معمل ميكروبيولوجيا المياه والصرف الصحي

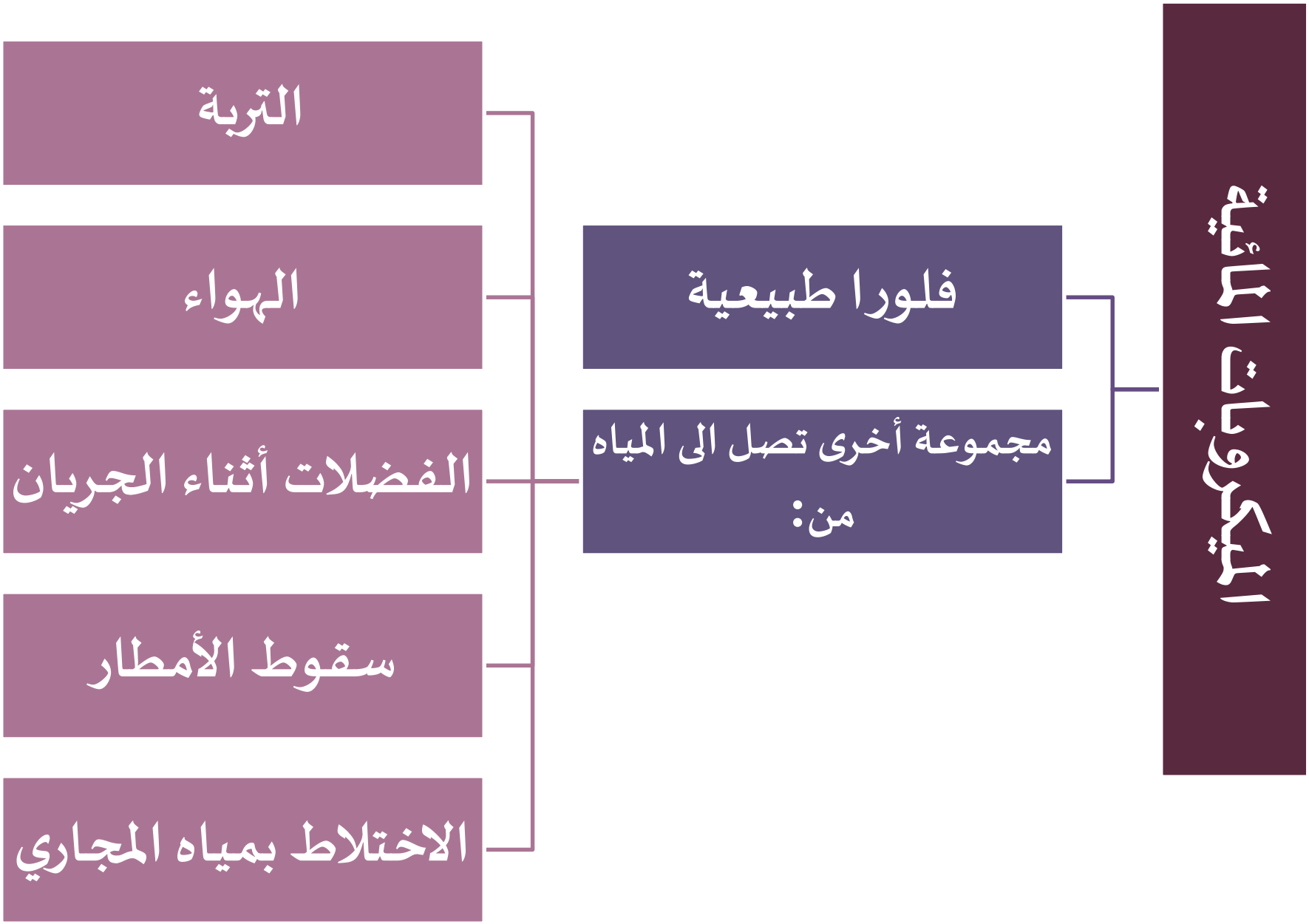
" 344 MBIO "

نورة الكبيسي

@Noorahkb

Nalkubaisi@ksu.edu.sa

- ينتشر الماء على الأرض بحالاته المختلفة (السائلة، الصلبة و الغازية) وفي الحالة السائلة فهو شفاف دون طعم أو رائحة أو لون .
- تركيبه الكيميائي مكون من ذرتي هيدروجين وذرة من الاكسجين H2O.
- يغطي الماء أكثر من 70% من سطح الأرض حيث يملأ المحيطات، الأنهار، البحيرات ويوجد بباطن الأرض وكذلك في الهواء الذي نتنفسه و ثلثي من جسم الإنسان.


الميكروبات المائية
فلورا طبيعية
مجموعة أخرى تصل الى المياه من:
التربة
الهواء
الفضلات أثناء الجريان
سقوط الأمطار
الاختلاط بمياه المجاري

أنواع المياه ومصادر تلوثها

نوع المياه	مثال	مصدر التلوث
المياه الجوية	الأمطار والثلوج	المرور بطبقات الجو و التلوث بواسطة الميكروبات العالقة بالهواء كما أن جريانها بالأرض يسبب اختلاطها بالميكروبات الأرضية.
المياه السطحية	الأنهار ، الجداول و العيون	▪ الهواء ▪ سطح الأرض ▪ مياه المجاري ▪ المخلفات الصناعية
المياه الراكدة	البحار، البحيرات و المحيطات	▪ سطح الأرض ▪ مياه المجاري ▪ المخلفات الصناعية
المياه الجوفية	المياه في باطن الأرض	أقل المياه احتواء على الميكروبات لأن التربة تعمل كمرشح للميكروبات عبر طبقات التربة العميقة المختلفة.

ثالثاً

النمو الميكروبي في المياه

- يعتبر الماء بيئة فقيرة من الناحية الغذائية إلا أنه يسمح بنمو وتكاثر الميكروبات الفقيرة في احتياجها الغذائي .
- تعيش لفترات متفاوتة (أشهر).
- البكتيريا الممرضة التي تحتوي على الكبسولة تعيش لمدة أطول لأنها تكون مواد لزجة تنمو عليها الطحالب و البروتوزوا مسبباً خروج روائح كريهة (كالخزانات).

رابعاً
مياه الصرف الصحي

تحتوي مياه المجاري على :

- **كمية كبيرة من المركبات العضوية**
- **أعداد رهيبة من الكائنات الحية الدقيقة الهوائية واللاهوائية وتحلل هذه الكائنات المركبات العضوية والغير عضوية مسببة نقصا في الأوكسجين إذا ألقيت في البحر وبذلك تختنق الكائنات التي تعيش في البحر وقد تموت.**

من الأمراض الخطيرة التي تنتقل عن طريقها : التفوئيد – الدوسنتاريا – الباراتيفوئيد – الكوليرا

خامساً

الميكروبات الدالة Indicator microorganisms

هي الميكروبات التي إذا وجدت بالماء فإنها تعتبر دالة على تلوث الماء بمياه المجاري أو كائنات أخرى ملوثة و تعتبر دلالة على وجود الميكروبات الممرضة.

أهم مميزاتها :

- وجودها فقط في المياه الملوثة.
- يتلازم وجودها مع الميكروبات الممرضة.
- العلاقة النسبية بين أعدادها والتلوث المائي بالميكروبات.
- تتميز بقدرتها على العيش مدة أطول من الميكروبات الممرضة في الماء.
- غير ضارة للإنسان.

انتهى المعمل الأول

العد الكلّي للبكتيريا في المياه

Determination of total bacterial count in water

الماء.. عرضة للتلوث من مصادر مختلفة سواء من التربة أو من الهواء أو من فضلات الإنسان أو الحيوان. توجد العديد من

الكائنات الدقيقة في الماء مثل الفطريات، البكتيريا، الطحالب والفيروسات ولكن ليس كل هذه الكائنات لها المقدرة على

استمرار المعيشة في الماء.

اختبارات تلوث المياه

الفحص الكيميائي	بالكشف عن العناصر الثقيلة أو النترات أو الأمونيا أو غير ذلك.
الفحص الميكروبيولوجي	وهو الذي سنتطرق له في تجاربنا القادمة.

اولاً : الأساس العلمي للتجربة

يكون الماء صالحاً للشرب إذا كان :

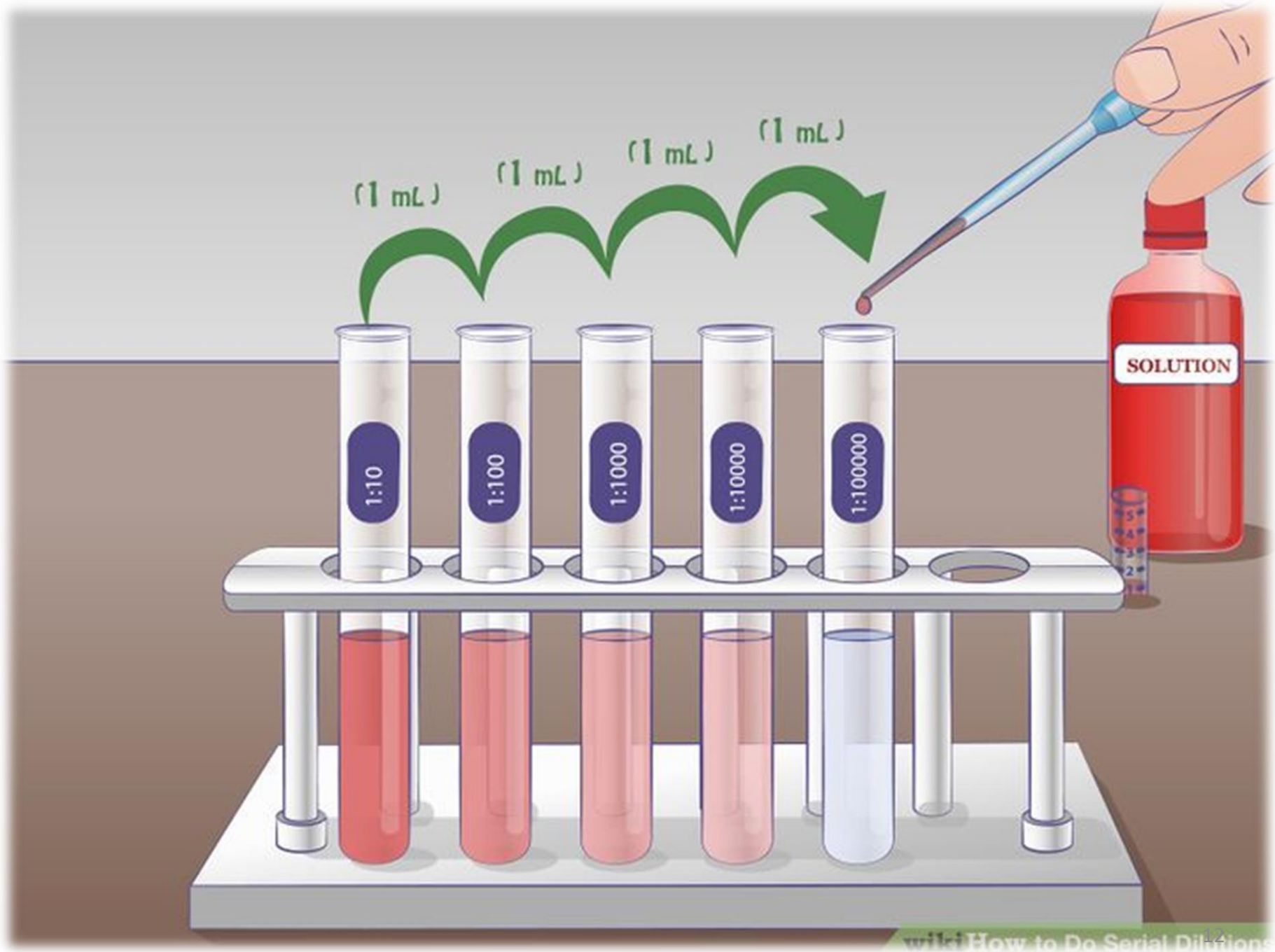
- **خالي من بكتيريا القولون *Enterobacteriaceae* بشرط خلوه من الملوثات الكيميائية أو أي مواد سامة .**
- **العدد البكتيري الكلّي أقل من 100 مستعمره لكل 1 مل، أو يكون عدد المستعمرات ما بين 30 – 300 مستعمرة في الطبق الواحد المعملي .**

