برنامج المسار الوظيفي للعاملين بقطاع مياه الشرب والصرف الصحي

حقوق الطبع محفوظة
الشركة القابضة لمياه الشرب والصرف الصحي
الإدارة العامة للمسار الوظيفي - إدارة المناهج

دليل المتدرب

البرنامج التدريبي فني معمل

أساسيات الميكروبيولوجي – الدرجة الرابعة (ب)

تم اعداد المادة بواسطة الشركة القابضة لمياه الشرب والصرف الصحي
قطاع تنمية الموارد البشرية - الادارة العامة لتخطيط المسار الوظيفي V1 1-7-2015

الفـــــهـــــرس

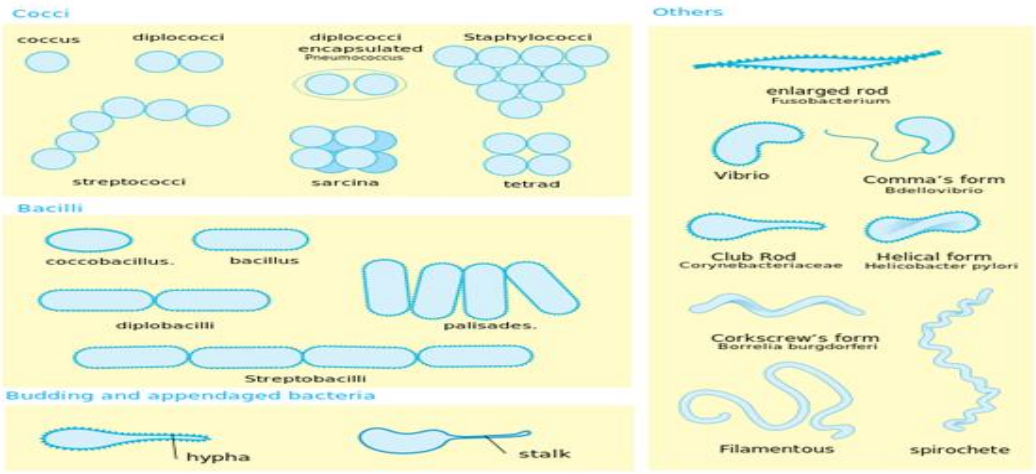
البكتريا Bacteria 3
بعض العوامل التي توثر في نشاط البكتريا: 4
المزارع البكتريولوجية Culture media 6
العد الكلى للبكتريا بطريقة الصب بالأطباق Plate count Bactria 6
بكتريا المجموعة القولونية Coliform group 7
الأسباب التي دعت لاختيار المجموعة القولونية كدليل للكشف عن التلوث: 8
التجهيز للمزارع البكتريولوجية 9
أولا غسيل وتعقيم الأدوات الزجاجية 9
ثانيا غسيل وتعقيم الأدوات المصنوعة من البلاستيك (بولي بروبيلين) 10
حفظ وتخزين عبوات المزارع البكتريولوجية 10
حفظ وتخزين المزارع البكتريولوجية 10
مزرعة البكتريا العاديةTotal count bacteria 10
مزرعة بكتريا المجموعة القولونيةColiform bacteria 11
تجهيز المياه المستخدمة في تحضير المزارع البكتريولوجية 11
(2) تجهيز المياه المستخدمة في تخفيف عينة النيل 12
(3) مزرعة البكتريا العادية Plate count agar 13
طريقة الصب في الأطباق 13
(4) طريقة المرشح الغشائى Membrane Filter (MF): 14
الفحص البيولوجي Biological investigation 15
أهمية عد الطحالب والتعرف على أنواعها 15
تجهيز العينات للفحص الميكرسكوبى Microscopically examination 17
1.2. طرق وتحاليل ملوثات الصرف الصحي والمأخذ 19
1.2.2. الأدوات والكيماويات المستخدمة 19
2.2.2. طريقة تحضير محلول M-Endo Culture Media 21
3.2.2. طريقة تحضير محلول M-FC Culture Media 22
4.2.2. طريقة تحضير محلول الفوسفات المنظم Phosphate Buffer 22
6.2.2. طــرق التعقيم 23

البكتريا Bacteria

البكتيريا كائنات حية دقيقة لا ترى بالعين المجردة ومنها ما هو نافع وما هو ضار. وتقسم البكتريا من حيث:

1. الشكل

1. الشكل العصوي (باسيللى) Bacillus تشبه العصا في شكلها ومن أنواعها ما يسبب أمراض التيفود والدوسنتاريا والدفتريا.
2. البكتريا الواوية وهى واوية الشكل ومنها ما يسبب مرض الكوليرا.
3. البكتريا الكروية وشكلها يشبة الكرة وتسبب أمراض الالتهاب الرئوي السحائي وحمى النفاس والتقيحات كالدمامل.



