بسم الله الرحمن الرحيم

التجارب المتعلقة بالبكتيريولجى

اولا جمع العينات

1)تجمع العينات فى زجاجيات بلاستيكية معقمة

2)يزال الكلور منها بواسطة 0.1 مل من محلول $Na_2S_2O_3$ 3% فى زجاجة 120 مللى وهذه كافية لإزالة 5 مجم /لتر من الكلور

3) لو لم يمكن تحليل العينة فى غضون ساعة من أخذها تحفظ العينة فى درجة حرارة أقل 10 درجات مئوية بواسطة الثلج لمدة 30 ساعة إذا كان التحليل خاص بالبكتيريا القولونية ولمدة 8 ساعات إذا كان التحليل خاص بـ heterotrophic plate count

طرق الكشف السريع عن وجود البكتريا

أسهل الطرق هو اختبار السبع ساعات للبكتريا القولونية البرازية Seven hours Fecal Coliform test

الوسط: M-7 h FC agar

Proteose peptone No. 3 or polypeptone	5.0	g
Yeast extract	3.0	g
Lactose	10.0	g
d-Mannitol	5.0	g
Sodium chloride, NaCl	7.5	g
Sodium lauryl sulfate	0.2	g
Sodium desoxycholate	0.1	g
Bromcresol purple	0.35	g
Phenol red	0.3	g
Agar	15.0	g
Reagent-grade water	1	L

نسخن المكونات فى حمام مائى وبعد أن تذوب المكونات نكمل تسخينها حتى 5 دقائق نبرد الى حوالى 55-50 س

نضبط الـ PH على 7.3 بواسطة NaOH (0.1 N) (حوالى 0.35 مل/لتر)

خطوات التجربة :

ناخذ كمية مناسبة من العينة ونرشحها بواسطة membrane filter ثم نضعه على طبق يحتوى على الوسط الغذائى M-7 h FC agar مع ملاحظة عدم وجود أى فراغات بين الوسط الغذائى والفلتر ونضعها فى الحضانة لمدة 7 ساعات لو ظهر لون أصفر يدل على وجود البكتريا القولونية البرازية (حدث تخمر للاكتوز)

طريقة عد البكتيريا غير ذاتية التغذية :

وتسمى طريقة العد القياسية بواسطة الطبق ووحدة القياس هى cfu وهى اختصار جملة "colony forming units" ,

أشهر الاوساط الغذائية :

1) *" plate count agar" أو "trptose glycose yeast agar" واختصاره "TGY" "*
وهذا الوسط الغذائى يصلح لكل من طريقتى pour plate count and spread plate count

2) R2A agar :

وهذا الوسط يصلح لكل من pour plate count ,spread plate count , membrane filter count

الطرق الأكثر شهرة المستخدمة فى عد البكتيريا غير ذاتية التغذية

1)طريقة pour plate

- الوسط المستخدم :pour count agar او R2A agar
- نستخدم التخفيف الملائم لتكوين من 30-300 مستعمرة. ومن كل عينة نحضر طبقين
- ناخذ 1 مل من العينة (نضع الماصة اسفل سطح العينة بـ2.5 سم)ونضعه فى الطبق (يجب أن نفتح جزأى الطبق فتحة صغيرة ونضع من بينها الماصة ونغلق بسرعة حتى لا يحدث تلوث بالبكتريا الموجودة فى الهواء) ثم نصب الآجار فى الطبق ونحرك الطبق حركة دائرية فى مستوى واحد حتى يتوزع الوسط الغذائى على كل العينة (من غير رج) الى ان يتصلب الآجار ثم نقلب الطبق ونضعه فى الحضانة على درجة حرارة 35 م ولمد 48 ساعة.
- نجهز عينة blank وذلك لنتأكد من خلو الوسط الغذائى – الآجار- من أى نوع من البكتيريا
- نسجل التاريخ ونوع العينة والقائم بالتحضير وساعة التحضير.

