انابيب البريلينت جرين عند ٣٥ مئوية +/- ٥، درجة ، تكون غاز فى انبوبة درهام بعد فترة تحضين (من ٦ +/- ١ سلعة الى ٢٤ +/- ٢ ساعة) وخلال ٤٨ ساعة +/- ٣ ساعة.

الطريقة البديلة :

تستخدم تلك الطريقة بالنسبة للمياه الملوثة ومياه الصرف الصحى.

اذا كانت كل الأنابيب فى المرحلة الافتراضية ايجابية لتخفيفين متتالين من العينة المختبرة يتم اجراء الاختبار التأكيدى للانابيب الايجابية من الأنابيب المحقونة بالكمية الأقل من العينة والموجبة جميعها الى جانب الأنابيب الايجابية من الصف الثالث (المحقونة بكمية أقل من العينة)

*المرحلة الكاملة أو النهائية Complete phase

*يجرى هذا الاختبار كبيانات للتحكم فى الجودة على ١٠% على الأقل من الانابيب الايجابية من المرحلة السابقة.

*يتم حقن انابيب بريلينت جرين لبكتريا القولون الكلية و مرق ECأو بيئة مرق EC with MUG لايشيريشيا كولاى (كلاهما يتم التحضين عند ٤٤,٥ درجة مئوية) والنتيجة الايجابية فى الحالات الثلاث تدل على أن الاختبار النهائى ايجابى .

وايجابية أنابيب البرينت جرين فقط دل على الايجابية لبكتريا القولون الكلية.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

الطريقة

أ . فى ظروف معقمة ازرع على سطح طبق LES Endo agar أو MacConkey agar كل انبوبة موجبة من البريلينت جرين فور ظهور الغاز بها باستعمال لوب ٣ مم أو ابرة منحنية قليلا (لا يؤخذ الريم على سطح الانبوبه، تغمس اللوب الى العمق ويخطط الطبق للحصول على مستعمرات متباعدة). حضن على ٣٥ مئوية +/- ٥، درجة لمدة ٢٤ +/- ٢ ساعة.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

ب . المستعمرات التى تنشأ على LES Endo agar تكون نموذجية Typical(قرمزية الى أحمر قاتم مع اللمعة المعدنية) أو غير نموذجية Atypical (قرمزية، أحمر، أبيض، أو عديمة اللون بدون اللمعة المعدنية) بعد تحضين ٢٤ ساعة.

المستعمرات المخمرة للاكتوز النموذجية والتى تنشأ على بيئة الماكونكى تكون حمراء وربما تكون محاطة بمنطقة معتمة أو ترسيب املاح الصفراء.

من كل طبق التقط مستعمرة أو أكثر من بكتريا القولون النموذجية تكون منعزلة .

*فى حالة عدم تواجد تلك المستعمرات التقط مستعمرات أقرب ما يمكن للشكل المشار اليه وكل مستعمرة تلقح فى انبوبة تخمر من مرق لوريل تريبتوز وعلى سطح آجار مغذى مائل Nutrient agar وتحضن ٢٤ ساعة عند ٣٥ مئوية. حضن على ٣٥ +/- ٥و درجة مئوية لمدة ٢٤ + /- ٢ ساعة.

- افحصها لتكون غاز وأعد الفحص اذا كانت سالبة عند ٤٨ +/- ٣ ساعة.
- ويجرى الصبغ بجرام من انبوبة الآجار المغذى (يمكن عدم اجراء تلك الخطوة فى حالة مياه الشرب).
- تكون غاز فى انبوبة مرق اللوريل تربتوز خلال ٤٨ +/- ٣ ساعة واعطاء خلايا سالبة لجرام، غير متجرثمة ، عصوية تعتبر موجبة للاختبار التكميبى وتؤكد وجود أعضاء من مجموعة القولون.

حساب كثافة البكتريا
Estimation of Bacterial Density

دقة اختبار أنابيب التخمر
Precision of fermentation tube test

*اذا لم يتم اختبار عدد كبير من جزئيات العينة ، فان دقة اختبار أنابيب التخمر تكون منخفضة. مثلا، اذا أختبر ١ ملل من زجاجة تحتوى على خلية واحدة من بكتريا القولون/ملل، فان حوالى ٣٧ % من الأنابيب المحتوية على ١ ملل من العينة من المتوقع أن تنتج نتائج سلبية نتيجة للتوزيع العشوائى للبكتريا فى العينة.

وعندما يكون هناك ٥ أنابيب كل منها به ١ ملل من العينة فانه النتيجة السلبية تحت تلك الطروف فان التوقع أن تكون النتائج سلبية بالكامل لا يزيد عن ١%.

حساب وتسجيل العدد الأكثر احتمالا

*الجداول تشتمل على ٩٥ % حدود ثقة Cofidence limits لكل قيمة مقدرة من قيمة العدد الأكثر احتمالا المقدرة.

*عندما تكون التخفيفات المتتالية مختلفة عن تلك الموجودة فى الجدول، اختار قيم العد الأكثر احتمالا من جدول ٤ للعدد من النابيب الموجبة واحسب طبقا للمعادلة التالية:

$$\text{MPN value (from table) X } \frac{10}{\text{Largest volume tested in dilution Series used for MPN determination}}$$

$$= \text{MPN / 100ml}$$

* عند استعمال أكثر من ٣ تخفيفات فى سلسلة متدرجة من التخفيف، استعمل نتائج ٣ فقط منها فى حساب العد الأكثر احتمالا.

* لاختيار الثلاث تخفيفات لاستعمالها فى تقدير العد الأكثر احتمالا، اختار أعلى التخفيفات التىتعطى نتائج ايجابية فى كل الخمس اجزاء من العينة المختبرة والتخفيفان التاليان الناجحان الأعلى فى التخفيف.

اختبار التواجد – عدم التواجد لبكتريا القولون

Presence-Absence (P-A) Coliform Tes

*اختبار التواجد-عدم التواجد لمجموعة بكتريا القولون هى تطوير لطريقة العدد الأكثر احتمالا .

*بسط، باستعمال حجم كبير واحد (١٠٠ ملل) فى زجاجة زرع للحصول على معلومات نوعية عن تواجد أو غياب بكتريا القولون، ضبطت على نظرية أنه لا بد من غياب بكتريا القولون فى ١٠٠ ملل من عينة مياه الشرب (المواصفات الأمريكية).

*<u>اختبار التواجد:</u>عدم التواجد يوفر ايضا الفرصة لزراعة وعزل اللائل البكتيرية الأخرى (بكتريا القولون البرازية، ايروموناس، ستافيلوكوكى، سيدوموناس، السبحيات البرازية، والكلوستريديم) وعلى نفس الأساس النوعى وليس الكمى.

*وهناك مميزات أخرى تشمل امكانية اختبار عدد كبير من العينات فى وحدة الوقت.

*تعطى أقصى فرصة لكشف تواجد بكتريا القولون فى وجود العديد من البكتريا الأخرى والتى ربما تتفوق فى النمو على بكتريا القولون وتسبب مشاكل فى الكشف عنها

*<u>اختبار التواجد:</u>

الغياب وضع للاستعمال فى الاختبار الروتينى للعينات المجمعة من نظام التوزيع أو محطات معالجة المياه.

عندما تنتج العينات المجمعة من موقع معين نتائج ايجابية لاختبار التواجد-الغياب لبكتريا القولون، فانه ربما ينصح بأن تقدر كثافة بكتريا القولون فى عينات متكررة.

والمعلومات الكمية ربما تظهر مدى التلوث.

* بيئة الزرع Culture media

المرحلة الافتراضية Presumptive phase

P-A broth تحضر البيئة ثلاثية التركيز (القوة) عند اختبار ١٠٠ ملل من العينة:

الطريقة Procedure

***رج العينة بشدة حوالى ٢٥ مرة.**

***لقح ١٠٠ ملل فى زجاجة بيئة التواجد-الغياب.**

***اخلط جيدا بقلب الزجاجة مرة أو مرتين للحصول على توزيع تام للبيئة ثلاثية التركيز خلال العينة .**

***حضن عند ٣٥ +/- ٥، درجة مئوية.**

***افحص بعد ٢٤ ساعة و ٤٨ ساعة للتفاعل الحامضى**

***ظهور غاز فى انبوبة درهام أو بالرج (موجب) ويحتاج تأكيد**

gtz Partner for the Future. Worldwide.