ثانياً :الأدوات والمواد اللازمة

1. 2 لتر من عينات المياه المراد اختبارها (مياه زراعية – مياه مجاري غير معالجة – مياه آبار – مياه الحنفية – مياه الوديان)
2. يوضع كل لتر في زجاجة معقمة محكمة الإغلاق من كل عينة.
3. أطباق بتري فارغة و معقمة .
4. أنابيب اختبار بأغطية معقمة و محتوية على 9 مل ماء مقطر معقم .
5. فلاسكات تحتوي على بيئة الآجار المغذي (تسخن في حمام مائي لحين اجراء عملية الصبّ).

ثالثاً: خطوات العمل

1. يؤخذ مقدار 1 مل من الماء المراد اختباره ويوضع في الأنبوبة المحتوية على 9 مل ماء مقطر حيث يكون التخفيف 1/10 .
2. يؤخذ مقدار 1 مل من الأنبوبة السابقة و توضع في أنبوبة أخرى محتوية على 9 مل ماء مقطر حيث يكون التخفيف هنا 1/100.
3. يؤخذ من الأنبوبتين كل على حده 1 مل فقط وتوضع في طبق بتري معقم مع الأخذ بالاعتبار أن يكون الصب تحت ظروف التعقيم.
4. تصب بيئة الآجار المغذي في كل طبق وتحرك حركة دائرية على البنش حتى تختلط العينة جيداً ثم تترك لتتصلب .
5. تحضن مقلوبة عند درجة حرارة 37 م° لمدة 24 – 48 ساعة.

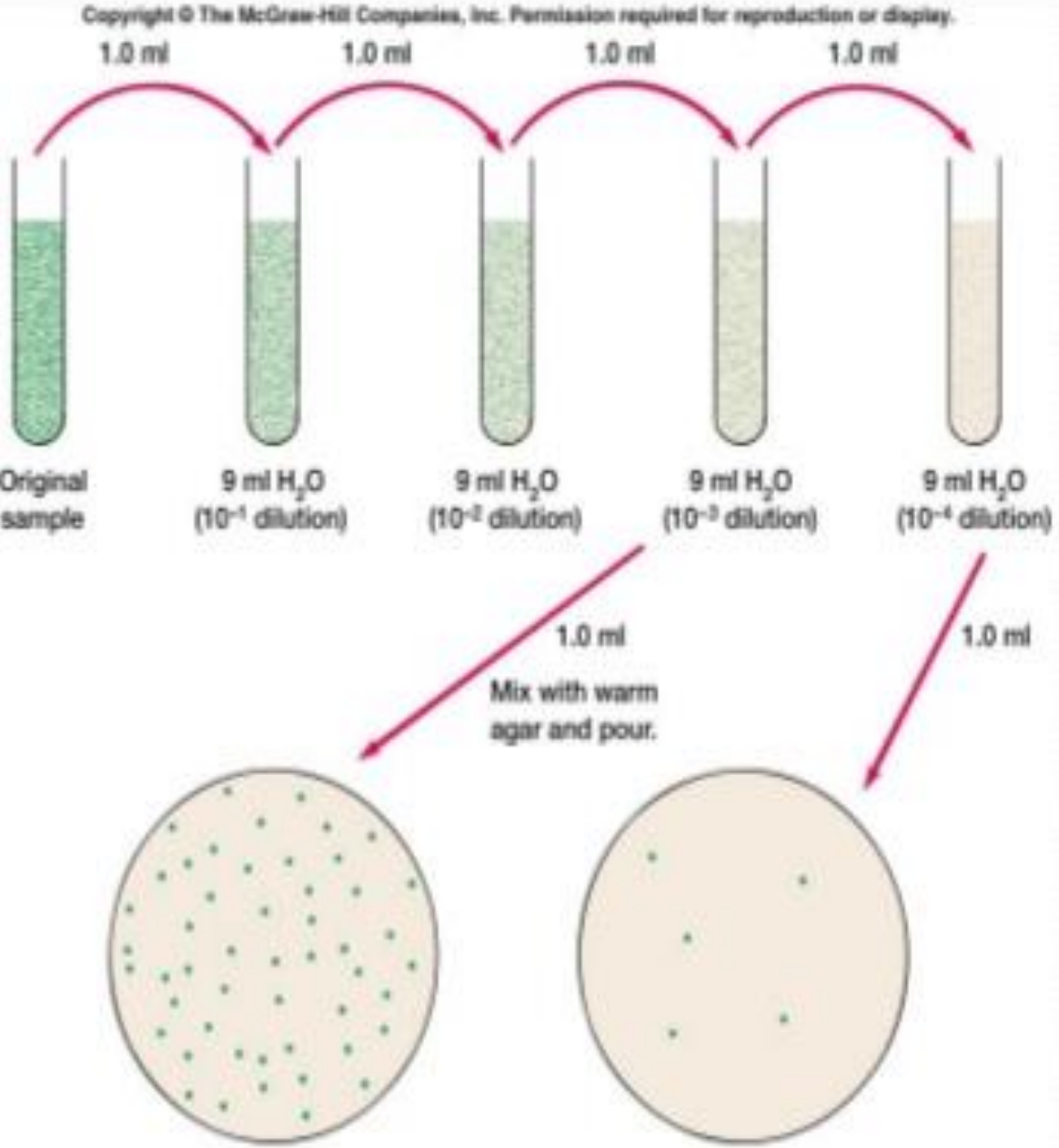

(1 mL)
(1 mL)
(1 mL)
(1 mL)
1:10
1:100
1:1000
1:10000
1:100000
SOLUTION

رابعاً:
طريقة تعيين العدد البكتيري الكلّي

1. يتم عد المستعمرات التي يكون فيها عدد المستعمرات ما بين 30 – 300 مستعمرة .
2. يتم اهمال عد المستعمرات التي تقل أو تزيد عن ذلك .
3. تعد المستعمرات لكل طبقين على حده ثم يضرب العدد الناتج في مقلوب التخفيف.

مثال :

- عدد المستعمرات في التخفيف 1/10 = 50
- إذاً العدد الكلّي للبكتيريا = 50 × 10 = 500 مستعمرة C.F.U = Colony Forming units



Indirect viable counts (also called plate counts)

Pour plate method

Advantages

- Sensitive
- Only count viable
- Accurate

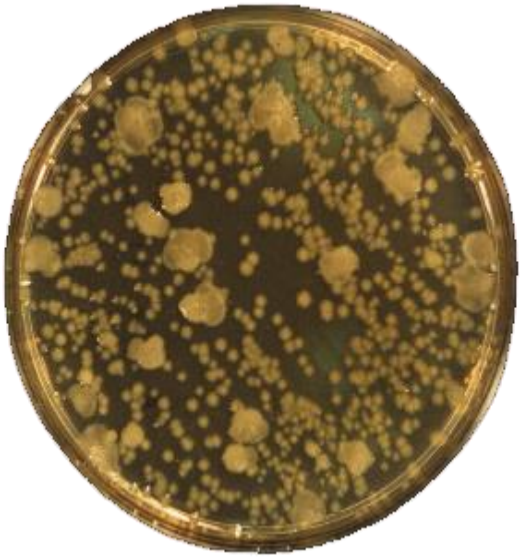
خامساً

نتائج تعيين العدد البكتيري الكلّي (مثال)

مصدر العينة	التخفيف	متوسط العدد البكتيري في الأطباق	العد البكتيري الكلي (العدد الناتج ×مقلوب التخفيف)
المجاري	1 / 10	نموكثيف	-
المياه الزراعية	1 / 100	200	20000مستعمرة C.F.U (Colony Forming units)
ماء الصنبور	1 / 100	3	-

الآن عزيزتي دورك هو الآتي :

التعليق على التجربة و مناقشة التعليق



انتهى المعمل الثاني

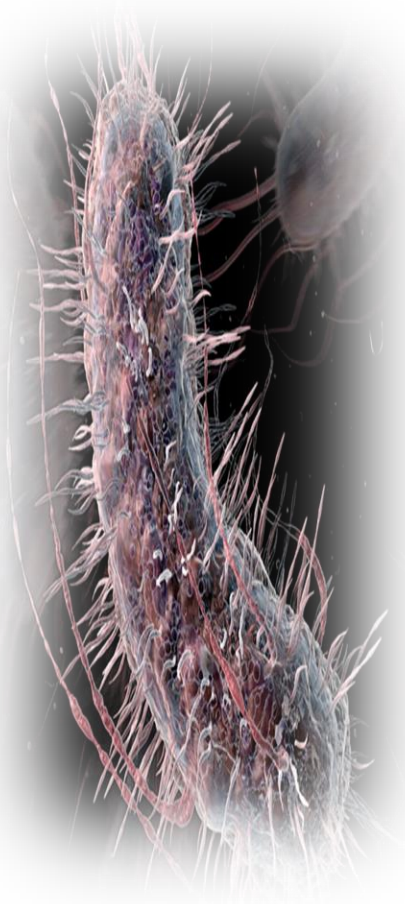
اختبار التلوث بمياه المجاري

Examination of water for sewage pollution

الماء.. عرضة للتلوث بمياه المجاري ويمكن الكشف عن هذا النوع من التلوث بالكشف عن مجموعة بكتيريا القولون

اختبارات تلوث العينة بميكروبات القولون يتم هذا الاختبار على ثلاث مراحل (اختبارات)	
Presumptive Test	الاختبار الاحتمالي
Confirmatory Test	الاختبار التأكيدي
Completed Test	الاختبار التكميلي

اولاً :ما هي ميكروبات القولون ..؟ *Escherichia coli*



- هي ميكروبات عصوية سالبة لجرام .
- غير متجرثمة و متحركة بأسواط .
- تحلل سكر اللاكتوز مع إنتاج حمض و غاز .
- توجد عادة في أمعاء الإنسان و الحيوانات ذات الدم **الحار** .
- لذلك فوجودها في الماء دليل على تلوث العينة بمياه المجاري .