عملية العد:

تظهر مستعمرات البكتيريا بيضاء مصفرة

- لو قررنا تأجيل عملية العد يمكن أن نحفظ الطبق بعد استخراه من الحضانة فى درجة حرارة 5-10 م لمدة لاتزيد عن 24 ساعة
- قانون العد :

c.f.u /ml =colonies counted /actual volume of sample

وبما أننا أخنا 1 مل من العينة سيكون c.fu=/ml = colonies counted

- ناخذ فى الإعتبار معامل التخفيف
- لو كانت كمية المستعمرات فى الطبق كبيرة نقسمه ونعد جزء ونضرب فى عامل القسمة
- لو كانت العدد كبير جدا بحيث يصعب عده نعيد التجربة بتخفيف أكثر ونحسب معامل التخفيف

2) ***membrane filter method***

الوسط المستخدم : R2A agar

- قطر الغشاء لا يزيد عن 0.45 µm
- ناخذ 1 مل من العينة ونضعه فى كمية ماء مقطر معقمة ثم نصبه على الغشاء حتى يتم توزيع العينة على مساحة الغشاء ثم نرفع الغشاء برفق بواسطة آداة معقمة
- نكون قد جهزنا مسبقا طبق وفيه الوسط المغذى (الآجار R2A المتصلب)
- نقلب الطبق ونضعه فى الحضانة على درجة حرارة 35 لمدة 48 ساعة أو أكثر قليلا أو على درجة حرارة 20-28 لمدة 5-7 ايام
- طريقة العد مثل طريقة pour plate

***تقنية العد الكلى للبكتيريا القولونية (التخمر**

الكشف عن المجموعة القولونية

تستخدم هذه الطريقة للكشف عن كل أنواع البكتيريا التى تستطيع تخمير اللا كتوز فى تحضين 35 م لمدة 48 ساعة

فى هذه الطريقة أثر وجود البكتيريا سيظهر على صورة وجود غاز(co2) او تغير فى الـ PH –تزيد الحامضية- يمكن أن نستخدم 0.01 g من bromocresol purple كدليل سنسمى العينة التى يثبت وجود اى بكتيريا بها بأنها عينة موجبة +ve

والعينة السالبة -ve هى التى لا يتواجد بها اى أثار البكتيريا من الغاز او الحامضية

الوسط المستخدم laryl broth

طريقة التحضير :

تعتمد طريقة التحضير على عدد الملليمترات المضافة من العينة او التخفيف

فعندما نضع 1 مللى من العينة سنضيف 10 مللى من اللوريل (35.6 جم من اللوريل فى اللتر)

وعندما نضع 10 مللى من العينة سنضيف 10 مللى من اللوريل (جم 71.2 من اللوريل فى اللتر)

يمكن الكشف عن المجموعة القولونية بطريقتين

1) تقنية التخمر بواسطة الانابيب المتعددة او ما يسمى بتجربة الوجود والغياب (وذلك من خلال الاطوار الفتراضى والتكميلى والتاكيدى)
2) المرشح الغشائى
3) انتاج الأساس الإنزيمى

****

اولا فى حالة المياه المرشحة

نأخذ 100 مل من العينة أو 5 أنابيب كل واحدة 20 ملل او 10 أنابيب كل واحدة تحتوى على 10 مل

1 الوسط الإفتراضى :

نستخدم اللوريل بروس كوسط غذائى

الجدول الآتى يوضح العلاقة بين كمية الوسط الغذائى وكمية العينة

عينة المياة	كمية الوسط المضاف اليها بالـ مل	الوزنة المستخدمة فى تحضير الوسط فى اللتر
100	50	106.8 جم
	35	137.1 جم
20	10	106.8 جم
10	10	71.2

والجدول التالى يوضح طريقة العدد عندما نستخدم 10 أنابيب كل انبوبة 10 مل وعدد الأنابيب الموجبة

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

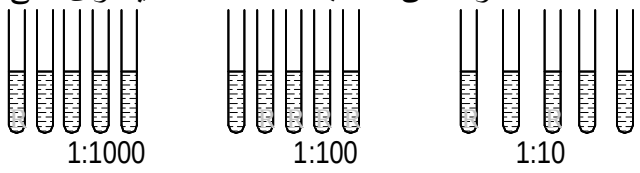
No. of Tubes Giving Positive Reaction Out of 10 of 10 mL Each	MPN Index/100 mL	95% Confidence Limits (Approximate) Lower	Upper
0	<1.1	0	3.0
1	1.1	0.03	5.9
2	2.2	0.26	8.1
3	3.6	0.69	10.6
4	5.1	1.3	13.4
5	6.9	2.1	16.8
6	9.2	3.1	21.1
7	12.0	4.3	27.1
8	16.1	5.9	36.8
9	23.0	8.1	59.5
10	>23.0	13.5	Infinite