مرحلة التأكيد

Confirmed phase

بيئة الزراعة : استعمل بيئة مرق البرلينت جرين لاكتوز أملاح الصفراء فى أنابيب

الاختبار المكمل Completed test

gtz Partner for the Future. Worldwide.

طريقة بكتريا القولون البرازية

Fecal Coliform Procedure

Elevated temperature tests

*الاختبار يمكن اجراؤه بطريقة الأنابيب المتعددة.

*الطريقة باستعمال بيئة مرق A ١ هى طريقة تجرى فى خطوة واحدة.

*اختبار بكتريا القولون البرازية باستعمال بيئة EC استعملت فى الدراسات على مياه الشرب، تلوث المجارى المائية، المياه الخام، نظم معالجة المخلفات السائلة ، مياه الاستحمام، مياه البحروعمليات مراقبة نوعية المياه. وتستخدم بيئة A ١ فى اختبار مصادر المياه، مياه البحر، والمخلفات السائلة المعالجة.

الطريقة Procedure

*ارسل انابيب الاختبار الفرضى Presumptive test(LTB)التى تظهر نتيجة ايجابية بان يكون فى أنابيب درهام أية كمية من الغاز، نمو، أو حموضة خلال ٤٨ ساعة من التحضين لاجراء اختبار بكتريا القولون البرازية.

* استخدم لوب قطر فتحتها ٣ – ٣,٥ مم لنقل النمو من كل انبوبة أو زجاجة موجبة.

*حضن الأنابيب الملقحة (EC) فى حمام مائى عند ٤٤,٥ +/- ٢ ، درجة مئوية لمدة ٢٤ +/- ٢ ساعة.

* ضع كل أنابيب مرق EC الملقحة فى الحمام المائى خلال ٣٠ دقيقة من الانتهاء من حقنها. احرص على أن يكون فى الحمام المائى كمية من المياه تكفى لتغطية مستوى البيئة فى الأنابيب المحضنة.

* انتاج الغاز مع النمو فى بيئة مرق EC خلال ٢٤ +/- ٢ ساعة أو أقل يعتبر الاختبار موجب لبكتريا القولون البرازية.

* تقرأ النتيجة من جداول MPN أو تسجل النتيجة على صورة P/A اذا كان الاختبار قد أجرى من أنبوبة واحدة.

اختبار بكتريا القولون البرازية المباشر

Direct Test (A-1 medium)-Fecal coliform

*تستخدم بيئة مرقA1 ، ليس هناك مرحلة افتراضية Presumptive phase

*حضر البيئة بتركيز مضاعف حتى يمكن استعمال ١٠ ملل من العينة بحيث لا يتأثر تركيز البيئة باضافة العينة.

الطريقة

لقح الأنابيب من بيئة A 1. حضن لمدة ٣ ساعات عند ٣٥ +/- ٥و درجة مئوية ثم انقل الأنابيب الى حمام مائى عند ٤٤,٥ +/- ٢و درجة مئوية وحضن لمدة ٢١ +/- ٢ ساعة.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

تفسير النتائج

انتاج الغاز فى الأنابيب خلال ٢٤ ساعة أو أقل يعتبر علامة على أن الأنبوبة ايجابية للاختبار لبكتريا القولون البرازية. احسب العدد الأكثر احتمالا MPN من عدد الأنابيب الايجابية .

gtz Partner for the Future. Worldwide.

طريقة أغشية الترشيح لمجموعة بكتريا القولون

Membrane Filter Technique of the Coliform Group

طريقة أغشية الترشيح:

يمكن استعمالها مع حجوم كبيرة نوعا ما من العينات، عادة تنتج نتائج أكثر حقيقة من طريقة العدد الأكثر احتمالا مفيدة جدا فى مراقبة مياه الشرب وعديد من نوعيات المياه الكبيعية.

ومع ذلك، فان طريقة أغشية الترشيح لها بعض المحدوديات، خاصة عند اختبار المياه ذات العكارة العالية أو أعداد البكتريا التى لا تنتمى الى مجموعة بكتريا القولون Noncoliform (background)

تعريف Definition

بالنسبة لطريقة أغشية الترشيح فان مجموعة بكتريا القولون عرفت على أنها الاهوائية اختيارا ، سالبة لجرام، غير مكونة للجراثيم ، عصوية الشكل والتى تنتج مستعمرات حمراء بلمعة ذهبية Metallic (golden) sheen خلال ٢٤ ساعة عند ٣٥ مئوية على بيئة الاندو Endo medium والتى تحتوى على سكر اللاكتوز .

بعض أعضاء مجموعة بكتريا القولون ربما تنتج مستعمرات بلون أحمر قاتم Dark red، مخاطية Mucoid أو ذات نواه Nucleated. دون اللمعة المعدنية.

وهذه تصنف على أنها مستعمرات بكتريا القولون ولكنها غير مثالية Atypical .

*عند اختبار مزارع بكتريا القولون المنقاة Purified cultures فانها تكون:

*سالبة لانزيم سيتوكروم أكسيديز Cytochrome oxidase

*موجبة لانزيم B-galactosidase.

*وبصفة عامة ، فانه فى تلك الطريقة MF تعتبر المستعمرات ذات اللون الأحمر الوردى Pink الغير مخاطية Nunmucoid، الزرقاء، البيضاء، أو عديمة اللون والتى ينقصها اللمعان فانها تعتبر ليست من بكتريا القولون.

التطبيق Application

*العكارة المتسببة عن وجود الطحالب ، الجزيئات أو أى مواد متداخلة ربما لا تسمح باختبار حجم من العينة كاف لانتاج نتائج معنوية.

*التقديرات المنخفضة لبكتريا القولون ربما تتسبب عن وجود البكتريا الأخرى والتى لا تنتمى لبكتريا القولون، أو عن وجود مواد سامة .

*طريقة أغشية الترشيح قابلة للتطبيق لاختبار المياه المالحة Saline water**ولكن ليس للمخلفات السائلة التى اجرى عليها معتاجة مبدئية** متبوعة بمعالجة بالكلور بسبب العكارة

*** عند استخدام حجوم كبيرة من العينات أو مخلفات سائلة تحتوى على معادن سامة أو مواد عضوية سامة مثل الفينولات. وللكشف عن تواجد بكتريا القولون الكلية المضارة Stressed total coliforms فى مياه الشرب المعالجة وناتج المعالجة الثانوية من المخلفات السائلة المعالجة بالكلور فان الطريقة صممت للكشف عن تواجد تلك المجموعة (ستناولها فى Module 4).**

*حجم العينة اللازم اختباره فى حالة مياه الشرب المرشحة هو ١٠٠ ملل.

*لاغراض المراقبة الخاصة، مثل حل مشاكل نوعية المياه أو تصنيف بكتريا القولون فى التركيزات المنخفضة من خلال خطوات المعالجة، ربما يكون من المرغوب اختبار ١ لتر من العينة.

*اذا كانت المواد المعلقة تمنع ترشيح اللتر من العينة خلال مرشح واحد، تقسم العينة الى الى أجزاء صغيرة ، ٢٥٠ ملل مثلا للتحليل. وتجمع اعداد بكتريا القولون الناتجة عن المرشحات المستخدمة لترشيح العينة ليكون لدينا العدد/اللتر.

*أحجام أصغر من العينات تكون لازمة فى حالة مياه المتنزهات Recreational water أو مصدر المياه Source water أو المخلفات السائلة والتى تحتوى على أعداد عالية من بكتريا القولون.

