الفصل العاشر

التحليل البكتريولوجي باستخدام طريقة الترشيح الغشائي

الفصل العاشر

التحليل البكتريولوجي باستخدام طريقة الترشيح الغشائي

أهداف التدريب (التعلم):

بانتهاء التدريب على أعمال هذا الفصل ينبغى أن يكون المتدرب قادراً على أن:

- يبين الاختلاف بين طريقة الترشيح الغشائى عن طريق الأنابيب المتعددة.
- يحدد العوامل التى تؤثر على حجم عينة الماء المعدة للترشيح.
- يذكر المواد والتجهيزات اللازمة لإجراء طريقة الترشيح الغشائى.
- يشرح الإجراءات الخاصة بتحضير كميات صغيرة من الأوساط لأنواع المرق.
- الخطأ فى التحاليل يشرح بالتفصيل خطوات وإجراءات تعيين إجمالى القولونيات.
- يذكر طريقة تعيين عدد القولونيات الغائطية.
- يحدد مصادر البكتريولوجية.
- يذكر الاحتياطات الواجب مراعاتها عند جمع العينة.
- يحدد احتياطات وإجراءات مراقبة الجودة التى يجب اتخاذها فى المعمل.

المبدأ الأساسي

بعكس طريقة الأنابيب المتعددة، تعطى طريقة الترشيح الغشائي (MF) عـداً مباشراً لإجمالي القولونيات وللقولونيات الغائطية الموجودة فى عينة معينـة من الماء، وتتضمن هذه الطريقة ترشيح حجم معروف من الماء خلال مرشح غشائي سيلولوزي ذي مسام منتظمة قطر كل منها ٠.٤٥ ميكرومتر، تحتجز الجراثيم على سطح المرشح الغشائي. وعندما يوضع الغشاء الذي يحتوى على الجراثيم فى مستنبت تفريقي انتقائي فى حاوية معقمة تحفظ فى حاضنة درجة حرارتها مناسبة، تنمو مستعمرات مميزة من القولونيات والقولونيات الغائطية يمكن عدها مباشرة.

حجم عينة الماء المعدة للترشيح

حيث أن مساحة الترشيح صغيرة نسبياً، فهي تعزز نمو عدد محدود من المستعمرات. والعدد الأمثل هو بين ٢٠ , ٨٠ مستعمرة، يصل بحد أقصى قدره ٢٠٠ مستعمرة. وفى حالة تخطى هذا الرقم، قد تنشأ مستعمرات غير نمطية أو مترابطة (Superimposed) صغيرة جـداً، أو قد يحدث تثبيط (Inhibition) للنمو بسبب التكاثر الجرثومي المفرط. ويعتمد اختيار حجم العينة التى يراد ترشيحها على نوع الماء، ويوضح الجدول رقم (١٠-١) الحجوم المقترحة من العينة للمرشح الغشائي.

جدول رقم (١٠-١)

الحجوم المقترحة من العينة للمرشح الغشائي للكوليفورم الكلي

مصدر المياه	الحجم × المرشح سم^3							
	١٠٠	٥٠	١٠	١	٠.١	٠.٠١	٠.٠٠١	٠.٠٠٠١
مصدر شرب	×							
حمامات سباحة	×							
آبار، عيون	×	×	×					
بحيرات، وخزانات	×	×	×					
مآخذ مياه			×	×	×			
خليج للسباحة			×	×	×			
مياه أنهار				×	×	×	×	
ماء صرف مكلور				×	×	×		
ماء صرف خام					×	×	×	×

وإذا لم يكن مصدر العينة معروفاً، وكان محتواها المحتمل من الجراثيم غير محدد المقدار، يجب ترشيح أحجام من الماء تختلف بمقدار عامل عشري (Factor of ten) للتوصل إلى نطاق ملائم للتحليل. وإذا كان حجم الماء المراد ترشيحه أقل من ١٠ مل، يجب وضع ٢٠ مل على الأقل من ماء تخفيف معقم فى القمع قبل الترشيح.

