الشركة القابضة
لمياه الشرب والصرف الصحى

برنامج المسار الوظيفي
للعاملين بقطاع مياه الشرب والصرف الصحي

دليل المتدرب

برنامج
مبادئ ميكروبيولوجيا المياه

حقوق الطبع محفوظة
الشركة القابضة لمياه الشرب والصرف الصحى
الإدارة العامة للمسار الوظيفى - إدارة المناهج

كيميائي مياه – حديث

تم إعداد المادة بواسطة الشركة القابضة لمياه الشرب والصرف الصحي
قطاع تنمية الموارد البشرية - الادارة العامة لتخطيط المسار الوظيفي
الإصدار الثانى - 2019.

الفـهـرس

1. مقدمة: 5

1.1. تعريف البكتيريا Bacteria : 5

1.2. لمحة تاريخية عن اكتشاف البكتيريا : 7

1.3. الخصائص العامة للبكتيريا: 8

.1.4 أشكال البكتيريا 11

1.5. تكاثر ونمو البكتيريا: 11

1.6. الظروف الملائمة لتكاثر البكتيريا ونموها 13

2. التحاليل البكتريولوجية للمياه........ 17

.2.1 الصفات العامة للدليل المثالي: 18

2.2. تقسم الدلائل البكتريولوجية طبقاً لدلالاتها إلى: 20

3. الاشتراطات الواجب توافرها في معامل التحليل البكتريولوجي 22

3.1. التهوية: 22

.3.2 المكان المتاح: 22

.3.3 منضدة المعمل: 22

.3.4 الجدران والأرضيات: 22

.3.5 تنظيف المعمل: 23

4. أدوات وأجهزة المعمل الميكروبيولوجي Equipment and Instruments 23

4.1. الحضانات Incubators 23

4.2. أفران التعقيم بالهواء الساخن Hot Air Sterilizing Ovens 24

4.3. الأوتوكلاف Autoclave 25

4.4. أجهزة العد البصرية Optical Counting Equipment 26

4.5. جهاز قياس تركيز أيون الأيدروجين pH Equipment 27

4.6. الموازين Balances 29

.4.7 أدوات تحضير البيئات Media preparation Utensils 29

.4.8 الماصات و الماصات الدقيقة والمخابير المدرجة: 30

4.10. الثلاجات Refrigerators 32

4.11. الفريزر Freezer 33

4.12. وسائل مراقبة وتسجيل الحرارة Temperature-Monitoring Device 34

4.13. زجاجيات أو أنابيب التخفيف Dilution Bottles 35
4.14. أطباق بترى Petri Dishes 35
4.15. جهاز الترشيح الغشائي Membrane filtration equipment 36
4.16. أنابيب التخمر و الدراهم Fermentation Tubes and Vials............................ 37
4.18. زجاجات العينات Sample Bottles 38
4.19. الميكروسكوبات Microscopes.. 39
4.20. كابينة الهواء المتدفق/ Laminar Air Flow 41
4.21. كابينة الأمان الحيوي Biological Safety Cabinets..................................... 41
4.22. لمبات الأشعة الفوق بنفسجية Ultraviolet Lights 42
4.23. وسائل توزيع البيئات Media and Solution Dispensers 43
4.24. حضانة الحمام المائي Water bath incubator... 44
4.25. المرشحات الغشائية والوسائد Membrane filters and pads 45
4.26. جهاز التقطير Water Still 46
4.27. جهاز قياس التوصيل الكهربائي conductivity meter 47
5. احتياطات الأمان داخل معمل البكتريولوجى.. 50
6. الغسيل والتعقيم Washing and Sterilization 53
6.1. الغسيل Washing 53
6.2. التعقيم Sterilization 54
6.3. التعقيم المستخدم داخل معامل الميكروبيولوجى.. 58
6.4. حفظ وتخزين العينات Preservation and Storage of samples.......................... 59
7. الأوساط الغذائية Culture media... 60
7.1. الأوساط الغذائية: 60
8. التجارب العملية.. 68
8.1. تحضير مياه التخفيف Dilution Water 69
8.2. طريقة التخفيف المتسلسل Serial Dilution 70
8.3. العد الكلى للبكتريا بطريقة الأطباق المصبوبة 71
8.4. طريقة تخطيط الاطباق Streak Plate Method 73
8.5. الصبغات الميكروبية Microbial Stains.. 75

مقدمة الإصدار الثانى

تهدف مجموعة البرامج التدريبية المعدة من إدارة المسار الوظيفى بالشركة القابضة لمياه الشرب والصرف الصحى إلى رفع كفاءة الكيميائين العاملين بها وبالشركات التابعة لها وتنمية مهاراتهم ومعارفهم بالشكل الذى يضمن الوصول إلى كوب مياه نظيف وبيئة آمنة يرضى متطلبات وإحتياجات العملاء الكرام.

ويعتبر الإصدار الثانى من برامج المسار الوظيفى لوظيفة كيميائى مياه الشرب هو ثمرة جهود الكيميائيين العاملين بمعامل الشركات التابعة والمعمل المرجعى لمياه الشرب بالشركة القابضة بما تحمله من مزيج متجانس من الخبرات والكفاءات الذين لم يدخروا جهدا حتى يخرج هذا العمل بالطريقة اللائقة.

وجدير بالذكر أن هذا الإصدار يعتبر مكتبة مرجعية وافية وشاملة لجميع الجدارات المتضمنة المهارات والمعارف التي تجعل الكيميائى كفؤا لوظيفته.

ومما تجدر الإشارة إليه بأنه تم الاعتماد على منهجية للمسار التدريبى بحيث يكون المتدرب قد تلقى الدورات الحقلية بداية من التعرف على مراحل التنقية والمعالجة ثم الانتقال إلى الدورات المعملية داخل معمله طبقا للإطار الزمنى المحدد للمدد البينية لكل درجة وظيفية.

ولقد اعتمدنا على وضع معايير لكل مرحلة فى إعداد هذا الاصدار وكان من أهم هذه المعايير:

- المشاركة الفعالة للخبرات والكفاءات التدريبية بالشركات التابعة فى وضع المناهج بما يناسب عموم الكيميائيين على مستوى الجمهورية.
- عقد ورشة عمل متخصصة لكل مادة تدريبية يشارك بها جميع المدربين ذوى التخصص والخبرات سواء من المعمل المرجعى أو معامل الشركات فضلا عن أن يكون المدرب قد قام بتدريس هذه المادة مرات عديدة.
- استخدام وسيلة اتصال غير تزامنى بين جميع المدربين المعتمدين لكل مادة على حدة من خلال انشاء جروب على الفيس بوك لكل مادة على حده (مذكور فى دليل المدرب).
- وضع حقيبة تدريبية كاملة لكل برنامج معدة طبقا لأحدث النظم والمعايير العالمية تحتوى على (دليل المتدرب- شرائح العرض- ملحقات مقرؤة ومرئية- دليل المدرب- بنك الأسئلة).
- بناء المحتوى لكل برنامج تدريبى طبقاً لأحدث المراجع العالمية ومن أهمها كتاب الطرق القياسية لتحليل مياه الشرب والصرف الصحى (الإصدار رقم 23) وبما يتوافق مع متطلبات آخر إصدارات الايزو(17025)، مع مراعاة التحديثات الخاصة بالتشريعات والقوانين ذات الصلة.

وجدير بالذكر أن الإصدار الثانى من البرامج التدريبية اعتمد فى تصميمه على عرض مبسط للمعلومات قدر الامكان طبقاً للأسس العلمية وطبقاً للجدارات المعتمدة على تحديد أهداف واضحة وصريحة لتدريب المتدربين، وتشتق تلك الجدارات من الفهم الواضح لدور المتدرب طبقا لبطاقة الوصف الوظيفى، وتتضمن معارف ومهارات وسلوك. مما يضمن إكساب المتدرب مهارات سلوكية بالإضافة إلى المواد التخصصية.

كما تم تصميم العديد من ورش العمل على أساس تسهيل و تسريع عمليتي التعلم و كسب المهارات بما يسمح بتعظيم الفائدة من العملية التدريبية.

كذلك تم استخدام أساليب التدريب الحديثة والاعتماد على التدريب التفاعلى والتركيز على الجوانب التطبيقية في استخدام الوسائل والأساليب المختلفة ، كما تم استخدام الطرق الحديثة

للتعليم التفاعلي والغير تزامني كمصادر مساندة للتعلم من خلال انشاء جروب على الفيس بوك للمدربين المعتمدين (**HCWW Trainers**) .

وفى الختام نرجوا من الله أن يتقبل منا هذا العمل كما نأمل أن يكون هذا العمل علما نافعا للعاملين بقطاع المعامل بالشـركة القابضـة والشـركات التابعة لما يشـمله من معلومات فنية قيمة وأن يفيد العاملين الجدد بها ليصبحوا قادرين على تنفيذ مهامهم الوظيفية بالشكل الأمثل .

والله ولي التوفيق.

1. مقدمة:

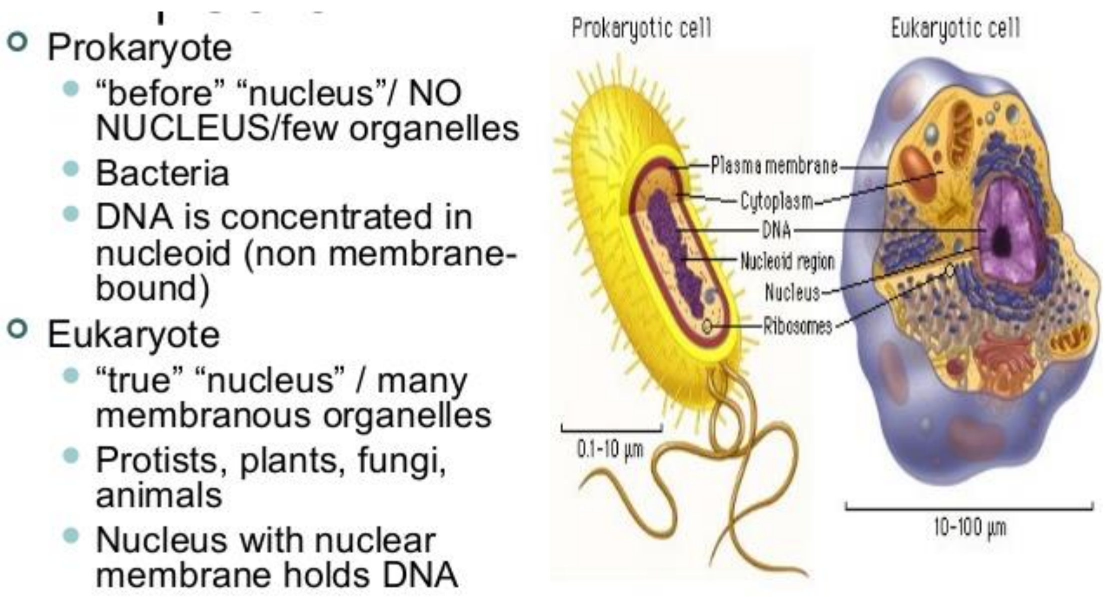
1.1. تعريف البكتيريا Bacteria :

- **البكتيريا:** هى كائنات حية دقيقة مكونة من خلية واحدة، بدائية النواه (حيث توجد المادة الوراثية فى وسط الخلية وغير محاطة بغشاء نووى)، تتحرك وتتكاثر وتتأقلم وفق الوسط المحيط بها. وبعض أنواع البكتيريا نافعة ومفيدة للإنسان وبعضها الآخر ضار ومسبب للأمراض.

جدول يوضح

فوق المملكة	البكتيريا البدائية	البكتيريا	حقيقية النوى			
مملكة	البكتيريا البدائية	البكتيريا الحقيقية	الطلائعيات	الفطريات	النباتات	الحيوانات
المثال	Methanopyrus	Pseudomonas	براميسيوم	فطر المشروم	حزازيات	دودة الأرض
نوع الخلايا	بدائية النوى		حقيقية النوى			
جدار الخلية	جدار خلوي بدون ببتيدوجلايكان	جدار خلوي يحتوي على ببتيدوجلايكان	جدار خلوي يحتوي على سليلوز في بعضها	جدار خلوي يحتوي على كايتين	جدار خلوي يحتوي على سليلوز	لا يوجد جدار خلوي
عدد الخلايا	وحيدة الخلية		وحيدة الخلية أو عديدة الخلايا	غالبًا عديدة الخلايا	عديدة الخلايا	
التغذية	ذاتية أو غير ذاتية التغذية			غير ذاتية التغذية	ذاتية التغذية	غير ذاتية التغذية

الممالك الست للكائنات الحية (اولية النواة وحقيقة النواة)



صورة

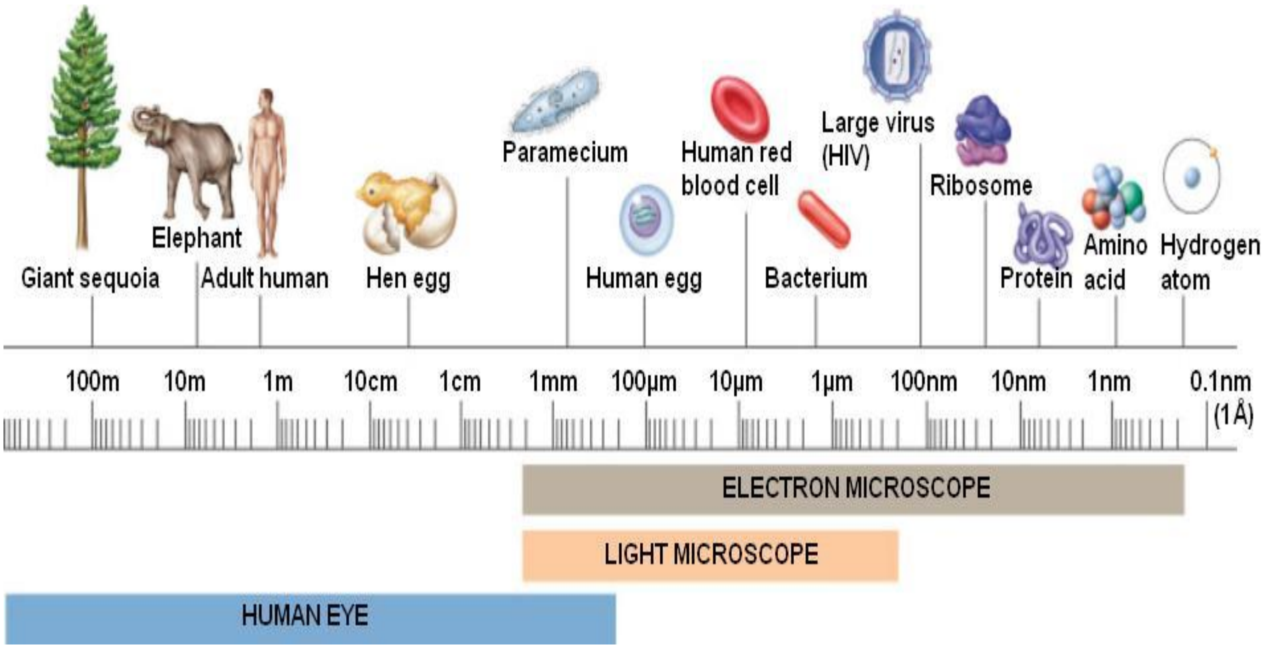
توضح الفرق بين الكائنات اولية النواة Prokaryotic والكائنات حقيقة النواة Eukaryotic

- تتصف البكتيريا بصفة الأنتشار الواسع، بحيث يمكننا أن نجدها محمولة على ذرات التراب في الهواء الجوي المحيط بنا إلى ارتفاع 5 اميال، وفي التربة التي ندوس عليها على عمق 3 اميال، وتشتد انتشارا في التربة الخصبة الزراعية، كما انها موجودة على سطوح أجسامنا (جلودنا) وبعض أجزاء الجهاز الهضمي والتنفسي، وهي ايضا موجودة في المياه العذبة والمالحة ومياه الينابيع الساخنة التي تصل حرارتها إلى 75 سيليزية وكذلك في الثلج والجليد.

- وقد تتساءل عن الأماكن التي يندر فيها وجود هذه الكائنات !!!!! تقريباً دم الانسان والحيوان غير المريضين يخلوان تماما من البكتيريا، وكذلك الأنسجة الداخلية السليمة للأنسان والحيوان والنبات، والطبقات العميقة من التربة والصخور وكذلك الفوهات البركانية ذات الحمم المنصهرة كلها تنعدم فيها البكتيريا.

- وقد تمكن الأنسان من زراعة البكتيريا على وسائط غذائية صناعية في المختبرات تحت ظروف معينة حتى اصبحت عملية زراعة البكتيريا سهلة للغاية ومأمونة بدرجة كبيرة.

- البكتريا صغيرة جداً لدرجة انه إذا صف 1500 من بكتيريا النوع المسبب لمرض التيفود ، طرفاً لطرف ، لا يتجاوز حجمها حجم رأس الدبوس .



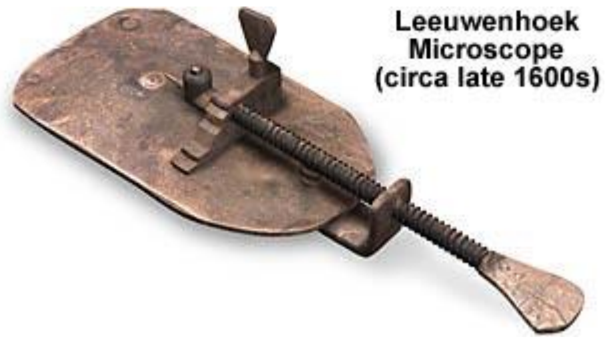
صورة توضح مقارنة بين احجام الكائنات الحية والجزئيات

1.2. لمحة تاريخية عن اكتشاف البكتيريا :

- **العالم الهولندي ليفنهوك (1632-1723)** : يرجع له فضل تركيب أول ميكروسكوب بسيط وضع تحته قطرة من المياه التي اكتشف داخلها عالما متكاملا من الكائنات الحية منها البكتريا
- **العالم الفرنسى لويس باستير (1822-1895)** : أكد أن الكائنات الحية لا تتوالد الا من كائنات حية أخرى وليس من مادة غير حية. كان له الفضل في اكتشاف التعقيم وهو صاحب طريقة التعقيم بالبستره المسماه باسمه حتى الان .
- **العالم الالمانى كوخ** : ساهم في اكتشاف الكثير من البكتريا المسببة لكثير من الامراض ومنها دراسته لمرض الكوليرا الذى انتشر كوباء في وقته ومنها مصر والذى حضر اليها لدراسة المرض في الاسكندريه .