*الدراسات المقارنة ما بين طريقة لمرشحات الغشائية وطريقة العدد الأكثر احتمالا أظهرت زيادة دقة طريقة أغشية الترشيح والنتائج بالنسبة لتقييم نوعية المياه بتلك الطريقتين متماثلتان ولكن الأعداد المحصاة بطريقة الأغشية أكثر دقة من طريقة العدد الأكثر احتمالا.

الطريقة القياسية لبكتريا القولون باستخدام أغشية الترشيح

Filter Standard Total Coliform Membrane Procedure

- الأدوات المعملية Laboratory apparatus
- زجاجات العينات Sampling bottles (QA/ QC Notes)
- زجاجات التخفيف Dilution bottles (QA/ QC Notes)
- الماصات والمخابير المدرجة (QA/QC Notes)

•أوعية بيئة الزرع Containers of culture medium

* أطباق الزرع Culture dishes
* وحدات الترشيح Filtration units
* أغشية الترشيح Membrane filter
* الوسادة الماصة Absorbent bads
* الملاقط Forceps
*الميكروسكوب ومصدر الاضاءة Microscope and light source.

المواد وبيئات الزرع Materials and Culture Media

*لا تلجأ الى تحضير البيئة من مكوناتها طالما البيئة الجاهزة متوافرة على نطاق تجارى. خزن البيئة التى تم فتح عبوتها فى مجفف. أنظر QC/QA للتحكم فى نوعية البيئة.

*اختبر كل لوط جديد من البيئة باستعمال اللوط القديم المقبول كمرجع (QC/QA) . مع كل لوط جديد من بيئة من نوع الاندو Endo type تحقق Verify على الأقل من ١٠% من مستعمرات بكتريا القولون المتحصل عليها من العينات الطبيعية لمقارنة اللوطات المختلفة للبيئة وقدرتها على الاستخلاص Recovery .

*قبل الاستعمال، اختبر كل عملية تحضير Batch للبيئة التى ستستخدم مع M F باستخدام مزرعة معروف أنها تعطى نتيجة ايجابية وأخرى معروف أنها تعطى نتيجة سلبية. اختبر تلوث بكتريا القولون عند بداية ونهاية كل سلسلة من الترشيح بترشيح ٢٠ – ٣٠ ملل من محلول التخفيف أوالشطف خلال المرشح. اذا ظهر تلوث فى المرجعيات Controls ارفض أية نتائج واطلب عينة أخرى.

* البيئة المستخدمة LES Endo agar

* بيئة M-Endo

*تعريف بكتريا القولون

البكتريا التى تنتج مستعمرات حمراء مع لمعة ذهبية (معدنية) Metallic sheen خلال ٢٤ ساعة من التحضين على ٣٥ درجة مئوية على بيئة من نوع الاندو تعتبر عضومن مجموعة بكتريا القولون.

اللمعة قد تغطى المستعمرة كلها أو قد تظهر على مركز المستعمرة فقط أو على الحواف .

هذا التعريف لبكتريا القولون يعتمد على انتاج الألدهيدات من تخمر اللاكتوز. وبينما هذه الخاصية البيوكيماوية هى جزء من طريق عملية التمثيل الغذائى لانتاج الغاز فى اختبار العدد الأكثر احتمالا، فان بعض الاختلاف فى اللمعان للمستعمرات يلاحظ بين سلالات بكتريا القولون.

الطريقة Procedure

* اختيار حجم العينة : يحكم حجم العينة بكثافة البكتريا المتوقعة.

فى تحليل مياه الشرب يحكم حجم العينة بالعكارة أو بنمو البكتريا التى لا تنتمى الى بكتريا القولون على البيئة

*وللأغراض التنظيمية، ١٠٠ ملل هو الحجم الرسمى.

*الحجم الأمثل من العينة ينتج ٢٠ – ٨٠ مستعمرة من بكتريا القولون وليس أكثر من ٢٠٠ مستعمرة من كل الأنواع على سطح المرشح الغشائى.

*تحليل مياه الشرب بترشيح من ١٠٠ الى ١٠٠٠ ملل، أو بترشيح مكررات من عينات صغيرة الحجم مثل اثنان كلا ٥٠ ملل أو ٤ كلا ٢٥ ملل.

- تحليل المياه الأخرى بترشيح ٣ حجوم مختلفة (مخففة أو غير مخففة) ، يعتمد على كثافة البكتريا المتوقعة.
- فى حالة ترشيح أقل من ١٠ ملل من العينة (مخففة أو غير مخففة) أضف حوالى ١٠ ملل محلول تخفيف معقم الى قمع الترشيح قبل الترشيح أو انقل الحجم من العينة الى زجاجة تخفيف ورشح ناتج التخفيف جميعه. هذه الزيادة فى حجم المياه يساعد على انتظام توزيع معلق البكتريا على سطح الفلتر .

وحدات الترشيح المعقمة Sterile filtration units

* سلسلة الترشيح تعتبر معترضة اذا مرت فترة ٣٠ دقيقة أو أكثر بين عمليات الترشيح المتتالية. واذا حدث ذلك عامل عملية الترشيح التالية على الرغم من انتمائها الى عملية سابقة تعامل على أنها عملية جديدةوبالتالى عقم كل الجهاز.

ترشيح العينة Filtration of sample

* تمييز المستعمرات سواء فى حالة استخدام البيئة فى صورة صلبة أو سائلة ربما يفقد أو يتعذر اذا حضنت المزارع أكثر من ٢٤ ساعة.

*بعد عشر عينات اختبر تعقيم مياه الشطف بترشيح ١٠٠ ملل واختبارها كمصدر للتلوث بتحضين أطباقها تحت نفس ظروف تحليل العينة.

*عينات المياه التى تستعمل فى اغراض أخرى خلاف الشرب وبسبب وجود أعداد كبيرة من بكتريا القولون يجب تعقيم وحدة الترشيح بعد كل عينة. وكبديل، استعمل محلول منظم Buffer rinseلشطف الوحدة بعد ازالة الفلتر ومنع نقل التلوث بين العينات .

طريقة التخصيب البديلة Alternative enrichment technique

- ضع وسادة ماصة معقمة فى غطاء طبق بترى معقم وشبعها بحوالى ٢ ملل من بيئة مرق لوريل تربتوز محضر كما ذكر مسبقا.

* ضع المرشح الغشائى الذى رشحت عليه العينة على الوسادة الماصة ولا تقلب الطبق وحضن لمدة ١,٥ الى ٢ ساعة عند ٣٥ + /- ٥، درجة مئوية فى جو رطوبته ٦٠% على الأقل.

*اذا استعملت بيئة اندو آجار، ازل الفلتر من على سطح الوسادة الماصة بعد التحضين وضعه بحركة دائرية على سطح بيئة اندو آجار مع الحرص بعدم السماح بوجود هواء بين الفلتر والبيئة.

*أما اذا استعملت البيئة السائلة ، فانه يتم وضع وسادة جديدة فى الطبق وتشبع بالبيئة M-Endoثم يزال الفلتر من على الوسادة القديمة ويقلب الطبق ويحضن تحت نفس ظروف استخدام البيئة الصلبة .

* سواء استخدمت البيئة الصلبة أو السائلة اقلب الأطباق وحضن لمدة ٢٠ الى ٢٢ ساعة عند٣٥ +/- ٥، درجة مئوية.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

العد Counting

لعد المستعمرات استعمل قوة تكبير ١٠ – ١٥ مرة من خلال

Wide-field dissecting microscope or other optical devices

مع استعمال لمبة فلورسنت بيضاء كمصدر للضوء وتوجه الاضاءة حتى ترى أوضح صورة .

مستعمرات بكتريا القولون المثالية لها لون قرنفلى Pink الى أحمر قاتم مع لمعان معدنى على السطح. عد كلا من المستعمرات المثالية وغير المثالية Typical and atypical.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

* المنطقة اللامعة ربما تختلف فى الحجم من نقط فى حجم رأس الدبوس الى كل سطح المستعمرة.

