Bacteriological examination of water الفحص الميكروبيولوجي للماء

يعد الماء صالحاً للشرب متى ما كان خالياً من الأحياء الدقيقة الممرضة Pathogenic التي يحتمل انتقالها عن طريق الماء مثل مسببات حمى التيفوئيد والزحار البكتيري والهيضة أو الكوليرا وغيرها من المسببات بما في ذلك بعض أنواع الفايروسات كشلل الأطفال Polio والتهاب الكبد Hepatitis .

ان المسببات المرضية لا تتواجد في الماء الا اذا كان الماء ملوثاً ببراز الإنسان المريض ولما كان الكشف هذه المسببات يحتاج إلى وقت ومهارة ومواد قد لا تتوفر في بعض المختبرات لذلك يصار إلى التحري عما جرى على تسميتها ببكتريا الكشف Indicator ومنها بكتريا القولون Coliform Bacteria والتي تشتمل على جميع أنواع البكتريا التي تتصف بأنها عضوية وهوائية ولا هوائية اختبارا Facultatively anaerobic وسالبة لصبغة كرام Gram negative وغير مكونة للسبورات non- sporeforming وتنتج تخمر (غاز وحامض من سكر اللاكتوز) خلال مدة أقصاها **48** ساعة في **35** °م ومن أكثر هذه المجموعة Coliform group شيوعاً وانتشاراً السلالات المختلطة لبكتريا *Escherichia Coli* و *Enterobacter aerogenes* ، هذه الأنواع تتواجد في أمعاء الإنسان السليم والمريض معاً وان ملايين منها تطرح يومياً مع البراز ان وجود مجموعة القولون Coliform group في ماء الشرب عليه، يعد دليلاً على احتمال تلوث الماء بالبكتريا المرضية ذلك لأن مصدر تلوث الماء بمجموعة القولون قد يكون براز إنسان سليم أو مريض. وتمتاز مجموعة القولون بأنها أطول عمراً من البكتريا الممرضة في الماء وهذا يوفر فرصة أكبر للكشف عن احتمالات التلوث.