2. التنفس

تمتص بعض أنواع البكتيريا الأكسجين من الهواء وتؤكسد به المواد الغذائية لتحصل على الطاقة التي تستغلها في أداء وظائفها الحيوية وينطلق غاز ثاني أكسيد الكربون وبخار الماء وتعرف هذه الأنواع بالبكتيريا الهوائية.

وتوجد أنواع أخرى لا تستمد الأكسجين اللازم لتنفسها من الهواء وإنما عن طريق اختزالها لمركبات غنية بالأكسجين ومن ثم فهي تؤكسد به جزء أخر من المواد لتنطلق منه الطاقة الكامنة فيه وتسمى هذه الأنواع بكتيريا لاهوائية.

وتوجد أنواع من البكتيريا يمكنها أن تواصل حياتها في وجود أكسجين الهواء وفي غيابة بمعنى أنه يمكنها القيام بعملية التنفس الهوائي واللاهوائي وفقا للظروف التي قد توجد فيها.

3. التغذية

1. البكتريا ذاتية التغذية:

وهى التي تعتمد على نفسها في تصنيع ما يلزمها من مواد عضوية وهى قلة من البكتريا ذات لون اخضر أو احمر أو أرجواني تحصل على الطاقة من ضوء الشمس بواسطة مادة تشبه الكلوروفيل الذي يوجد في النباتات الراقية وبواسطتها يتحد ثاني أكسيد الكربون مع الماء مكونا المواد الكربوهيدراتية.

2. البكتيريا غير ذاتية التغذية:

وهى بكتيريا لا تعيش مستقلة بذاتها، وإنما تعتمد على المواد العضوية معقدة التركيب للحصول على الطاقة التي تلزمها أو هي تستمد تلك المواد الكربوهيدراتية مباشرة من كائن أخر.

بعض العوامل التي توثر في نشاط البكتريا:

1. الغذاء

الغذاء هو مصدر الطاقة التي يستغلها الكائن الحي في أداء وظائفه الحيوية ونشاط البكتيريا يزداد بطبيعة الحال متى توافر الغذاء اللازم لها والعكس صحيح.

2. الأكسجين

يزيد نشاط البكتريا الهوائية بزيادة نسبة الأكسجين في الهواء إلى حد معين إما أنواع البكتيريا غير الهوائية فان زيادة الأكسجين يحد من نشاطها حتى يؤدى إلى قتلها في حين أن انعدام الأكسجين كلية يزيد من نشاطها.

3. الرطوبة

الرطوبة ضرورية لنمو البكتيريا. ذلك إن خلاياها الحية لابد لها أن تستمد غذائها من وسط سائل مذاب فيه فإن قلت الرطوبة لحد كبير في الوسط الذي تعيش فيه البكتيريا فإن نشاطها

يقل حتى إذا ما حدث الجفاف فان البكتريا (غير المتجرثمة) لا يمكنها إن تواصل الحياة لأكثر من ساعات قليلة.

4. درجة الحرارة

توجد درجة حرارة مثلي لنمو البكتيريا ودرجة حرارة دنيا وقصوى وبصفة عامة فإن أغلب الخلايا البكتيرية (غير المتجرثمة) تموت في درجة حرارة (55°C) إما البكتيريا المتجرثمة فإنها تقاوم الحرارة العالية حتى أنها يمكن أن تظل حية في بعض الأحيان إذا وضعت في ماء يغلي لعدة ساعات.

5. الضوء

أغلب أنواع البكتيريا تنشط إذا قل الضوء والعكس صحيح فيما عدا البكتيريا اليخضورية فإن نشاطها يزداد إذا ما زادت شدة الإضاءة كما أن بعض الأنواع من الأشعة تؤثر في نشاط البكتيريا وفي حيويتها فقد دلت التجارب على أن الأشعة فوق البنفسجية ذات أثر فعال في قتل البكتريا.

6. الأس الهيدروجيني

لكل نوع من البكتيريا مدى معين من الأس الهيدروجيني تعيش فيه واختلاف هذا المدى يؤثر في نموها ونشاطها.

7. الضغط الأسموزى

إذا ارتفع الضغط الأسموزى للوسط الذي تعيش فيه البكتيريا مثل البحار فإن عددا قليلا من أنواع البكتيريا هو الذي يستطيع مقاومة تلك الضغوط الأسموزية العالية وتواصل نشاطها أما أغلب البكتريا فإن نموها يقل أو يتوقف.