التجهيزات

بالإضافة إلى التجهيزات والأواني الزجاجية الأساسية المستخدمة فى طريقة الأنابيب المتعددة (MT) (انظر الفصل التاسع)، من الضروري توفر المواد التالية لإجراء طريقة الترشيح الغشائي (MF):

١. شفاط مائي (Water aspirator)، أو مفرغ هواء (Vacuum pump) كهربائي أو أية طريقة ملائمة لإحداث فراغ جزئي يساوي نصف الضغط الجوي على الأقل.
٢. قارورة ايرلنماير (ذات فتحة جانبية) سعة لتر واحد وأنبوبة مطاطية متصلة بها ذات جدار سميك لمنع أنطواء الأنبوبة عند إحداث التفريغ.
٣. دعامة للمرشح مكونة من قاعدة أو دعامة مسامية (Porous) يوضع عليها المرشح ويمكن تثبيتها بقارورة ايرلنماير بواسطة سدادة مطاطية، بالإضافة إلى حاوية علوية يمكن تثبيتها بالدعامة المسامية. ويجب لف قطعتي دعامة المرشح بالورق كل على حدة وتعقيمهما فى الحاضنة لمدة ١٥ دقيقة على الأقل فى درجة حرارة ١٢١°م.
٤. أطباق بترى (Petri) زجاجية أو بلاستيكية بمقياس ٦٠ × ١٥ ملليمتر.
٥. مرشحات غشائية، قطرها ٤٧–٥٠ ملليمتر، وقطر مسامها ٠.٤٥ ميكرومتر. وأكثر المرشحات الغشائية ملائمة المغلفة منها على انفراد والمعقمة سلفاً. ويمكن أيضاً استعمال مرشحات غشائية غير معقمة ولكن يجب لفها فى رزم صغيرة وبأعداد ملائمة (حسب عدد العينات المراد فحصها)، و تعقيمها دفعة واحدة فى الحاضنة وتجفف بالسحب السريع للبخار.

٦. رفائد ماصة مغذية (Nutrient pads) تتكون من أقراص من ورق الترشيح سمكها ١ ملليمتر، وقطرها مطابق لقطر المراشح الغشائية.
٧. ملقط.
٨. عدسة مكبرة، قدرتها على التكبير ٤ أو ٥ أضعاف، لفحص وعد المستعمرات على المرشحات الغشائية.

المستنبتات (الأوساط) وماء التخفيف

يمكن استخدام أوساط متعددة لفحص الجراثيم القولونية بطريقة الترشيح الغشائي. منها غراء لاكتوز تيرغيتول ولاكتوز (TTC)، وغراء تيرغيتول ومرق لاكتوز سلفات اللوريل التى يمكن استخدامها فى فحص الجراثيم القولونية فى درجة حرارة ٣٥°م أو ٣٧°م، وفى فحص جراثيم القولونيات الغائطية فى درجة ٤٤°م. ويجب استعمال أوساط من النوع (Endo-type) فى عد القولونيات فى درجة ٣٥° أو ٣٧°م ومرق (MFC) فى درجة ٤٤°م لعد القولونيات الغائطية، ومع أن كافة هذه الأوساط تعتمد على اختمار اللاكتوز لاكتشاف الجراثيم القولونية الظنية، يختلف التفاعل المميز باختلاف المستنبت. ويعتمد اللمعان المعدني المميز للمستعمرات فى الأوساط التى من النوع (Endo-type) على تكون الألدهيد.

ورغم أنه بالإمكان تحضير الأوساط من المكونات (Ingredients) الأساسية، فقد يكون ذلك غير عملي بالنسبة لمختبر صغير. ولذا يوصى باستخدام أوساط مجففة لهذا الغرض. ويمكن تحضير الأوساط على شكل مرق واستعمالها مع رفائد ماصة مغذية (Nutrient)، أو كصفائح غراء جامدة ويمكن تجميد الأمراق بإضافة ١.٢-١.٥% من الغراء قبل الغلي. فعلي سبيل المثال تبين فيما يلي الإجراءات الخاصة بتحضير كميات صغيرة من الأوساط المتعلقة بمرق (M-Endo MF) ومرق (MFC):

أ. مرق M-Endo MF:

١. أذب ٢.٤ جراماً من مستنبت مجفف فى ٥٠ مل من الماء المقطر وأضف ١ مل من الكحول الإيثيلي ٩٥%.