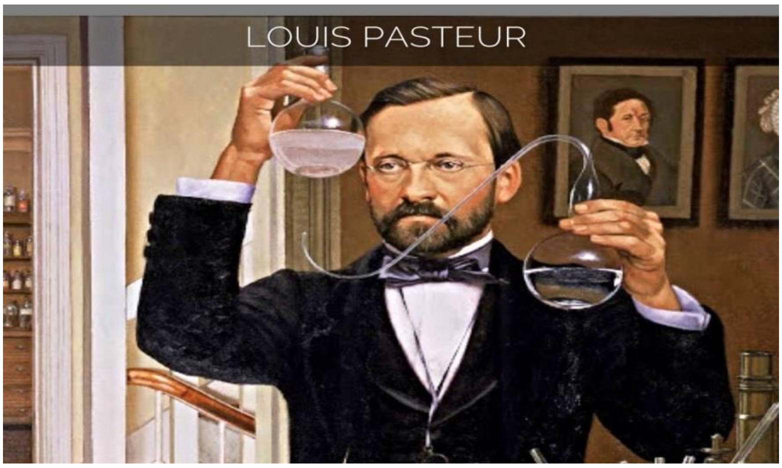
الميكروسكوب البسيط للعالم

ليفنهوك



العالم لويس باستير

ونقض تجربة التوالد الذاتى



1.3. الخصائص العامة للبكتيريا:

1.3.1.كائنات دقيقة مجهرية بدائية النواه لا ترى بالعين المجردة.

1.3.2.تتميز ببساطة التركيب:

- تتركب من جدار وغشاء خلويين يحيطان بالسيتوبلازم .
- تحتوى على جزيئات DNA على شكل كروموسومً حلقي واحداً أو اكثر على شكل دوائر صغيرة تسمى البلازميدات.

1.3.3.تأتي صلابة جدارها لوجود مركب عديد الببتيد (ببتيدوجلايكان peptedoglycon)

1.3.4.تحاط بعض أنواعها بطبقة مخاطية تسمى المحفظة Capsule تشكل غطاء وتزيد من قدرة بعض أنواع البكتيريا في إحداث المرض

1.3.5.يختلف حجم الخلية البكتيرية فمنها ما هو متناهي الصغر كما في الميكوبلازما يتراوح قطر الخلية بين 100−200 نانومتر ومنها ما هو كبير قد يصل إلى 500 نانومتر كما في بكتيريا القولون العصوية

1.3.6. تتكاثر بالإنشطار الثنائي البسيط

1.3.7.تعد الأسواط Flagella وسيلة الحركة في كثير من أنواع البكتيريا وقد يوجد عليها سوط واحد في أحد قطبي الخلية أو سوط في كل قطب أو مجموعة من الأسواط على أحد قطبي الخلية أو كلاهما أو قد تحيط الاسواط بجسم الخلية.

1.3.8. تنتشر على سطح خلايا أنواع من البكتيريا سالبة الجرام تراكيب تسمى الشعيرات (الأهداب) Pili وهي مشابهة للأسواط، إلا أنها أقصر، ومن وظائفها أنها تساعد البكتيريا في الإلتصاق بالسطح، وهناك نوع منها يسمى الشعيرات الجنسية يساعد على نقل المواد الوراثية أثناء عملية الإقتران.

1.3.9.البكتيريا تكون شفافة ولكي تتم رؤية خلايا البكتيريا بوضوح تحت الميكروسكوب فنحتاج إلى إستعمال الصبغات المختلفة.

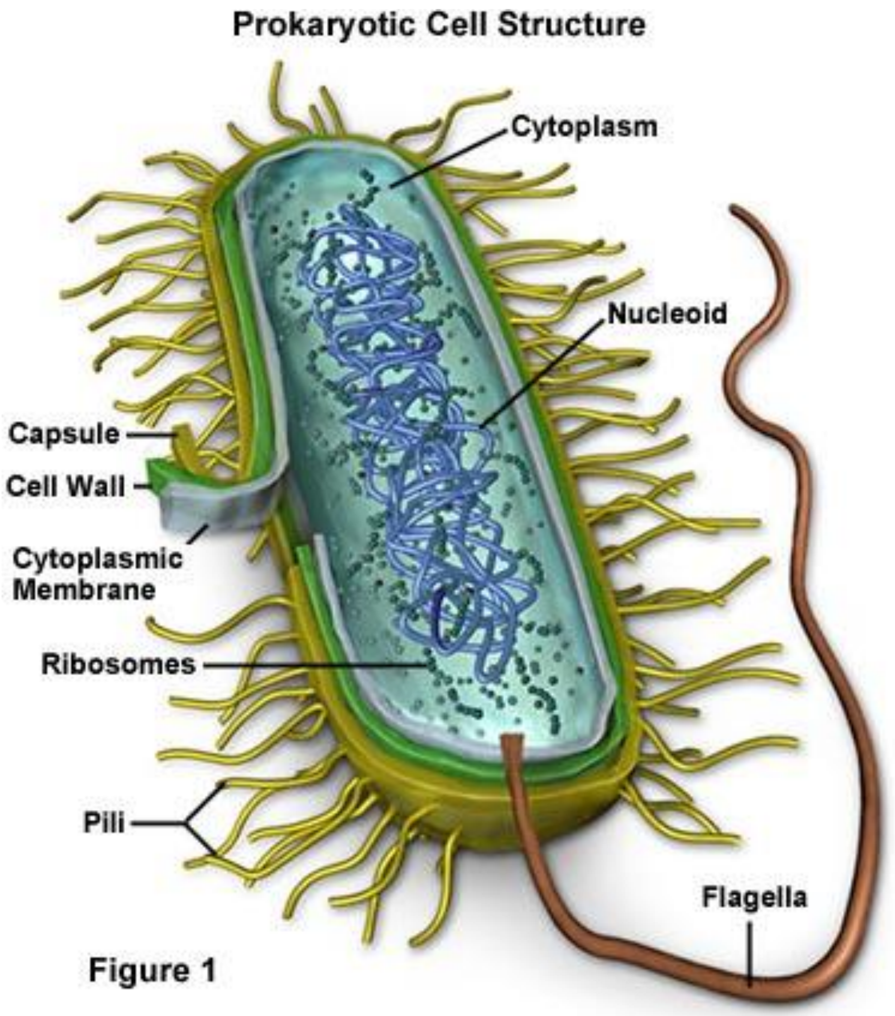
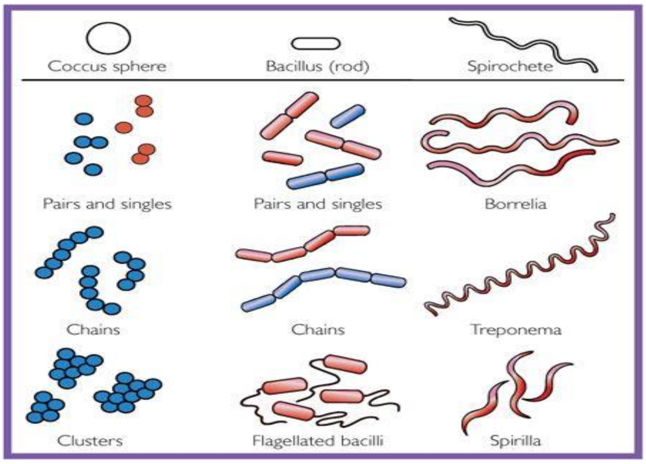

Prokaryotic Cell Structure
Cytoplasm
Nucleoid
Capsule
Cell Wall
Cytoplasmic Membrane
Ribosomes
Pili
Flagella

Figure 1

1.4. أشكال البكتيريا

– **الاشكال الرئيسية للبكتيريا هى ثلاثة :** الشكل العصوى والشكل الكروى والشكل الواوى (الحلزونى).

– والاشكال الكروية إما أن تكون مفردة أو مزدوجة أو رباعية أو تترتب في مجموعات مثل عنقود العنب أو السبحة . كما هو موضح



1.5. تكاثر ونمو البكتيريا:

تتكاثر البكتيريا بالإنشطار الثنائي (1، 2، 4، 8، 16، 32 ،...)

– تتفاوت سرعة الإنقسام من نوع إلى آخر.

– تتراوح المدة اللازمة لإنقسام الخلية الواحدة بين 20 دقيقة وأكثر من يوم واحد

يمر نمو الخلايا بمراحل يطلق عليها أطوار النمو وهي:

1.5.1. طور الركود Lag phase:

لا تنقسم فيه الخلية ولكنها تكون تراكيبها وعضياتها والمواد اللازمة للانقسام.

1.5.2. طور النمو Log (exponential) phase:

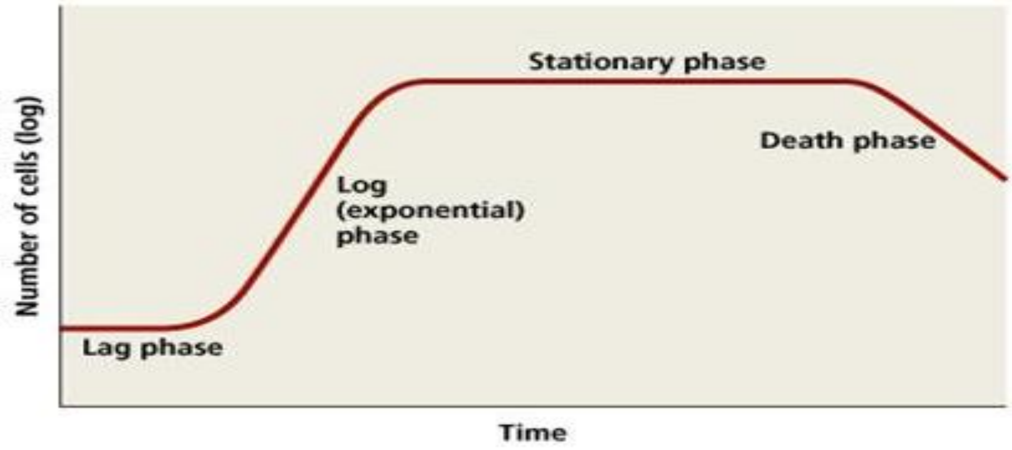
(الطور اللوغاريتمي) وتكون سرعة إنقسام الخلايا بنسب هندسية متصاعدة.

1.5.3. طور التوقف Stationary phase:

أو الثبات و فيه يكون "عدد الخلايا الناتجة = عدد الخلايا الميتة" ، ويتميز هذا الطور بأنه الطور الذي تنتج فيه البكتريا المنتجة لمركباتها الثانوية تلك المركبات مثل المضادات الحيوية، ويحدث فيه التجرثم لبعض الأنواع .

1.5.4. طور الهبوط أو الموت Death phase:

تزداد نسبة الخلايا الميتة (وتكون سرعة الموت لوغاريتمية أيضاً).



منحنى النمو Growth Curve

1.6. الظروف الملائمة لتكاثر البكتيريا ونموها

تتميز البكتيريا بمقدرتها على التأقلم حسب الظروف المحيطة وتعتمد البكتيريا قدرتها فى النمو على بعض العوامل الفيزيقية والكيميائية مثل:

1.6.1. الغذاء :

تقسم البكتيريا حسب طريقة تغذيتها إلى ذاتية التغذية: Autotroph او غير ذاتية التغذية Heterotroph ، وكلا النوعيان يقوم بتجهيز إحتياجاته الغذائية اما عن الطريق الضوء او عن طريق العناصر والمركبات الكيميائية كما هو موضح بالجدول التالى

Nutritional type	Energy source	Carbon source	Examples
Photo auto trophs	Light	CO2	Cyanobacretia Some purple and green bacteria
Photo hetero trophs	Light	Organic compounds	Some purple and green bacteria
Chemo auto trophs	Inorganic compounds (H2,NH3,NO2,H2S)	CO2	Afew bacteria and many Archaea
Chemo hetero trohps (heterotrophs)	Organic compounds	Organic compounds	most bacteria and some Archaea

1.6.2. الرطوبة Moisture (النشاط المائى :Water activity)

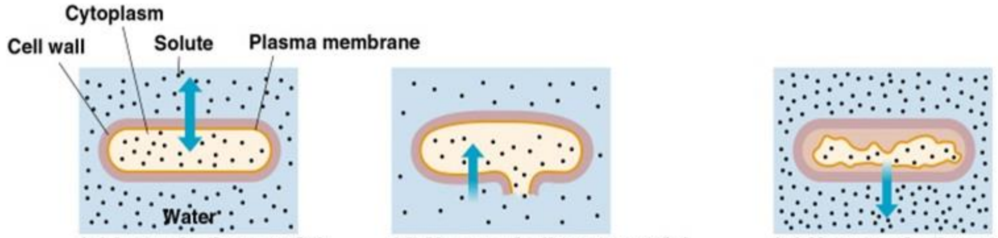
يعد الماء وسطاً مناسباً لنشاط البكتيريا وتكاثرها حيث يشكل 80% من كتلتها الخلوية لانها تتغذي بالإنتشار الغشائي فيذيب الماء المواد الغذائية اللازمة لها ويحمل نواتج الآيض لخارج الخلية، ويجب المحافظة على

رطوبة البرتوبلازم, فالماء يمثل 70-90% من مكونات الخلية ولذلك فإن عملية التجفيف تساعد في حفظ الغذاء حيث لا تتمكن البكتيريا من التكاثر بعيداً عن الرطوبة.

1.6.3. الضغط الأسموزي: Osmotic pressure

يؤثر الضغط الأسموزي على مقدار استفادة الكائن من الرطوبة وتحرك المحاليل لداخل الخلية وخارجها، فالضغط الأسموزي له تأثير مباشر على سرعة واتجاه تيار الماء من الوسط الخارجي والكائن الدقيق، فإذا أرتفع الضغط الأسموزى للوسط الذي تعيش فيه البكتيريا فإن عددا قليلا من أنواع البكتيريا هو الذي يستطيع مقاومة تلك الضغوط الأسموزية العالية وتواصل نشاطها أما أغلب البكتريا فإن نموها يقل أو يتوقف.

1.6.4. درجة الحرارة:



(c) Isotonic (isosmotic) solution— no net movement of water

(d) Hypotonic (hypoosmotic) solution—water moves into the cell and may cause the cell to burst if the wall is weak or damaged (osmotic lysis)

(e) Hypertonic (hyperosmotic) solution— water moves out of the cell, causing its cytoplasm to shrink (plasmolysis)

البكتريا لها ثلاث درجات حرارة : (درجة مثلى يكون نموها افضل ما يكون، ودرجة صغرى تحد من نمو البكتيريا ونشاطها دون أن تقتلها، ودرجة عظمى لا تستطيع النمو اعلي منها حيث تؤثر في الأنزيمات والحمض النووي DNA والريبوسومات فتحد من نشاطها وتقتلها)

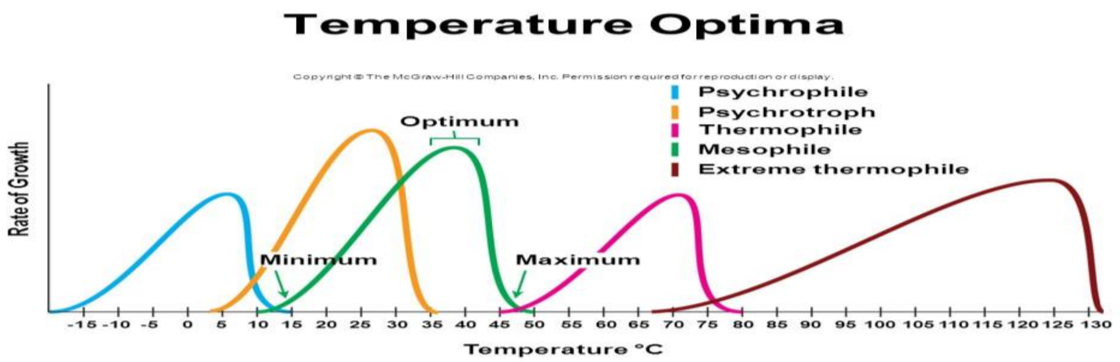
وتقسم البكتريا على حسب درجة الحرارة إلى :

1- **بكتريا محبة للبرودة Psychrophile** : تنمو عند صفر درجة مئوية

2- **بكتريا متعادلة Mesophiles**: افضل نمو لها عند 37

3- **بكتريا محبه للحرارة Thermohpilic**: تنمو من 45 إلى 70 درجة مئوية .

4- **شديدة التحمل للحرارة Hyperthermophile**: تتحمل حرارة قد تصل إلى122درجة.



1.6.5. الرقم الهيدروجيني: (pH)

كل مجموعة من الكائنات لها حدود معينة من الأس الهيدروجينى في نموها ولها حد أمثل لكي تعطي أقصي نمو لها. لذلك يجب ضبط pH للبيئة، تنمو غالبية أنواع البكتيريا في الوسط المتعادل .