اولاً: الأساس العلمي لتجربة الاختبار الاحتمالي

يجرى هذا الاختبار لمعرفة تلوث المياه بالمجاري، و حيث أن مياه المجاري تحتوي على مجموعة بكتيريا القولون ولهذه الأنواع قدرة على تخمر سكر اللاكتوز معطية حامض وغاز ولذلك تختبر العينات بزراعتها على بيئة تخمر السكريات المحتوية على سكر اللاكتوز وعلى دليل أحمر الفينول/ دليل بروموكريسل الارجواني ثم تحضن هذه الأنابيب وتفحص لوجود نتائج هذا الاختبار.

مبدأ عمل بيئة آجار ماكونكي واستخداماتها:

تستخدم ماكونكي أجار لعزل البكتيريا المعوية السالبة لجرام كذلك للتفريق ما من البكتيريا المخمرة للاكتوز والغير مخمرة.

- Peptone (Pancreatic digest of gelatin) و Proteose peptone (meat and casein):

توفير المواد الغذائية الأساسية، والفيتامينات وعوامل النيتروجينية اللازمة لنمو الكائنات الحية الدقيقة.

- **Lactose monohydrate:** اللاكتوز هي مصدر متخمر من الكربوهيدرات يعزى اليها العمل **التفريقي differential media** لهذه البيئة ما بين المخمرة والغير مخمرة لسكر اللاكتوز.
- يعزى العمل الانتقائي لهذه البيئة **Selective media** الى **crystal violet and bile salts** والتي تثبط معظم أنواع البكتيريا الموجبة لجرام.
- **Neutral red Or Bromocresol purple (BCP):**

هو مؤشر الرقم الهيدروجيني الذي يعطي لوناً أحمرا/ بنفسجياً في الرقم الهيدروجيني الأقل من 6.8، وهو عديم اللون في الرقم الهيدروجيني الأكبر من 6.8.

- Agar: أجار هي عامل التصلب في الوسط.

ثانياً: الأدوات والمواد اللازمة

1. عينة المياه المراد اجراء الاختبار عليها .
2. بيئة ماكونكي السائلة MacConkey agar (MAC).
3. أنابيب اختبار كبيرة بأغطية و معقمة .
4. أنابيب اختبار صغيرة معقمة .
5. ماصات ذات سعة 1 مل معقمة .
6. ماصات ذات سعة 10 مل معقمة .

ثالثاً: خطوات العمل

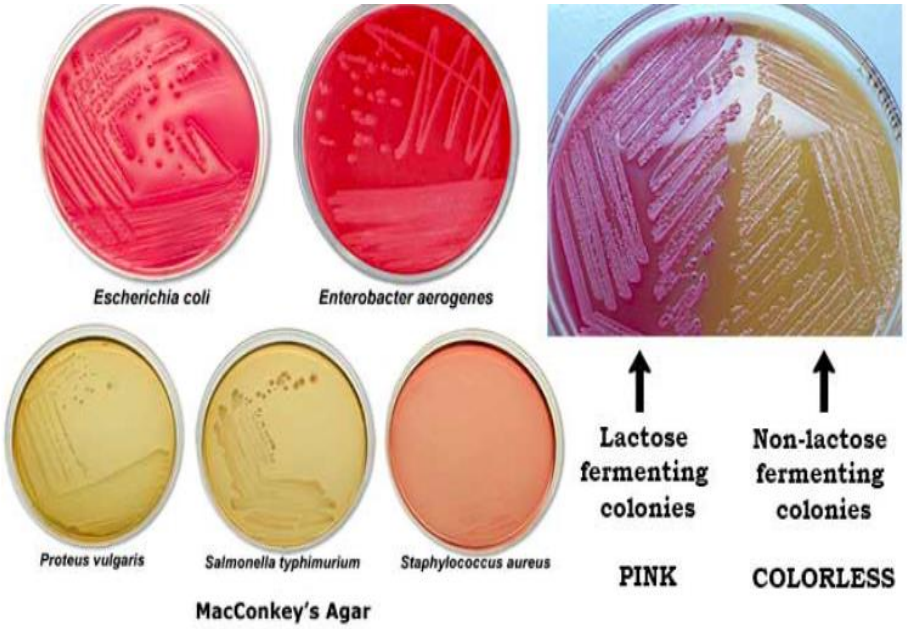
1. تحت ظروف التعقيم يصب من البيئة مقدار 10 مل في كل الأنابيب الكبيرة .
2. توضع الأنبوبة الصغيرة (درهام) بصورة مائلة في داخل الأنبوبة الكبيرة.
3. تلقح الأنبوبة الكبيرة بعينة المياه المراد فحصها بعد رجها جيداً بما يقارب 0.5 – 1 مل من المياه .
4. تحضن عند 37 م° لمدة 24 ساعة.
5. تفحص النتائج .

مكونات بيئة ماكونكي MacConkey agar (MAC).

النسبة	المكونات
17 gm	Peptone (Pancreatic digest of gelatin)
3 gm	Proteose peptone (meat and casein)
10 gm	**Lactose monohydrate**
1.5 gm	**Bile salts**
5 gm	Sodium chloride
0.03 gm	**Bromocresol purple (BCP) / Neutral red**
0.001 g	**Crystal Violet**
13.5 gm	Agar
Add to make 1 Liter	Distilled Water

نتائج النمو على بيئة آجار ماكونكي الصلبة

- السلالات المخمرة للاكتوز تظهر حمراء أو وردية ويمكن أن تحيط بها منطقة من الحمض bile salt.
- اللون الأحمر بسبب الحمض الناتج تخمر سكر اللاكتوز وامتصاص محايدة أحمر وامتصاص الأحمر المحايد عندما ثم تنخفض حموضة الوسط الى أقل من 6.8 .
- السلالات الغير مخمرة للاكتوز، مثل Shigella and Salmonellaهي عديم اللون وشفافة وعادة لا تغير مظهر البيئة.
- قد تظهر Yersinia enterocolitica، المستعمرات صغيرة غير مخمرة للاكتوز بعد تحضينها في درجة حرارة الغرفة.



نتائج النمو على بيئة آجار ماكونكي السائلة

بعد تحضين 24 ساعة

ظهور حمض و غاز	عدم ظهور حمض وغاز
موجبة	تحضن لمدة 24 ساعة

نتائج النمو على بيئة آجار ماكونكي السائلة

بعد تحضين 24 ساعة أخرى

ظهور حمض و غاز

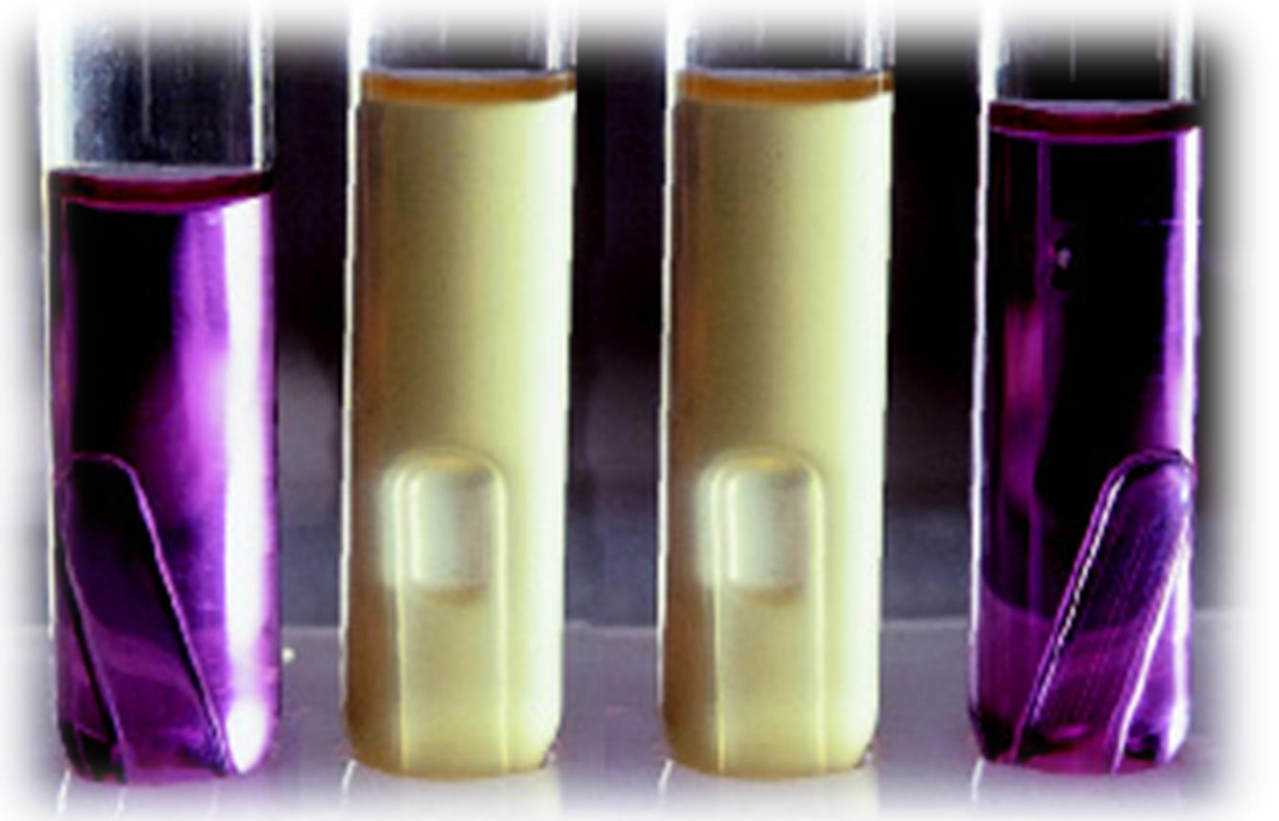
مشكوك فيها

عدم ظهور حمض وغاز

العينة سليمة

الآن عزيزتي دورك هو الآتي :

التعليق على التجربة و مناقشة التعليق



انتهى المعمل الثالث

اختبار التلوث بمياه المجاري

Examination of water for sewage pollution

الماء.. عرضة للتلوث بمياه المجاري ويمكن الكشف عن هذا النوع من التلوث بالكشف عن مجموعة بكتيريا القولون

اختبارات تلوث العينة بميكروبات القولون يتم هذا الاختبار على ثلاث مراحل (اختبارات)	
Presumptive Test	الاختبار الاحتمالي
Confirmatory Test	الاختبار التأكيدي
Completed Test	الاختبار التكميلي

مبدأ عمل بيئة مكونات بيئة أيوسين أزرق الميثلين EMB واستخداماتها

- تستخدم لعزل البكتيريا المعوية السالبة لجرام كذلك للتفريق ما من البكتيريا المخمرة للاكتوز والغير مخمرة أي لعزل بكتيريا القولون ومسببات الأمراض المعوية في المياه، منتجات الألبان والعينات البيولوجية.