٢. عقم بالتسخين برفق إلى مجرد نقطة الغليان. ويمكن تخزين الوسط لغاية ٤ أيام فى الثلاجة، ويكفى نحو ٥٠ مل من الوسط لإجراء ٢٥ اختباراً تقريباً.

ب. مرق MFC:

١. أذب ١.٩ جراماً من الوسط المجفف فى ٥٠ مل من ماء مقطر يحتوى على ١.٠% من حمض الروزوليك فى ٠.٢ مول/لتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم.
٢. سخن الوسط إلى نقطة الغليان.
٣. أبعده عن الحرارة بسرعة وبرده إلى ما دون ٤٥°م.

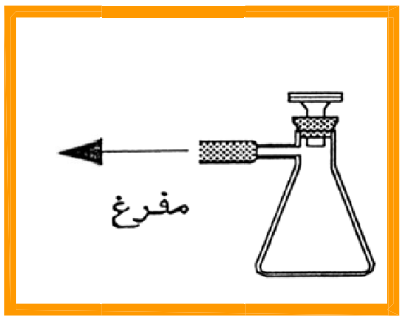
هذا ويمكن تخزينه لمدة ٤ أيام فى الثلاجة. ويتعين تحضير ماء التخفيف كما هو موضح فى الفصل التاسع.

الطريقة:

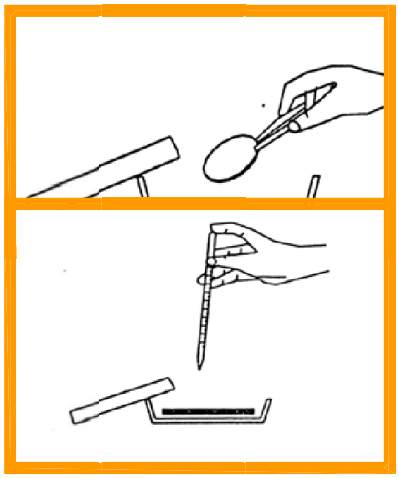
فيما يلى سردا للطرق العامة، ولكن توجد هناك أنواع مختلفة من وحدات الترشيح والأجهزة الأخرى.

تعيين إجمالي القولونيات

أ. أوصل قارورة أيرلنماير جانبية المقبض Side-arm إلى مصدر التفريغ وضع الدعامة المسامية Porous فى مكانها. وفى حالة استخدام مضخة كهربائية، يستحسن وضع قارورة ثانية بين قارورة ايرلنماير ومصدر التفريغ، وتقوم القارورة الثانية مقام مصيدة للماء لتحمى المضخة الكهربائية.



ب. أفتح طبق بترى وضع فيه رقيقة.

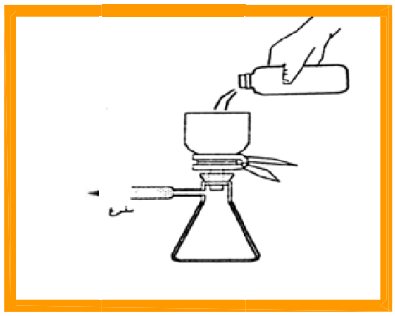


جـ. أضف ٢ مل من وسط انتقائي مرقى بواسطة ماصة معقمة لإشباع الرفادة

د. ركب وحدة الترشيح بوضع مرشح غشائي معقم فوق الداعمة المسامية مستخدماً ملقطاً معقماً بالنار.

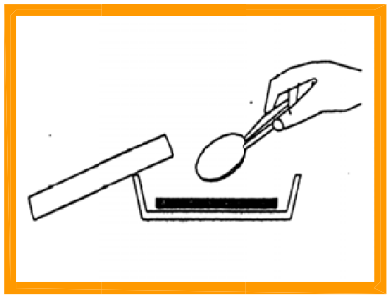
هـ. ضع الحاوية العلوية فى مكانها وثبتها بواسطة المشابك الخاصة (يتوقف نوع المشبك المستخدم على نوع الأجهزة).