* مستعمرات بكتريا القولون غير المثالية يمكن أن تكون ذات لون أحمر قاتم، مخاطية Mucoid أو ذات نواة دون لمعان.

عامة المستعمرات القرنفلية، الزرقاء، البيضاء أو عديمة اللون والتى يغيب عنها اللمعان تعد على أنها ليست بكتريا القولون

*عدد كل المستعمرات (بكتريا القولون وغيرها) على بيئة الاندو ليس له علاقة بعدد البكتريا الكلى فى العينة الأصلية.

* العدد العالى من البكتريا الغير قولونية ربما يتداخل مع نشوء أقصى أعداد من بكتريا القولون.

* تبريد المزارع (بعد ٢٢ ساعة تحضين) مع العدد المرتفع من البكتريا الغير قولونية لمدة ٥، الى ١ ساعة قبل العد ربما يمنع الاحتشاد ويساعد على تمييز اللمعان.

* عينات المياه المطهرة أوناتج المخلفات السائلة المعالجة ربما يحتوى على كائنات مضارة Stressed organisms والتى تنمو ببطء وتنتج أقصى لمعان فى ٢٢ – ٢٤ ساعة. الكائنات من المصادر الغير مطهرة ربما تنتج اللمعان بعد ١٦ – ١٨ ساعة، ويبهت اللمعان بعد ٢٤ – ٣٠ ساعة .

- **التحقق من بكتريا القولون Coliform verification**

ربما تظهر المستعمرات اللامعة المثالية على فترات عن نمو بكتريا لا تتبع بكتريا القولون والمستعمرات غير المثالية (مستعمرات لونها أحمر قاتم أو مستعمرات ذات نواة دون لمعان) ربما تكون بكتريا القولون.

ويفضل أن يتحقق من كل نوعيات المستعمرات المثالية وغير المثالية عن طريق مسح الفلتر الغشائى أو التقاط على الأقل ٥ مستعمرات مثالية وخمسة مستعمرات غير مثالية.

***فى حالة المياه الأخرى خلاف مياه الشرب، كحد أدنى، تحقق من ١٠ مستعمرات لامعة (وممثلات للمستعمرات الغير مثالية والمختلفة فى مظهرها) من عينات المياه الموجبة شهريا (QA/QC notes).**

- **اختبارات التحقق Verification tests**

تخمر اللاكنوز- انقل نمو من كل مستعمرة أو امسح غشاء الترشيح باستعمال Swab قطن (فى حالة اختبار التواجد والغياب فى عينات مياه الشرب) وضعها فى مرق لوريل سلفات، وحضن عند ٣٥ +/- ٥، درجة مئوية لمدة ٤٨ ساعة.

*انتاج غاز فى مرق اللوريل سلفات والتأكيد فى مرق بريلينت جرين لاكتوز وخلال ٤٨ ساعة تحقق من المستعمرة كبكتريا القولون.

*من الممكن زرع البيئتان فى نفس الوقت والتحقق من انتاج الغاز فى كلاهما.

واضافة حقن أنابيب EC broth والتحضين عند ٤٤,٥ +/- ٢، درجة مئوية لمدة ٢٤ ساعة يعطى نتيجة عن وجود بكتريا القولون البرازية، وحقن انابيب من نفس البيئة مضاف اليها MUG والتحضين تحت نفس الظروف السابقة يعطى نتيجة عن وجود ايشيرشيا كولاى.

* **بديل عن التحقق من بكتريا القولون:** استعمل تلك الطريقة لعزل مستعمرات على أغشية الترشيح. اذا شك بأن المزرعة مختلطة أو اذا كانت المستعمرات المفصولة أقل من ٢ مم، ازرع من النمو على بيئة M-Endo أو ماكونكى آجار لتأكيد نقاء المزرعة أو اجرى اختبار انابيب التخمر.

* **الاختبار السريع:** التحقق من المستعمرات باستعمال اختبار التفاعل للسيتوكروم أكسيديز وبيتا جالاكتوسيديز الموجب خلال ٤ ساعات تحضين للانبوبة .

*نظم الاختبار المتعدد Commercial multi-test systems

تحقق من المستعمرة بزرعها للتنقية. اختار مستعمرة معزولة جيدا، احقنها فى نظام الاختبار المتعدد لمجموعة Enterobacteriaceae والتى تشمل اختبارات تخمر اللاكتوز و/ أو بيتا جالاكتوسيديز وسيتوكروم أكسيديز.

حساب كثافة بكتريا القولون Calculation of Coliform Density

احسب العدد، باستعمال المرشحات الغشائية التى بها ٢٠ – ٨٠ مستعمرة كوليفورم وليس أكثر من ٢٠٠ مستعمرة من كل الأنواع لكل مرشح غشائى باستعمال المعادلة:

* بكتريا القولون الكلية / ١٠٠ ملل = عدد مستعمرات بكتريا القولون X١٠٠ / حجم العينة المرشحة ملل

اذا لم تتواجد مستعمرات لبكتريا القولون يكتب التقرير أقل من ١ من بكتريا القولون/ ١٠٠ ملل.

ولعد التحقق طبق المعادلة التالية:

نسبة بكتريا القولون المتحقق منها = عدد المستعمرات المتحقق منها X١٠٠ / العدد الكلى لمستعمرات الكوليفورم المعرضة للتحقق

gtz Partner for the Future. Worldwide.

* المياه من نوعية مياه الشرب

نظمت EPA تحتم خلو المياه من بكتريا القولون / ١٠٠ ملل فان ذلك يتطلب تقدير كثافة بكتريا القولون فى عينات متكررة . هذا مهم اذا كانت بكتريا القولون مستوطنة نظام التوزيع. المعلومات الكمية تعطى مؤشر عن مدى حدث التلوث.

المياه الجيدة محتواها من بكتريا القولون يكون أقل ما يمكن. لذلك ، تعد كل مستعمرات بكتريا القولون ولا يؤخذ فى الاعتبار الحد الأدنى المذكور سابقا (٢٠ مستعمرة) وتستعمل المعادلة لمعرفة كثافة بكتريا القولون.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

* اذا كان النمو مغطى لكل مسطح الفلتر الغشائى أو جزء منه والمستعمرات غير محددة تكتب النتيجة نمو طاغ مع وجود بكتريا القولون أو عدم وجودها

Confluent growth with (or without) coliform

* اذا كان العدد الكلى لبكتريا القولون وغيرها يزيد عن ٢٠٠ على سطح المرشح الغشائى أو اذا كانت المستعمرات محددة لعدها تكتب النتيجة أعداد كبيرة جدا لعدها Confluent or too numerous to count TNTC على الترتيب.

*المياه خلاف مياه الشرب Water of other than drinking water

اذا كانت الأعداد الظاهرة يمكن عدها وكان قد استعمل فى تحليل ١٠٠ ملل من العينة ٢ مرشح غشائى وتم ترشيح ٥٠ ملل من كلا منهما وظهر على الأول ٣ مستعمرات والثانى ٥ مستعمرات فان العدد الكلى يكون ٨ مستعمرة / ١٠٠ ملل .

واذا كان العدد الكلى للبكتريا على هذا المرشح أكبر من ٢٠٠ تكتب النتيجة أكبر من أو تساوى ١٠٠/٤٠٠ ملل.

*وفى حالة الحصول على نتيجة من ترشيح ١٠ ملل، ١ ملل، ١، ملل – ٤٠ ، ٩، وأقل من واحد من مستعمرات بكتريا القولون فان الحساب يتم على اساس نتيجة ١٠ ملل وهى ٤٠ فيكون العدد/ ١٠٠ ملل ٤٠٠ .

gtz Partner for the Future. Worldwide.

تأخر التحضين لبكتريا القولون الكلية
Delayed-Incubation Total Coliform Procedure

تطوير طريقة المؤشحات الغشائية القياسية يسمح بنقل العينة بعد ترشيحها الى مكان المعمل للتحليل وهناك يتم نقل المرشح الغشائى الى البيئة المتخصصة والتحضين واكمال الاختبار.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

هذا الاختبار الخاص بتأخير التحضين يمكن استعماله عندما لا يكون عمليا استخدام الطرق التقليدية .