- تحضر هذه البيئة بإضافة كمية معلومة من سكر اللاكتوز مع الصبغتين (الايوسين و الميثلين الأزرق **) إلى الآجار المغذي .**

1- المستعمرات الملونة على البيئة تعتبر مخمرة لسكر اللاكتوز.

2- المستعمرات الغير ملونة على البيئة تعتبر غير مخمرة لسكر اللاكتوز.

3- مزيج الصبغتين (الايوسين الحامضية مع الميثلين الزرقاء القاعدية) يمنع نمو أغلب البكتيرات الموجبة لجرام ويسمح لنمو البكتيريا السالبة لجرام.

ثانياً: الأدوات والمواد اللازمة

1. الأنابيب التي أعطت نتيجة موجبة أو مشكوك فيها من الاختبار الاحتمالي .
2. أطباق من بيئة Eosin Methylene blue agar (EMB)
3. إبر تلقيح .
4. مزارع نقية من *E.coli* و *Aerobacter areogenes* للمقارنة.

ثالثاً: خطوات العمل

1. تحت ظروف التعقيم يتم تقسيم أسفل طبق بيئة EMB إلى ثلاثة أقسام بواسطة قلم .
2. بواسطة ابرة تلقيح معقمة يتم تلقيح القسم الأول من أنابيب الاختبار السابقة و يلقح القسم الثاني من مزرعة *E.coli* و القسم الثالث من مزرعة *Aerobacter aerogenes*
3. تحضن الأطباق عند 37م° لمدة 24 ساعة .
4. تفحص النتائج .

مكونات بيئة أيوسين أزرق الميثلين (EMB).

المكونات	نسبتها والغرض منها
Peptone	10g
Lactose: Sugar sucrose	5g helps to differentiate lactose fermenter from non lactose fermenter
Potassium Phosphate	2g
Eosin Y	0.4g Indicator
Methylene Blue	0.65g pH indicator
Agar	13.5g Solidify agent
Distilled Water	Add to make 1 Liter

نتائج النمو على بيئة EMB

- **تعتبر وسط تفريقي من خلاله يتم التعرف على ميكروبات القولون**

1 - تتفرد بكتيريا E.coli بإظهار النمو المعدني الأخضر metallic green sheen.

2- بقية ميكروبات القولون تظهر داكنة .

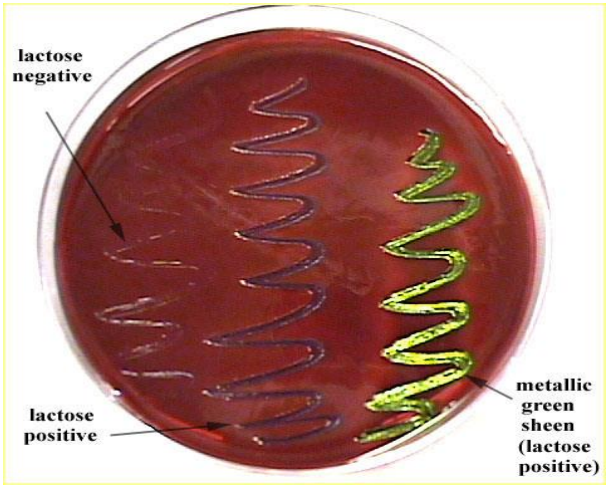
3-البكتيريا التي لا تخمر سكر اللاكتوز تظهر شفافة لأن الصبغة المركبة لا تعمل في وسط قلوي حيث تظهر البيئة باللون الأحمر .

- **يمكن تفسيرلون المجاميع التي تنمو على البيئة كما يلي :**

1. تفاعل صبغة الايوسين (حامضية) مع صبغة الميثلين الأزرق (قاعدية) لتكون صبغة ذات خواص متعادلة قريبة إلى الحامضية.
2. تكوين كمية من الأحماض الناتجة من تخمر اللاكتوز تؤدي إلى خفض pH مسبباً امتصاص الصبغة المركبة على الخلايا النامية.

نتائج النمو على بيئة أيوسين أزرق الميثلين

بكتيريا غير مخمرة لسكر اللاكتوز	*Aerobacter aerogenes*	*E.coli*



الآن عزيزتي دورك هو الآتي :

التعليق على التجربة و مناقشة التعليق

انتهى المعمل الرابع

اختبار التلوث بمياه المجاري

Examination of water for sewage pollution

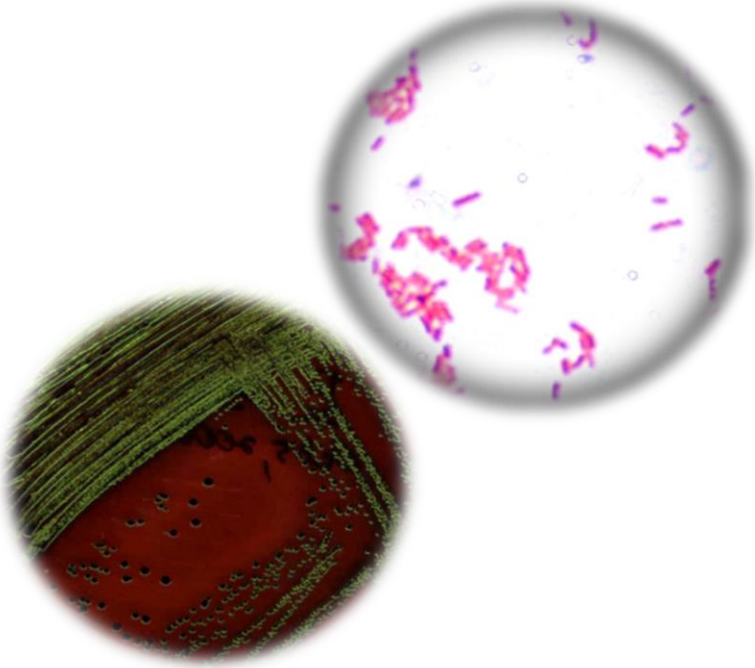
الماء.. عرضة للتلوث بمياه المجاري ويمكن الكشف عن هذا النوع من التلوث بالكشف عن مجموعة بكتيريا القولون

اختبارات تلوث العينة بميكروبات القولون يتم هذا الاختبار على ثلاث مراحل (اختبارات)	
Presumptive Test	الاختبار الاحتمالي
Confirmatory Test	الاختبار التأكيدي
Completed Test	الاختبار التكميلي

اولاً: الأساس العلمي لتجربة الاختبار التكميلي

الأطباق التي ظهرت عليها مستعمرات حقيقية من مجموعة بكتيريا القولون في بيئة EMB يتم زراعتها مره

أخرى على بيئة تخمر اللاكتوز (الماكونكي) وتفحص لوجود الحمض و الغاز حيث يجب الحصول عليهما معاً .



أن هذه المستعمرات الحقيقية هي عصويات سالبة لجرام .

ثانياً: الأدوات والمواد اللازمة

1. الأطباق التي ظهرت عليها مستعمرات حقيقية من الاختبار التأكيدي .
2. أنابيب من بيئة الماكونكي السائلة المحتوية على دليل بروموكريسل الارجواني .
3. أنبوبة درهام المقلوبة .
4. أنابيب من بيئة الآجار المائل .
5. ابر تلقيح .
6. صبغة جرام .

ثالثاً: خطوات العمل

1. تحت ظروف التعقيم يتم تلقيح بيئة الماكونكي بمقدار ملء عقدة من ابرة التلقيح
2. بواسطة ابرة تلقيح معقمة يتم تلقيح أنابيب الآجار المائل بطريقة التخطيط .
3. تحضن أنابيب الماكونكي عند 37م° لمدة 48 ساعة .
4. تحضن أنابيب الآجار المائل عند 37م° لمدة 48 ساعة .

❖ **إذا ظهرت النتائج حسب ما يلي :**

- ظهر حمض و غاز في أنابيب الماكونكي .
- وجد أنها مستعمرات مكونة من عصويات سالبة لجرام .