1.6.6. الأكسجين:

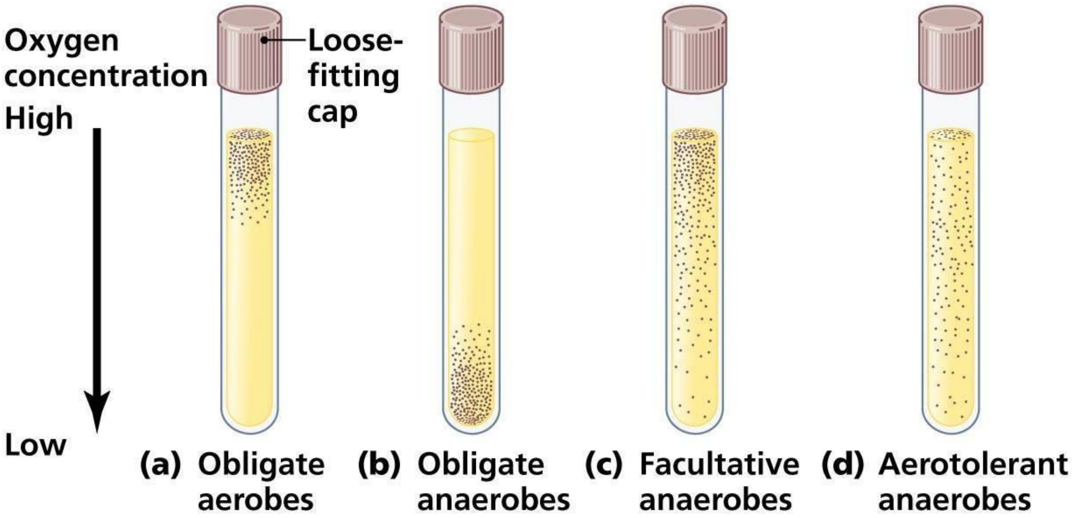
تصنف البكتريا على حسب حاجتها للأكسجين إلى :

1- **بكتريا هوائية Obligate aerobes**: تحتاج لأكسجين لنموها.

2- **بكتريا لا هوائية Obligate anaerobes**: بكتريا تعيش بواسطة التخمر أو التنفس اللاهوائى لذا لا تحتاج الأكسجين بل ويصبح الأكسجين كمادة سامة لها

3- **بكتريا اختيارية لا هوائية Faculative anaerobes**: هي في الأصل بكتريا هوائية يمكنها التكيف مع الظروف اللاهوائية.

4- **بكتريا لاهوائية تتحمل وجود الأكسجين Aerotolerant anaerobes**: هي بكتريا تعيش بواسطة التخمر، ولها القدرة على النمو فى وجود الاوكسجين .



1.6.7. الضوء

أغلب أنواع البكتيريا تنشط إذا قل الضوء والعكس صحيح فيما عدا البكتيريا اليخضورية(التى تحتوى على نوع خاص من الكلورفيل البكتيرى) فإن نشاطها يزداد إذا ما زادت شدة الإضاءة .

2. التحاليل البكتريولوجية للمياه

- الهدف الأساسي من الإختبارات الميكروبيولوجية لمياه الشرب هو الوقوف على نوعية المياه والتأكد من خلوها من مسببات الأمراض لتوفير الحماية الصحية للمستهلك.
- الأصل فى مياه الشرب أنها نقية غير ملوثة بالميكروبات الضارة، الا اذا حدث حادث عارض وتلوثت مياه الشرب بمياه الصرف الصحى (مياه المجارى) فتتحول الى مياه غير صالحة للشرب لأن هناك أمراض تنتقل عن طريق المياه الملوثة بسبب وجود ميكروبات معوية مثل التيفود، والباراتيفود، والكوليرا، والدوسنتاريا، والفيروسات المعوية.
- وكل تلك الميكروبات مصدرها فى الاصل المواد البرازية الناتجة من الانسان او الحيوان، لذلك فإن مياه الشرب التى تلوثت بمياه المجارى (الصرف الصحى) تكون خطرة، إذ ربما قد تحتوى على واحد أو أكثر من الميكروبات المرضية، السابق ذكرها.
- ومن المعروف أن أمعاء الإنسان، والحيوانات ذات الدم الحار ، تحتوى على أعداد كبيرة من الميكروبات أغلبها من النوع غير الضار والنافعة للانسان.
- لذلك تم اختيار مجموعات من البكتريا الغير ضارة التى توجد وتعيش فى معدة وامعاء الانسان لتعمل كمؤشر او دليل حيوي Microbial indicator على تلوث هذه المياه بمياه المجاري، إذ تعتبر هذه الميكروبات كاشفات للتلوث لانها تكون مصاحبة للكائنات الضارة لانهم جمعياً من نفس المصدر وهو البراز .
- وتتميز الدلائل الحيوية (كاشفات التلوث) بأن الكشف عنها سهل وميسور لكل انواع المعامل ، كما انها غير ممرضة ولا تضر القائمين بالعمل، ومصدرها برازي، وتوجد دائماً بالمياه الملوثة ، وتعيش بالمياه لمدة أطول من الميكروبات المرضية.

2.1. الصفات العامة للدليل المثالي:

2.1.1. يجب أن تكون هذه الدلائل البكتيرية غير ممرضة لتجنب الإصابة بالعدوى.

2.1.2. يجب وجودها بأعداد عالية في المواد البرازية للإنسان والحيوان.

2.1.3. يجب ألا تتواجد في المياه بصورة طبيعية.

2.1.4. يجب أن تكون قدرة تحملها مشابهة أو أكثر من الميكروبات المرضية المعوية.

2.1.5. يجب أن توجد بأعداد أكبر من الميكروبات المرضية المعوية.

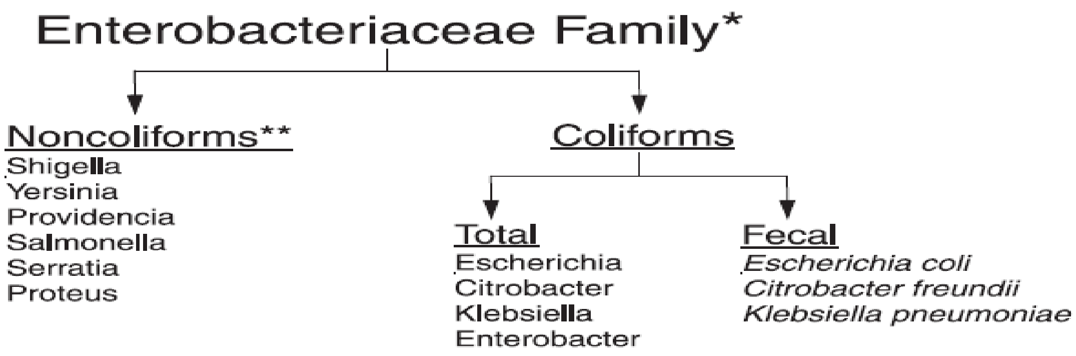
2.1.6. مدي أستجابتها لعمليات المعالجة يجب أن يكون أكثر مقاومة من استجابة الميكروبات المرضية المعوية.

2.1.7. أن يكون من السهل الكشف عنها وعدها بواسطة طرق بسيطة وسريعة وغير مكلفة.

2.1.8. وطبقاً للمواصفة المصرية الدلائل البكتيرية المطلوب فحصها فى المعمل هى :

- العدّ الكلى للبكتريا Total Plate Count
- بكتيريا القولون الكلية Total Coliform
- بكتريا القولون البرازية Fecal Coliform
- بكتريا السبحية البرازية Fecal Streptoccus

والصورة التالية مخطط لعائلة مجموعة البكتيريا المعوية Entrobacteriaceae ومن ضمنها مجموعة بكتيريا القولون الكلية والقولون البرازية التى تستخدم كدلائل ميكروبية يتم الكشف عنها فى المعمل، والتى ان ظهرت فربما يكون هناك احتمال بوجود كائنات ممرضة التى تتبع نفس العائلة كما هو موضح بالرسم.



الجدول التالى يوضح أنواع الأجناس المكتشفة لمجموعة القولون الكلية طبقا لطريقة الكشف:

Pre 1994 Acid and Gas from Lactose	Report 71, 1994 Acid from Lactose	Enzyme-based ß-Galactosidase
Escherichia	*Escherichia*	*Escherichia*
Klebsiella	***Klebsiella***	***Klebsiella***
Enterobacter	***Enterobacter***	***Enterobacter***
Citrobacter	***Citrobacter***	***Citrobacter***
	Yersinia	***Yersinia***
	Serratia	***Serratia***
	Hafnia	***Hafnia***
	Pantoea	***Pantoea***
	Kluyvera	***Kluyvera***
		Cedecea
		Ewingella
		Moellerella
		Leclercia
		Rahnella
		Yokenella

bold type = coliforms which can be present in the environment as well as in human faeces.

bold and underline = coliforms which are considered to be primarily environmental.

2.2. تقسم الدلائل البكتريولوجية طبقاً لدلالاتها إلى:

2.2.1. دلائل كفاءة عمليات المعالجة Process Indicators أو تدل على نوعية المياه بصفة عامة General Indicators:

- عد البكتيريا الهيتروفية (العدّ الكلي البكتيري.) Heterotrophic Plate Count
- بكتريا القولون الكلية. Total coliforms

2.2.2. 2دلائل تدل على التلوث البرازي في المياه Fecal Pollution:

- بكتريا القولون البرازية Fecal Coliforms.
- البكتريا السبحية البرازية fecal streptococci.

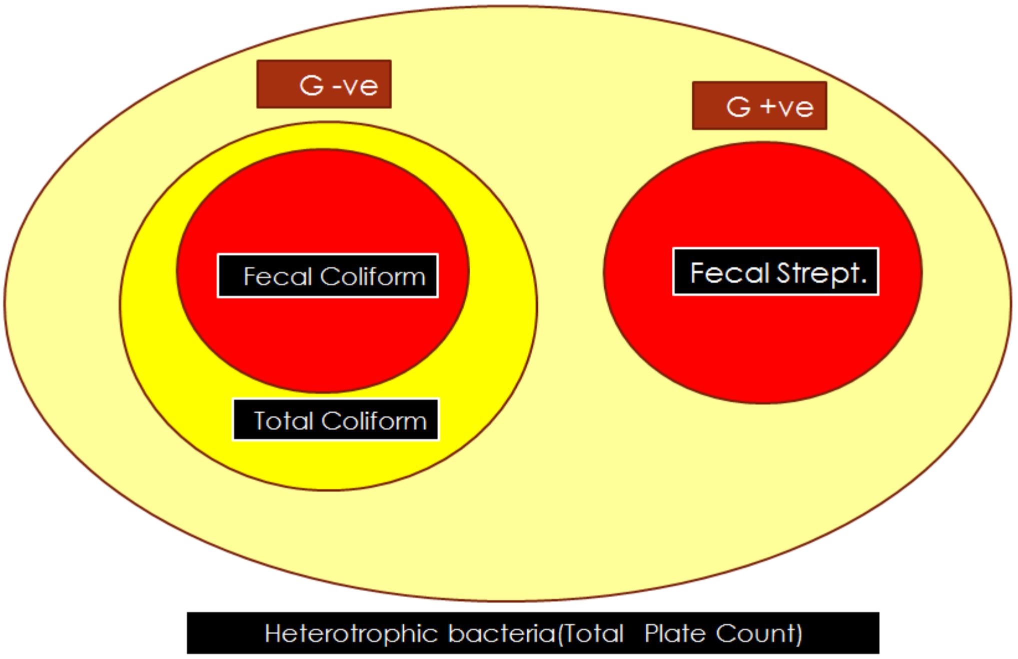
ويتم تحليل المياه طبقاً للمعايير البكترولوجية لمياه الشرب المذكورة بالمواصفات القياسية المصرية، حيث يجب ان نؤكد على ضرورة اجراء كل الاختبارات معاً لتقييم حالة المياه.

لأنه لا نستطيع الاكتفاء باختبار عدَ البكتريا الهتروفية (العدَ الكلى) فقط وهو ليس له مدلول على صحة المياه وصلاحيتها للشرب، ولا حتى الاكتفاء بإجراء اختبار المجموعة القولونية الكلية والبرازية فقط ولكنك بهذا تكون قد اختبرت تواجد الملوثات من نوع واحد فقط وهو البكتريا السالبة لصبغة جرام. لذلك لابد من اضافة اختبار مجموعة المكورات العنقودية لأنها تمثل البكتريا الموجبة لصبغة جرام.

اسم الاختبار	نوع البكتريا المختبرة	الهدف الاساسى منه
عدّ البكتريا الهتروفية Heterotrophic bacteria Count	كل الانواع (السالبة والموجبة لصبغة جرام)	تقدير الحمل الميكروبى لمياه الشرب نظافة شبكات التوزيع
بكتيريا القولون الكلية Total Coliform	السالبة لصبغة جرام G−ve	سلامة شبكات المياه الفيلم الحيوى BIOFILM
بكتريا القولون المحبة للحرارة Thermotolerant Coliform	السالبة لصبغة جرامG−ve	دليل على التلوث البرازى لمياه الشرب
البكتريا المعوية Enterococcus	الموجبة لصبغة جرامG+ve	دليل على التلوث البرازى لمياه الشرب

جدول يوضح الدلائل البكترولوجية لمياه الشرب طبقاً للمواصفة المصرية لمياه الشرب

والشكل التالى يوضح العلاقات بين الاختبارات الاربعة :



3.الاشتراطات الواجب توافرها في معامل التحليل البكتريولوجي

3.1. التهوية:

- يجب ان يكون المعمل خاليا من الأتربة والتيارات الهوائية والتغيرات الحرارية.
- يفضل ان تكون المعامل مكيفة الهواء بطريقة مركزية. وذلك للتقليل من التلوث ومشاكل الرطوبة ولتسهيل العمل تحت ظروف ثابتة.

3.2. المكان المتاح:

- يصمم المعمل ليعمل تحت ظروف تقل فيها الحركة والزوار، وبحيث يحتوي على مكان لتحضير وتعقيم أوساط نمو البكتريا والأدوات الزجاجية والأجهزة ووجود كابينة الامان الحيوى.
- يجهز المعمل بمصدر إضاءة غير ساطعة (مبهرة) قوتها حوالي 1000 شمعة Lux.

3.3. منضدة المعمل:

- يخصص $2م^2$ على الأقل من المنضدة لكل فرد، ومساحة إضافية للتحضير والخدمات.
- تستخدم عادة منضدة مغطاة بصلب مقاوم للصدأ يكون من الاستنلس ستيل، أو بألواح الفورمايكا، او بلاستيك ابوكسى ، أو غيرها من الأسطح الملساء، الغير منفذه وتكون خاملة Inert , ومقاومة للتآكل وبها أقل عدد من الشقوق .
- أبعاد منضدة العمل فى حالة الوقوف هى 90-97 سم ارتفاع و 70 -76 سم عمق، اما أبعاد منضدة العمل فى حالة الجلوس يكون الارتفاع 75-80 سم .

3.4. الجدران والأرضيات:

- تغطى الحوائط بسطح املس دون خدوش يسهل تنظيفه مثل السيراميك، وتغطى الأرضيات بمواد ملساء كأرضيات الفينيل يسهل غسلها.

3.5. تنظيف المعمل:

- ينظف المعمل بطريقة دورية وذلك بغسل المناضد والأرفف والأرضيات والنوافذ ويستخدم محلول تعقيم.

4. أدوات وأجهزة المعمل الميكروبيولوجي Equipment and Instruments

تنبيه هام : اقرأ كتيب تشغيل الجهاز بتروى وفهم ، واتبع تعليمات التشغيل قبل العمل عليه .

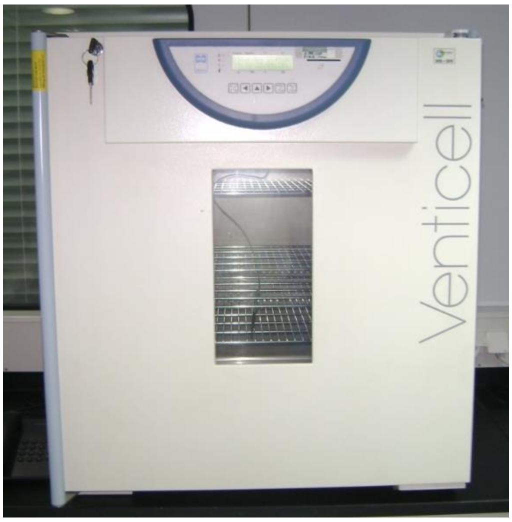
4.1. الحضانات Incubators

- يجب أن توفر الحضانات حرارة متجانسة وثابتة على طول الوقت في جميع الأجزاء والتي لا يجب أن تختلف أكثر من ±0.5 °م.

- تزود الحضانات بأرفف من السلك المفتوح أو ألواح مثقبة بينها مسافات لضمان أنتظام الحرارة خلال الغرفة.

- تترك مسافة 2,5 سم بين الجوانب وصفوف الأطباق أو سلال الأنابيب.
- تأكد أن الحضانة تعطى حرارة التحضين المطلوبة، وأكشف وسجل الحرارة مرتين يوميا (صباحا وبعد الظهر).
- وإذا أستعمل ترمومتر زجاجي، يغمس خزان الزئبق والساق في جليسرين إلى علامة الساق، ولأفضل النتائج يستعمل ترمومتر متصل بمسجل مع نظام إنذار .
- ويجب أن توضع الحضانة في منطقة حرارتها ما بين 16 إلى 27°م.
- لاختبار العد الكلى البكتيرى عند 22°م يجب أن تكون الحضانة مزودة بوحدة تبريد .

4.2. أفران التعقيم بالهواء الساخن Hot Air Sterilizing Ovens



- أستعمل أفران التعقيم بالهواء الساخن ذات السعة المناسبة لحجم العمل حتى لا تكون مزدحمة.
- ويجب أن تكون منتظمة ومتماثلة الحرارة في جميع أجزائها بحيث توفر الدرجة المناسبة للتعقيم (170 ± 10 °م) وتكون مزودة بترمومتر مناسب.
- يختبر الأداء كل شهر بإستخدام المتاح سواء شريط الجراثيم أو معلق الجراثيم

Spore strips or spore suspensions (Bacillus.subtilis)

- وتراقب درجة الحرارة بترمومتر دقيق عند مجال 160–180 °م وتسجل النتائج.
- وتستعمل أشرطة بيان الحرارة Heat–indicating tape لبيان صحة عملية التعقيم لأي مواد تعرض لحرارة التعقيم.
- يجب أن يتم تنظيف الحضانة بشكل روتينى .