* يمكن استعماله أيضا

(أ) عندما لا يمكن حفظ العينة على درجة الحرارة المطلوبة أثناء النقل

(ب) عندما يكون الوقت اللازم لعملية النقل أطول من الوقت المسموح به

(ج) عندما يكون مكان أخذ العينة نائى عن منطقة المعمل.

أجريت دراسات باستخدام مياه مالحة ومياه عذبة.

•وجد أن نتائج طريقة التأخير فى التحضين مماثلة لنتائج الاختبار الفورى للعينة. اكمال الاختبار لبكتريا القولون بنقل غشاء الترشيح من بيئة النقل الى LES Endo والتحضين عند ٣٥ +/- ٥، درجة مئوية لمدة ٢٠ – ٢٢ ساعة وعد المستعمرات المثالية Typical والغير مثالية Atypical.

بيئة النقل صممت لتسمح ببقاء بكتريا القولون حية ولكن لا تنتج مستعمرات مرئية خلال النقل. المواد الموجودة فى بيئة النقل تقتل البكتريا الأخرى المصاحبة لبكتريا القولون ولكن لا تقتلها هى ذاتها الى وقت نقلها الى بيئة اجراء الاختبار فى المعمل.

* M-Endo methods

M-Endo preservative medium :

حضر بيئة M-Endo كما سبق ، بعد تبريدها الى ٤٥ أقل من درجة مئوية أضف ٣,٤٨ جرام بنزوات الصوديوم /لتر . اخلط جيدا ووزعها ٥ – ٧ ملل فى أطباق صغيرة واحفظها فى الثلاجة ويهمل مالم يستعمل منها بعد ٩٦ ساعة.

محلول صوديوم بنزوات :

*** أذب ١٢ جرام بنزوات صوديوم فى كمية من الماء Reagent- grade water واكملها الى ١٠٠ ملل.**

*** عقم فى الاوتوكلاف أو بالترشيح خلال مرشح غشائى ٢٢، ميكرون ولا يستعمل بعد ٦ شهور من تحضيره.**

•سيكلوهكساميد Cyclohexamide اختياريا أضف سيكلوهكساميد الى بيئة M-Endo المضاف اليها البنزوات.

*** ويضاف للتخلص من الفطر والخميرة فى حالة اعتياد تلويثها للعينة.**

*** أضف السيكلوهكساميد بواقع ٥٠ مجم/١٠٠ ملل من البيئة.**

*** خزن محلول السيكلوهكساميد فى الثلاجة ويتخلص من المتبقى بعد ٦ شهور.**

*** البيئة تستخدم على صورة سائلة.**

طريقة أغشية الترشيح لتقدير بكتريا القولون البرازية
Fecal Coliform Membrane Filter Procedure

medium M-FC*

يختبر كل لوط من البيئة مقارن باللوط السابق المقبول (QC/QA)
ويعمل تخفيف من مزرعة E,coli ويرشح حجم مناسب ليعطى ٢٠ – ٦٠ مستعمرة على الفلتر.

ومع كل لوط تحقق من ١٠ مستعمرات أو أكثر متحصل عليها من عينات طبيعية مختلفة، لتأكيد عدم وجود نتائج ايجابية غير حقيقية False positive.

*قبل الاستخدام يختبر كل Batch من البيئة لكفاءته باستخدام مزرعة ايجابية واخرى سلبية. ويختبر للتلوث فى نهاية وبداية كل سلسلة من الترشيح بامرار ٢٠ – ٣٠ ملل من محلول الشطف المعقم وفى حالة وجود تلوث تهمل النتائج للعينات المتأثرة بالتلوث ويعاد طلب عينات.

*استخدام حضانة هوائية فى التحضين ربما يترتب عليها مشاكل نتيجة طبقات الحرارة فى الحضانة، انخفاض معدل انتقال الحرارة من هواء الحضانة الى البيئة، والتغير فى حرارة الحضانة مع كل عملية فتح لها طوال اليوم.

•لذلك فان استخدام حضانة مائية (حمام مائى) هو ما ينصح به بالنسبة لهذا الاختبار الشديد الحساسية ويكون مغطى بغطاء جمالون لتقليل الفقد فالحرارة وفى المياه.

*الحجم المختار يعطى ما بين ٢٠ – ٦٠ مستعمرة بكتريا قولونية يرازية على الفلتر.

عندما تكون كثافة البكتريا غير معروفة ، رشح عدة حجوم أو تخفيفات للحصول على كثافة يمكن عدها. احسب التخفيف والحجم المتوقع أن يعطى عد معقول على الفلتر واختار كميتان أخرتان تمثل عشر وعشرة أضعاف الحجم المختار.

*ضع وسادة ماصة فى كل طبق وشبعها بحوالى ٢ ملل من البيئة m-FC.

*يحضن تحت سطح الماء فى الحمام المائى عند ٤٤,٥ +/- ٢، درجة مئوية لمدة ٢٤ +/- ٢ ساعة. يراعى وضع كل الأطباق المستعملة خلال ٣٠ دقيقة من الترشيح

*بكتريا القولون البرازيةعلى بيئة M-FC تأخذ درجات مختلفة من اللون الأزرق. بكتريا القولون الغير برازية تأخذ لون رمادى- كريم.

قليل من مستعمرات بكتريا القولون الغير برازية سوف ترى على بيئة M-FC بسبب حرارة التحضين المرتفعة ووجود Rosalic acid .
استعمل للعد قوة تكبير ١٠ -١٥ باستخدام Binocular wide field.

*التحقق Verification تحقق من المستعمرات الزرقاء المثالية وأية مستعمرات غير مثالية Atypical رمادية الى خضراء .

*حساب كثافة البكتريا القولونية البرازية احسب عدد المستعمرات فى المجال المحدد ٢٠ – ٦٠ مستعمرة ويلاحظ أن الأعداد المسموح بها فى حالة بكتريا القولون الكلية ٢٠ – ٨٠ ويرجع ذلك لكبر حجم الخلية على بيئة M-FC.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

تأخر التحضين للبكتريا القولونية البرازية
Delayed-Incubation Fecal Coliform Procedure

- الطريقة مشابهة لطريقة البكتريا القولونية الكلية وتستعمل فى حالة عدم امكان عمل الاختبار فى الحقل أو اذا كان هناك حالة خاصة ينصح فيها بأنه سيتم التحقق من المستعمرات.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

- ترشح العينة ويوضع الفلتر على بيئة M-STوترسل العينة الى المعمل.
- المستعمرات يمكن أن تستمر حيويتها على تلك البيئة لمدة ٣ أيام والتأثير ضئيل.
- جميع الخطوات بعد ذلك هى الخطوات العدية السابق ذكرها بالنسبة لبيئة M-FC.

مجموعتى البكتريا السبحيه البرازيه والكريات المعويه ككشاف للتلوث

FECAL STREPTOCOCCUS AND ENTEROCOCCUS GROUPS

* مجموعة البكتريا السبحيه Fecal Streptococcus Group

مجموعة البكتريا السبحية البرازيه تتكون من عدد من الأجناس species للنوع genusستربتوكوكس مثل :

S.faecalis, S. avium ,S. bovis, S.faecium, S.equinus, S.gallinarum

الكل يعطى نتيجة إيجابية مع Lance field's Group D antisera وتم عزلها من براز الحيوانات ذات الدم الدافئ warm-blooded animals

* تحت الأنواع

S. faecalis subspecies (variety) liquefaciens, and S. faecalis var. zymogenes

تتميز بمقدرتها على إسالة الجيلاتين وتحليل كرات الدم الحمراء.

مكان تواجد fecal streptococci هوالمعده والأمعاء gastrointestinal tract. والأجناس الشائعة فى الانسان هى S. faecalis and S. faecium

* وبالمثل فان

S. bovis, S. equines snd S. avium غير مقتصر وجودها على الحيوان بالرغم من أنها عادة ما تكون متواجده بكثافة عالية فى براز الحيوانات.