- **خطوات الفحص عن بكتريا القولون**

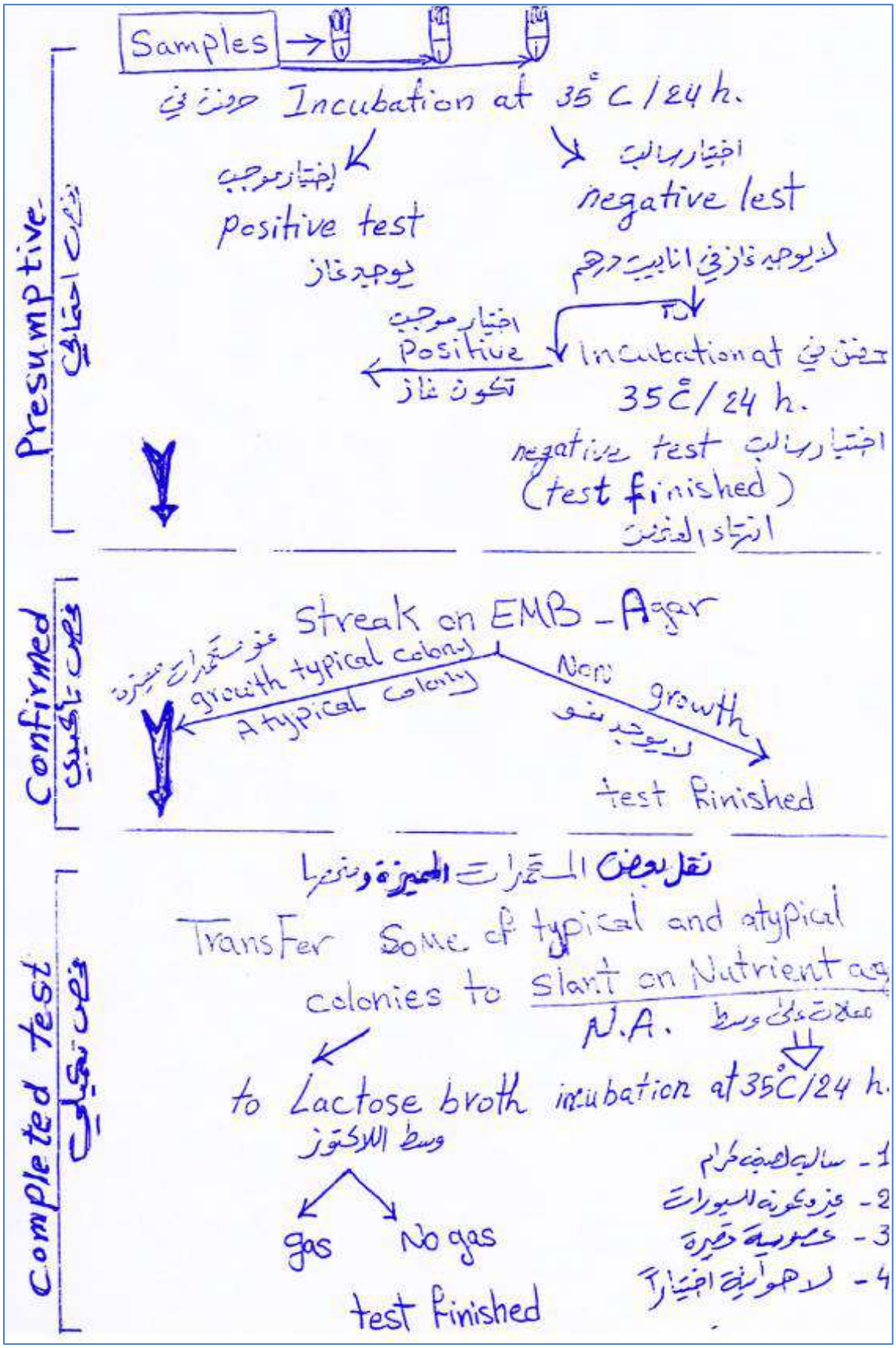
1. الفحص الاحتمالي Presumptive test

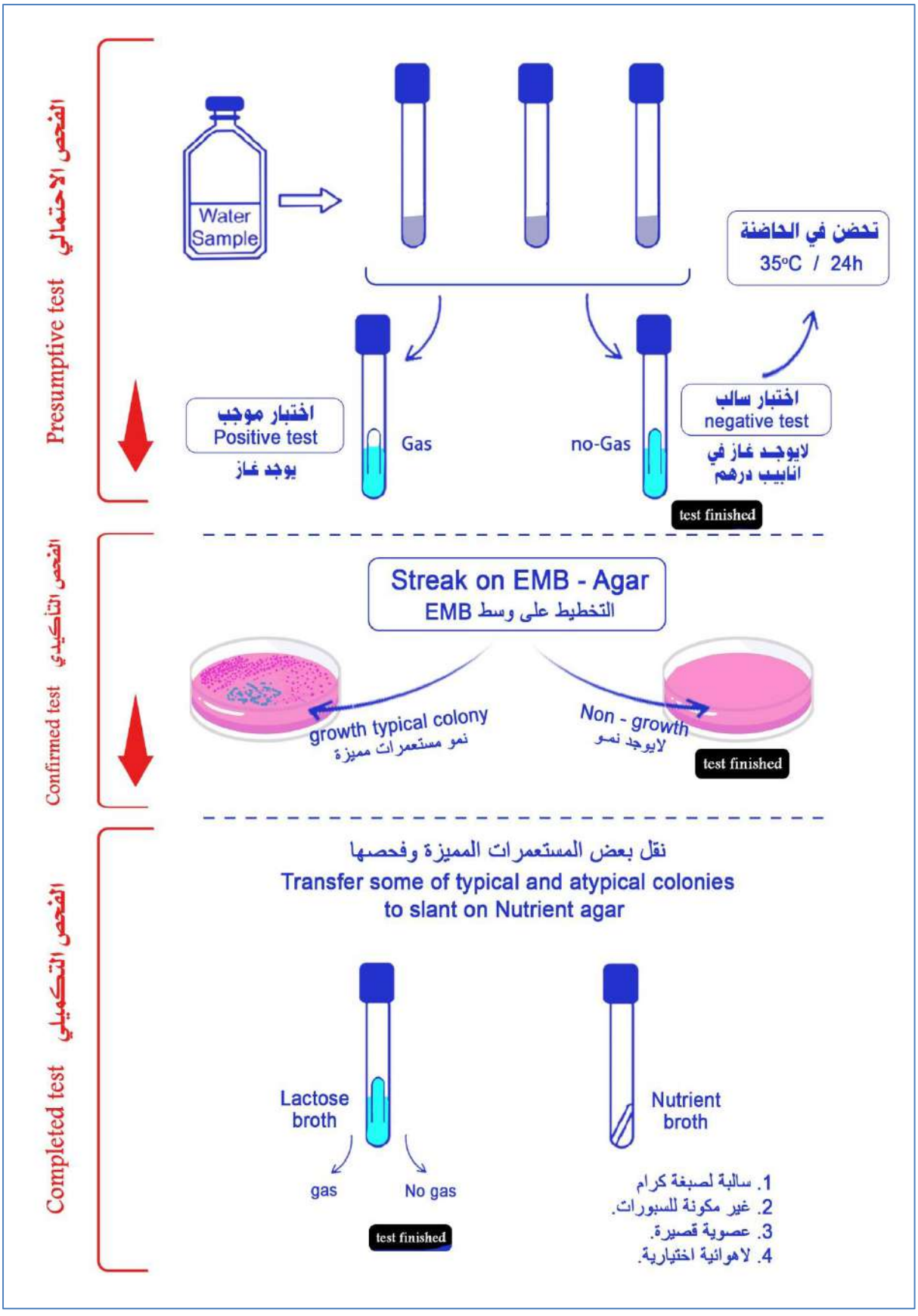
ينقل ملليلتر واحد من الماء قيد الفحص إلى أنابيب اختبار يحتوي على **5** ملليلتر من Lactose Broth وعلى أنابيب صغيرة موضوعة بصورة مقلوبة في داخل هذا الوسط السائل تعرف أنابيب درهام Durham tube (تحضن الأنابيب بدرجة **35** °م ويلاحظ تكون الغاز الذي يعد دليلاً أولياً على وجود مجموعة القولون. تنقل هذه الأنابيب إلى مرحلة الاختبار الآتية اما الأنابيب الخالية من الغاز فتعاد إلى الحاضنة **35** °م مدة **24** ساعة أخرى للتأكد من خلوها من مجموعة القولون وبالتالي من المسببات المرضية (بعدم تكون الغاز).

2. **الفحص التأكيدي Confirmed test**

تنقل مسحة من وسط Lactose Broth الموجب الاختبار الاحتمالي بوساطة Loop وتخطط على سطح أحد الأوساط المتخصصة مثل Eosin Methylene Blue agar (EMB) وتحضن الأطباق في **35 °م** لمدة **24** ساعة مع ملاحظة تكون مستعمرات تعود إلى مجموع القولون ولاسيما *E.Coil* وهذه البكتريا تكون على وسط EMB- Agar مستعمرات خضراء لماعة معدنية Metalic ومستعمرات بكتريا *E. aerogens* تكون بنفسجية كبيرة الحجم، وفي حالة عدم ظهور مستعمرات بالمواصفات التي ذكرت يتم الانتقال إلى المرحلة الأخرى.

3. **الفحص التكميلي Completed test** : يتم انتقاء عدد من مستعمرات بكتريا القولون ومستعمرات لا تمثل مجموعة بكتريا القولون إلى الوسط Lactose broth وكلاً على انفراد وتحضن في **35 °م** لمدة **24** ساعة لملاحظة تكون الغاز. كما تنقل مسحة من المستعمرات التي وقع عليها الاختبار إلى الوسط Nutrient Agar على شكل Slant وتحضن في **35 °م** لمدة **24** ساعة ثم تجري عليها الفحوصات المجهرية للتأكد من عائديتها إلى مجموعة بكتريا القولون من حيث أنها عصوية، سالبة لصبغة كرام، غير مكونة للسبورات.