4.3. الأوتوكلاف Autoclave

- يستخدم الأوتوكلاف ذى سعة كافية بحيث تتناسب مع حجم العمل اليومي ولمنع الأزدحام داخله.
- ويجب أن يكون مجهز بحيث يعطى حرارة متماثلة في حيز التعقيم (حرارة التعقيم 121 °م : 124 °م)، ومجهز بترمومتر دقيق ومستودع الزئبق الخاص بالترمومتر يجب أن يكون في مستوى خروج العادم Exhaust ليسجل أقل حرارة في غرفة التعقيم.

- ويكون مجهز بمقياس للضغط وصمامات أمان مناسبة ومتصلة مباشرة بمصدر البخار المشبع، ومجهز بفلتر مناسب لإزالة الجسيمات وقطرات الزيت أو متصل مباشرة بمصدر لتوليد البخار.
- وقادر على الوصول إلى درجة الحرارة المطلوبة خلال 30 دقيقة.
- تسجل الأدوات التي يتم تعقيمها، والحرارة، والضغط والزمن لكل دورة, ويستعمل ترمومتر بجهاز تسجيل، وتضبط حرارة التشغيل أسبوعيا بترمومتر.

- يختبر الأداء شهريا بشريط أو معلق من الجراثيم. Spores Bacillus Sterothermophilus
- يستعمل شريط بيان الحرارة لمعرفة المواد التي تم تعقيمها (عن طريق تغير لون الشريط).

4.4. أجهزة العد البصرية Optical Counting Equipment

4.4.1. للأطباق المصبوبة أو المفروض عليها: Pour and spread plates

تنبيه هام : لايتم وضع اى مواد مطهرة مع الاشياء التى يتم اعدامها في الاتوكلاف مثل الكلور حتى لا يتسبب في التأكل..

- يستخدم جهاز لعد المستعمرات من نوع Dark-fields، يوفر 1,5 مرة تكبير طبيعي مع وضوح الرؤية والإضاءة الكافية.

4.4.2. للمرشحات الغشائية Membrane filters:

- يستخدم ميكروسكوب Binocular بقوة تكبير 10 – 15 مرة و يمكن توفير مصدر ضوء فلورسنت بزاوية 60 إلى 80 درجة أعلى المستعمرات، وإستخدام الإضاءة بزاوية منخفضة للمستعمرات الغير ملونة.

4.4.3. أجهزة العدّ والحصر Colony Counter: لا تستخدم عدادات المستعمرات التلقائية

Automatic colony counters عند تحديد العد لأغراض المطابقة Compliance purposes أو عند تعداد الأطباق المصبوبة, التي تحتوى عادة على مستعمرات دقيقة مغمورة في الأوساط الغذائية الشفافة الملونة.

- وعندما تستخدم عدادات المستعمرات التلقائية automatic colony counters يتم معايرة الوحدات عند تركيبها واختبار الأداء باستخدام أساليب العد التقليدية.

4.5. جهاز قياس تركيز أيون الأيدروجين pH Equipment

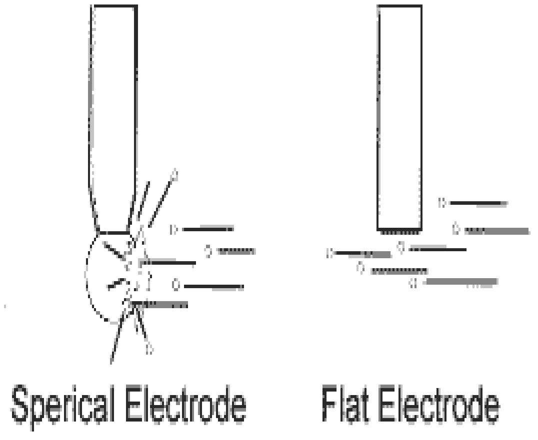
جهاز قياس الأس الأيدروجينى

- أستعمل جهاز كهربي لقياس تركيز أيون الأيدروجين، دقته على الأقل 0,1 وحدة pH لتقدير قيم الـ pH للبيئات الغذائية ويحتوي على تعويض تلقائي لدرجة الحرارة.

- يستخدم القطب المناسب طبقاً لنوع الوسط الغذائى الذى يراد قياسه كالاتى:

- الكترود مسطح (Flat Surface pH Electrode) لتقدير الـ pH لمزارع الآجار الصلبة.

- الكترود مدبب او دائرى (Sperical pH Electrode) لتقدير الـ pH للاوساط السائلة.



أقطاب قياس الأس الأيدروجينى

- يتم عمل تقييس Standardization للجهاز قبل كل سلسلة من الإختبارات بإستخدام محاليل منظمة قياسية (4و 7و 10) وتعوض أو تكافيء الحرارة، ويتم التأكد من ضبط الميل slope المطلوب.
- يكتب على المحاليل المنظمة Standard buffers التي تم فتحها تاريخ الفتح وتضبط شهريا بإستعمال جهاز آخر لقياس pH.
- ويفضل إستخدام pH meter رقمي Digital

تنبيه هام : اترك الاوساط الغذائية حتى تبرد قبل قياسها بالالكترود حتى لا يتلف بسبب الحرارة .

4.6. الموازين Balances

الميزان الإليكترونى والميزان علوي التحميل

- استعمل ميزان حساس Analytical balance له حساسية 1 ملجم .
- يلزم إجراء الخدمة الروتينية والمعايرة سنويا أو أطول حسب تغير الحالة آو حدوث مشاكل وذلك بواسطة فنى من قبل مركز معايرة معتمد.
- نظف الميزان قبل وبعد أي استخدام بإستخدام فرشة ناعمة ويفضل المصنوعة من شعر الجمل.
- نظف كفة الميزان بعد كل إستخدام وتزال بقايا المواد التي تسقط بإستخدام قماش معملي Lab tissue.
- يتم تداول صنج الميزان بإستخدام ملقط ذا طرف بلاستيكي ويجب أستبعاد الصنج التي حدث فيها تآكل أو صدأ, ويتم معايرة الصنج شهريا بإستخدام صنج قياسية.
- توضع الموازين على الأسطح الصلبة لتجنب الإهتزازات وفي المواقع التي تنخفض فيها مستويات الرطوبة.

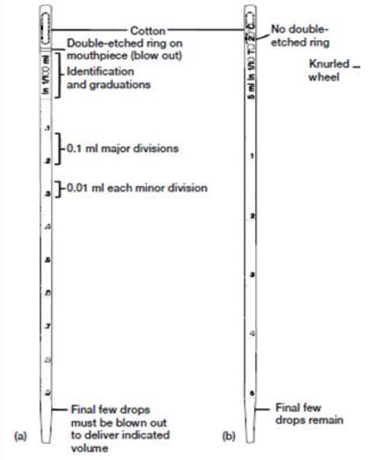
4.7. أدوات تحضير البيئات Media preparation Utensils

- أستعمل زجاج بوروسليكات أو أي أوعية أخرى غير متآكلة مثل الاستينلس ستيل.

- أستخدم الأدوات الزجاجية، النظيفة الخالية من البقايا، مثل الآجار الجاف أو أي مواد أخرى غريبة يمكن أن تلوث الوسط الغذائى.

4.8. الماصات و الماصات الدقيقة والمخابير المدرجة:

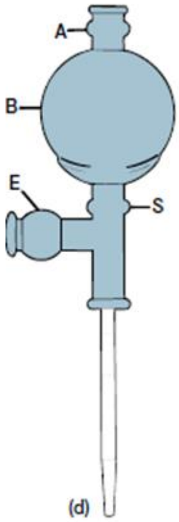
(Pipets, Micropipets, and Graduated Cylinders



صورة توضح انواع مختلفة من الماصات (Micropipets)

- استعمل ماصات بأي حجم مناسب، بحيث يمكنها أن تمدك بالحجم المطلوب بدقة وبسرعة.
- خطأ التدريج لا يجب أن يزيد عن 2,5 %.
- استعمل الماصات ذات التدريج الثابت وغير مكسورة النهاية.

- لا تستخدم الماصة عن طريق الفم، واستخدم مالئ الماصات.



بعض وسائل ملء وتفريغ الماصات

- تستخدم نهايات معقمة sterile tips محددة للماصات الدقيقة والإستخدام المقصود بها.

4.9. علب الماصات Pipette Cans

- استعمل علب من الألومنيوم أو الاستنلس ستيل، قطرها من 5 الى 7,5 سم, اسطوانية أو مستديرة وطولها حوالي 40 سم.

- وإذا كانت هذه غير متاحة، لف الماصات في ورق منفردة وأستعمل نوعية جيدة من الورق (sulfate pulp (kraft) paper) لمنع الشياط أثناء التعقيم.

- ولا تستعمل علب نحاسية أو من سبائك النحاس كحاويات للماصات.

4.10. الثلاجات Refrigerators

- استعمل ثلاجة توفر درجة حرارة بين 2 – 8 درجة مئوية لتخزين البيئات، والعينات، والأدلة وغيرها.

- لا تحفظ المذيبات المتطايرة، في الثلاجة مع البيئات.

- ربما تسبب الثلاجات من نوع Frost free جفاف زائد للبيئات عند تخزينها لمدة أطول من أسبوع ويجب ألا تستخدم إذا حدث ذلك.

- وتسجل درجة الحرارة يوميا وتنظف الثلاجة شهريا، ويصنف ويكتب التاريخ على المواد المخزنة في الثلاجة.

- ويسال الثلج المتكون في الثلاجة كلما أحتاج الأمر وتخلص من المواد المخزنة التي تخطت فترة التخزين .

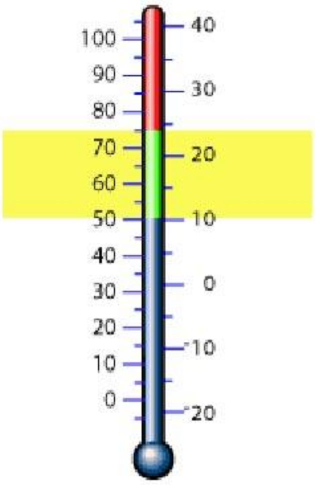
4.11. الفريزر Freezer

- وسيتم تحديد مدى درجة حرارة الفريزر بواسطة الإحتياجات التحليلية ، على سبيل المثال، لحفظ السلالات البكتيرية.
- قد يكون مدى فريزر المختبر القياسي من (–10 إلى –20 درجة مئوية ± 5 °م) أو إلى درجة حرارة منخفضة للغاية مثل (–70 إلى –90 °م).
- تراقب درجة حرارة هذه الوحدات, تسجل الحرارة يوميا, ومن الأفضل إستخدام ترمومتر بمسجل مع نظام إنذار Alarm.
- ويصنف ويكتب التاريخ على المواد المخزنة,
- ويتم التخلص من المواد التي تخطت فترة التخزين.

4.12.وسائل مراقبة وتسجيل الحرارة Temperature–Monitoring Device

- تستعمل ترمومترات زجاجية أو معدنية مدرجة إلي 0,5 °م لمراقبة الحضانات والثلاجات.

Data Logger



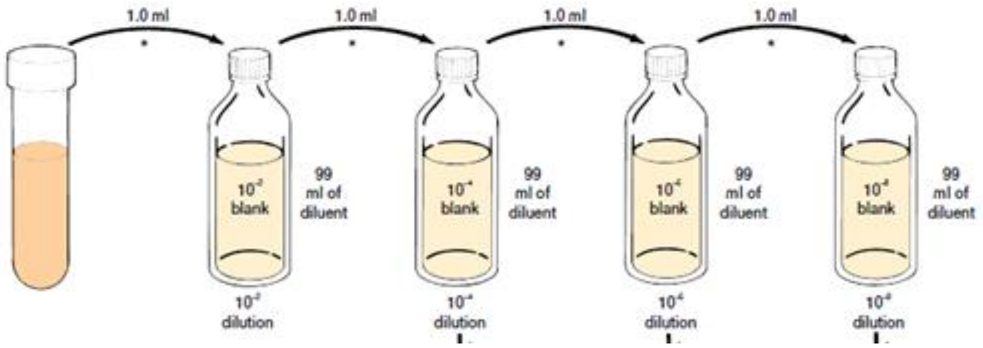
ترمومتر

- تستعمل ترمومترات تدريجها 0,1 °م للحضانات التي تعمل على درجة أعلى من 40 °م تضبط دقة وسائل مراقبة وتسجيل الحرارة سنويا بإستعمال ترمومتر معتمد

National Institute of Standards and Technology (NIST).

- وعندما يكون ممكنا، وصل الحضانات وحمامات المياه Water Bathes بمسجل لدرجة الحرارة يعمل بإستمرار لتسجيل الحرارة تلقائيا Data Logger.

4.13.زجاجيات أو أنابيب التخفيف Dilution Bottles

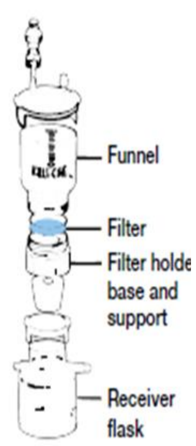


- أستعمل زجاجات أو أنابيب من زجاج مقاوم، يفضل البوروسليكات تغلق بغطاء زجاجي مسنفر أو غطاء قلاووظ مزود ببطانة لا ينتج عنها بالتعقيم مركبات سامة أو معوقة لنمو البكتريا.
- لا تستعمل سدادات القطن.
- يجب أن تكون مستويات التدريج على جدران أنابيب التخفيف غير قابلة للمحو, وتأكد من دقة التدريج بالمستوى المطلوب.
- يمكن إستعمال الأدوات البلاستيكية من مواد غير سامة وبحجم مناسب على أساس قابليتها للتعقيم الجيد.
- تستبعد أي زجاجيات بها شروخ أو خربشة.

4.14.أطباق بترى Petri Dishes

- أستعمل للعد البكتيري أطباق بتري زجاجية أو بلاستيكية (100 x 15 مم) أو (20x150
- استعمل أطباق قاعها خال من الفقاعات والخدوش ويكون مستو تماما وبالتالي تكون البيئة متماثلة السمك خلال الطبق.
- يستعمل في حالة المرشحات الغشائية أطباق بلاستيكية أو زجاجية (60 X 15 مم) ذات غطاء حر أو ذات غطاء محكم (50 X 12 مم).
- عقم الأطباق الزجاجية وأحتفظ بها في علب معدنية (ألومنيوم أو استنلس ستيل ولكن ليست نحاسية) ، أو لفها في ورق كرافت (Kraft) قبل التعقيم.
- يفضل استعمال الأطباق البلاستيكية المعقمة.

4.15.جهاز الترشيح الغشائي Membrane filtration equipment



جهاز الترشيح الغشائي

- استعمل قمع ترشيح وحامل المرشح مصنوع من ستانلس ستيل الغير ملحوم، أو الزجاج، أو بلاستيك القابل للتعقيم في الأوتوكلاف ، ولا يسرب وغير معرض للتآكل.
- يمكن أستعمال أجهزة خارج المعمل Field laboratory kits,

- ويستخدم في المعمل أجهزة الترشيح والطرق القياسية.
- يركب الجهاز قبل الإستعمال، ويختبر للتسرب, وتستبعد الوحدات إذا خدش السطح الداخلي. وتغسل ويشطف الجهاز جيدا بعد الإستخدام، ويلف الجهاز في ورق كرافت غير سام أو في ورق ألومنيوم أو بوضع في وعاء غير متآكل ويعقم في الأوتوكلاف.

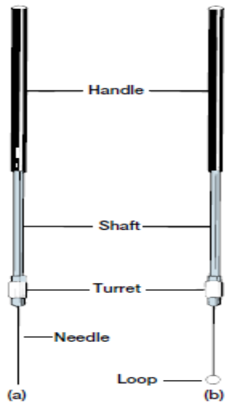
4.16.أنابيب التخمر و الدراهم Fermentation Tubes and Vials

- أستعمل أنابيب التخمر من أي نوع تتناسب مع حجم الوسط الغذائى والعينة المضافة.
- عند أستعمال أنابيب للإختبار ، ضع بالأنبوبة الكبيرة أنبوبة صغيرة مقلوبة (Durham tube or vial).
- ويجب أن تكون الأنبوبة الصغيرة مملوءة تماما بالوسط الغذائى، وتكون مغمورة جزئيا في البيئة، وبحجم كاف يسمح بإدراك تكون فقاعات غاز ولو بحجم بسيط.

4.17.معدات التلقيح Inoculating Equipment

- استعمل لوب من السلك يتحمل الحرارة من سبيكة نيكل كروم أو بلاتين للتعقيم باللهب.

- استعمل لوب ذات قطر 3 مم على الأقل.



Microbiological Transfer Instruments.
(a) Inoculating needle, and
(b) Inoculating loop.

- يمكن استعمال ناقل من الخشب الصلب أو البلاستيك Hardwood or plastic applicator بحيث يستعمل مرة واحدة, قطره (0,2 – 0,3 سم) , و أطول من الأنبوبة على الأقل بمقدار 2.5 سم.
- وتعقم النواقل الخشبية بالحرارة الجافة, وتعقم النواقل البلاستيكية بالأوتوكلاف وتخزن في أوعية من الزجاج أو أي مادة أخرى ليس لها تأثير سام.
- وتوجد لوب بلاستيكية معقمة ومعبأة مسبقا للأستخدام مرة واحدة.