* بعض أجناس البكتريا السبحية تسود فى أجناس محددة من الحيوانات وغير متواجده فى غيرها، ولكن ليس من الممكن تفرقة مصدر التلوث البرازى اعتمادا على اجناس البكتريا السبحيه.

*استخدمت البكتريا السبحية البراز يه مع بكتريا القولون البرازيه لتفرقة التلوث الآدمي عن التلوث من الحيوانات ذات الدم الدافئ .

النسبة بين بكتريا القولون البرازيه / البكتريا السبحية البرازيه تكون أكبر من ٤ فى حالة ما اذا كان مصدر التلوث آدمى، فى حين ما اذا كانت النسبة بينهما أقل من ٧ , يكون مصدر التلوث غير آدمى.

على أن هذه النسبة محل تساؤل حيث أنه من المعروف أن مدة بقاء أجناس البكتريا السبحية حيه Survival مختلفه فنجد أن S. bovis and S. equinus تموت بسرعه عقب خروجها الى البيئة المائيه بينما S. faecalis and S. faecium تبقى حيه لمدة طويله.

كذلك فان تأثير تطهير مخلفات الصرف الصحى يؤثر على تلك النسبه بين مؤشرات التلوث مما قد يجعل الاستنتاج عن مصدر التلوث غير صحيح.

•بالاضافة الى أن طريقة الكشف على البكتريا السبحية هى الأخرى عامل مؤثر فنجد أن استخدام بيئة KF مع طريقة الأغشية الفارزه Membrane Filter يعطى نتيجة ايجابية خادعة بنسبه تتراوح ما بين ١٠ – ٩٠ % فى حالة المياه المالحة والعذبه.

وعلى ذلك فانه لا يجب اتخاذ النسبة المذكورة بين بكتريا القولون البرازيه والبكتريا الشبحية البرازية كأساس للتفرقة بين التلوث الآدمى والحيوانى.

مجموعة البكتريا الكرويه المعويه Enterococcus Group

هى تحت مجموعه من مجموعة البكتريا السبحيه البرازيه وتشمل :

S. faecalis, S. faecium,

S. gallinarum, and S. avium وتفرق على أساس مقدرتها على النمو فى وجود ٦.٥ % ملح طعام ، النمو عند pH 9.6 وعند كلا من درجتى حراره ١٠ ، ٤٥ مئويه.

وتستخدم كدليل على التلوث فى مياه المتنزهات Recreational water وتشمل شواطئ الاستحمام العذبة والمالحة (الخطوط الاسترشاديه هى ٣٣ / ١٠٠ ملل فى المياه العذبه ، ٣٥ / ١٠٠ ملل فى المياه المالحة).

والأساس هو المتوسط لخمسه عينات على الأقل خلال الشهر ذلك خلال موسم استخدام الشاطئ فى الاستحمام .

طريقة الأنابيب المتعدده Multiple-Tube Technique أو العد الاحتمالى MPN

الاختبار المبدئى Presumptive Test

باستخدام بيئة Azide dextrose broth - التحضين على ٣٥ +/- ٥,. لمدة ٢٤ +/- ٢ ساعه واذا لم تشاهد عكاره فى قاع الأنبوبه تنتشر مع الرج تزاد مدة التحضين الى ٤٨ ساعه +/- ٣ ساعات.

* الاختبار التأكيدى Confirmed Test

باستخدام بيئة Pfizer selective enterococcus (PSE) agar - الأنابيب الايجابية للاختبار المبدئى تخطط على البيئة التأكيديه وتحضن على ٣٥ مئويه لمدة ٢٤ ساعه. المستعمرات البنيه المائله الى اللون الأسود مع وجود هاله بنية حولها ربما تنقل الى أنابيب من بيئة

Brain Heart Infusion Broth + 6.5 % NaCl

والنمو عند التحضين على ٤٥ مئويه يدل على أن المستعمرات تنتمى الى enterococcus group ومن عدد الأنابيب الايجابية يقدر عددها الاحتمالى .

gtz Partner for the Future. Worldwide.

طريقة أغشية الترشيح Membrane Filter Method

بيئة mE agar for enterococci

EIA substrate

m-Enterocccus agar for fecal streptococci

Brain – heat infusion Broth

Brain heart infusion agar

gtz Partner for the Future. Worldwide.

mE method

يختار حجم العينه ويرشح خلال membrane filter وينقل الى سطح البيئه mE (٢٠ – ٦٠ مستعمره على سطح membrane). يحضن غلى درجة ٤١ +/- نصف درجه. بعد ٤٨ ساعة تحضين ينقل الفلتر الى EIA يحضن غلى درجة ٤١ +/- نصف درجه لمدة ٢٠ دقيقة. تعد المستعمرات ذات اللون اقرمزى الى أحمر على أنها الكريات المعويه enterococci وهى تكون راسب بنى الى أسود فى خلف المستعمره.

m-enterococcus method

يختار حجم العينه ويرشح خلال membrane filter وينقل الى سطح البيئه وتترك الأطباق ٣٠ دقيقه قبل ادخالها الحضانه عند ٣٥ مئويه +/- نصف درجه ولمدة ٤٨ ساعة. تعد المستعمرات الحمراء فاتحة أو قاتمه وتكون تابعة enterococci.

التفرقه:

تنقل المستعمره الى سطح brain heart infusion agar وتحضن لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة على ٣٥ مئويه. تنقل مستعمرة منفصله الى Brain heart infusion broth والى شريحتين زجاجيتان .

تحضن أنابيب Brain heart infusion broth عند ٣٥ مئويه لمدة ٢٤ ساعة.

ويضاف فوق أكسيد الأيدروجين ٣% الى الفيلم على الشريحة اذا تكونت فقاقيع يكون الاختبار موجب و١ه دليل على أن المستعمرة ليست من البكتريا السبحية البرازيه.

- أما اذا كان الاختبار سالب فيعمل سبغة جرام للفيلم على الشريحة الثانيه.

المفروض أن Fecal Streptococci، Enterococci

موجبه لجرام وتكون كرويه مزدوجة أو فى سلاسل .

- ينقل لوب من Brain heart infusion broth الى كلا من:

Bile esculin agar ويحضن عند ٣٥ مئوية لمدة ٤٨ ساعة.

Brain heart infusion broth ويحضن عند ٤٥ مئوية لمدة ٤٨ ساعة.

•Brain heart infusion broth مضاف اليه ٦.٥ % ملح طعام والتحضين عند ٣٥ مئوية لمدة ٤٨ساعة. كتاليز -، جرام + كرويه على Bile esculin agar وعند ٤٥ مئويه فى Brain heart infusion broth يدل على أن المستعمرة تنتمى الى Fecal streptocci group

النمو عند ٤٥ مئويه فى وجود ٦.٥% ملح الطعام يدل على أن المستعمرة تنتمى الى enterococcus group

نظم الولايات المتحدة

فى عام ١٩٧٧ أختيرت النظم القومية الأوليه لمياه الشرب

Drinking Water Standards

National Interim Primary Drinking Water Regulations

لوضع جميع النظم العامة لمياه الشرب. وبصفة عامة فان الآبار الخاصة هى الوحيدة التى لم تنظم وذلك لأنها لا تخدم ١٥ وصلة خدميه أو تخدم على الأقل ٢٥ شخص يوميا لمدة ٦٠ يوما فى العام.

ولتأكيد الأمان لجميع مياه الشرب يجب أن تستعمل نفس النظم الأولية المشار اليها كخطوط استرشادية بالنسبة للآبار.

وبناء على النظم المشار اليها حدد أقصى مستوى للملوثات Maximum Contaminany Level (MCL) وهو أعلى تركيز مسمح به من ملوث معين فى مياه الشرب.

بعض هذه التركيزات وضعت لمنع المشاكل الصحية التى تنشأ عن تركيز عالى من ملوثات مختلفة خلال مدة طويلة من الوقت.