و. صب كمية العينة التى يتم اختيارها على أنها مثالية وفقاً لنوع الماء، فى الحاوية العلوية. وإذا كان حجم عينة الاختبار أقل من ١٠ مل يضاف ٢٠ مل على الأقل من ماء التخفيف المعقم إلى الحاوية العلوية قبل الترشيح. شغل مفرغة الهواء.

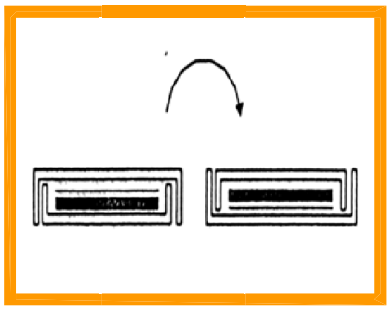


ز. بعد إمرار العينة خلال المرشح، أفصل مفرغ الهواء واشطف الحاوية بواسطة ٢٠-٣٠ مل من ماء التخفيف المعقم. كرر الشطف بعد أن يكون جميع ماء الشطف الأول قد مر خلال المرشح.

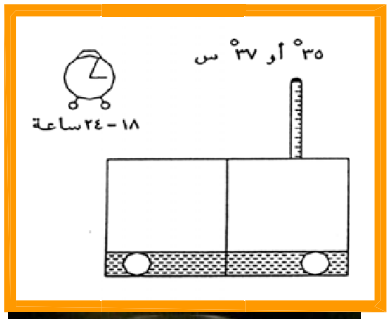
ح. فك وحدة الترشيح باستعمال الملقط، وضع المرشح الغشائي فى طبق بتري على الرفادة على أن يكون الجانب الشبكي إلى أعلى وتأكد من عدم احتجاز فقاقيع هوائية بين الر ادة والمرشح.

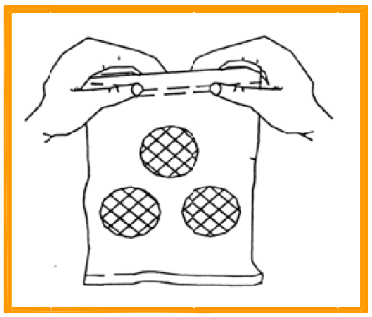


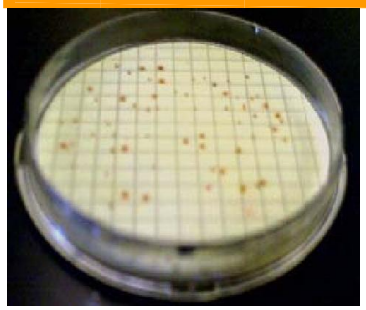
ط. أقلب طبق بترى تمهيداً لوضعه فى الحاضنة.



ى. ضع طبق بترى فى الحاضنة فى درجة حرارة ٣٥°م أو ٣٧°م لمدة ١٨-٢٤ ساعة فى نسبة رطوبة ١٠٠% (لضمان ذلك ضع قطعة قطنية مبتلة فى الحاضنة). وفى حالة استعمال أطباق بلاستيك ذات أغطية محكمة، لا حاجة حينئذ للترطيب.







يكون لون مستعمرات الجراثيم القولونية متوسط الحمرة أو داكن الحمرة، ولها لمعان سطحي ذهبي ضارب للخضرة أو معدني. وقد يغطي هذا اللمعان المستعمرة برمتها، أو يظهر فقط فى وسط المستعمرة.