❖ **فيتم عمل الاختبارات التعريفية لمجموعة بكتيريا القولون وهي :**

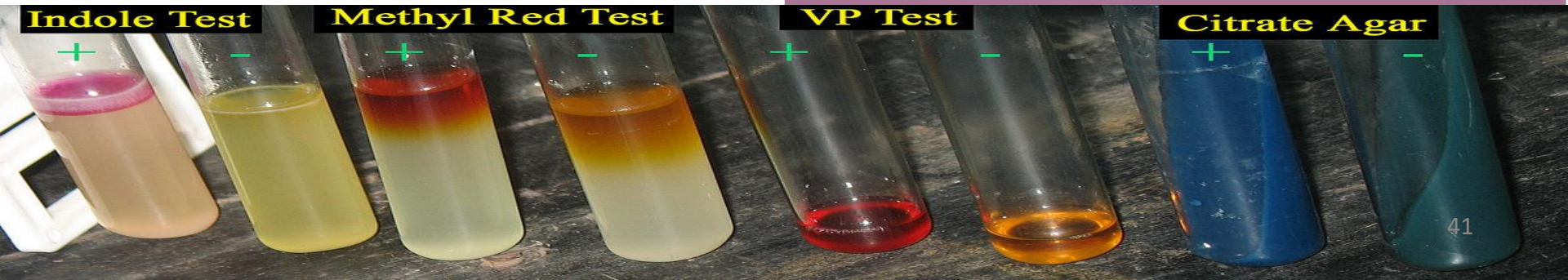
- اختبار انتاج الاندول .
- اختبار أحمر الميثايل .
- اختبار فوجس بروسكر .
- اختبار تمثيل السترات

انتهى المعمل الخامس

اختبارات التفرقة بين مجموعة القولون IMViC

بعد ظهور نتائج الاختبارات السابقة و التحقق من وجود مجموعة ميكروبات القولون يتم عمل الاختبارات التالية لها وذلك للتفرقة بينها:

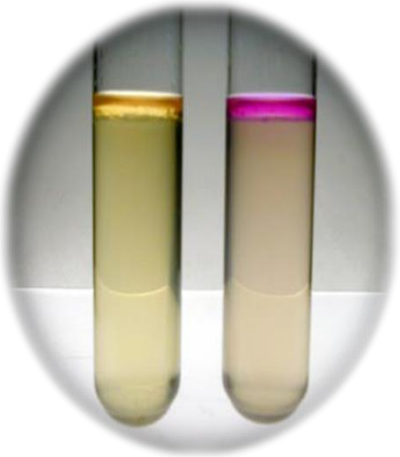
Indole Test	اختبار انتاج الأندول .
Methyle Red Test	اختبار أحمر الميثايل .
Vp Test	اختبار فوجس بروسكر .
Citrate agar	اختبار تمثيل السترات .



اولاً: الأساس العلمي لتجربة اختبار انتاج الأندول

1. بعض أنواع البكتيريا لها القدرة على تحليل الحمض الأميني (التربتوفان) و تحرير مركب الأندول و حمض البيروفيك .

2. يستدل عليه باستخدام دليل كوفاك حيث تتكون حلقة أو طبقة حمراء فوق البيئة .



ثانياً: الأدوات والمواد اللازمة

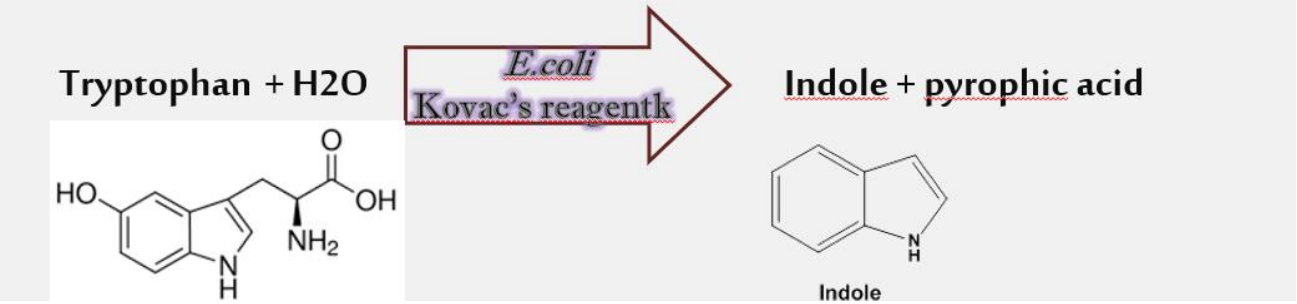
1. أنابيب من بيئة مرق التربتوفان .
2. الأنابيب التي أعطت نتيجة من الاختبار التكميلي .
3. دليل كوفاك .Kovac's reagent
4. ابر تلقيح .

ثالثاً: خطوات العمل

1. تحت ظروف التعقيم يتم تلقيح بيئة مرق التربتوفان بلاقحة من الأنابيب التي أعطت نتيجة موجبة من الاختبار السابق .
2. يتم تلقيح أنبوبة واحدة ببكتيريا E. coli ككنترول .
3. تحضن الأنابيب عند 37م° لمدة 48 ساعة .
4. أضف 10 نقاط من كاشف كوفاك .
5. تفحص النتائج .

النتائج

- تكون الحلقة الحمراء دليل على تحرر الأندول من مركب التربتوفان للبيئة بواسطة انزيم التربتوفينيز لبكتيريا القولون ثم يستدل على تحرر الأندول بتفاعله مع الألدهايد بعد إضافة الكاشف.

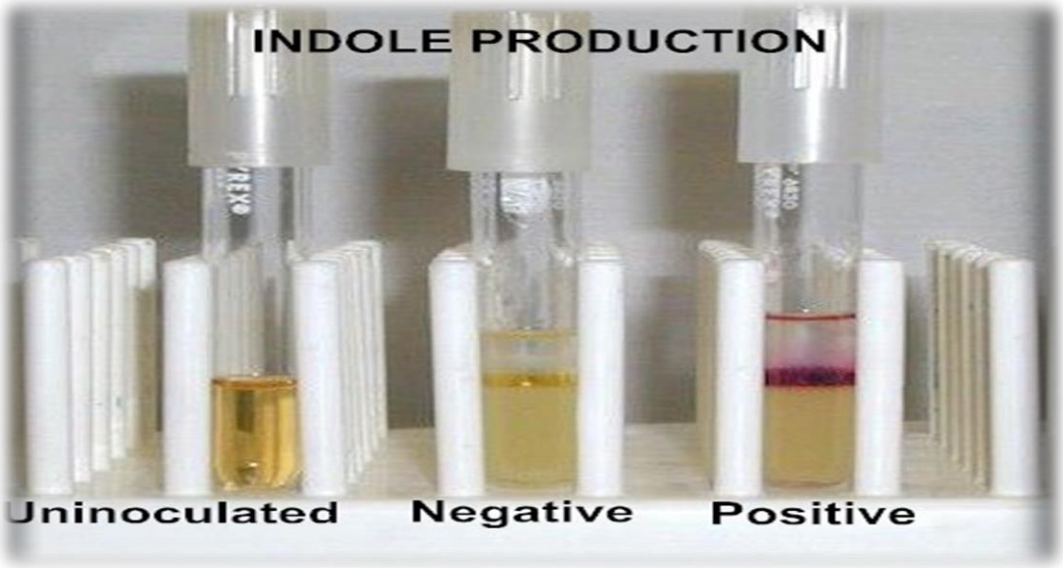


- حيث يتكون كاشف كوفاك من :

1.	P-dimethyl aminobenzaldehyde	10	gr
2.	Isoamyl or Isobutyl alcohol	150	ml
3.	Concentrated HCl	50	ml

- نلاحظ أن *E.coli* تعطي نتيجة (+) بينما *Aerobacter aerogenes* تعطي نتيجة (-)

(انتاج الأندول)



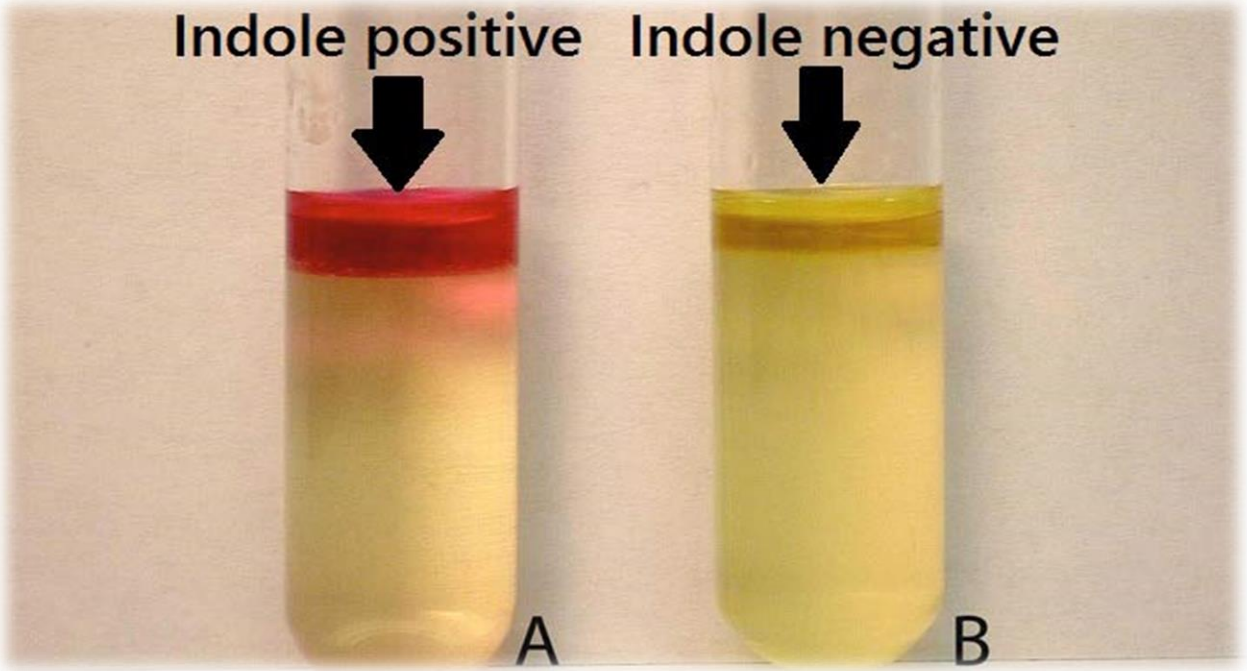
REACTION SCHEME II

$$\text{Tryptophan} + H_2O \xrightarrow[\text{Tryptophanase}]{\textit{E. coli}} \text{Free Indole} + \text{Pyruvate} + \text{Ammonia}$$

(IV) (V) (VI) (VII)

الآن عزيزتي دورك هو الآتي :

التعليق على التجربة و مناقشة التعليق

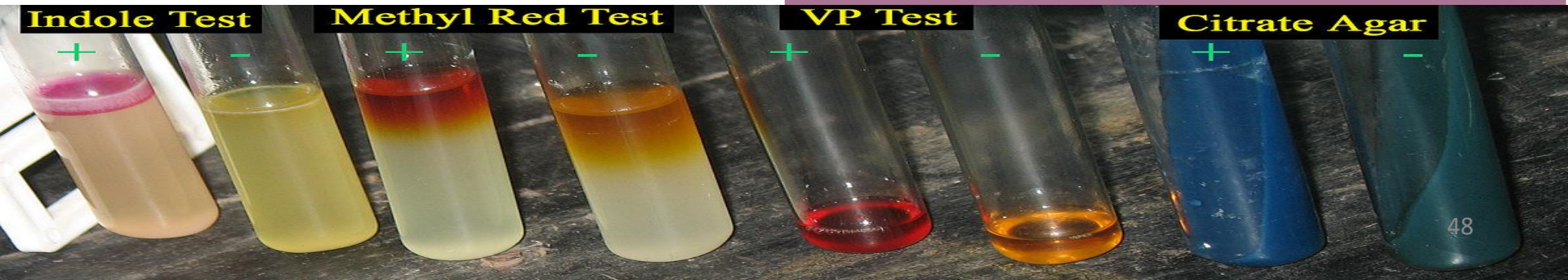


انتهى المعمل السادس

اختبارات التفرقة بين مجموعة القولون IMViC

بعد ظهور نتائج الاختبارات السابقة و التحقق من وجود مجموعة ميكروبات القولون يتم عمل الاختبارات التالية لها وذلك للتفرقة بينها:

Indole Test	اختبار انتاج الأندول .
Methyle Red Test	اختبار أحمر الميثايل .
Vp Test	اختبار فوجس بروسكر .
Citrate agar	اختبار تمثيل السترات .