4.18.زجاجات العينات Sample Bottles

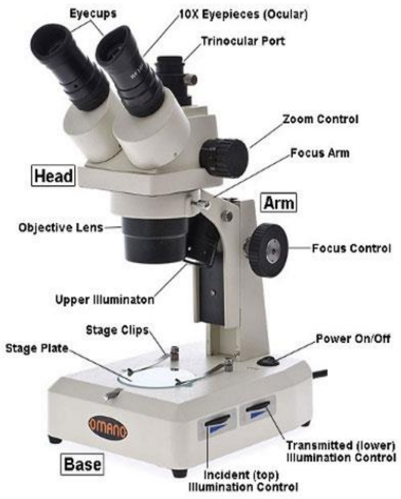
- استعمل لعينات التحليل البكتريولوجى زجاجات معقمة من الزجاج أو البلاستيك بحجم وشكل مناسب.
- استعمل الزجاجات التي يمكن أن تستوعب حجم كاف من العينة لإجراء جميع الاختبارات التي من المفروض إجرائها مع ترك فراغ من الهواء بالزجاجة عند ملئها .
- الزجاجة تسمح بالغسيل الجيد، وتحافظ على العينة غير ملوثة حتى استكمال الإختبارات.

- يفضل استعمال الأوعية البلاستيكية، ذات الحجم المناسب واسعة الفوهة، والمصنوعة من مواد غير سامة مثل البولي بروبلين والممكن تكرار تعقيمها.
- متوافر تجاريا أكياس البلاستيك سابقة التعقيم، مع أو بدون مادة نازعة للكلور (صوديوم ثايو سليفات Sodium thiosulfate)، وربما تستعمل.
- تحد الأوعية البلاستيكية من إمكانية الكسر خلال النقل وهي كذلك خفيفة الوزن.
- ربما تستعمل الأغطية البلاستيكية أو المعدنية ذات القلاووظ والبطانة على زجاجات العينات على اعتبار أنها لا تنتج أي مركبات سامة بالتعقيم.

4.19.الميكروسكوبات Microscopes

- تعتمد خصائص الميكروسكوبات مثل التكبير ومكونات الإضاءة على احتياجات المعمل.
- إن معظم معامل الميكروبيولوجي الأساسية بها ميكروسكوب مركب ضوئي bright field.

- يجب أن يتم التحقق من قبل الشركة المصنعة من معايرة ميكرومتر مسرح الميكروسكوب Stage micrometer calibration وكذلك جودة العدسة و بؤرة التركيز .
- أتبع توصيات الشركة الصانعة لتعديل الإضاءة و تركيز البؤرة للعدسات العينية، وتحقق من المواءمة بشكل روتيني.



- اتبع Kohler illumination procedures لكل هدف من الأهداف المستخدمة.
- ينظف جسم الميكروسكوب فضلا عن العدسات بعد كل استخدام.
- يستخدم زيت الغمر الموصى به من قبل الشركة المصنعة لعدسات الغمر في الزيت فقط.
- ينفخ الغبار بإستخدام الهواء المضغوط أو لمبة المطاط, ولا تنفخ على العدسات.
- أستخدم فقط (Kimwipes tissues) حتى تكون آمنة على العدسات ومحاليل التنظيف المصممة للميكروسكوبات.
- يتم تغطية الميكروسكوب عندما لا تكون قيد الإستخدام و يخزن في المناطق حيث درجات الحرارة والرطوبة منخفضة بإستمرار .
- بالنسبة لبعض الميكروسكوبات، على سبيل المثال، الميكروسكوبات الفلورسنت fluorescent microscopes، سجل مرات إستخدام المصباح و الوقت الفني لحساب فترة نصف العمر للمبة .

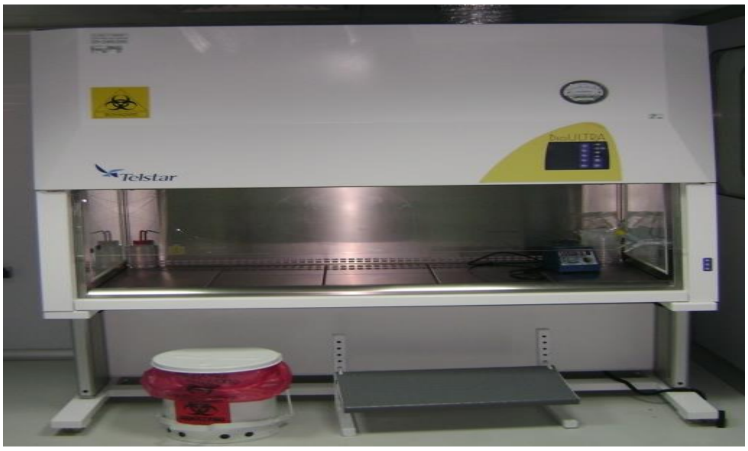
- وتراقب لمبة الميكروسكوب بمقياس للضوء وتستبدل عند حدوث فقد محسوس في إشعاعها, ويسجل إستعمال اللمبة، لتحديد الكفاءة.

4.20.كابينة الهواء المتدفق/ Laminar Air Flow

- الهدف من وحدات التدفق Laminar–flow هو حماية العينة فقط من التلوث .
- في وحدات التدفق Laminar–flow يتدفق الهواء إلى الخارج و يهب الهواء المعقم في إتجاه المشغل.

4.21.كابينة الأمان الحيوي Biological Safety Cabinets

- تستخدم فى التعامل مع السلالات البكترية والعينات الملوثة.
- تصنف كابينة الأمان البيولوجية وفقا لدرجة الحماية لكل من العاملين والنشاط لميكروبيولوجي والبيئة.



- تعقم جميع الوحدات بعد كل استخدام.

- وتعرض كل تشغيلة لأطباق من الآجار TSA agar للهواء المناسب من الكابينة، وتحضن الأطباق عند 35 °م لمدة 48 ساعة ويختبر التلوث (لا نمو على البيئة إذا كانت الكابينة تعمل جيدا).

4.22.لمبات الأشعة الفوق بنفسجية Ultraviolet Lights

- يمكن أستخدام لمبات الأشعة الفوق بنفسجية (254-nm) UV lights للأغراض الصحية ولتقليل تلوث الحامض النووي.
- وتستخدم لمبات الأشعة الفوق بنفسجية طويلة الموجات Long-wave UV lights (365-366-nm) لأكتشاف الوهج الفلوروسينتى للطرق الأنزيمية.
- تفك الوحدة شهريا وتنظف اللمبات بإستعمال قطعة قماش مبللة بكحول الإيثانول تركيز 70%, وتختبر اللمبة كل 3 شهور بجهاز قياس الأشعة الفوق بنفسجية, وتستبدل إذا كانت تشع أقل من 70% من أصل قوتها أو إذا عرضت لها مياه ذات محتوى من الكائنات الدقيقة يتراوح بين 200 – 300 مستعمرة ولم يتم خفضها بواقع 99% خلال دقيقتين من التعرض للأشعة.

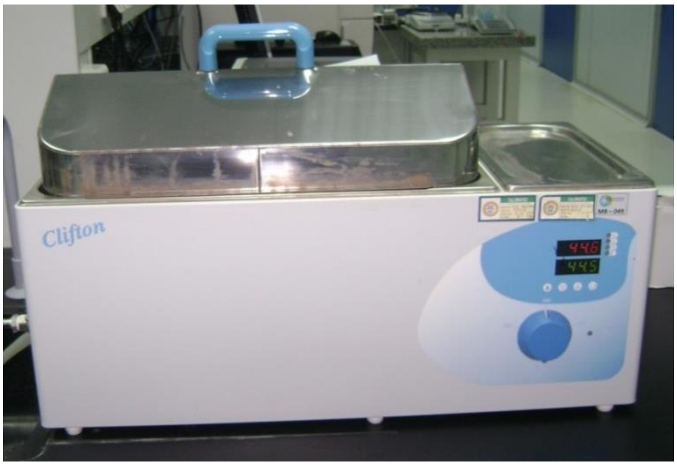
تحذير: على الرغم أن الأشعة فوق البنفسجية ذات الموجات القصيرة (254 نانومتر) معروف أنها أكثر خطورة من تلك ذات الموجات الطويلة (365 نانومتر)، إلا أن كلا النوعين يمكن أن يضر العين والجلد وهى مسرطنه قوية.

- احم عينيك والجلد من التعرض للأشعة الفوق بنفسجية.

4.23.وسائل توزيع البيئات Media and Solution Dispensers

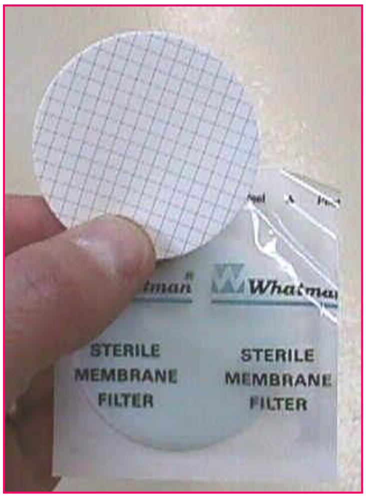
- تضبط دقة الحجوم الموزعة بوحدة التوزيع بإستخدام مخبار مدرج Class A مع كل بداية لتغيير الحجوم ودوريا خلال العمل الطويل.
- وإذا كانت الوحدة تستخدم أكثر من مرة خلال اليوم، يضخ حجم كبير من المياه Reagent grade خلال الموزع للشطف.
- ويتم إصلاح التسريبات Leaks والوصلات الغير محكمة أو ذات الأداء السيئ مباشرة.
- ومع نهاية العمل اليومي، يتم فك الجهاز إلى أجزاء، ويغسل، ويشطف بمياه من نوعية Reagent water ويجفف, وتشحم Lubricate الأجزاء طبقا لتعليمات المصنع أو على الأقل مرة كل شهر.

4.24.حضانة الحمام المائي Water bath incubator



- يتم التأكد من أن حضانة الحمام المائي تعطى حرارة الإختبارات عند درجة 35 ± 0,5°م أو 44,5 ± 0,2 °م. ويحتفظ بترمومتر مناسب مغموس في الحمام، وتراقب وتسجل الحرارة يوميا (صباحا وبعد الظهر) ويمكن أستعمال ترمومتر متصل بمسجل مع نظام إنذار.
- ويستعمل فقط حوامل أنابيب المصنعة من معدن مغطى بالبلاستيك، أوالاستنلس ستيل، أو أي مواد مقاومة للتآكل والصدأ. ويفضل الحمام المائي ذو الغطاء الجمالونى. وينظف الحمام المائي كلما أحتاج الأمر.

4.25.المرشحات الغشائية والوسائد Membrane filters and pads



يجب أن تتوافر في المرشحات الغشائية والوسائد المستخدمة في تحليل المياه الإشتراطات التالية:

- قطر المرشح (الفلتر) 47 مم، وقطر الثقوب 0,45 ميكرون, ويجب أن تكون الثقوب على الأقل 70 % من مساحة المرشح.
- وعندما تطفو المرشحات على Reagent water ، تنتشر المياه بإنتظام خلال المرشحات خلال 15 ثانية بدون مناطق جافة على المرشحات.
- يجب أن تكون معدلات الإنسياب Flow rates خلال المرشحات على الأقل 55 مل/الدقيقة/سم^{٣} عند 25 °م والضغط التفاضلي Differential pressure يعادل 93 KPa.
- يجب ألا يكون للمرشحات تأثير سام، وتكون خالية من المواد التي تمنع أو تشجع النمو، وخالية أيضا من المواد التي تتداخل بطريقة مباشرة أو غير مباشرة مع نظم الدلائل البكتيرية الموجودة في البيئات؛ ويكون الحبر المستخدم في تقسيم الفلتر غير سام. ويجب أن يكون المتوسط الحسابي لنسبة الأعداد البكتيرية التي تظهر على المرشحات 90 % على الأقل من المتوسط الحسابي للعدد على خمسة أطباق معدة بطريقة الفرد السطحي وبإستعمال نفس الحجم من العينة وبيئة الآجار.

- أن تحجز المرشحات الكائنات من 100 مل من معلق بكتيريا Serratia marcesens يحتوى على 310 خلية.
- ألا يزيد المستخلص المائي للمرشح عن 2.5 % بعد غليان المرشح في 100 ملل ماء لمدة 20 دقيقة، ويجفف، ويبرد، ويصل إلى وزن ثابت.
- قطر الوسادة الماصة Absorbent pad 47 مم، والسمك 0,8 مم، وقدرة الامتصاص 2 ± 0,2 مل من مرق الأندو Endo broth.
- تخرج الوسائد Pads أقل من 1 ملجم من الحموضة الكلية مقدرة على صورة كربونات كالسيوم $CaCO_3$ عندما تعادل بإستخدام 0,02N من الصودا الكاوية NaOH مع الفينول فيثالين – Phenolphthalein.
- إذا كان المرشح والوسادة الماصة غير معقمة يجب أن لا تتحلل بالتعقيم عند 121 °م لمدة 10 دقائق. أكد التعقيم بغياب النمو عند وضع المرشح والوسادة مشبعة بمرق أو آجار مستخلص التربتون جلوكوز Tryptone glucose extract والتحضين على 35 °م لمدة 24 ساعة.

4.26.جهاز التقطير Water Still

- تنتج أجهزة التقطير مياه من الدرجة الجيدة والتي تتدنى خواصها ببطيء مع الوقت بحدوث التآكل، الإرتشاح، التلوث Corrosion, leaching, and fouling, ويمكن التحكم في هذه الحالات بالصيانة المناسبة والتنظيف.
- ويزيل التقطير بكفاءة المواد الذائبة ولكن لا يزيل الغازات الذائبة أو المواد العضوية المتطايرة.
- وربما تحتوى المياه المقطرة حديثا على كلور و أمونيا (NH_3), ومع التخزين يحدث إمتصاص لزيادة من الأمونيا وثاني أكسيد الكربون من الهواء.
- وتستعمل مياه ميسرة Softened water كمصدر للمياه للإقلال من تكرار تنظيف جهاز التقطير.
- يتم تفريغ المياه العادمة Drain وتنظيف جهاز التقطير والخزان طبقا لتعليمات المصنع والإستخدام.

4.27. جهاز قياس التوصيل الكهربائيconductivity meter

- يقاس التوصيل الكهربائي للماء باستعمال جهاز قياس التوصيل الكهربائي Electrical Conductivity Meter الذي يرتبط بخلية أو قطب حساس للتوصيل الكهربائي، وتؤخذ القراءات بشكل مباشر من مقياس الجهاز ثم تعدل القيم الناتجة عند درجة حــرارة 25 سليزيس على اعتبار هذه الدرجة قياسية للتوصيل الكهربائي.
- يستفاد من قياس التوصيل الكهربائي لتحديد جودة الماء المقطر حيث يكون الماء الخالي من الأيونات Deionized Water عديم التوصيل للكهربائية إذ تكون قيمته قريبة من الصفر.
- إذا تم تخزين الماء المقطر لعدة أسابيع يمكن ان ترتفع قيمة التوصيلية وتنتج هذه الزيادة عن امتصاص الماء لغاز ثنائي أوكسيد الكربون أو غاز الأمونيا إن وجد في الجو.
- يتم معايرة جهاز الفحص بوساطة محاليل قياسية ذات توصيلية كهربائية معلومة

TABLE 9020:I. KEY QUALITY CONTROL PRACTICES

Item	Action	Frequency
Air in workplace	Monitor bacterial density	Monthly
Autoclave	Check temperature with max-registering device	Weekly
	Check performance with bioindicator	Monthly
	Check timing	Quarterly
Balances	Check zero	Daily before use
	Check accuracy with at least 2 weights	
	Service and recalibrate	Monthly, preferably
Biosafety cabinet	Inspect for airflow	Each use
	Have certified	Annually
Conductivity meter	Calibrate	Monthly
Dilution water bottles	Check sterility, pH, and volume	Each batch or lot
Freezer	Check temperature	Daily
	Defrost	Annually
Glassware	Inspect for cleanliness, chips, and etching	Each use
	Check pH with bromthymol blue	Each wash batch
	Conduct inhibitory residue test	Initial use and new washing procedure (also may be annual)
	Check for autofluorescence if used for testing	Each batch or lot
Hot-air sterilizing oven	Check temperature	Each use
	Check performance with bioindicator	Monthly
Incubator	Check temperature	Twice daily when in use
Media	Check sterility, pH, and appearance	Each batch or lot
	Check performance with + and – culture controls	Each batch or lot
	Check recovery of new vs. old media	Before first use
Media-dispensing apparatus	Check volume dispense accuracy	Each volume change
Membrane filters	Check sterility and properties	Each new lot
Membrane-filtration equipment	Check for leaks and surface scratches	Each use
	Check sterility	Pre- and post-test
	100-mL volume check	Initially
Micropipetters	Check dispense accuracy and precision	Quarterly or more frequently if heavily used
	Calibrate	Annually
Microscope	Clean optics and stage, check alignment	Each use
Multi-well sealer	Check performance	Monthly
pH meter	Standardize with at least 2 buffer solutions	Each use
	Determine slope	Daily
Plate counts	Perform duplicate analyses	Monthly
	Repeat counts	Monthly
Reagent water	Monitor quality	See Table 9020:II
Refrigerator	Check temperature	Daily
Sample bottles	Check sterility	Each batch or lot
	Check dechlorination agent efficiency	Each batch or lot
	Check 100 mL line	Each lot
	Check for autofluorescence if also used for testing	Each lot
Temperature devices:		
Working units	Check accuracy	Annually, preferably semiannually
Reference units	Recertify	Every 5 years
Timer:		
Autoclave	Check timing with stopwatch	Quarterly
Stopwatch	Check against National Time Signal	Annually
UV lamps, short-wave disinfection	Monitor bulb use	Each use
	Test with UV meter or perform plate count check	Quarterly
Weights:		
Working	Check with reference weights	
Reference	Recertify	Annually

5. احتياطات الأمان داخل معمل البكتريولوجى

- ارتداء المعطف النظيف Laboratory coat قبل الدخول للمعمل ويجب غلق المعطف.
- التعامل مع أي عينة بالمختبر مهما كان نوعها على أنها عينة معدية.
- عدم الأكل والشرب أو جلب الأغراض الشخصية داخل المعمل.
- تنظيف طاولة العمل Bench بالمطهر المناسب (commercial ethanol 70%) قبل وبعد العمل.
- يجب إبلاغ مدير المعمل أو من ينوب عنه في حال تلوث او انسكاب أي مادة او كسر أي اداة زجاجية.
- عدم حمل العينات او المزارع الميكروبية خارج المعمل.
- كتابة جميع البيانات التوضيحية على كل عينة.
- الحرص على نظافة وسلامة الاجهزة والمعدات.
- غسل اليدين جيدا بالماء والصابون قبل مغادرة المعمل.
- يجب التعامل مع جميع المواد الكيميائية بحذر والتعامل معها حسب توصيات الصانعين.
- عدم لمس العينين او استخدام الفم اثناء العمل داخل المعمل.
- كافة ادوات المعمل المستخدمة من أنابيب وماصات وشرائح وماصات توضع في الاواني الخاصة بها لحين تنظيفها.
- يجب أن يتم التعامل مع السلالات البكتيرية داخل الكابينة الواقية Safety cabinet مع ارتداء القفازات الواقية.