ويجب عدم عد المستعمرات التى من أنواع أخرى. ويمكن عد المستعمرات بالاستعانة بعدسة. وعندها يمكن التوصل إلى عدد إجمالي القولونيات فى كل ١٠٠ مل كما يلي:

$$\text{إجمالي القولونيات فى كل ١٠٠ مل} = \frac{\text{عدد المستعمرات القولونية التى يتم عدها}}{\text{عدد المليلترات من العينة المرشحة}} \times ١٠٠$$

تعيين عدد القولونيات الغائطية

الطريقة المتبعة فى تعيين عدد القولونيات الغائطية مماثلة للطريقة المتبعة فى تعيين عدد إجمالي القولونيات. رشح العينة كما هو موضح، وضع المرشح الغشائي على الرفادة المشبعة، على سبيل المثال بوسط (MFC).

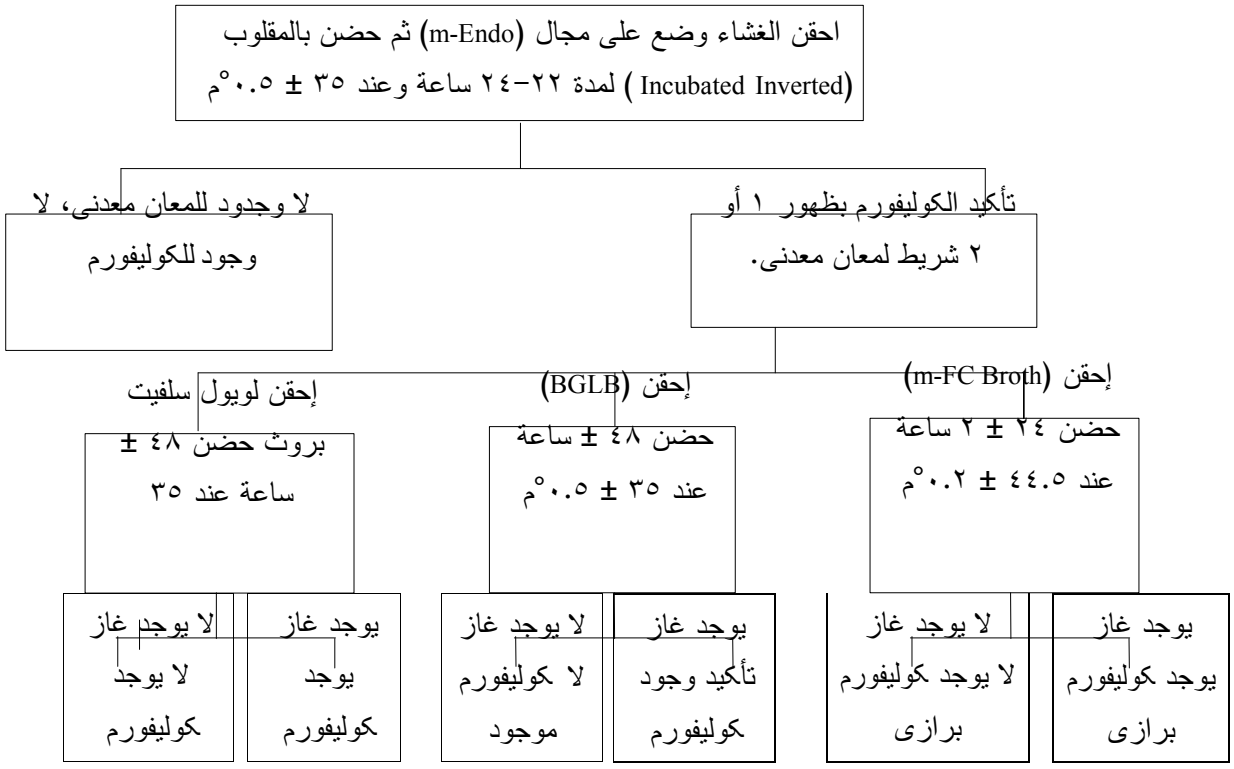
أ. ضع الأطباق فى حاضنة فى درجة حرارة ٤٤ ± ٠.٥°م لمدة ٢٤ ساعة فى درجة الرطوبة ١٠٠% وكبديل لذلك، يمكن وضع أطباق بترى محكمة الإغلاق فى أكياس بلاستيك غير منفذة للماء تمهيداً لوضعها فى الحاضنة.

