العدّ الكلي للبكتريا في المياه

الكلية كلية العلوم للبنات القسم قسم علوم الحياة المرحلة 3
أستاذ المادة تساهيل حامد كاظم حمزة الدليمي 17:52:57 06/12/2016

Share

الأحياء المجهرية في المياه المختبر الثامن Water microbiology

العدّ الكلي للبكتريا في المياه

تقسم البكتريا الموجودة في المياه إلى ثلاث أقسام تبعا لمصدرها هي:

1- البكتريا التي تعيش بصورة طبيعية في المياه ومعظمها يقع ضمن مجموعة البكتريا السالبة لصبغة كرام وتتضمن أنواع تابعة للأجناس التالية Pseudomonas و Flavbacterium وغيرها . وقد توجد مجموعة البكتريا السالبة لصبغة كرام ولكن بكميات قليلة جدا مثل Micrococcus و Acinetbacter و Chromobacterium.

2- البكتريا التي تأتي من التربة وتنجرف إلى الماء من البزل أو الأمطار والسيول و غيرها مثل بكتريا Bacillus و Streptomyces.

3- البكتريا التي مصدرها أمعاء الإنسان والحيوان أو مخلفاته أي تصل للمياه عند امتزاج مياه الأمطار بالمياه الرئيسة وتكون محملة ببكتريا Bacillus أو وصول المخلفات مباشرة إلى المصدر المستعمل مثل بكتريا القولون وتشمل E.coli و Kelbsiella و Citrobacter .

يعتمد عدد البكتريا في المياه على طبيعة المياه فالأنهار غير الملوثة تحوي أعدادا قليلة لا تتجاوز 100 خلية /سم 3 والمياه القريبة من المدن تحوي أعدادا أكثر نتيجة إضافة مياه المجاري والمصانع إليها وقد يصل العدد إلى مليون خلية /سم 3.

إن التقدير الكلي لعددً البكتريا الموجودة في المياه يعطي بشكل عام فكرة عن درجة التلوث البكتيري للماء من دون الإشارة إلى الأنواع البكتيرية الموجودة فيه ويكون العدّ بطريقتين:

1- التقدير المباشر للخلايا البكتيرية في الماء

يمكن تقدير عدد الخلايا البكتيرية المباشر في عينة الماء بالاستعانة بالمجهر ويتم ذلك عن طريق تقدير عدد البكتريا في كمية قليلة من العينة الممزوجة بعد وضعها فوق شريحة المجهر (شريحة عد كريات الدم الحمر) المقسمة إلى مربعات معلومة البعد والمساحة ومن حساب معدل عدد البكتريا في المربع الواحد وضرب هذه القيمة في المعامل ألمجهري ,يمكننا الحصول على عدد البكتريا في سم3 الواحد من العينة,وفي حالة العينات المخففة تضرب هذه القيمة بمقلوب نسبة التخفيف .ومن مساوئ هذه الطريقة لا يمكن التمييز بين الخلايا الحية والخلايا الميتة في العينة المفحوصة.

عدد البكتريا المحسوبة في الحقول

عدد البكتريا /مل = ---------- × 20000 ×مقلوب التخفيف

عدد الحقول

2- التقدير غير المباشر لعدد الخلايا البكتيرية في الماء

يقدر بهذه الطريقة عدد الخلايا الحية ذات القدرة على التكاثر الموجودة في سم3 الواحد من العينة عند تهيئة الظروف المناسبة لنموها ويجري ذلك من خلال استعمال الطرق التالية:

A - طريقة العد بالأطباق Plate count

1- يحضر ثلاث أطباق معقمة لكل عينة أو تخفيف .

2 - يرفع غطاء الطبق من احد الجوانب بأقل فتحة ممكنة وينقل إليه بواسطة ماصة معقمة

(1 مل) من العينة أو من أي تخفيف يرغب فيه.

3- يرفع غطاء الطبق مرة أخرى ويصب فيه 20- 15 مل من الوسط الغذائي المعقم وتكون درجة حرارته 44-46 م0.