- في حالة استخدام القفازات الواقية يجب عدم لمس كافة محتويات المختبر حتى لاتتلوث.
- العينات والمزارع الملقحة والقفازات الملوثة المراد التخلص منها توضع في الانية المحددة لذلك حتى يتم اعدامها والتخلص منها بالطرق الصحيحة المناسبة.
- الشعر الطويل يجب أن يربط للخلف لتلافي خطر الاحتراق والتلوث.
- تحرق ابرة التلقيح Loop او الابرة الناقلة قبل وبعد الاستعمال.
- المجهر Microscope يعتبر الصديق المصاحب لك فيجب صيانته والتعامل معه بدقة, ويجب تنظيف العدسات وازالة اثار زيت السيدر وعدم ترك الشريحة على المجهر وغلق المجهر بعد الانتهاء من الفحص.
- عدم رمي المواد التالفة والاوساخ في حوض الغسيل.
- الحرص على اطفاء اللهب بعد الانتهاء من العمل.
- **في حال وقوع مزارع ميكروبية حية، ابق هادئاً واتبع الاتي:**
  - ارتدى قفاز للوقاية اولاً
  - اسكب مادة مطهرة بكمية وافرة فوقها.
  - ضع منشف ورقية او قطعة قطن فوق المادة المسكوبة.
  - ارفع المنشفة او القطن بعد 15 دقيقة وضعها في الوعاء المخصص.

صورة توضح كيفية التصرف فى حالة انكساب السوائل داخل المعمل

6. الغسيل والتعقيم Washing and Sterilization

هناك عمليات هامة يتم اجرءاها فى معمل الميكروبيولوجى قبل تحضير الاوساط الغذائية وزراعة العينات عليها، وهى ما سنتعرف عليها بالتفصيل فى هذا الفصل، وهى كالاتى :

1- غسيل الادوات
2- التعقيم وانواعه

6.1. الغسيل Washing

لاحظ انه لكي يتم إزالة جميع آثار المنظف السائل المستخدم فإنه يلزم شطف الزجاجيات بالماء البارد من 5 إلى 10 مرات بعد غياب فقاعات الصابون

6.1.1. نظف كل الزجاجيات جيدا باستخدام منظف مناسب مع الماء الساخن.

6.1.2. أشطف بماء بارد لإزالة كل آثار من المركبات التى استخدمت فى الغسيل

6.1.3. لكي يتم إزالة جميع آثار المنظف السائل المستخدم فإنه يلزم شطف الزجاجيات بالماء البارد من 5 إلى 10 مرات بعد غياب فقاعات الصابون.

6.1.4. الشطف النهائي يكون بماء مقطر من مرتين إلى 3 مرات.

6.1.5. إذا استعملت غسالة أوتوماتيكية للزجاجيات يتم تركيبها باستخدام مواد سباكة من الاستنلس ستيل أو أى مواد أخرى غير سامة.

6.1.6. لا تستعمل أنابيب نحاسية لادخال المياه للغسالة، استعمل الاستنلس ستيل أو أى مواد غير سامة لنظام الشطف بالماء.

6.1.7. لأن بعض محاليل التنظيف من الصعب إزالتها بالكامل،يتم التأكد من نظافة الزجاجات بقياس pH (لأس السالب لتركيز الهيدروجين) خاصة إذا كانت تنقع فى حامض أو قلوي.

6.1.8. لاختبار عدم وجود بقايا القلوي أو الحامض على الزجاجيات يتم اضافة بضع قطرات من محلول 0.4 % من الكاشف بروموثيمول بلو Bromothymol blue (BTB) أو أى دليل آخر (BTB يكون لونه أزرق – مخضر فى الوسط التعادل)، لتحضير محلول 0.4% من دليل بروموثيمول بلو، أضف 16 ملل من محلول 0.1 عياري من الصودا الكاوية الى 0.1 جرام BTB وخفف إلى 250 ملل بمياه Reagent water.

6.2. التعقيم Sterilization

التعقيم هو العملية التي من خلالها يمكن قتل أو إزالة جميع الكائنات الدقيقة والجراثيم Spores من الأدوات أو الأوساط الغذائية.

اما التطهير هو تقليل الحمل الميكروبي الى الحد الآمن عن طريق إضعاف العمليات الحيوية وايقاف النمو للكائنات الدقيقة الموجودة فى الأدوات أو الأوساط الغذائية ولا تؤثر على الجراثيم Spores.

الأشعة فوق البنفسجية

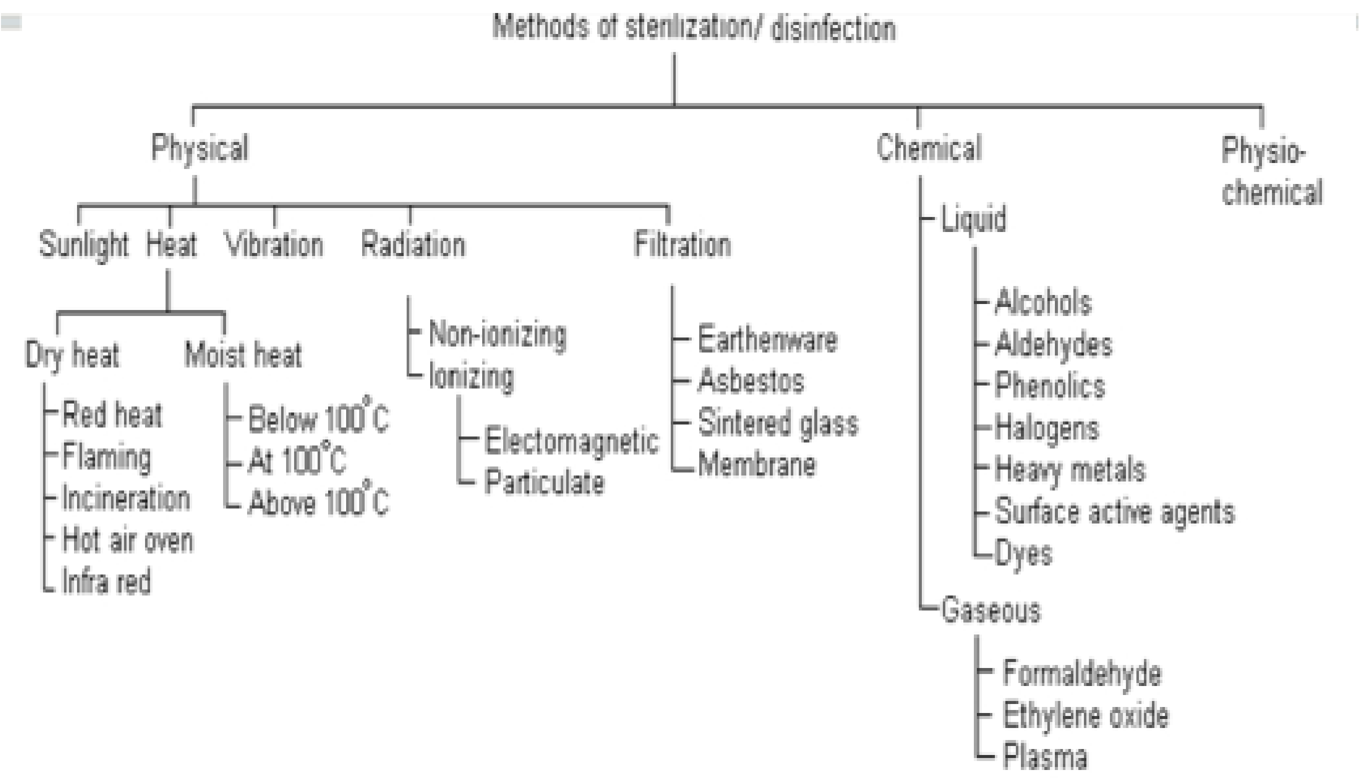
مادة مطهرة

- يوجد طرق للتعقيم هي:

1. طرق فيزيائية: **Physical method**

2. طرق كيميائية **Chemical method**

Different Methods



صورة توضح طرق التعقيم باختصار (للمعرفة فقط)

6.2.1. اولاً : الطرق الفيزيائية: Physical method

6.2.1.1 التسخين:

- **التسخين الجاف**

- **أفران الهواء الساخن:** تستخدم في تعقيم الأدوات الزجاجية مثل أطباق بترى والماصات والدوراق وأنابيب الإختبار وأفضل درجة حرارة هى 170°م لمدة لا تقل عن ساعتين.

- **اللهب المباشر:** بإستخدام لهب بنزن لتعقيم ابر التلقيح المصنوعة من البلاتنيوم.

- **لهب الكحول:** يستخدم في تعقيم الأدوات المصنوعة من Stainless steel مثل الملاقط forcipes حيث يغمر في الآيثانول ثم يعرض للهب.

- **التسخين الرطب:**

هو إستخدام بخار الماء الذي له القدرة على قتل الخلايا الحية عند إستخدامه تحت ضغط عالى حيث أن التسخين بالرطوبة يعمل على تخثر البروتين الخلوي للكائنات الدقيقة .

ويستخدم لتطبيق هذه الطريقة جهاز الأوتوكلاف Autoclave ويستخدم في تعقيم الأوساط الغذائية والمحاليل الملحيه والمحاليل السكرية والأقمشة وإعداد المزارع البكتيرية القديمة قبل التخلص منها.

6.2.1.2 الإشعاع:

بإستخدام أشعة جاما.

6.2.2. <u>الطرق الكيميائية Chemical method</u>

بإستخدام مواد كيميائية:

1. أوكسيد الإيثلين.

> الايثانول 70% والديتول ليســـت من أدوات التعقيم ولكنها من المطهرات.

2. الأوزون.

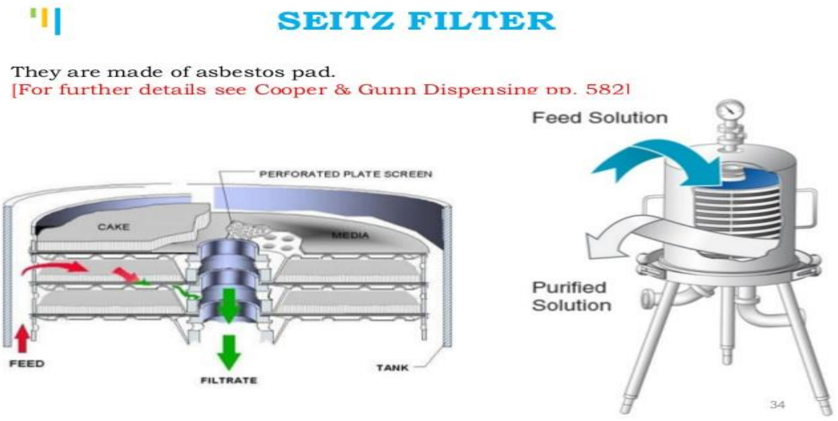
3. الفومالدهيد والجلوتارالدهيد.

6.2.3. <u>الطرق الفيزيائية (ميكانيكيا) Mechanical method</u>:

وهي طريقة تستخدم لإزالة الكائنات الدقيقة من المحاليل دون قتلها **عن طريق الترشيح** بإستخدام أنواع مختلفة من المرشحات مثل:

Filter membrane , Seitz filter , Sintered glass filter

والترشيح الغشائي هو الأكثر إستخداما حيث يحتوى على مرشحات تتراوح أقطارها من 0.01 إلى 4 ميكرون تمنع مرور الكائنات الدقيقة من خلالها.



Seitz filter

Sintered glass filter

6.3. التعقيم المستخدم داخل معامل الميكروبيولوجى in microbiology lab Sterilization

- عقم الأدوات الزجاجية (الماصات، الأطباق، زجاجات العينات) ، والأدوات المعدنية، عند درجة 170 °م، لمدة لا تقل عن ساعتين.
- عقم المحاليل أو البيئات التي لا تعقم في الأوتوكلاف بالترشيح خلال مرشحات قطر ثقوبها 0,22 ميكرون بحيث يستقبل الراشح في إناء معقم.
- عقم زجاجات العينات المصنوعة من البلاستيك في الأوتوكلاف عند 121 °م – 124°م لمدة 20 دقيقة.
- في حالة الأوعية البلاستيكية أفتح الغطاء قليلا ولا تنزعه قبل التعقيم في الأوتوكلاف لمنع تشوهها.
- في حالة اعدام الأدوات المستخدمة في الزرع والتحليل، ولكي يتم التخلص منها بطريقة آمنة فانه يلزم تعقيمها في الأوتوكلاف عند درجة 121 °م – 124°م لمدة 30 دقيقة.
- التعقيم عند 121 °م لمدة 15 دقيقة يقتل الجراثيم، إذا حدث نمو للجراثيم المعالجة بالأوتوكلاف وبعد التحضين في بيئة Trypticase soy broth عند 55 °م لمدة 48 ساعة فإن التعقيم يعتبر غير ناجح.
- استعمل شرائط اختبارالجراثيم Spore Test المتاحة تجاريا أو المعلقات من البكتريا لضبط التعقيم

6.4. حفظ وتخزين العينات Preservation and Storage of samples

- ابدأ الإختبارات الميكروبيولوجية لعينة الماء مباشرة بعد الجمع لمنع التغيرات.
- إذا لم يمكن إجراء ذلك خلال ساعة من الجمع استعمل مبرد الثلج للحفظ خلال النقل إلى المعمل.
- استعمل ناقل خاص لجلب العينات إلى المعمل خلال 6 ساعات.
- اجعل حرارة كل عينات النيل الملوثة و مياه الشرب تحت 10 درجة مئوية خلال فترة النقل وأقصاه 6 ساعات.
- برد هذه العينات في الثلاجة 3±5 سليزيس عند درجة حرارة وعند أستلامها في المعمل يتم تحليلها خلال ساعتين.
- عندما تستدعى الظروف المحلية تأخير وصول العينات عن 6 ساعات، قم بإجراء الإختبارات في الحقل بإستخدام الأجهزة الحقلية أو أستعمل طرق التأخير في التحضين Delayed incubation procedures.
- لا يجب أن يزيد الوقت الذى يمضى بين الجمع والاختبار عن 24 ساعة.
- سجل الوقت وحرارة التخزين لكل العينات مع الأخذ في الأعتبار التفاصيل في تفسير البيانات والنتائج.

7. الأوساط الغذائية Culture media

7.1. الأوساط الغذائية:

- هي المواد الغذائية التي يمكن للكائن الحي أن ينمو فيها أو عليها وهي متباينة في التركيب
- وهي تستعمل لتنمية البكتريا ودراسة تأثير الكائنات الحية على المواد الغذائية في الوسط الغذائي
- وعموما تتكون أي بيئة من مصادر غذائية مثل :
  - **مصدر كربوني** : والتي يحصل عليها من الكربوهيدرات مثل سكر الجلوكوز والمالتوز واللاكتوز
  - **مصدر نتروجين (آزوتي)** : ويحصل عليه من أملاح الأمونيوم والنترات وبعضها يتطلب آزوت عضوي ويفضل إستخدام الببتون ومشتقاته.
  - **مصدر للفوسفات والكبريت:** الفوسفور يستخدم في تخليق الأحماض النووية والفوسفولبيدات، والكبريت لتكوين الأحماض الأمينية الكبريتية.
- وتضاف للبيئة الغذائية الأملاح المعدنية مثل الصوديوم والبوتاسيوم والمغنسيوم والكالسيوم وأيون الفوسفور وبعض المعادن بكمية ضئيلة جدا مثل الزنك وغيره والمنجنيز والتي تستخدم في نمو البكتريا.
- ويجب توفر جميع العوامل الضرورية للنمو كتوفر نسبة الرطوبة وتركيز أيون الهيدروجين pH والضغط الأسموزي والتوتر السطحي وحالة الأكسدة والإختزال.

7.1.1.تقسيم البيئات الغذائية على حسب القوام (الشكل):

- **أوساط صلبة**

- **أوساط سائلة :** مثل المرق المغذى ومثل االلبن
- **أوساط صلبة قابلة للإسالة :** هذه الأوساط تحتوى على مادة الاجار أوالجيلاتين في تكوينها وبالتالي فهي أوساط تتصلب في درجة الحرارة العادية ويمكن اسالتها بالتسخين
- **أوساط شبه صلبة :** تحتوى فقط على 3 جرام من الاجار في اللتر .

7.1.2. تقسيم البيئات الغذائية على حسب الوظيفة إلى :

7.1.2.1. البيئات المخصبة: Enriched Media

إضافة بعض المواد الضرورية إلى المنبت الغذائي الصلب أو السائل كالدم، السيرم وبعض المستخلصات النباتية والحيوانية لكي تساعد هذه المواد على نمو وتكاثر البكتيريا.

7.1.2.2. البيئات الآنتقائية Selective Media:

إضافة بعض المواد الكيماوية أو المختارة إلى المنبت الغذائي لأجل منع نمو نوع واحد أو مجموعة من البكتريا وليس الأنواع الأخرى.

