العد الكلي للبكتريا في المياه

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

١- 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*.

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

٣- 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* .

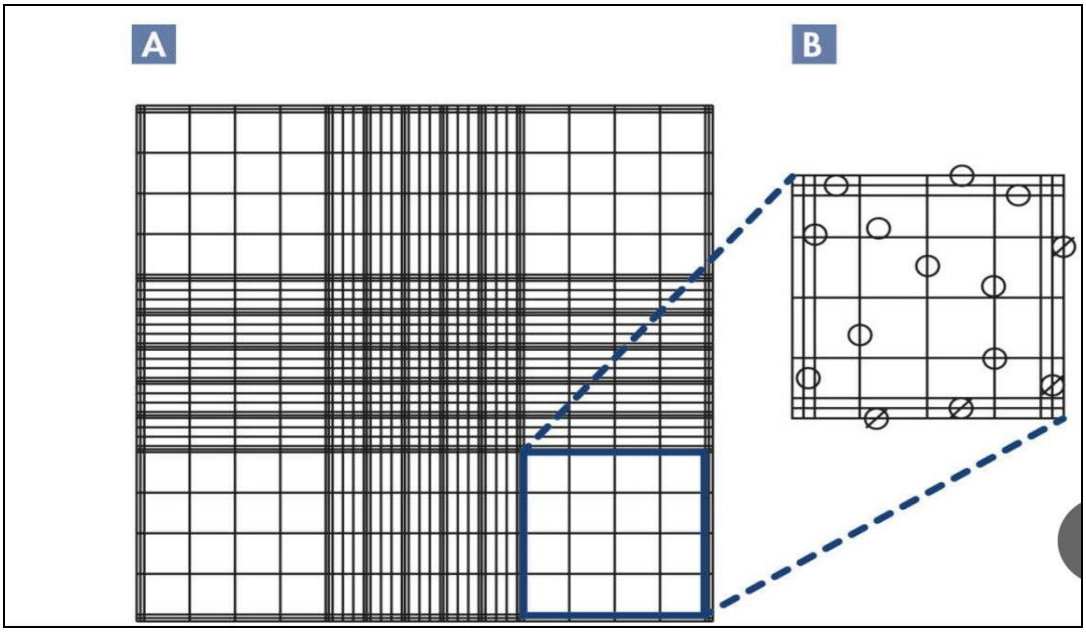
يعتمد عدد البكتريا في المياه على طبيعة المياه فالأنهار غير الملوثة تحوي أعدادا قليلة لا تتجاوز ١٠٠ خلية /سم ^{٣} والمياه القريبة من المدن تحوي أعدادا أكثر نتيجة إضافة مياه المجاري والمصانع إليها وقد يصل العدد إلى مليون خلية /سم ^{٣}.

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

١- 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 سم^{٣} 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 /مل = عدد البكتريا المحسوبة في الحقول \ عدد الحقول × ٢٠٠٠٠ × مقلوب التخفيف



شريحة عد كريات الدم الحمراء

٢- التقدير غير المباشر لعد الخلايا البكتيرية في الماء

يقدر بهذه الطريقة عدد الخلايا الحية ذات القدرة على التكاثر الموجودة في سم^{٣} الواحد من العينة عند تهيئة الظروف المناسبة لنموها ويجري ذلك من خلال استعمال الطرق التالية:

A - طريقة العد بالأطباق Plate count

١- يحضر ثلاث أطباق معقمة لكل عينة أو تخفيف .

٢ - يرفع غطاء الطبق من احد الجوانب بأقل فتحة ممكنة وينقل إليه بواسطة ماصة معقمة (١ مل) من العينة أو من أي تخفيف يرغب فيه.

٣- يرفع غطاء الطبق مرة أخرى ويصب فيه ٢٠- ١٥ مل من الوسط الغذائي المعقم وتكون درجة حرارته ٤٤-٤٦°م.

٤- تخلط محتويات الطبق جيدا وذلك بتحريك الطبق حركة رحوية بشكل رقم ٨ .

٥- تترك الأطباق لتتصلب .

٦- تحضن الأطباق بشكل مقلوب بدرجة حرارة ٣٥-٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة وعند عدم وجود نمو تزود مدة الحضانة ٢٤ ساعة أخرى للتأكد من النتائج .

٧- 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 (١ 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(١ مل) وينشر على الوسط بواسطة swab أو ناشر معدني معقم وتراعى وجود الظروف المعقمة.

تحضن المزارع بدرجة حرارة ٣٥-٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة ثم تحسب عدد المستعمرات النامية والذي يمثل عدد البكتريا الموجودة في (١ مل) من العينة المدروسة.

***عزل وتشخيص البكتريا**

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

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

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.

٢- 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 ٢-٣ دقائق و بعدها بدرجة حرارة ٨٠°م لمدة ١٠ دقائق، ثم يزال ذلك ويوضع مباشرة في ماء بدرجة حرارة الغرفة ويزرع منه في الوسط الزرعي الصلب ويوضع في الحاضنة بدرجة حرارة ٣٧°م 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:

١- الخصائص المظهرية Morphological Properties

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

٢- الخصائص المجهرية Microscopic Properties

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

٣- 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.

٤- 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 :

١- Manitol salt agar ..... (Staphylococci مستعمرات صفراء كبيرة)

٢- Sheep blood agar أو Sodium Azide agar (مستعمرات ناعمة شفافة كرأس الدبوس Streptococci) .

٣- ThioSulphat Citrate Bile –Salt Sucrose agar (vibrio) .

٤- MacConkey agar أو MacConkey broth (coliform bacteria مستعمرات ذات لون وردي Pink colour).

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

٦- Salmonella Shigella Agar بكتريا Salmonella و Shigella.