ب. غطس الأكياس فى حمام مائي يحتفظ به فى درجة حرارة ٤٤ ± ٠.٥°م لمدة ٢٤ ساعة ويجب أن تبقى الأكياس تحت سطح الماء طوال فترة الحضانة ويمكن إبقاؤها مغمورة بالماء بواسطة ثقل مناسب مثل رف معدني.

يكون لون مستعمرات جراثيم القولونيات الغائطية أزرق فى حين أن مستعمرات القولونيات غير الغائطية ذات لون رمادي أو أصفر شاحب Cream ويمكن عد المستعمرات بالاستعانة بعدسة مكبرة وعندها يمكن التوصل لعدد القولونيات الغائطية كما يلي:

$$\text{عدد القولونيات الغائطية فى كل ١٠٠ ملليلتر} = \frac{\text{عدد المستعمرات القولونية التى يتم عدها}}{\text{عدد الملليلترات من العينة المرشحة}} \times ١٠٠$$

ويوضح الشكل رقم (١٠-١) الخطوات التوضيحية للكوليفورم الكلي باستخدام المرشح الغشائي.



شكل رقم (١٠-١)
الخطوات التوضيحية للكوليفورم الكلي باستخدام المرشح الغشائي

مصادر الخطأ فى التحاليل البكتريولوجية:

١. أن يقوم بتجميع العينات عامل وليس فني.
٢. الحصول على عينات من أماكن غير مناسبة.
٣. عدم نقل العينات فوراً للمعمل.
٤. وضع عينات المياه بجوار عينات صرف.
٥. عدم استخدام ثلاجة لنقل العينات.
٦. استخدام مياه تخفيف أو بيئات وزجاجيات غير معقمة.
٧. استخدام بيئات انتهت فترة صلاحيتها.
٨. استخدام أجهزة غير معايرة.
٩. عدم استخدام برامج ضبط وتأكيد جودة التحاليل

الاحتياطات الواجب مراعاتها عند جمع العينة:

١. عدم لمس العبوة للصنبور أثناء جمع العينة.
٢. عدم شطف العبوة بالماء.
٣. عدم التنفس فى داخل العبوة.
٤. عدم ملء العبوة لدرجة الانسكاب.
٥. عدم لمس العبوة أو غطائها من الداخل.
٦. قياس تركيز الكلور المتبقي والعكارة فى موقع أخذ العينة.
٧. منع تساقط الأتربة أثناء جمع العينة.
٨. ألا يزيد الوقت بين سحب العينة وتحليلها عن ٦ ساعات.

اختبارات مراقبة الجودة:

١. يجب أن يكون المعمل نظيفاً وذى درجة حرارة ورطوبة مسيطر عليها. المعمل الجيد التهوية مرغوب فيه. كما يلزم تواجد إضاءة مناسبة (١٠٠٠ لوكس) وما لا يقل عن ٦ قدم فراغ على منضدة المعمل لكل كيميائى أو قائم بالتحليل لحظة التجربة. وكذلك يوصى بتوفير ٥-٦ قدم من مسطح منضدة التحاليل تكون فراغاً احتياطياً لكل قائم بالتحليل، ماء، غاز، مخارج كهربية، أجهزة تفريغ و كل هذا يلزم توفيره.

٢. تحضر عينات ضبط معقمة و تختبر كل عشر عينات فى المرشح الغشائي وفى حالة ظهور تلوث على عينة الضبط، تعتبر كل البيانات لهذا اليوم غير مطابقة مما يتطلب إعادة أخذ العينات.

٣. تستخدم مياه مقطرة فى تحضير المحاليل و التخفيف ويلزم تحليل هذة المياه شهرياً بمراقبة درجة التوصيل الكهربي، الرقم الهيدروجيني، الكلور المتبقي، وفى حالة وجود أى نتائج تزيد عن القيم القياسية، يلزم البحث عن ماء آخر، كما يلزم مراجعة آثار المعادن مثل الرصاص، الكادميوم، الكروم، النحاس، النيكل، الزنك.