وهذا الجدول فى حالة استخدام 5 انابيب 20 ما مكن المياه المرشحة

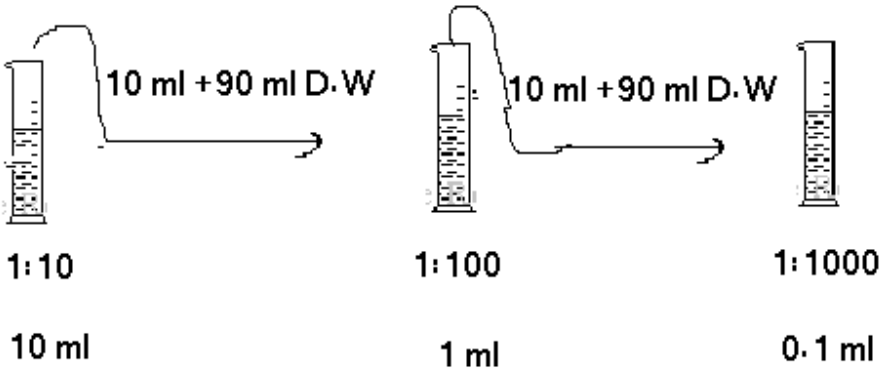
TABLE 9221.IV. MPN INDEX AND 95% CONFIDENCE LIMITS FOR VARIOUS COMBINATIONS OF POSITIVE AND NEGATIVE RESULTS WHEN FIVE 20-ML PORTIONS ARE USED

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	3.5
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

ثانيا فى حالة المياه الغير مرشحة أو العكرة
نأخذ ثلاثة صفوف من التخفيفات كل صف يحتوى على 5 انابيب



نأخذ 10 مللى من العينة الأصليه ونضيف اليها 90 مل من المياه المقطرة المعقمة يصبح التخفيف 1:10



معمل البلينا المرشحة

كل أنبوبة تحتوى على 1 مللى من التخفيف + 10 من اللوريل
او ما يقتضيه التخفيف
ترص الأنابيب على حسب ترتيبها وتوضع فى الحضانة على 35 م لمدة 24 ساعة ثم ننظر ونسجل الملاحظات والنتيجة النهائية بعد 48 ساعة

التجربة التأكيدية:
سنستخدم brilliant green lactose bile broth كوسط غذائى

العينة التى سيثبت بها وجود بكتريا فى طريقة اللوريل سنخضعها للفحص بواسطة
Brilliant green lactose bile broth