ومع ذلك، فان وجود الملوثات الميكروبيولوجيه استعملت كدليل على وجود التلوث وامكانية حدوث مشاكل صحية منها.

وبلتالى اختبرت مياه الشرب لبكتريا القولون الكلية Total coliform لتدل على التلوث الحديث.

عند استعمال طريقة العد الاحتمالى Most Probable Number (MPN) فان أقصى مستوى للتلوث MCLs يكون:

لا تتواجد بكتريا القولون فى اكثر من ١٠% من جزئية ١٠ ملل من العينات المختبرة فى الشهر

اذا كانت العينات المختبرة خلال الشهر أقل من ٢٠ فلا يسمح بأكثر من عينه واحدة تعطى نتيجة ايجابية بالنسبة الأجزاء الثلاث المستعمله من العينة فى تقدير MPN.

- لا يسمح بأكثر من ٥ % من العينات تعطى نتيجة ايجابية فى الثلاثة اجزاء المستخدمة من العينة فى تقدير MPN وذلك اذا كانت العينات المختبرة ٢٠ أو أكثر خلال الشهر.
- عند استعمال طريقة الترشيح خلال الأغشية الفارزة Membrane filtration (MF) فان أقصى مستوى للتلوث يكون:
- وحدة واحدة من وحدات تكوين المستعمرات Colony Forming Unit (CFU) فى كل ١٠٠ ملل من العينه كمتوسط للغينات المختبرة خلال شهر.

- يسمح بعينة واحدة تعطى ٤ وحدات من وحدات تكوين المستعمرات (CFU) فى ١٠٠ ملل من العينة وذلك اذا كان عدد العينات أقل من ٢٠ عينة خلال الشهر.
- اذا كانت العينات المختبرة ٢٠ أو أكثر خلال الشهر يسمح ٥% من العينات تعطى ٤ وحدات من وحدات تكوين المستعمرات (CFU) فى كل ١٠٠ ملل من العينه .
- فى عام ١٩٨٥عدلت المواصفات الأمريكية بعد ذلك بأنه لا يسمح بتواجد بكتريا القولون الكلية Total coliform فى أى عينه من مياه الشرب.

الخطوط الاسترشادية لمنظمة الصحة العالمية
World Health Organization Guidelines

يجب خلو مياه الشرب من بكتريا القولون البرازية Fecal coliform وذلك عند اختبار ١٠٠ ملل من العينة وذلك بالنسبة لكل مصادر المياه سواء كانت توزع خلال مواسيرأو أية وسيلة أخرى معالجة أو غير معالجة.

أما بالنسبة لبكتريا القولون الكلية Total coliform فانها يجب أن تكون غائبة فى ١٠٠ ملل من العينة المختبرة المعالجة والموزعة خلال مواسير ويسمح عرضيا بتواجد مستعمرتان فى كل ١٠٠ ملل.

بالنسبة للمياه التى لا توزع خلال مواسير يمكن السماح بتواجد ١٠ من وحدات تكوين المستعمرات فى كل ١٠٠ ملل من العينة.

تكرارية تواجد أعداد عالية من بكتريا القولون يعنى الحاجة الى مصدر بديل يتوفر فيه حماية أكثر من التلوث. الفشل فى تحقيق خاصية غياب بكتربا القولون الكلية والبرازية فى مصادر مياه الطوارىء يعنى الحاجة الى غليان الماء.

gtz Partner for the Future. Worldwide.

معايير نوعية مياه التنزه والاستجمام

*حددت المواصفات للمياه العذبة والمالحة بالآتى (EPA, 1986):

فى حالة المياه العذبة: عدد ايشيرشيا كولاى يساوى أو أقل من ١٢٦ / ١٠٠ ملل

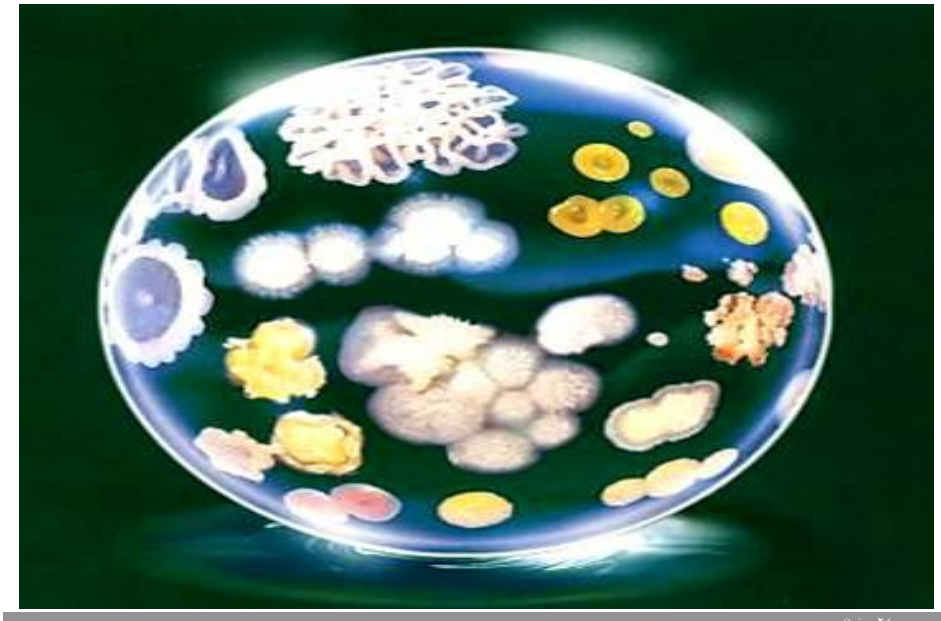
عدد مجموعة انتيروكوكى يساوى أو أقل من ٣٣/ ١٠٠ ملل

فى حالة المياه المالحة (البحر) : عدد مجموعة انتيروكوكى يساوى أو أقل من ٣٥ / ١٠٠ ملل.

ولقد حددت طريقة الكشف عن كلا الدليلين باستخدام الأغشية الفارزة Membrane Filter(EPA 600/4-85-076).

Seite ٢٣٩

gtz Partner for the Future. Worldwide.



Seite ٢٤٠

Detection

Basic methods used for "total" numbers are

1. Standard Plate Counts (SPC) for viable cells
2. The most-probable numbers (MPN) for viable cells (statistical determination)
3. Dye-reduction techniques for viable cells that posses reducing capacities
4. Direct Microscopic Counts (DMC) for both viable and nonviable cells

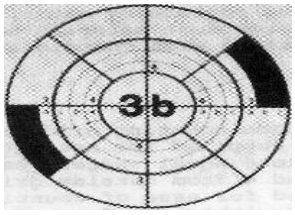
Alternative Plating Techniques

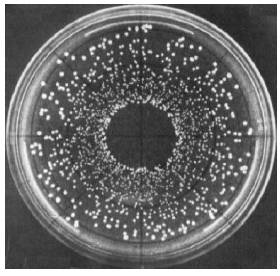
Spiral Plating

☺ Using Spiral plater

- Continuously distributes the liquid inoculum on the surface of a rotating agar plate
- Results in depositing the sample in an Archimedes spiral
- After inoculation colonies will grow intensively near the center of the plate while fewer grow toward the edge
- Approved by Assciation of Official Analytical Chemists (AOAC)