اولاً: الأساس العلمي لتجربة اختبار أحمر الميثيل

1. بعض أنواع بكتيريا مجموعة القولون لها القدرة على تخمر الكربوهيدرات (السكريات كالجلوكوز) منتجة أحماض.
2. هذا الاختبار يقوم بتمييز الأنواع الميكروبية المنتجة للأحماض بكميات كبيرة عن التي لا تنتج إلا كميات قليلة .

- يستدل على قدرة البكتيريا على تخمر السكريات الموجودة في البيئة باستخدام دليل أحمر الميثيل Methyl Red.
- تختلف درجة اللون الناتج باختلاف كمية الأحماض المنتجة في الوسط البيئي فكلما كانت الكمية كبيرة تحول لون الدليل إلى اللون الأحمر (أي أن كمية الحمض كافية لتغيير اللون).
- في حين أن الأنواع التي أنتجت كمية قليلة من الأحماض فيظل لون الدليل أصفر وذلك لعدم وجود كمية كافية من الحمض لتغيير لون الدليل.

ثانياً: الأدوات والمواد اللازمة

- أنابيب من بيئة مرق الجلوكوز Glucose broth.
- الأنابيب التي أعطت نتيجة من الاختبار التكميلي .
- مزارع نقية من بكتيريا *E. coli*.
- دليل أحمر الميثيل Methyl Red reagent.
- ابر تلقيح .

ثالثاً: خطوات العمل

1. تحت ظروف التعقيم يتم تلقيح بيئة مرق الجلوكوز بلاقحة من الأنابيب التي أعطت نتيجة موجبة من الاختبار السابق .

2. يتم تلقيح أنبوبة واحدة ببكتيريا *E. coli*.
3. يتم ابقاء الأنبوبة الثالثة بدون تلقيح ككنترول .
4. تحضن الأنابيب عند 37 م° لمدة 2 - 5 أيام.
5. أضف 5 نقط من دليل أحمر الميثيل مع الرج الخفيف لمدة من 15 – 20 دقيقة .
6. تفحص النتائج .

النتائج

- عندما تخمر البكتيريا سكر الجولوكوز أو اللاكتوز فإن أول ناتج من عمليات التخمر هو:

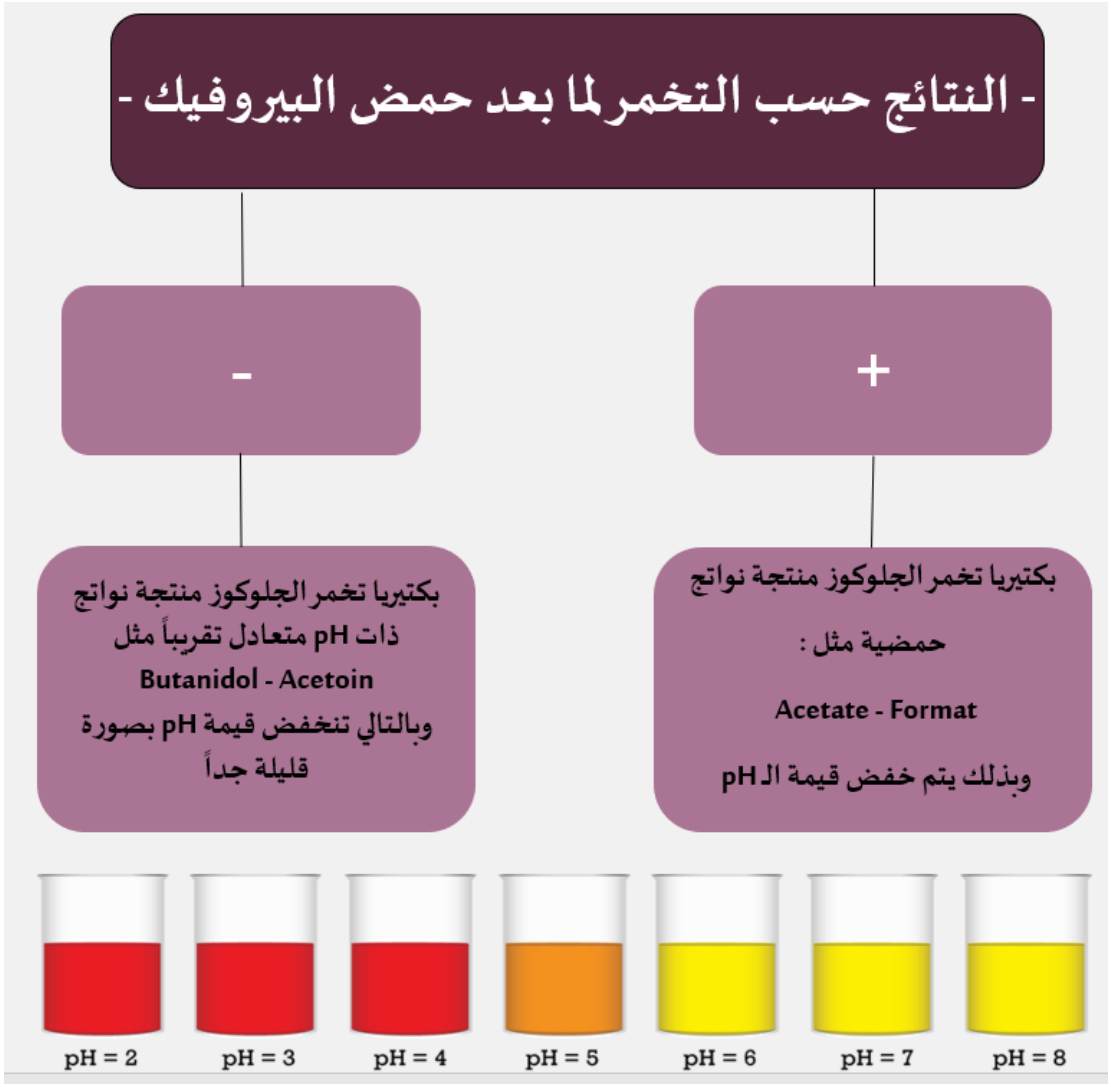
Pyruvic acid كناتج أساسي لجميع البكتيرات, ثم تختلف بعدها مسارات التخمر حسب احتياج البكتيريا الهوائي

- حيث يتكون كاشف ميثل الأحمر من :

1.	Methyl red indicator	0.1	gr
2.	Ethyl alcohol 95%	300	ml
3.	Distilled Water	200	ml

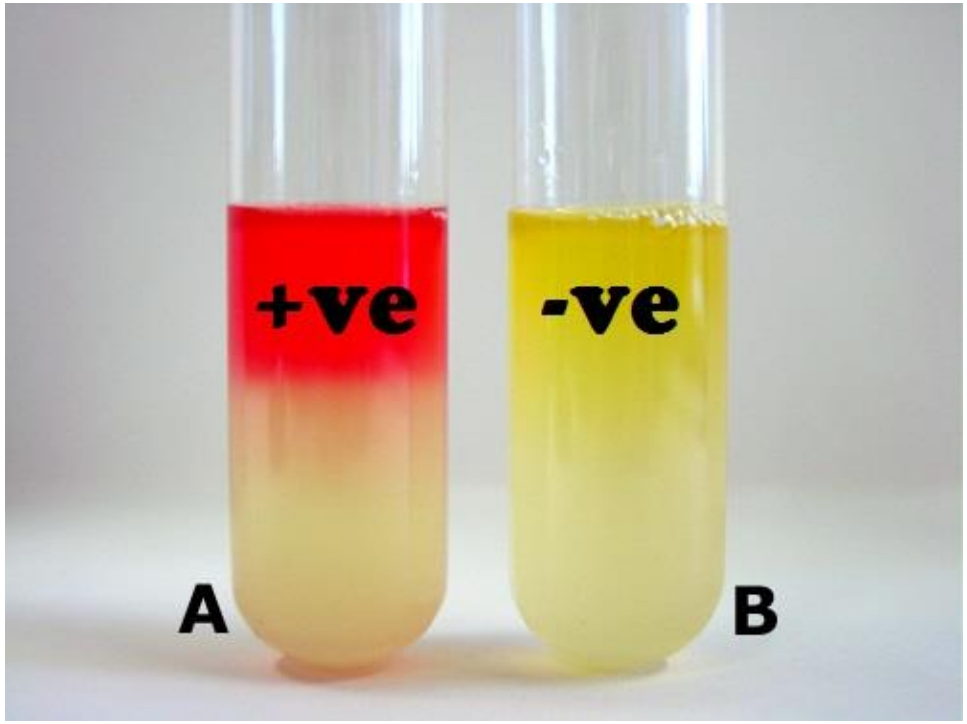
- لذلك تقسم النتائج حسب التخمر لما بعد حمض البيروفيك إلى ما يلي:

النتائج


- النتائج حسب التخمر لما بعد حمض البيروفيك -
+
-
بكتيريا تخمر الجلوكوز منتجة نواتج
حمضية مثل :
Acetate - Format
وبذلك يتم خفض قيمة الـ pH
بكتيريا تخمر الجلوكوز منتجة نواتج
ذات pH متعادل تقريباً مثل
Butanidol - Acetoin
وبالتالي تنخفض قيمة pH بصورة
قليلة جداً
pH = 2
pH = 3
pH = 4
pH = 5
pH = 6
pH = 7
pH = 8

الآن عزيزتي دورك هو الآتي :