٤. يقوم المعمل بتحليل عينة غير معروفة لإثبات الكفاءة (Performance Sample) سنوياً.

٥. لمراقبة جودة مياه التخفيف/ الشطف (Free Dilution or Rinse Water) يضاف ٢٠ سم^{٣} من المياه الى ٢٠ سم^{٣} من مرق المغذيات (Nutrient Broth) ويوضع فى حضانة عند درجة حرارة ٣٥ ± ٠.٥° م لمدة ٢٤ ساعة. فى حالة وجود ترسيب أو عكارة، فإن ماء التخفيف/ الشطف يكون ملوثاً ويجب عدم استخدامه.

٦. تراجع زجاجة عينة لكل كمية معقمة ٢٥ سم^{٣} من مرق المغذيات يأن توضع فى حضانة عند درجة حرارة ٣٥±٠.٥°م لمدة ٢٤ ساعة وتراجع الزجاجة لملاحظة التعقيم أو النمو. في حالة الإيجابية يلزم إعادة غسل وتعقيم كل الزجاجات مرة ثانية.

٧. يلزم توافر كل بيانات ظروف الاستخدام (Media list) مع تاريخ الاستلام، تاريخ الفتح، تاريخ تسلسل الحيازة، كشف البيانات (Data Sheet). كما يلزم تخزين وحفظ عبوات الأوساط التى تم فتحها فى مجفف (Desiccators) لإطالة فترة التخزين إلى ١٢ شهر. وإلا يتم التخلص من هذة المواد بعد ستة أشهر.

٨. يلزم تسجيل كل بيانات ظروف العمل فى ملف خاص يحوى اسم القائم بالتحضير، التاريخ، أسم ورقم العينة، الوزن، الحجم الذي تم تحضيره، وقت التعقيم والحرارة، الرقم الهيدروجيني، المراجعات الموجبة والسالبة.

٩. عند تسجيل بيانات ظروف العمل الإيجابية والسلبية للبكتريا لهذا المجال يتم تحليلها للنمو قبل الاستخدام.

١٠. فى حالة تواجد أكثر من كيميائي، يقوم كل منهم بعد القرص من ٣٠-٣٠٠ كوليفورم كلي على الأقل مرة فى الشهر من المزارع اللاحقة. وعدد المستعمرات يجب أن يكون فى حدود ١٠%.

١١. يراجع تعقيم أغشية المرشح بالتشرب باستخدام ٥٠ سم^{٣} من مرق المغذيات ويوضع فى حضانة عند درجة حرارة ٣٥ ± ٠.٥°م ويراقب النمو على المرق بعد ٢٤ ساعة، وفى حالة نمو إيجابى لا تستخدم هذه المرشحات.

١٢. عند استخدام (MPN)، تراجع ظروف التعقيم بأخذ أنبوبة من العينات المعدة وتوضع فى حضانة عند درجة حرارة ٣٥ ± ٠.٥°م لمدة ٢٤-٤٨ ساعة. وفى حالة وجود عتامة أو غازات، لا تستخدم الكمية كلها (Batch) ويتم التخلص منها.

١٣. تسجل بيانات التعقيم (Autoclave Sheet) لتبين التاريخ، ووقت الدخول ووقت الخروج و درجة الحرارة ومحتويات جهاز التعقيم (Autoclave).

١٤. يلزم مراجعة درجة الحرارة لجهاز التعقيم، ودائرة التوقيت وتسجيلها كل ٤ شهور.

١٥. يلزم تسجيل درجة حرارة الثلاجة أو حمام الماء والحضانات يومياً للتاكد من أنها فى حدود مجال درجة الحرارة المطلوبة.

١٦. يلزم تسجيل رقم عينة الغشاء وتاريخ الاستلام.

١٧. يلزم استخدام لاصقات لا تتأثر بالحرارة أو المياه.

١٨. يلزم وضع ملصقات (Labeled) على كل عبوات الكيماويات والمحاليل تبين نوع وتركيز المحتويات وطريقة الحفظ و تاريخ التحضير وانتهاء الصلاحية، ومن قام بالتحضير.