Spiral Plating



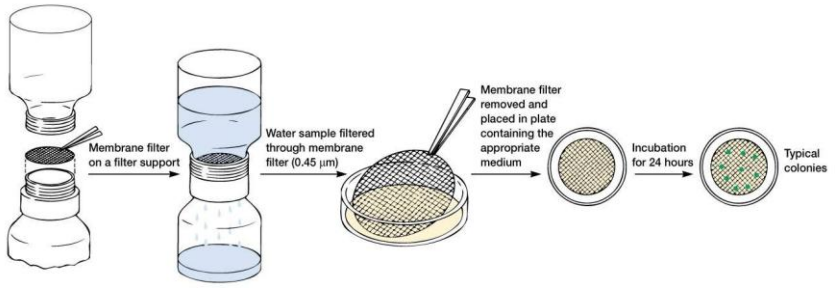


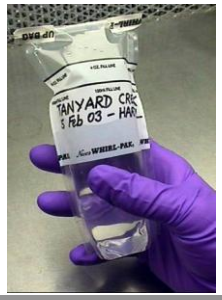
Spiral Plating

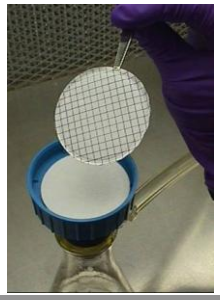
Advantages	Disadvantages
- Less agar is used - Fewer plates and pipettes are required - Little training is required for its operation	- Food particles may block the dispensing stylus It is more suitable for use of liquid food - It is expensive is more suitable for use of liquid food - It is expensive

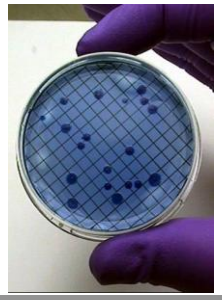
Membrane Filters

- Membranes with a pore size will retain bacteria (generally 0.45 µm)
- Then the membrane is placed on an agar plate
- Collected microorganisms are viewed and counted
- Suitable for samples that contain low numbers of bacteria
- Example of membrane filters is Hydrophobic Grid Membrane Filter (HGMF)









Membrane Filter

Advantage

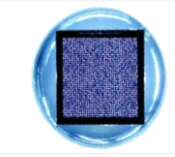
More than 100ml samples can be tested.

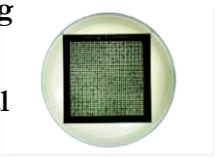
Effective and acceptable technique. Used to monitor drinking water in government laboratories.

one of a few methods that will allow the isolation and enumeration of microorganisms

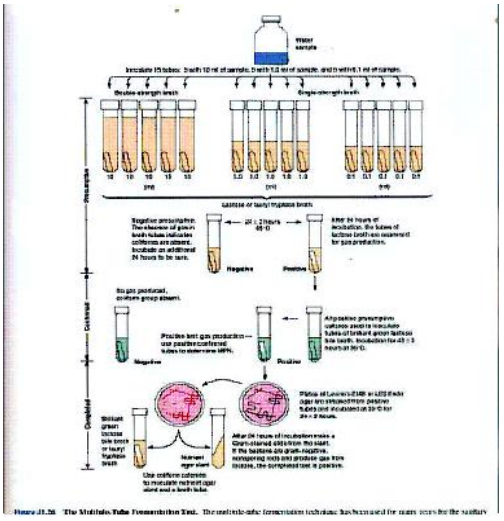
HGMF

Advanced by Sharpe and Michaud
Widely used to enumerate microorganisms from a variety of food products
1,600 wax grids on a single membrane filter (hydrophobic wall to prevent the spread of colony)
Can detect as few as 10 cells/g
Can be used to enumerate all cfu's including indicator organisms
Approved by AOAC for total coliforms, fecal coliforms, and salmonellae





The Most-Probable Number



-Presumptive test
❖Determine by gas produced

-Confirmed test
❖Streak on EMB agar plate

-Completed test
❖Tranferring to lactose broth and NA slant

The Most-Probable Number

Combination of Positives	MPN Index/ 100 ml	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
4-2-0	22	9	56
4-2-1	26	12	65
4-3-0	27	12	67
4-3-1	33	15	77
4-4-0	34	16	80
5-0-0	23	9	86
5-0-1	30	10	110
5-0-2	40	20	140
5-1-0	30	10	120
5-1-1	50	20	150
5-1-2	60	30	180
5-2-0	50	20	170
5-2-1	70	30	210
5-2-2	90	40	250
5-3-0	80	30	250
5-3-1	110	40	300
5-3-2	140	60	360

The Most-Probable Number

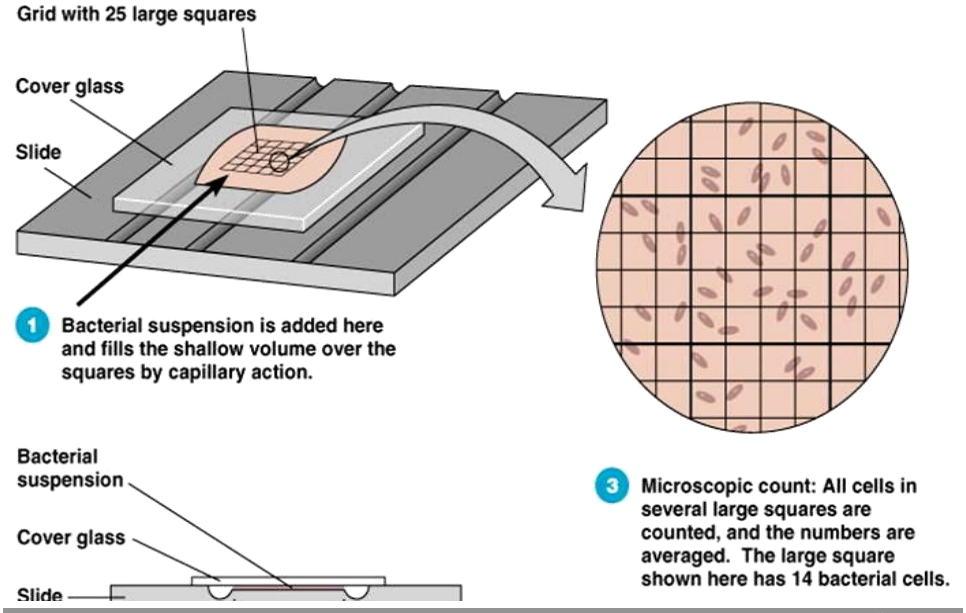
Advantages	Disadvantages
1. It is relatively simple 2. Results from one laboratory are more likely than SPC results to agree with those from another laboratory 3. Specific groups of microbes can be determined by use of appropriate selective and differential media 4. It is the method of choice for determining fecal coliform densities	1. Not all organisms reduce the dyes equally 2. Not applicable to food specimens that contain reductive enzymes

Dye Reduction

Estimate the number of viable organisms in suitable products
Methylene blue and resazurin
Add prepared supernatants of food to standard solution
Methylene blue : blue → **white**
Resazurin : blue → **pink or white**
Time used is inversely proportional to the number of organisms in the sample
A long history of use in the dairy industry, especially to measure microbial quality from raw milk

Direct Microscopic Count

- Smears of food specimens or cultures onto a microscope slide
- Stain with an appropriate dyes
- View and count cells with the aid of microscope
- Widely used in dairy industry



Direct Microscopic Count

Advantages	Disadvantages
1. It is rapid and simple 2. Cell morphology can be determined 3. Fluorescent probes for improved efficiency	1. Results depends on each analyst 2. Both viable and nonviable are counted 3. Food particles are not always distinguishable from microorganisms 4. Some cell may not take the stain well

Questions

What is the method used for determining both viable and nonviable cells?

- Direct microscopic count

Which method is popular in testing the presence of coliforms?

- The most-probable number method

What is the relationship between time used and number of microorganisms in dye reduction method?

- Inversely proportional

Deutsche Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH
Water & Wastewater Management Program
Holding Company for Water and Wastewater (HCWW),
Corniche El Nil, Water Treatment Plant-Road El Farag
Tel.: +2 02 245 98 405/411
Fax: +2 02 245 98 405/411
Website: www.gtz.de

الوكالة الألمانية للتعاون الفني
برنامج إدارة مياه الشرب و الصرف الصحي
الشركة القابضة لمياه الشرب و الصرف الصحي
كورنيش النيل محطة مياه روض الفرج
تليفون : ٤١١/٥٠٤ ٩٨ ٢٤٥ ٠٢ ٠٠
فاكس: ٤١١/٥٠٤ ٩٨ ٢٤٥ ٠٢ ٠٠
موقع إلكتروني: www.gtz.de