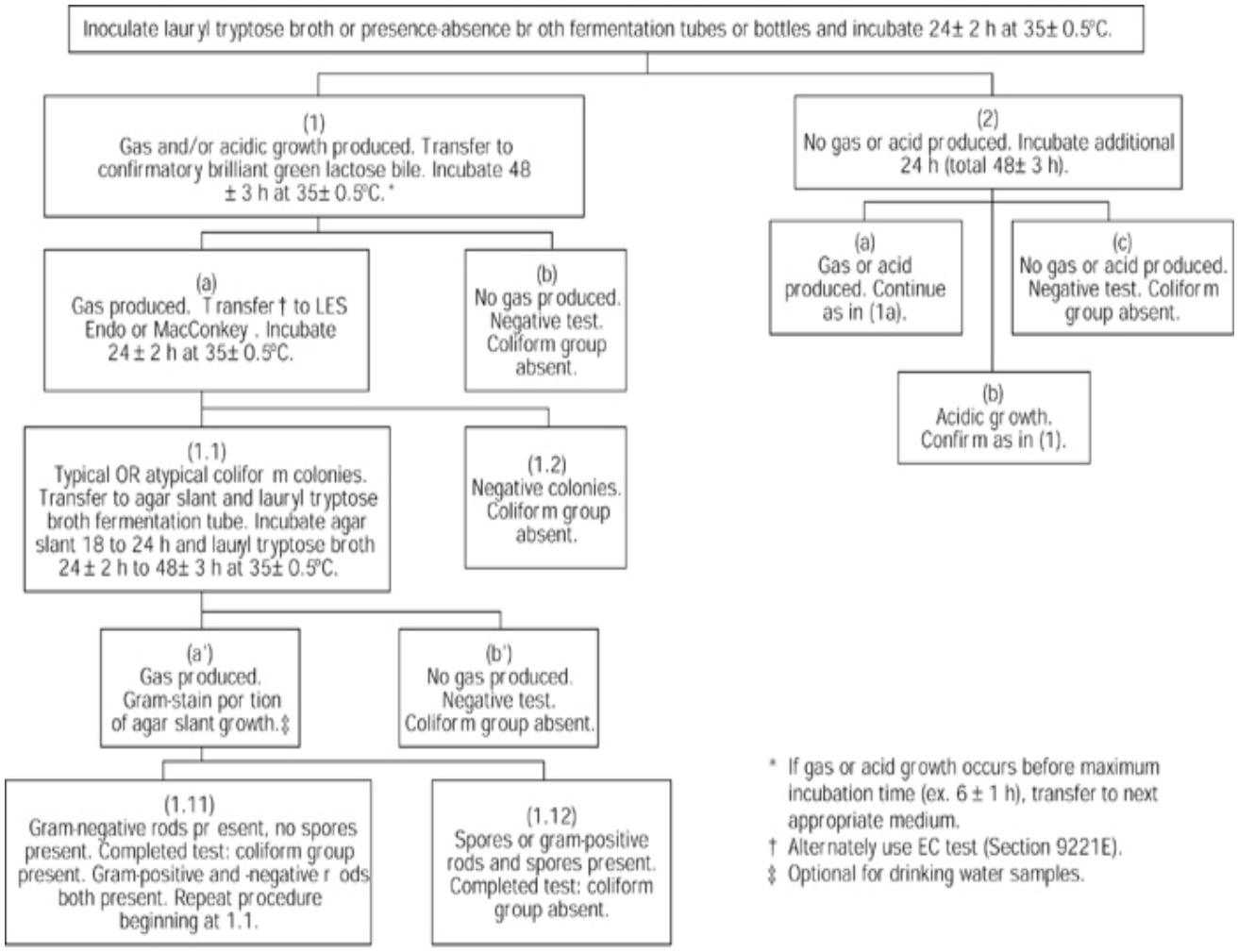
نعقم ساق زجاجى والأفضل عن طريق اللهب ونغمسه بحيث ينطفأ على السطح العلوى لعينة اللوريل حتى نتأكد أنه لم يأخذ أى بكتريا الا من عينة اللوريل ثم نغمسه فى العينة ونخرجه ونضعه فى الوسط التأكيدى Brilliant green lactose bile broth أو نرج انبوبة اللوريل ثم نأخذ الغطاء الخاص بها ونقفل به انبوبة الوسطة التأكيدى نقلب الانبوبة عدة مرات حتى يتوزع اثر العينة على جميع الوسط

نضعه فى الحضانه على 35 م لمدة 24 ساعة وللتأكيد 48 ساعة

تجربة التفريق بين البكتريا القولونية البرازية وغير البرازية:

نأخذ العينات الموجبة +ve (التى ثبت بها وجود بكتريا) فى تجربة اللوريل ونأخذ منها أثر

كما فعلنا فى التجربة التأكيدية السابقة وسوف نستخدم الوسط الغذائى EC –broth لنتعرف على وجود البكتريا القولونية البرازية fecal Coliform على 44.5 م ولمدة 24 ساعة
إذا ثبت وجود البكتريا فهى بكتريا قولونية برازية
إما إذا تأكدنا من وجود البكتريا فى Brilliant green lactose bile broth اى كانت العينة +ve وكانت –ve فى EC broth اى لم يثبت وجود البكتريا
فإنه فى هذه الحالة تكون البكتريا قولونية غير برازية non fecal Coliform
والتخطيط التالى يوضح أكثر:



* If gas or acid growth occurs before maximum incubation time (ex. 6 ± 1 h), transfer to next appropriate medium.

† Alternately use EC test (Section 9221E).

‡ Optional for drinking water samples.

وهذا الجدول يوضح طريقة العد عند استخدام 5 انابيب لكل تخفيف

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

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

ويكون الحساب من خلال القانون التالى

$$\text{MPN value (from table)} \times \frac{10}{\quad} = \text{MPN/100 mL}$$

أما التركيبات التى لا توجد فى الجداول السابقة مثل 4-4-4 او 3-3-3 فيمكن حسابها من قانون توماس

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

Collected and written by
Abu Alhassan Abd Elshafi
2010

aboalhassan20082000@yahoo.com

abo_alhassan2010@hotmail.com