فمثلا إضافة صبغة الايوسين، الكريستال البنفسجية، وأزرق المثيلين للمنبت الغذائي حيث يؤدي لنمو نوع معين من البكتريا وعدم نمو الأنواع الأخرى.

7.1.2.3. البيئات المميزة للميكروبات Differential Media:

ينتج عن إضافة بعض الأصباغ والمواد الكيماوية مع المنبت الغذائي تغير لبعض أنواع الكائنات المجهرية بعد الزرع والتحضين على درجات الحرارة المطلوبة وبذلك من الممكن التفرقة بين أنواع الكائنات فمثلا تلقيح خليط من البكتريا على بيئة آجار الدم Blood agar فإن بعض البكتريا سوف تحلل كريات الدم الحمراء بينما الآخرى لا تحلله .

7.1.2.4. بيئات المعايرة Assay Media:

بيئات غذائية تحتوي على مواد غذائية خاصة وثابتة تستعمل لبيان كمية الفيتامينات والأحماض الأمينية والمضادات الموجودة في المادة كذلك بيئات غذائية خاصة يمكن إستخدامها في الفحص عن قوة المواد المطهرة.

7.1.2.5.بيئات عد البكتريا Media for Enumeration of bacterial:

بعض البيئات الغذائية تستخدم لإحصاء العد الكلي البكتيري في المياه أى أنها ليست وسط انتقائى بل وسط غذائى عام.

7.1.2.6.البيئات المستخدمة لتصنيف البكتيريا عن طريق بيان صفات البكتريا Characterization:

تستخدم للتعرف على نوع النمو وعلى التغير الكيميائي الناتج عن الأحياء المجهرية مثل بيئات السكر التخمرية.

7.1.3.خصائص المزارع البيئية Culture Media Specifications

- يفضل استعمال البيئات الجافة (المنزوع منها الماء Dehydrated).
- لا تلجأ إلى تركيب البيئة من مكوناتها طالما البيئة الجاهزة الجافة متوفرة.
- اتبع توجيهات المنتج في تحضير البيئة وتعقيمها.
- يمكن استعمال البيئات جاهزة التحضير Ready to use على صورة سائلة معبأة في أمبولات ومعقمة طالما أنه معروف أنها تعطى نتائج مماثلة.
- أطلب البيئات بكميات محددة بحيث لا تبقى لديك أكثر من عام.

- إذا كان عمليا، أطلب البيئات في عبوات (100 جرام) فهي أفضل من عبوات (500 جرام) للمحافظة على البيئة مغلقة أطول وقت ممكن.
- استعمل البيئات على أساس أن ما يتم توريده أولا يستعمل أولا.
- سجل نوع، كمية، مظهر البيئة الواردة، رقم التشغيلة Lot number، تاريخ التوريد، تاريخ الفتح، ظروف التخزين.
- راجع قائمة الجرد كل 3 شهور واستبعد البيئات التي مضى تاريخ صلاحيتها، تحجرت، تغير لونها، أو ظهر عليها أي علامات التدهور في الصفات.
- لأن الحرارة، الضوء، والرطوبة تختلف بين المعامل، فإنه ليس ممكنا وضع حدود لعمر البيئة الغير مفتوحة. ولكن بصفة عامة فإن حدود الوقاية للعبوات من البيئة الغير مفتوحة هو عامان على درجة حرارة الغرفة. وإذا كانت العبوة عمرها أكثر من عام
- استعمل عبوات البيئات المفتوحة خلال 6 شهور بعد الفتح وطالما فتحت العبوة احفظها في مجفف Desecrator مباشرة بعد الفتح.

7.1.4.تحضير المزارع البيئية Culture Media preparation

7.1.4.1.الماء المستخدم فى عملية التحضير

- لتحضير بيئات المزارع والأدلة، استعمل ماء مقطر أو ماء منزوع الأيونات (Reagent grade Water) مع خلوه من آثار المعادن الذائبة أو المواد ذات التأثير القاتل أو مانعات النمو للبكتريا.
- ربما تنتج السمية في الماء المقطر من الماء المعالج بالفلور والمرتفع في السليكا.
- المصادر الأخرى للسمية هى الفضة، الرصاص، مركبات عضوية.

- الأمينات السامة أو مركبات الغلاية الأخرى ربما تتواجد في الماء المقطر.
- ربما يتواجد أيضا الكلور المتبقي أو الكلورامين في الماء المقطر المحضر من ماء معالج بالكلور. إذا تواجد كلور في الماء المقطر، عاده يزال بإضافة كمية مكافئة من ثيوكبريتات الصوديوم أو كبريتيت الصوديوم.
- الماء المقطر يلزم أن يكون خاليا من المغذيات الملوثة.
- ربما يأتى التلوث من تخزين المياه في زجاجات غير نظيفة. خزن الماء المقطر بعيدا عن أشعة الشمس المباشرة لمنع نمو الطحالب.

7.1.4.2.تجهيز المزارع البيئية Culture Media

- حضر البيئة في أوعية على الأقل ضعف الحجم المطلوب تحضيره.
- أثناء التسخين تقلب البيئة، خاصة المحتوية على آجار. تجنب الغليان الزائد أو التشييط Scorching بإستعمال حمام مائي أثناء تحضير الكميات الصغيرة من البيئة وسخان أو لهب بالنسبة للحجوم الكبيرة مع التقليب بإستمرار بإستخدام Hot plate–magnetic stirrer.
- راجع pH كل بيئة بعد التعقيم والتبريد.
- راجع pH البيئة المتصلبة بواسطة إلكترود سطحي Surface probe. سجل النتائج. اجر الضبط البسيط في pH البيئة (أقل من 0.5 وحدة) بواسطة محلول صودا كاويه أو حامض هيدروكلوريك طبقا لما هو محدد في تركيب البيئة. إذا كان الفرق في pH البيئة أكبر من 0,5 وحدة، أهمل هذه التشغيلة وأعد التحضير.

- قيمة pH الغير صحيح ربما يدل على مشكلة فى نوعية المياه المستخدمة في التحضير، تدهور البيئة Media deterioration أو تحضير غير جيد. راجع التوجيهات للتحضير، راجع pH المياه: إذا كان pH المياه غير صحيح، حضر البيئة من جديد وبإستعمال مياه من مصدر جديد. إذا كانت المياه مناسبة و pH البيئة لا تزال غير صحيح ، حضر البيئة من عبوة أخرى من البيئة.

7.1.4.3.تعقيم البيئات الغذائية Sterilization for media

- بعد إذابة البيئة تجزأ وتعقم خلال ساعتين.
- استعمل أوعية صغيرة للبيئة أثناء التعقيم، لتسمح بالتسخين المتماثل وسرعة التبريد.
- ضع فى كل دورة تعقيم أوعية متماثلة فى الحجم، لتسمح بالتسخين المتماثل، اى لا تضع الزجاجات الكبيرة مع الانابيب الصغيرة فى دورة واحدة حيث سيحدث تسخين اعلى من المطلوب فى الانابيب .
- لا تخزن البيئة الغير معقمة.
- عقم البيئات، في الأوتوكلاف عند 121°م–124 °م لمدة 15 دقيقة (طبقا لنوع الوسط الغذائى). بعد وصول الحرارة إلى 121°م.
- لا تعرض البيئات المحتوية على سكريات للحرارة المرتفعة أكثر من 45 دقيقة. مدة التعرض (من وقت غلق الأوتوكلاف إلى تفريغه).
- عند وصول الضغط إلى صفر، افتح الأوتوكلاف واخرج البيئة، بردها بسرعة لمنع تحلل السكريات مع طول التعرض للحرارة.

- يفضل استعمال الأوتوكلاف مزدوج الجدار للسماح بالتسخين المبدئي قبل الملأ لخفض الزمن اللازم ليكون في حدود 45 دقيقة المحددة.
- لا تعيد تعقيم البيئة مطلقا.
- رشح ووزع البيئة في كابينة أمان أو Biohazard hood إذا كانت متاحة.

7.1.4.4.أستعمال الآجار المنصهر Using Melted agar

- يضبط الآجار المنصهر Melted agar في حمام مائي عند 44 – 46 °م حتى وقت الآستعمال ولكن لا يترك في الحمام المائي أكثر من 3 ساعات.
- لمراقبة حرارة الآجار، عرض زجاجة من الماء لنفس ظروف التسخين والتبريد مثل الآجار. آغمس ترمومتر في زجاجة المراقبة لتقدير متى تصل الحرارة إلى 44 – 46 °م والمناسبة للأستعمال في صب الأطباق.
- بعد صب الآجار في الأطباق للزرع على سطحه جفف سطح الآجار بترك الأطباق مفتوحة قليلا في كابينة بكتريولوجية Bacteriological hood لمدة 15 دقيقة على الأقل لمنع التلوث.

7.1.4.5.تخزين المزارع البيئة المحضرة Storage of prepared media

- حضر البيئة المعقمة بكميات مناسبة طبقاً للاستهلاك المطلوب حتى لا يتم اهدارها.
- في حالة إسالة بيئات الآجار وتبقى جزء في الدورق بعد الأستعمال لا تتركه ليتصلب ويعاد أستعماله مرة أخرى، تخلص من المتبقي فورا.
- تحفظ الأطباق من البيئات التي لم تستعمل في يوم تجهيزها وذات الغطاء الغير محكم في الثلاجة بإستعمال أكياس بلاستيكية محكمة الغلق هذا إذا لم تكن ستستعمل خلال يومين.

- حضر البيئات التي تخزن بالثلاجة لمدة أطول من أسبوعين في أنابيب محكمة ذات غطاء قلاووظ لمنع فقد الرطوبة.
- وللكشف عن الفقد في الرطوبة من أنابيب المرق Broth tubes قم بوزن بعض الأنابيب قبل التعقيم وبعد التعقيم ولاحظ الفقد في الرطوبة. و إذا كان الفقد أكثر من 10% استبعد الأنابيب.
- احمي البيئات التي تحتوى على الصبغات من الضوء، إذا تغير اللون استبعد البيئة ولا تستعملها.
- المرق والآجار المحضر والمعقم المتوافر تجاريا Ready to use ربما يوفر مزايا عند الرغبة في إجراء التحليل متقطعا وعند عدم توافر الفنى للتحضير، أو عندما يمكن أن تتوازن التكاليف مع العوامل الأخرى للعمليات المعملية.

جدول يوضح فترات تخزين الاوساط الغذائية المحضرة طبقاً لنوع الاناء المحفوظة فيه :

TABLE 9020:V. HOLDING TIMES FOR PREPARED MEDIA

Medium	Holding Time
Broth in screw-cap flasks*	96 h
Poured agar in plates with tight-fitting covers*	2 weeks
Agar or broth in loose-cap tubes*	2 weeks
Agar or broth in tightly closed screw-cap tubes†	3 months
Poured agar plates with loose-fitting covers in sealed plastic bags*	2 weeks
Large volume of agar in tightly closed screw-cap flask or bottle*	3 months

* Hold under refrigerated conditions 2–8°C.
† Hold at <30°C.

8.التجارب العملية

تجربة 1: مياه التخفيف Dilution Water

تجربة 2: Serial Dilution

تجربة 3: Pour Plate Technique

تجربة 4: طريقة تخطيط الاطباق Streak Plate Method

تجربة 5: الصبغات الميكروبية Microbial Stains

8.1. تحضير مياه التخفيف Dilution Water

8.1.1.المياه المنظمة Buffered water:

- لتحضير رصيد Stock من الفوسفات المنظم، أذب 34 جرام بوتاسيوم فوسفات ثنائي الهيدروجين Potassium dihydrogen phosphate (KH_2 PO_4) في 500 مل ماء مقطر، أضبط pH عند 7,2 ± 0,5 بواسطة محلول من صودا كاوية (NaOH) (1N) وخفف إلى لتر بماء مقطر.

لا تترك البكتريا في أي ماء تخفيف لمدة أطول من 30 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة

- **تحضير ماء التخفيف :-**

- أضف 1.25 مل من محلول الفوسفات المنظم5 مل من محلول كلوريد ماغنسيوم (81,1 جرام كلوريد مغنسيوم (MgCl2.6H2O/L distilled water) إلى 1 لتر ماء مقطر.
- قم بتوزيع اللتر الذى تم تحضيره على انابيب بحيث يكون فى كل انبوبة 99 ± 2,0 مل أو 9 ± 0,2 ملل ثم من ماء التخفيف ثم قم بالتعقيم لمدة 15 دقيقة عند درجة حرارة 121 سيلزيس.

8.1.2.ماء البيتون:Peptone water (تركيز 0,1 %.)

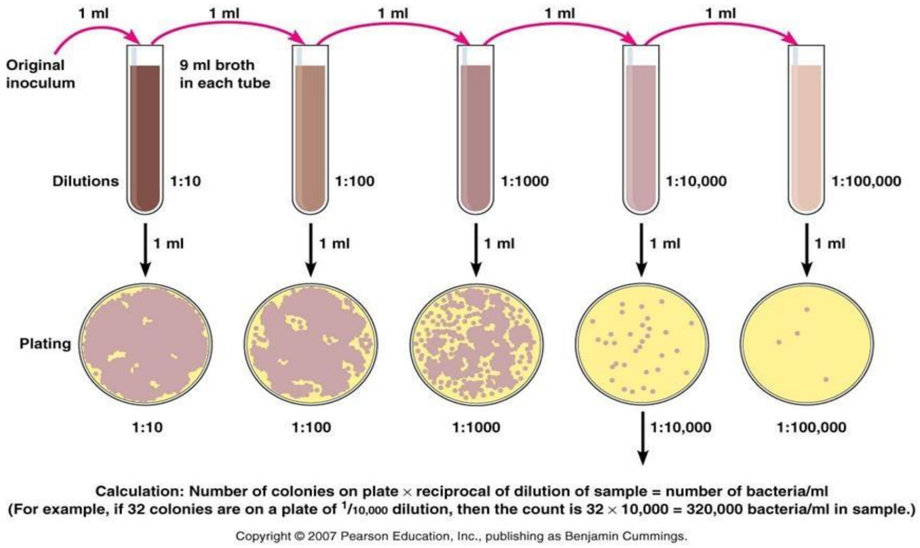
- خفف حجم معين ليعطى محلول تركيز 0,1 %.

- أضبط الـpH عند 7 ±0.2
- وزع كميات 99 ±2 مل أو 9 ± 0.2 مل ثم قم بالتعقيم لمدة 15 دقيقة.
- لا تترك البكتريا في أي ماء تخفيف لمدة أطول من 30 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة حتى لا يحدث موت أو تكاثر.

8.2. طريقة التخفيف المتسلسل Serial Dilution

- خذ بماصة معقمة 1 مللي من العينة بعد رجها جيدا وضعه في أول زجاجة تخفيف التي تحتوى على 9 مللي وبذلك يكون هذا التخفيف تخفيف 1: 10
- رج الأنبوبة الأولى جيدا ثم خذ بماصة جديدة خذ 1 مللي من التخفيف الأول وضعه في عبوة التخفيف الثانى التي تحتوى على 9 مللي من ماء التخفيف وبذلك يصبح التخفيف 1 : 100
- رج التخفيف الثانى جيدا ثم خذ منه بماصة معقمة جديدة 1 مللي وانقله إلى عبوة التخفيف الثالثة التي تحتوى على 9 مللي فيصبح التخفيف 1 : 1000
- بنفس الطريقة قم بعمل التخفيفات الباقية .
- خذ 1 مللي من التخفيف المطلوب وازرعه بطريقة الصب على الاطباق على الاجار

- عد المستعمرات الناتجة واضرب الناتج في مقلوب التخفيف.



8.3. العد الكلى للبكتريا بطريقة الأطباق المصبوبة Pour Plate Technique

- يقوم المعمل بتقدير العد الكلى للبكتريا حيث أن زيادة عدد الكائنات الحية القادرة على تكوين مستعمرات مرئية على مستنبتات المزارع له دلالته كما يلى :
- يفيد في تقدير مدى كفاءة عمليات معالجة المياه .
- يفيد في تقدير مستوى نظافة وسلامة شبكة التوزيع .

8.3.1. الأدوات المستخدمة :

- أطباق بتري معقمة
- ماصات معقمة

- أنابيب تحتوى كل منها على (15مللي) من الوسط الغذائى المستخدم فى العدَ، ويفضل استخدام الوسط الغذائى R2A agar فى تحاليل المياه بدلاً من Plate Count Agar او Nurtient Agar.

8.3.2.الوسط المستخدم :

- يتم تحضيره طبقاً على تعليمات الشركة المصنعة على العلبة.