التعليق على التجربة و مناقشة التعليق

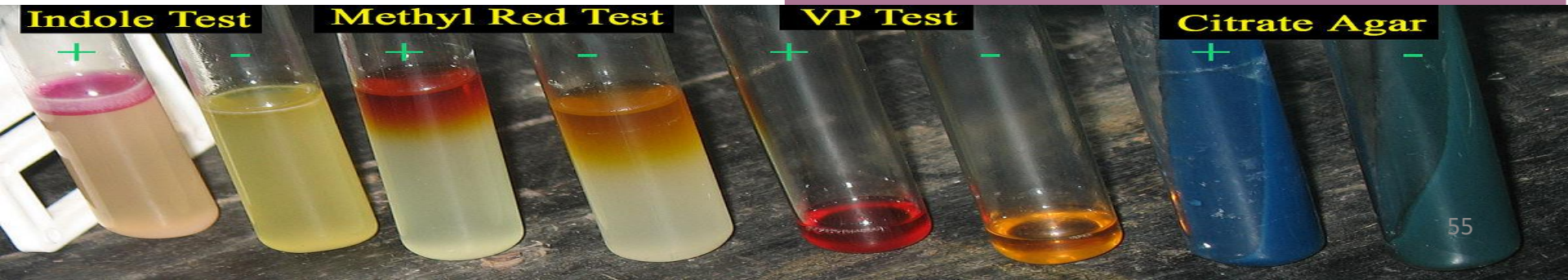


انتهى المعمل السابع

اختبارات التفرقة بين مجموعة القولون IMViC

بعد ظهور نتائج الاختبارات السابقة و التحقق من وجود مجموعة ميكروبات القولون يتم عمل الاختبارات التالية لها وذلك للتفرقة بينها:

Indole Test	اختبار انتاج الأندول .
Methyle Red Test	اختبار أحمر الميثايل .
Vp Test	اختبار فوجس بروسكر .
Citrate agar	اختبار تمثيل السترات .



اولاً: الأساس العلمي لتجربة اختبار فوجس بروسكر

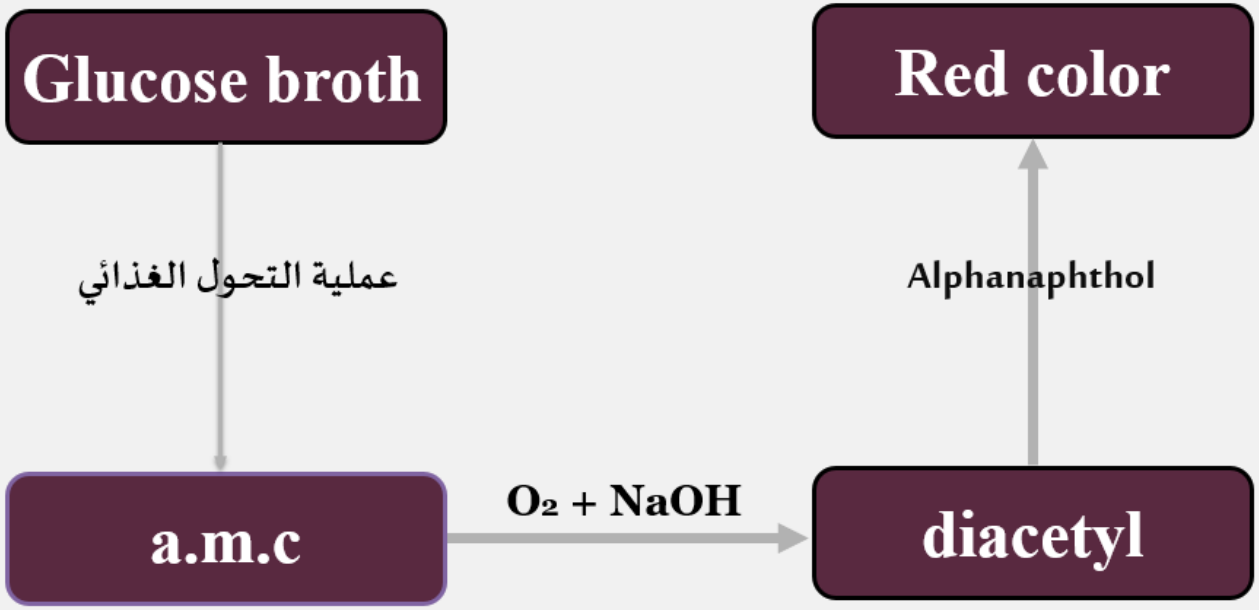
1. أن هناك ميكروبات لها قدرة على عملية التحويل الغذائي لبعض المركبات حيث تنتج مواد تعمل على معادلة الأحماض المنتجة في الوسط .

2. هذا التحويل الغذائي ناشئ كردة فعل للميكروب كي يتفادى الوسط الحامضي الناتج من عمليات التخمر .

3. يطلق على هذه العملية بـ عملية التعادل و من هذه المركبات المعادِلة Acetyl methyl carbinol

عملية التعادل

Neutralization mechanism



ثانياً: الأدوات والمواد اللازمة

- أنابيب من بيئة مرق الجلوكوز Glucose broth.
- الأنابيب التي أعطت نتيجة من الاختبار التكميلي .
- مزارع نقية من بكتيريا *E. Coli*.
- محلول Barrit A (40% NaOH or KOH)
- دليل Baritt B (Alphanaphthol)
- ابر تلقيح .

ثالثاً: خطوات العمل

1. تحت ظروف التعقيم يتم تلقيح بيئة مرق الجلوكوز بلاقحة من الأنابيب التي أعطت نتيجة موجبة من الاختبار السابق .
2. يتم تلقيح أنبوبة واحدة ببكتيريا *E. coli*.
3. يتم ابقاء الأنبوبة الثالثة بدون تلقيح ك كنترول .
4. تحضن الأنابيب عند 37م° لمدة 48 ساعة.
5. أضف 1 مل من Baritt A و بضع نقط من Baritt B مع الرج الخفيف و تترك من 2 – 4 ساعات ليتم التفاعل ، ثم تفحص النتائج .

النتائج

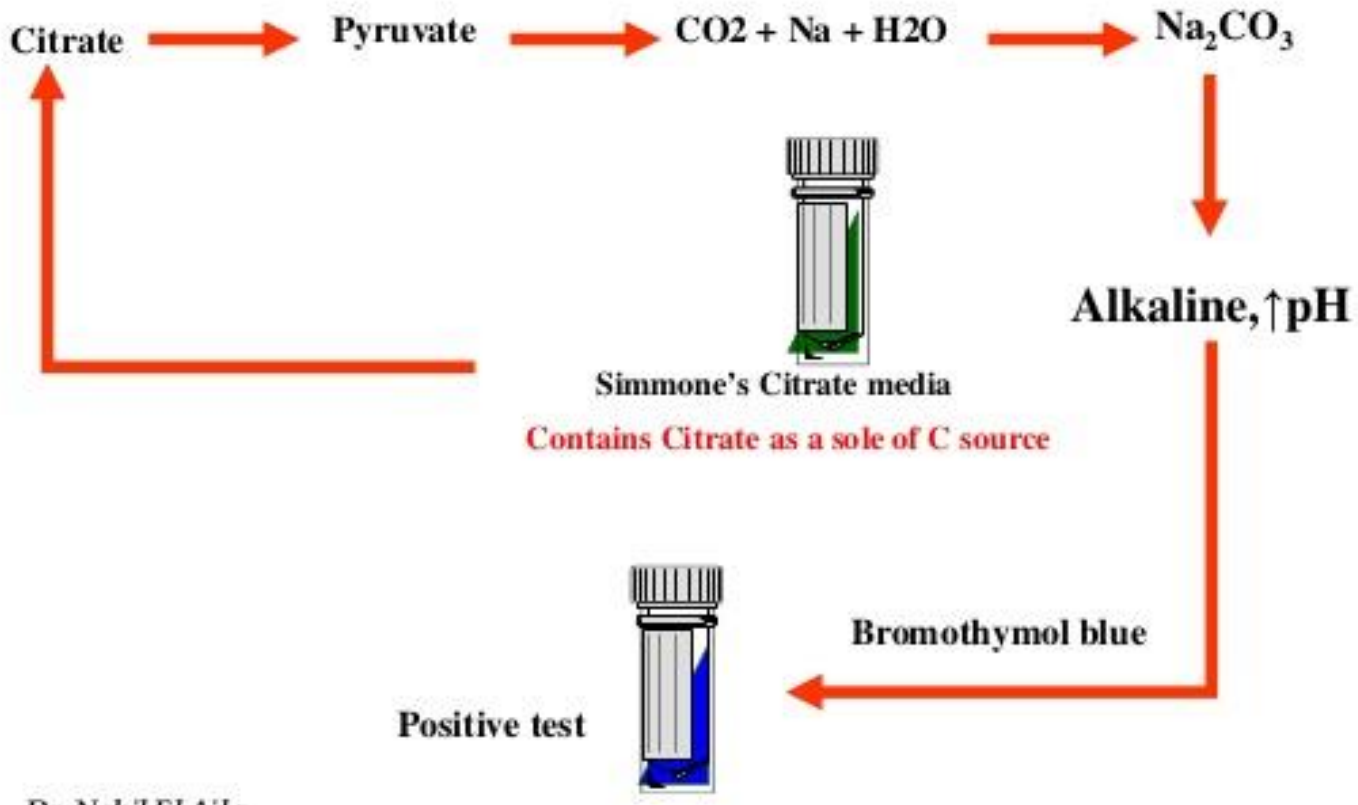
- يستخدم هذا الاختبار للتمييز بين *E. coli* و *A. aerogenes* إذن أن الثانية قادرة على عملية التحلل الغذائي وإنتاج مركب a.m.c بينما *E. coli* لا تكونه , فبالتالي يعتبر هذا الاختبار عكس للاختبار السابق .
- النتيجة الموجبة للاختبار تعطي لون من الوردي إلى الأحمر بينما السالبة تكون ذات لون أصفر.