Samples
Incubation at 35°C / 24 h.
حضن في
Presumptive
فحص احتمالي
positive test
يوجد غاز
اختبار موجب
negative test
لايوجد غاز في انابيب درهم
اختبار سالب
Positive
تكون غاز
Incubation at
35°C / 24 h.
negative test
(test finished)
انتهاء الفحص
Confirmed
فحص تأكيدي
Streak on EMB - Agar
growth typical colony
Atypical colony
Non growth
لايوجد نمو
test finished
Completed test
فحص تكميلي
نقل بعض المستعمرات المميزة وغيرها
Transfer some of typical and atypical colonies to Slant on Nutrient ag
N.A. مائلة على وسط
to Lactose broth incubation at 35°C/24 h.
وسط اللاكتوز
gas
No gas
test finished
1 - سالب الصبغة كرام
2 - فرز وتحوية السبورات
3 - حركية قصيرة
4 - لا هوائية اختيارية


الفحص الاحتمالي
Presumptive test
Water Sample
تحضن في الحاضنة
35°C / 24h
اختبار موجب
Positive test
يوجد غاز
Gas
no-Gas
اختبار سالب
negative test
لايوجد غاز في
انابيب درهم
test finished
الفحص التأكيدي
Confirmed test
Streak on EMB - Agar
التخطيط على وسط EMB
growth typical colony
نمو مستعمرات مميزة
Non - growth
لايوجد نمو
test finished
الفحص التكميلي
Completed test
نقل بعض المستعمرات المميزة وفحصها
Transfer some of typical and atypical colonies
to slant on Nutrient agar
Lactose broth
gas
No gas
test finished
Nutrient broth
1. سالبة لصبغة كرام
2. غير مكونة للسبورات.
3. عصوية قصيرة.
4. لاهوائية اختيارية.

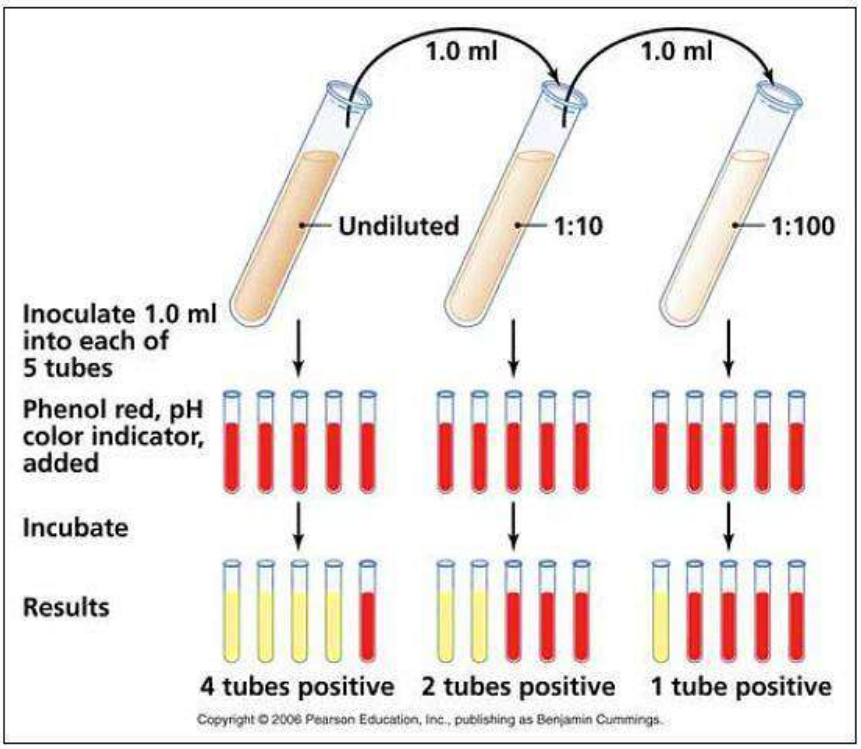
- **طرق العد المايكروبي Enumeration of Microbiology**