4- تخلط محتويات الطبق جيدا وذلك بتحريك الطبق حركة رحوية بشكل رقم 8 .

5- تترك الأطباق لتتصلب .

6- تحضن الأطباق بشكل مقلوب بدرجة حرارة 35-37 م0 لمدة 24 ساعة وعند عدم وجود نمو تزود مدة الحضانة 24 ساعة أخرى للتأكد من النتائج .

7- بعد انتهاء مدة الحضانة تعد مستعمرات كل طبق ويتم الحساب بطريقة المربعات أو باستخدام جهاز العد بحساب عدد المستعمرات في المليمتر.

B- طريقة النشر Spreading method

يزرع (1 مل) من العينة المزروعة الأصلية أو المخففة في وسط غذائي موضوع في طبق بتري معقم بواقع ثلاث أطباق لكل تخفيف أو عينة تتم عملية الزرع بوضع(1 مل) وينشر على الوسط بواسطة swab أو ناشر معدني معقم وتراعى وجود الظروف المعقمة.

تحضن المزارع بدرجة حرارة 35-37 م0 لمدة 24 ساعة ثم تحسب عدد المستعمرات النامية والذي يمثل عدد البكتريا الموجودة في (1 مل)من العينة المدروسة.

العدد الكلي لبكتريا القولون Total coliform bacteria (TC)

يتم إجراء هذا الفحص لغرض الكشف عن بكتريا المجموعة القولونية في الماء . ومن أهم الأجناس التابعة لبكتريا القولون هي بكتريا E.coli و Klebsiella و Citrobacter و Entrobacter.

من المعلوم إن العوامل المرضية التي تدخل للمياه تصل عن طريق فضلات الإنسان والحيوان إضافة إلى بعض الأنواع البكتيرية وخاصة E.coli و البكتريا الأخرى من مجموعة coliform والمسبحيات البرازية Sterptococcus faecalis و perfingens Clostiridium , وهذه جميعها تكون Normal flora في الأمعاء الغليظة للإنسان والحيوان ومن المؤكد إنها موجودة في البراز لذلك فان وجود أي نوع من أنواع البكتريا التعايشية في الماء هو دليل على التلوث البرازي سواء مصدرها بشري أو حيواني .

إن وجود هذه الأنواع في الماء يدل على إن الطريق مفتوح للعوامل المرضية المعوية لتدخل إلى الماء ولكونها موجودة هي الأخرى في البراز أيضا.

يتم حساب أعداد بكتريا القولون حسب الطرق التالية:

1- طريقة الترشيح Membrane filter method طريقة تستعمل في حساب بكتريا القولون وأساس عمل هذه الطريقة هو ترشيح كمية من الماء من خلال أغشية خاصة ثم يوضع المرشح وما بقيت عليه من البكتريا على أوساط خاصة لنمو البكتريا القولون فقط , حيث تحضن هذه الأوساط مع المرشح filter لمدة يوم أو يومين على حرارة 37م0 وبعدها تعد المستعمرات النامية

تتميز هذه الطريقة عن الطرق الأخرى بسرعتها والحصول على نتائج خلال 18-24 ساعة . كما يمكن فحص كميات كبيرة من المياه بوقت قصير كذلك يمكن تركيز أعداد كبيرة من البكتريا وخاصة البكتريا الممرضة إذا وجدت بأعداد قليلة من خلال ترشيح كميات كبيرة من الماء ولا تحتاج هذه الطريقة إلى أجهزة أو أوساط زرعيه كثيرة.