1. يتكون كاشف alpha naphthol indicator من :

2.	alphanaphthol	5	gr
3.	Ethyl alcohol 95%	100	ml

IMViC: CITRATE TEST

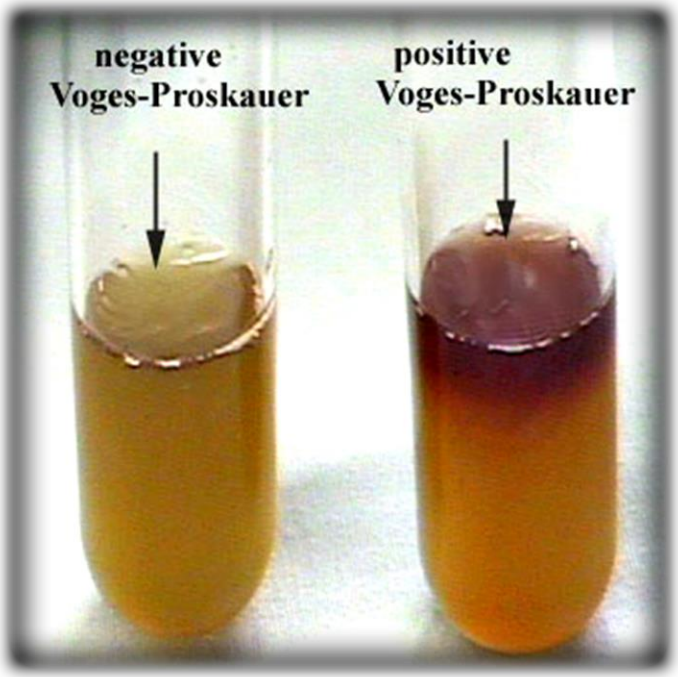
Principle:



Dr. Nabil El Aila
Diagnostic Microbiology

الآن عزيزتي دورك هو الآتي :

التعليق على التجربة و مناقشة التعليق

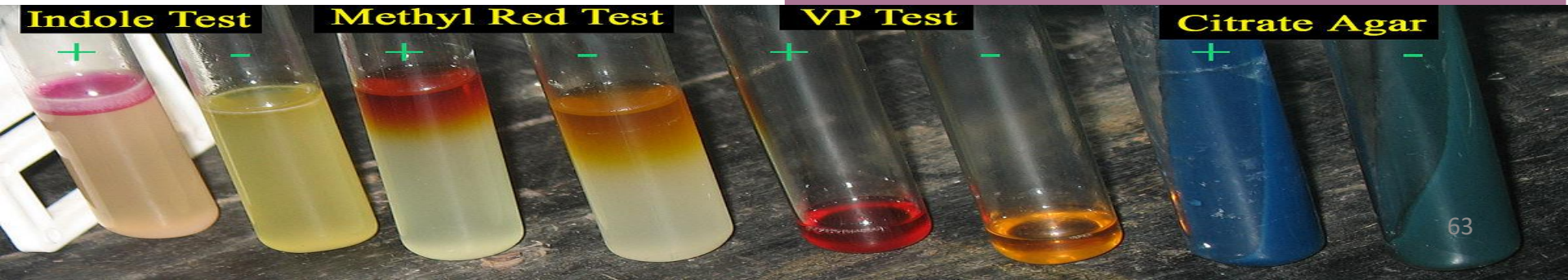


انتهى المعمل الثامن

اختبارات التفرقة بين مجموعة القولون IMViC

بعد ظهور نتائج الاختبارات السابقة و التحقق من وجود مجموعة ميكروبات القولون يتم عمل الاختبارات التالية لها وذلك للتفرقة بينها:

Indole Test	اختبار انتاج الأندول .
Methyle Red Test	اختبار أحمر الميثايل .
Vp Test	اختبار فوجس بروسكر .
Citrate agar	اختبار تمثيل السترات .



اولاً: الأساس العلمي لتجربة اختبار تمثيل السترات

1. يعرف هذا الاختبار باسم Koser's test .
2. تعتمد فكرة الاختبار على استخدام بيئة مكونة من أملاح معدنية فقط .
3. تستهلك البكتيرات الموجبة لهذا الاختبار سيترات الصوديوم كمصدر الكربون الوحيد في البيئة .

عندما تستهلك البكتيريا السترات تعطي نواتج ترفع من قاعدية الوسط مما يؤدي إلى تحول لون الوسط

إلى اللون الأزرق .

تتكون بيئة Simmon citrate من التالي

- Ammonium Dihydrogen Phosphate 1gr
- Dipotassium Phosphate 1gr
- Sodium Chloride 5gr
- **Sodium Citrate (C6H5Na3O7) 2gr**
- Magnesium Sulfate 0.2gr
- Agar 15gr
- **Bromthymol Blue 0.08gr**

ثانياً: الأدوات والمواد اللازمة

- أنابيب من بيئة الستراتSimmons citrate.
- الأنابيب التي أعطت نتيجة من الاختبار التكميلي .
- مزارع نقية من بكتيريا *E. Coli* عمرها 24 ساعة .
- مزارع نقية من *A. aerogenes* عمرها 24 ساعة .
- ابر تلقيح .

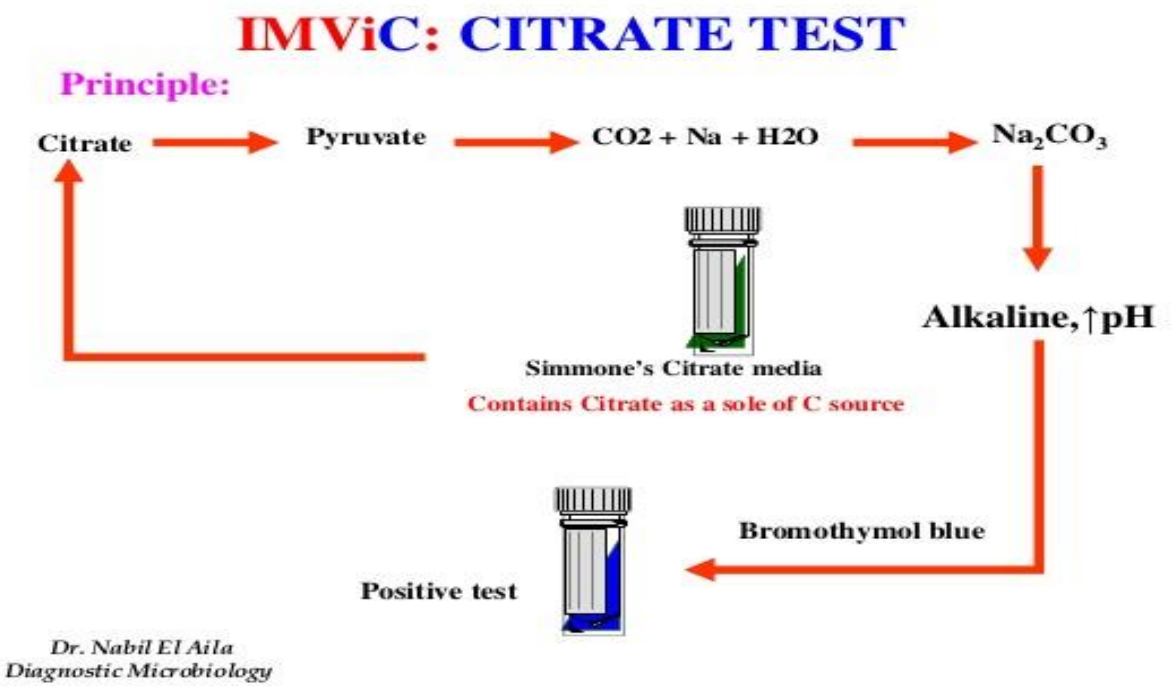
ثالثاً: خطوات العمل

1. تحت ظروف التعقيم يتم تلقيح بيئة السترات بلاقحة من الأنابيب التي أعطت نتيجة موجبة من الاختبار السابق .

2. يتم تلقيح أنبوبة واحدة ببكتيريا *E. coli*.
3. يتم ابقاء الأنبوبة الثالثة بدون تلقيح كـ كنترول .
4. تحضن الأنابيب عند 37م° لمدة 4 أيام.
5. تفحص النتائج من حيث تواجد النمو أو عدمه.

النتائج

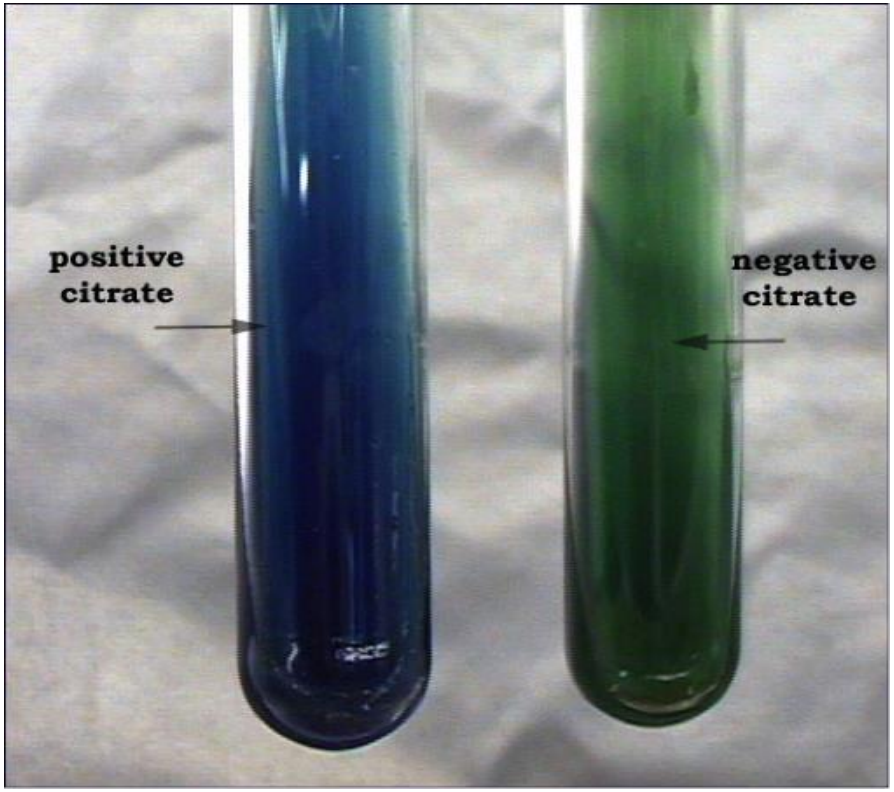
- يستخدم هذا الاختبار للتمييز بين *E. coli* و *A. aerogenes* إذن أن الثانية تستهلك السترات كمصدر كربوني بالوسط وبالتالي تعطي نواتج ترفع من قاعدية الوسط وتتفاعل مع Bromthymol Blue مما يؤدي إلى تحول لون الوسط إلى اللون الأزرق .



حيث تكون :

- *E.coli* سالبة لهذا الاختبار

- *A. aerogenes* موجبة للاختبار.



الآن عزيزتي دورك هو الآتي :

التعليق على التجربة و مناقشة التعليق

Simmons Citrate

A: Positive…Enterobacter

B: Negative…E. coli

C: Control-uninoculated

انتهى المعمل التاسع