1. **طريقة العد الاكثر احتمالاً Most probable Number (MPN)**

1. ترج عينة المياه جيدا **25** مرة وذلك لضمان توزيع البكتيريا في العينة.
2. ينقل بماصة معقمة **1** مل من عينة المياه إلى أنبوبة محتوية على **9** مل من ماء مقطر معقم فيصبح التخفيف **10/1**.
3. يرج التخفيف **10/1** جيدا وبواسطة ماصة معقمة جديدة ينقل **1** مل إلى **2** طبق بتري معقم يمثل التخفيف **10/11** وبنفس الماصة ينقل **1** مل أخرى منن الأنبوبة **10/ 1** انبوبة ماء مقطر معقم حاوية على **9** مل لنحصل على التخفيف **100/1** وهكذا تعاد نفس الخطوات لعمل سلسلة من التخافيف.
4. يصب على كل طبق حاوي وسط Nutrient agar ويخلط جيدا بالعينة المخففة وتترك لتتصلب .
5. تحضن الإطباق مقلوبة في الحاضنة على درجة حرارة **37** ^{o}**م** لمدة **48** ساعة.
6. تحسب عدد المستعمرات في الطبق الواحد لكل تخفيف، تعتمد التخافيف التي تتراوح عدد المستعمرات فيها ما بين **30-300** مستعمرة ومنه تحسب عدد الخلايا الحية في **1** مل من عينة المياه الأصلية، وذلك بضرب متوسط عدد المستعمرات في الطبق في مقلوب التخفيف المستخدم.

عدد الخلايا الحية في 1 مل من عينة المياه الأصلية = **متوسط عدد المستعمرات في الطبق** × **مقلوب التخفيف المستخدم**

يستخرج عدد بكتريا القولون الأكثر احتمالا في عينة الماء وذلك من مطابقة نتائج الاختبار بجدول دليل MPN القياسي وذلك بحساب عدد الأنابيب الموجبة في مجموعة الأنابيب 00.1 و 0.1 و 0.1 مل، ثم نستخرج القيمة المقابلة لها في الجدول وهي تمثل عدد الخلايا الأكثر احتمالا في 100 مل من الماء.

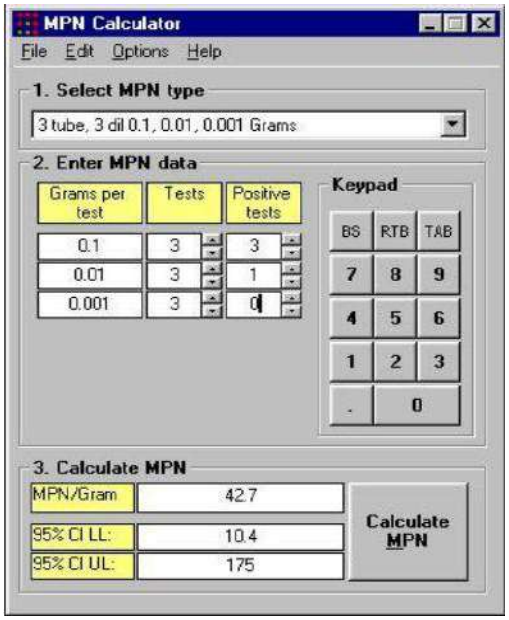


طريقة التخفيف المتبعة لعينة الماء (طريقة MPN)

Table: MPN table for a three-replicate design from FDA's *Bacterial Analytical Manual.*

Positive Tubes					Positive Tubes				
0.1	0.01	0.001	MPN	95% Confidence Range	0.1	0.01	0.001	MPN	95% Confidence Range
0	0	0	<3.0	0-9.5	2	2	0	21	4.5-42
0	0	1	3	0.15-9.6	2	2	1	28	8.7-94
0	1	0	3	0.15-11	2	2	2	35	8.7-94
0	1	1	6.1	1.2-18	2	3	0	29	8.7-94
0	2	0	6.2	1.2-18	2	3	1	36	8.7-94
0	3	0	9.4	3.6-38	3	0	0	23	4.6-94
1	0	0	3.6	0.17-18	3	0	1	38	8.7-110
1	0	1	7.2	1.3-18	3	0	2	64	17-180
1	0	2	11	3.6-38	3	1	0	43	9-180
1	1	0	7.4	1.3-20	3	1	1	75	17-200
1	1	1	11	3.6-38	3	1	2	120	37-420
1	2	0	11	3.6-42	3	1	3	160	40-420
1	2	1	15	4.5-42	3	2	0	93	18-420
1	3	0	16	4.5-42	3	2	1	150	37-420
2	0	0	9.2	1.4-38	3	2	2	210	40-430
2	0	1	14	3.6-42	3	2	3	290	90-1000
2	0	2	20	4.5-42	3	3	0	240	42-1000
2	1	0	15	3.7-42	3	3	1	460	90-2000
2	1	1	20	4.5-42	3	3	2	1100	180-4100
2	1	2	27	8.7-94	3	3	3	>1100	420-4000