ومن مساوئها إنها لا تصلح في حالة فحص المياه العكرة والأطيان العالقة تترسب على الغشاء وتعيق عملية الترشيح

2- طريقة العدّ الأكثر احتمالا Most probable number وتعتبر هذه الطريقة هي الأكثر اعتمادا في الدراسات وتتم كالآتي :

*** تحضير الوسط الغذائي : يستعمل وسط مرق الماكونكي McConkey broth medium لهذا الفحص , ويحضر بتركيزين مختلفين وكالاتي :

A- مفرد التركيز: يحضر بإذابة 35 غم في لتر ماء مقطر ثم يضبط الأس الهيدروجيني إلى 7.2 ويسخن قليلا مع الرج لمجانسته ثم يوزع في أنابيب اختبار تحوي كل منها على أنبوبة درهم Durham tube إذ

يوزع الوسط في تلك الأنابيب بواقع 10 مل لكل أنبوبة ثم تعقم هذه الأنابيب بجهاز Autoclave بحرارة 121م0 بضغط 1جو لمدة 15 دقيقة .

B- مضاعف التركيز: يحضر بإذابة 70 غم في لتر ماء مقطر ثم تجري نفس الخطوات في الوسط أحادي التركيز.

بعد تحضير الوسط يتم إتباع الآتي :

1- يتم تلقيح ثلاث مجاميع من الأنابيب بعينات المياه إذ أن المجموعة الأولى تكونت من خمس أنابيب .

أنابيب المجموعة الأولى : تحوي 10 مل من وسط مرق الماكونكي ذات التركيز المضاعف

أنابيب المجموعة الثانية والثالثة كل واحده منها تحوي 10 مل من وسط مرق الماكونكي المفرد التركيز (في كل أنبوبة توضع أنبوبة درهم بشكل مقلوب).

بعد تعقيم الوسط كما أعلاه يجب التأكد من عدم وجود فقاعات في أنابيب درهم .

2- يتم تلقيح أنابيب المجموعة الأولى ب 10 مل من عينة الماء المراد فحصها لكل أنبوبة بعد رج عينة الماء قبل ذلك.

3- ينقل 1 مل من عينة الماء إلى أنابيب المجموعة الثانية.

4- ينقل 0.1 مل من عينة الماء إلى أنابيب المجموعة الثالثة.

5- تحضن جميع الأنابيب للمجاميع الثلاث في الحاضنة لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 م0

6- يتم حساب الأنابيب الموجبة لكل مجموعة . إذ أن تكون الغاز داخل أنابيب درهم وتكون الحامض نتيجة موجبة. أما الأنابيب السالبة لكل مجموعة فترجع للحاضنة وتترك مدة 24 ساعة أخرى.

بعد ذلك تقرأ النتيجة النهائية للأنابيب الموجبة لكلا المدتين المستعملة 24 ساعة و 48ساعة.

7- وبموجب جدول خاص يتم تقدير العدد الأكثر احتمالا لبكتريا القولون (TC) في 100 مل من نموذج الماء الأصلي .

عزل وتشخيص البكتريا

للحصول على مزارع نقية للبكتريا تعزل أولا بتنميتها على أوساط زرعيه مغذية صلبة مثل وسط البيتون ومستخلص اللحم والخميرة أو على أي وسط ملائم ثم يتم تنقيتها بإحدى الطرق التالية :

1- طرق تقوم على أساس الفصل الميكانيكي للكائن ألمجهري Mechanical Separation of Microorganisms وتعتبر هذه الطريقة الأكثر استعمالا.

2- طرق بيولوجية Biological method

أولا: الطرق الميكانيكية:

وتتميز بفصل خليط من الخلايا أو مجموعة من الخلايا إلى خلايا معزولة بتنميتها في وسط زرعي ملائم وبعد إن تنمو هذه الخلايا إلى مستعمرات تنقل إلى سطح الوسط الصلب لتنقيتها. ويمكن الحصول على مزارع نقية وذلك باستخدام طريقة التخافيف وصب الأطباق ثم استعمال طريقة التخطيط أو النشر للتأكد من مدى نقاوتها . ثم تحفظ كمزارع نقية على أوساط في أنابيب اختبار بصورة مائلة من الوسط الزرعي.

ثانيا : الطرق البيولوجية Biological method:

تقوم على أساس الاختلاف في الصفات الميكروبية وتستعمل لأغراض معينة فقط وهي تستعمل في العادة للحصول على مزارع نقية للبكتريا المكونة للسبورات فقط الموجودة مع البكتريا غير المكونة للسبورات.