8.3.3.زراعة عينات مياه الشرب :

- قم بصهر أنابيب الميديا ثم وضعها في حمام مائى عند درجة حرارة 47 حتى تبرد
- بماصة معقمة خذ 1 مللى من العينة وضعه في طبق بتري معقم
- قم بصب أنبوبة من أنابيب الاجار في الطبق
- قم بخلط العينة مع الوسط عن طريق تحريك الطبق حركة دائرية برفق
- اترك الطبق حتى يتصلب الوسط
- ضع الطبق مقلوبا في الحضان بعد وضع بيانات الزرع وهي :
- مصدر العينة
- تاريخ جمع العينة
- تاريخ الزرع وساعة الزرع
- اسم القائم بعملية الزرع

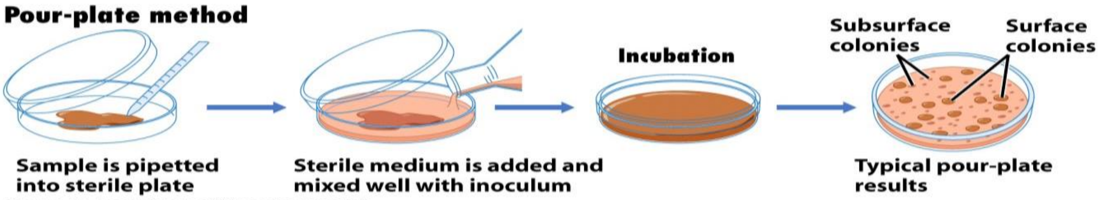
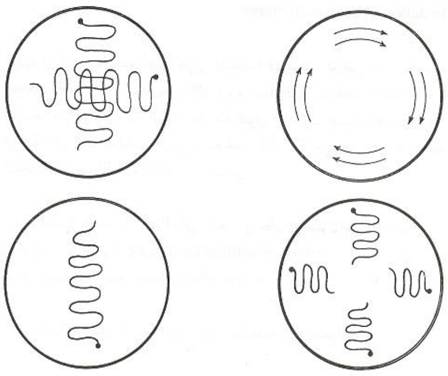


Figure 6-10 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

8.4. طريقة تخطيط الاطباق Streak Plate Method

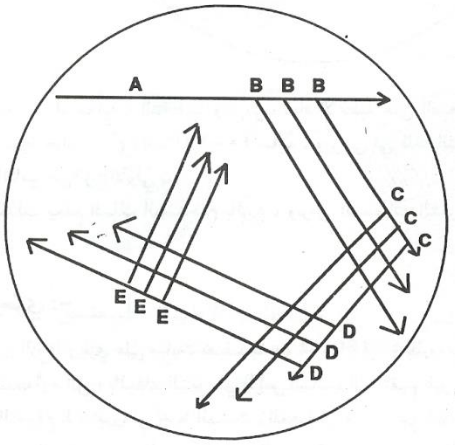
- – الهدف من التخطيط هو الحصول على مستعمرات منفصلة تماما
- – تخطط العينة على سطح بيئة الاجار المغذي بطريقة التخطيط البسيط أو التخطيط البسيط المتكرر أو التخطيط المتعامد

8.4.1.التخطيط البسيط



- تحت ظروف التعقيم, تعقم ابرة التلقيح باللهب ثم تبرد بلمس حافة الاجار
- تؤخذ ملء عقدة Loopfull من المزرعة المختلطة ويخطط على سطح البيئة الصلبة
- تكتب البيانات اللازمة أسفل الطبق
- تحضن الأطباق مقلوبة عند 37م لمدة 24 ساعة
- لاحظ ظهور مستعمرات فردية في الجزء الأخير من التخطيط

8.4.2.التخطيط المتعامد



- تحت ظروف التعقيم, تعقم ابرة التلقيح كما سبق
- بملء العقدة من المزرعة المختلطة يخطط خطوط متعامدة على سطح البيئة الصلبة كما بالرسم
- تكتب البيانات اسفل الطبق ثم تحضن الأطباق مقلوبة عند 35 م لمدة 24ساعة
- لاحظ النمو الكثيف في منطقة الخطوط الاولى يقل تدريجيا حتى تظهر مستعمرات فردية في اخر التخطيط.

Figure 5-4c Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

8.5. الصبغات الميكروبية Microbial Stains

- لتحديد أشـــكال البكتيريا أو الأحياء الدقيقة العامة أو أجزائها المختلفة لابد من صـــبغها بعد تثبيت على سطح الشريحة ويقصد بعملية الصبغ هذه تلوين الكائنات الحية الدقيقة بصبغات خاصة لتحديد أجزائها المختلفة.

بعض أنواع الصبغات الأكثر استخداما في مجال الدراسات الميكروبية.

8.5.1. أولاً:الصبغ البسيط Simple stain

- يقصـد بالصـبغ البسـيط استخدام صـبغة واحدة فقط في صـبغ الغشـاء البكتيري. ويجرى بأن توضـع عدة قطرات من الصـــبغة على الغشـــاء البكتيري Smear المثبت لمدة عدة دقائق، ثم يتم غســـل الصـــبغة بماء وتجفف الشـريحة. ويتم دراسـتها باسـتعمال العدسـة الزيتية في المجهر الضـوئي، وتستخدم الصبغات البسيطة لدراسة وتوضيح الشكل العام لخلايا البكتيريا.
- ومن أشـهر الصـبغات المسـتعملة فيها صـبغة أزرق المثيلين، الصـفرانين، الجنسـيان البنفسـجي، الفوكسين.

8.5.2.ثانياً:الصبغ التفاضلي Differential stain

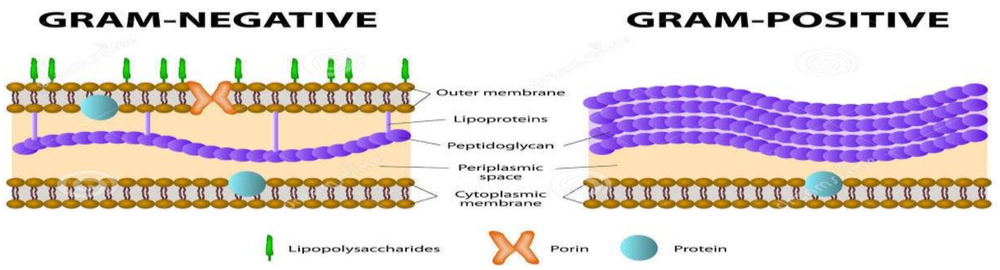
- يقصـد بالصـبغ التفاضـلي اسـتخدام أكثر من صـبغة واحدة، وذلك للتمييز بين مجموعات بكتيرية مختلفة، أو للتمييز بين بعض أجزاء ومكونات الخلية البكتيرية نفســها، ومن أشـــهر الصـــبغات التفاضلية ما يلي.

8.5.3. صبغة جرام Gram stain

- تعد هذه الصبغة من أهم الصبغات البكتيرية، لأنها مكنت من تقسيم البكتيريا إلى مجموعتين كبيرتين هي موجبة جرام (+Gram positive (G وسالبة جرام (-Gram negative (G، استنادا إلى اختلاف اللون الذي تأخذه البكتيريا في هذه الصبغة.

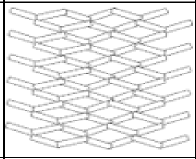
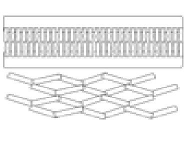
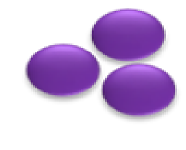
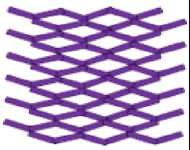
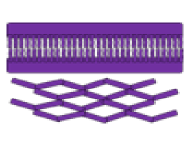
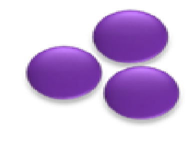
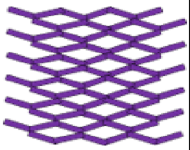
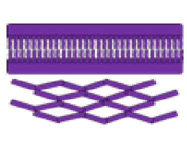
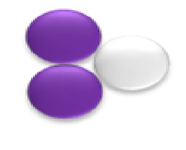
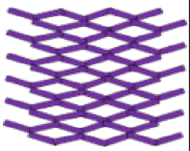
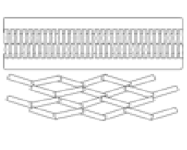
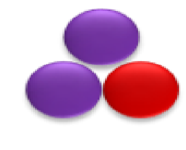
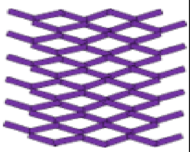
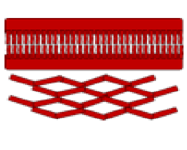
8.5.3.1. فكرة الصبغة :

- - يخلتف تركيب الجدار الخلوى Cell Wall للبكتيريا الموجبة لصبغة جرام عن البكتيريا السالبة لصبغة جرام فى سمك طبقة البيبتديوجليكان Peptidoglycan ، كما هو موضح فى الشكل التالى :



- عند إضافة صبغة الكريستال البنفسجى Crystal violet إلى الشريحة تدخل هذه الصبغة إلى داخل جدار الخلية.
- و عند إضافة محلول اليود Iodine Solution يتفاعل مع صبغة الكريستال البنفسجى Crystal violet ليكون مركب معقد يسمى Crystal violet – Iodine complex
- يتم إضافة الكحول Alcohol يدخل إلى جدار الخلية فلا يستطيع نزع المركب Crystal violet – Iodine complex من البكتيريا الموجبة لصبغة جرام بسبب سمك طبقة البيبتديوجليكان وتظل البكتيريا مصبوغة باللون البنفسجى، بينما ينزع الكحول اللون من البكتيريا السالبة لصبغة جرام فتصبح شفافة، كما هو موضح بالجدول التالى .

- يتم إضافة الصبغة المعاكسة السفرانين Safranin ذات اللون الأحمر فتقوم بصبغ البكتيريا سالبة لصبغة جرام التى لونها شفاف ويصبح لونها احمر ، أما البكتريا الموجبة لصبغة الجرام لن تقبل صبغة Safranin ويظل لونها بنفسجى .

Gram Staining Procedure		Gram Positive Cell Wall		Gram Negative Cell Wall	
Process of test	Appearance of Cells	Effect of Step	Effect on Cell Wall	Effect of Step	Effect on Cell Wall
Step 1: Begin with heat fixed cells		**Step 1:** Cell wall remains clear.		**Step 1:** Cell wall remains clear.	
Step 2: Flood slide with crystal violet dye for 1 min.		**Step 2:** Peptidoglycan cell wall is flooded with crystal violet and appears purple.		**Step 2:** Cell wall is stained purple from the crystal violet dye.	
Step 3: Add iodine solution for 1 min.		**Step 3:** A crystal violet – iodine complex is formed within the peptidoglycan cell wall trapping the purple stain.		**Step 3:** A crystal violet-iodine complex is formed but does not adhere to the cell wall due to the thin layer of peptidoglycan.	
Step 4: Wash slide with alcohol for 20sec.		**Step 4:** The crystal violet – iodine complex is trapped with the peptidoglycan cell wall and doesn't wash out.		**Step 4:** The crystal violet – iodine structure is washed out of the thin peptidoglycan layer.	
Step 5: Counter stain with safranin.		**Step 5:** As the peptidoglycan cell wall remains stained purple the red safranin has no effect.		**Step 5:** The red safranin stains the washed gram negative cells.	

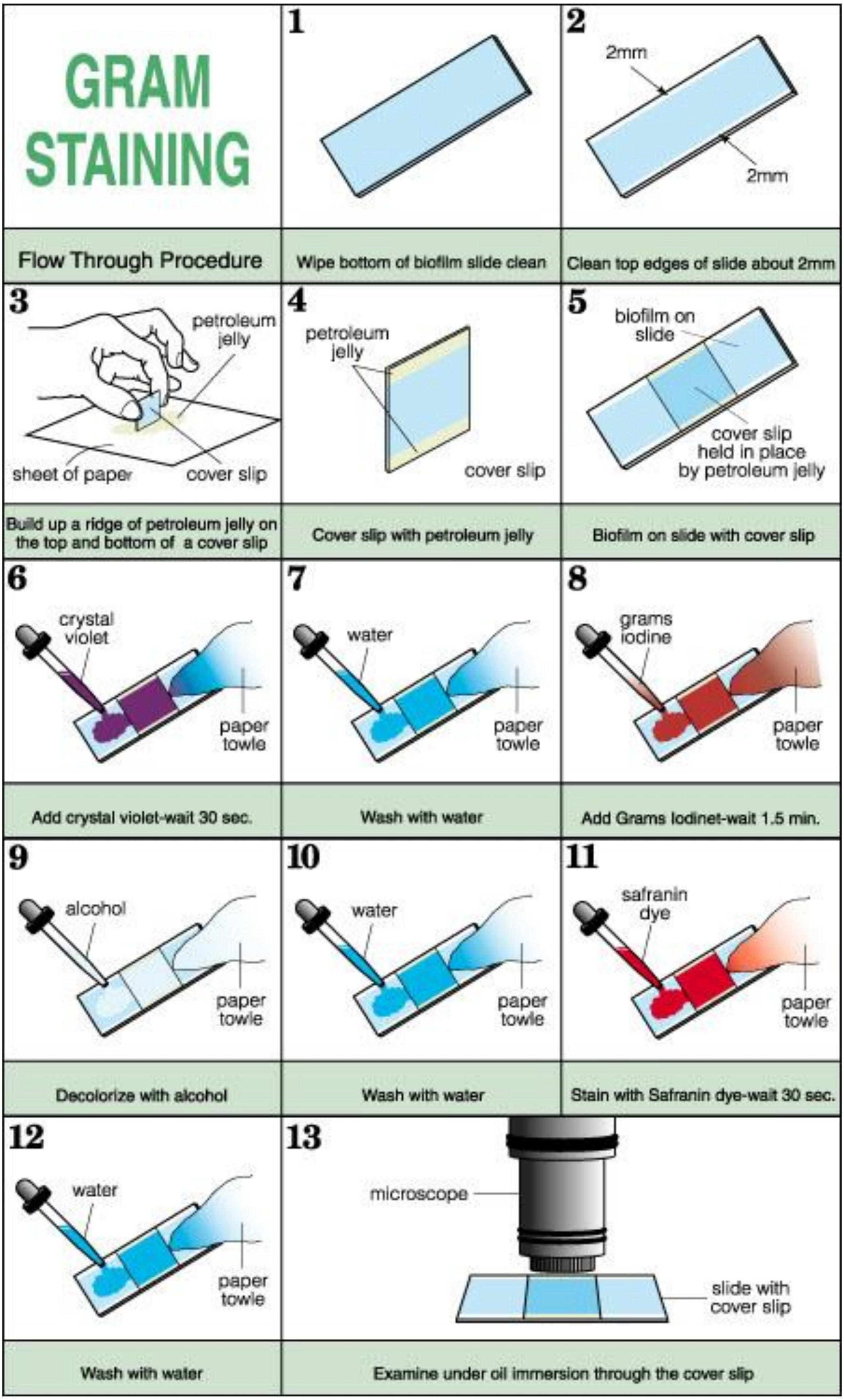
8.5.3.2.الأدوات المطلوبة :

- صبغة اساسية " الكريستال البنفسجي" Crystal violet.
- محلول "اليود" Iodine Solution .

- عامل مزيل للون "الكحول" Alcohol.
- صبغة مختلفة (عكس اللون البنفسجى) مثل صبغة "السفرانين" الحمراء اللون Safranin.
- ماء مقطر للغسيل

8.5.3.3.خطوات عملية الصباغة :

- ناخذ شريحة نظيفة ونضع عليها نقطة مياه معقمة
- باستخدام إبرة العزل نأخذ نقطة من المستعمرة البكترية ونذيبها في نقطة المياه على الشريحة النظيفة حتى نفردها علي الشريحة .
- نقوم بتثبيت الغشاء (الفليم البكتيرى) علي اللهب او داخل الفرن .
- نصبغ الغشاء بمحلول بالكريستال البنفسجي لمدة دقيقة.
- نتخلص من الزيادة من محلول الصبغة ، ثم نغسل الشريحة بالماء.
- نغمر الغشاء بمحلول اليود، ونتركه لمدة دقيقة .
- نتخلص من محلول اليود ، ثم نغسل الغشاء بالماء.
- نترك الشريحة لتجف في الهواء .
- نغسل الغشاء بمحلول الإيثانول (95%)، وذلك بإضافته للشريحة قطرة قطرة مع إمالة الشريحة ليتساقط منها الكحول بعد مروره على الغشاء ، وتستمر الإضافة حتى يصبح الكحول المتساقط يكاد يكون عديم اللون.
- نغسل الغشاء بعد ذلك بالماء.
- نغمر الغشاء بصبغة السفرانين لمدة نصف دقيقة.
- نتخلص من محلول الصبغة الزائدة ، ثم نغسل بالماء.
- نترك الشريحة في الهواء كي تجف تماما ، ويمكن الإسراع من عملية التجفيف بتعريض الشريحة إلى الهواء الساخن فوق لهب بنزن.
- نضع نقطة بسيطة جداً من زيت السيدر على الغشاء(الفليم الميكروبى).
- نفحص الشريحة بإستعمال العدسة الزيتية.



نهاية الكتاب

قام بإعداد الإصدار الثانى من هذا البرنامج:

كيميائى/ عاصم عبد الرحمن	المعمل المرجعى لمياه الشرب– الشركة القابضة
كيميائى/ أحمد كمال عبدالهادى	المعمل المرجعى لمياه الشرب– الشركة القابضة
كيميائى/ وائل عبدالرحيم أبوالمجد	المعمل المرجعى لمياه الشرب– الشركة القابضة
كيميائى/ كريم فاروق إسماعيل	المعمل المرجعى لمياه الشرب– الشركة القابضة
كيميائى/ محمود جمعة حسين	المعمل المرجعى لمياه الشرب– الشركة القابضة
كيميائى/ الحسن الصادق	المعمل المرجعى لمياه الشرب– الشركة القابضة

قام بالمشاركة وابداء الرأى لهذا البرنامج:

كيميائية/ إيمان فهمى الشربينى عمر	شركة مياه دمياط
كيميائية/ إيمان محمد فعص	شركة مياه دمياط
كيميائية/ داليا حسن خفاجى	شركة مياه كفرالشيخ
كيميائية/ سارة حسين أحمد أبو طالب	شركة مياه القليوبية
كيميائية/ شيماء محمد جودة	شركة مياه القليوبية
كيميائية/ لمياء مصطفى طه حسن	شركة مياه الاسكندرية
كيميائى/ محمد أحمد عبدالحكيم	المعمل المرجعى لمياه الشرب– الشركة القابضة
كيميائى/ محمد حسن حسن	شركة مياه المنوفية
كيميائى/ محمد عبد الفتاح السيد	شركة مياه الجيزة
كيميائى/ محمد محمد ربيع عوض	شركة مياه الدقهلية
كيميائى/ مصطفى محمود مصطفى محمد	شركة مياه الجيزة
كيميائية/ مى مصطفى إسماعيل حسن	شركة مياه الفيوم
كيميائية/ نورا محمود ربيع	شركة مياه الفيوم

قام بالتنسيق الفني والإخراج لهذا الإصدار :

كيميائى/ محمود جمعه	الإدارة العامة للمسار الوظيفى– الشركة القابضة

للاقتراحات والشكاوى قم بمسح الصورة (QR)