جداول خاصة موضوعة لتحديد القراءات حسب التخافيف



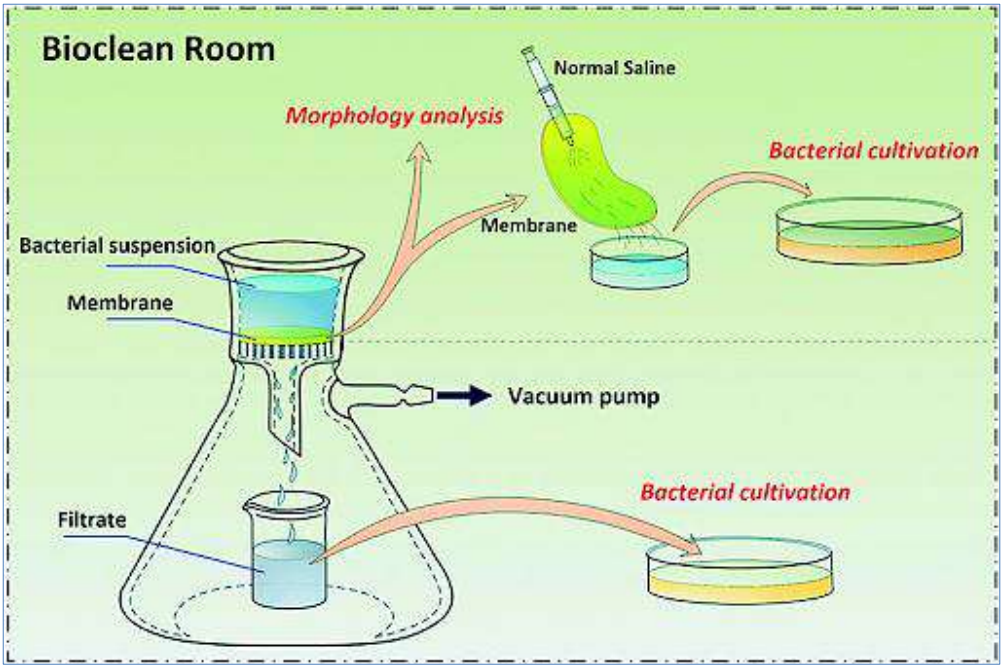
برنامج حاسوبي للحسابات المباشرة

2. طريقة المرشح الغشائي Membrane Filter Method

تستخدم هذه الطريقة ايضا لتحديد وجود بكتريا القولون في مياه الشرب ولهذه الطريقة محاسن حيث تسمح بالكشف وعد بكتريا القولون بصورة دقيقة ومباشرة على سطح المرشح مع ذلك فان لها بعض المساوئ حيث تحتاج الى جهاز ترشيح ومضخة تفريغ من الهواء واوراق ترشيح غالية الثمن.

- **طريقة العمل :**

1. يتم امرار **100** مل من عينة الماء خلال مرشح غشائي معقم ذو ثقوب دقيقة **0.22** مايكرومتر من ثم ينقل الغشاء الى وسط مغذي انتقائي مناسب لبكتريا القولون وهذا يشمل وسط، **EMB Endo agar** حيث تنمو بكتريا القولون بشكل مستعمرات خضراء معدنية براقة على وسط EMB وبشكل مستعمرات حمراء معدنية براقة على وسط Endo agar.
2. بعد فترة الحضانة تفحص الاطباق والمستعمرات التي تحمل هذه الصفات، وفي حال غياب هذه المستعمرات يعني ان الماء صالح للشرب اما في حال وجود هذه المستعمرات فيحسب عدد المستعمرات لكل **100** مل واذا تجاوز العدد **300** مستعمرة فيعتبر الماء ملوث وغير صالح للشرب.



Membrane Filter Method