وفي هذه الحالة تترك المزارع المختلطة مدة من الزمن للسماح بإكمال تكوين السبورات ويتم التأكد من ذلك بالفحص ألمجهري. إذ يتم نقل جزء من البكتريا النامية على الوسط إلى أنبوبة تحوي ماء معقم ويمزج جيدا ويوضع في حمام مائي بواسطة حامل ويترك في الحمام المائي بدرجة الغليان لمدة 2-3 دقائق و بعدها بدرجة حرارة 80 م0 لمدة 10 دقائق. ثم يزال ذلك ويوضع مباشرة في ماء بدرجة حرارة الغرفة ويزرع منه في الوسط الزرعي الصلب ويوضع في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م0. فتنمو عندئذ البكتريا المكونة للسبورات فقط .كما تستعمل الطرق البيولوجية لفصل الأحياء المجهرية اللاهوائية عن الهوائية .

بعد العزل والتنقية تبدأ عملية التشخيص والتي تتضمن عدد من الخصائص التشخيصية وكالاتي:

1- الخصائص المظهرية Morphological Properties

تشمل دراسة خصائص المستعمرات وصفاتها المظهرية بما فيها الشكل والحجم والارتفاع والقوام واللون والقابلية على إنتاج الصبغات والرائحة وغيرها

2- الخصائص المجهرية Microscopic Properties

وتتضمن دراسة شكل البكتريا تحت المجهر ودراسة قابليتها على إنتاج السبورات وكيفية تجمع الخلايا فضلا عن استجابة البكتريا لصبغة كرام .

3- الخصائص الكيموحيوية Biochemical Properties

تشمل عدد من الاختبارات التشخيصية مثل اختبار إنزيم الكاتليز والاوكسيديز والاندول واليوريز واختبار الحركة وتحلل الجيلاتين والنشا والدم واختبار تحلل السكريات وغيرها من الاختبارات المهمة.

4- الخصائص المصلية Serological Properties

وتتضمن دراسة صفات وطبيعة الأنتجينات Antigens السطحية والتي تظهرها الأجسام المضادة Antibodies المناسبة والمحددة لها وهذه الصفات دقيقة ومتخصصة لأنها تعتمد على الصفات الوراثية (الجينات) .

إن دراسة الخصائص المظهرية غالبا ما تتأثر بنوع الوسط الزرعي للمستعمرات النامية على أوساط زرعيه انتخابية Selective media إذ أن لأغلب مجاميع البكتريا وسط انتخابي خاص تنمو عليه كل مجموعة بحيث لها صفات شكلية تميزها عن غيرها وفي بعض الأحيان تثبط نمو المجاميع الأخرى من البكتريا وكما مبين كالآتي :

1- Staphylococci Manitol salt agar مستعمرات صفراء كبيرة

2- Sheep blood agar أو Sodium Azide agar Streptococciمستعمرات ناعمة شفافة كرأس الدبوس.

3- Vibrio ThioSulphat Citrate Bile –Salt Sucrose agar (TCBS) .

4- MacConkey agar أو MacConkey broth coliform bacteria مستعمرات ذات لون وردي Pink colour

5- Pseudomonas agar أو King –B Pseudomonas مستعمرات شفافة ناعمة .

6- Salmonella Shigella Agar بكتريا Salmonella و Shigella.

المادة المعروضة اعلاه هي مدخل الى المحاضرة المرفوعة بواسطة استاذ(ة) المادة . وقد تبدو لك غير متكاملة . حيث يضع استاذ المادة في بعض الاحيان فقط الجزء الاول من المحاضرة من اجل الاطلاع على ما ستقوم بتحميله لاحقا . في نظام التعليم الالكتروني نوفر هذه الخدمة لكي نبقيك على اطلاع حول محتوى الملف الذي ستقوم بتحميله .

الرجوع الى لوحة التحكم

جميع الحقوق محفوظة لشعبة تطوير المواقع / رئاسة جامعة بابل

Web Development Department / Chancellor Office 2016-2015