المزارع البكتريولوجية Culture media

- **الأجهزة المستخدمة في الاختبارات البكتريولوجية:**

1. حضانة كهربائية للمزارع البكتيرية لتوفير جو ملائم لنمو البكتريا.
2. أوتوكلاف رأسي للتعقيم ولتسييح الاجار وإعدام المزارع البكتيرية بعد إجراء الاختبار.
3. فرن تعقيم
4. ميزان حساس برقميين عشريين.
5. ثلاجة لحفظ المزارع البكتيرية.

- **الأدوات المستخدمة في الاختبارات البكتريولوجية:**

1. ماصات مدرجة بأحجام مختلفة.
2. زجاجات جمع العينات سعه250 مل بغطاء قلاووظ محكم.
3. أطباق بتري من الزجاج أو البلاستيك الذي يستخدم للمرة الواحدة.
4. أنابيب زجاجية بغطاء قلاووظ مقاس 16×160مم وبها دراهم زجاجيه (أنابيب تخمر).
5. حاوية للماصات من الاستليس ستيل.

العد الكلى للبكتريا بطريقة الصب بالأطباق Plate count Bactria

العد الكلى للبكتريا لا يمثل كل البكتريا الموجودة بالمياه ولكنه يمثل فقط البكتريا التي تستطيع النمو على الوسط الموجود بالأطباق تحت الظروف المعملية من درجة الحرارة والمدة التي تركت فيها الأطباق داخل الحضانات.

وتستخدم هذه الطريقة لتقييم المحتوى البكتيري للمياه بصفة عامة.

العد الكلى للبكتريا يتم في درجة حرارة ٢٢ °م لتحديد العد الكلى للبكتريا الموجودة بصورة طبيعية في المياه وليس لها علاقة بالتلوث الآدمي " البراز"

أما العد الكلى للبكتريا في درجة حرارة ٣٧ °م يحدد العد الكلى للبكتريا الناتجة من تلوث المياه بالمواد البرازية الآدمية أو من الحيوانات Warm – blooded.

العد البكتيري عند درجة حرارة ٢٢ °م ليس له أهمية من الوجهة الصحية ولكنه هام في تقييم كفاءة المياه وخاصة خطوات الترويق والترسيب والترشيح والتعقيم حيث أن الهدف هو التخلص من جميع البكتريا إلى أقل عدد ممكن.

وكذلك يفيد العد الكلى عند درجة ٢٢ °م في تقييم نظافة وسلامة شبكة توزيع المياه وملائمة المياه في تصنيع الأطعمة والمشروبات حيث أن زيادة العد البكتيري في المياه يساعد على فساد الأطعمة والمشروبات.

أية زيادة في العد البكتيري عند درجة ٣٧ °م بالمقارنة بالنتائج السابقة يعتبر إشارة أو إنذار مبكر لبدء تلوث المياه.

عند درجة٢٢ °م لمدة ٤٨ ساعة لا يزيد العد الكلى للبكتريا عن ٥٠ خلية / ١سم^{٣}

عند درجة٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة لا يزيد العد الكلى للبكتريا عن ٥٠ خلية / ١سم^{٣}

بكتريا المجموعة القولونية Coliform group

تسبب المياه الحاملة لميكروبات مرضية مشاكل صحية خطيرة، إذ ينتقل عن طريق المياه، الميكروبات التي تسبب عدوى للجهاز المعوي، مثل بكتريا التيفود، والكوليرا، والدوسنتاريا وفيروسات شلل الأطفال، والالتهاب الكبدي الوبائي، وتوجد هذه المسببات المرضية، في بول وبراز المرضى وحاملي العدوى.

الكشف عن الميكروبات المرضية بالماء، أمر بالغ الصعوبة للأسباب الأتية:

1. هذه الميكروبات قد توجد بأعداد قليلة، مما يجعل من الصعب عزلها في مزارع نقية.
2. الكشف عنها وتمييزها يتطلب عملاً ومجهودا كبيراً، ووقتاً طويلاً.
3. قد يحدث أثناء الكشف عنها خطر على العاملين.

فنلجأ للكشف عن الميكروبات المرضية، بطريقة غير مباشرة.

من المعروف، أن أمعاء الإنسان، والحيوانات ذات الدم الحار، تحتوي على أعداد كبيرة من البكتريا، أغلبها من النوع غير الضار، ومن هذه البكتريا:

(Escherichia coli) بكتريا المجموعة القولونية، التي توجد بكثرة في البراز.

فوجود بكتريا المجموعة القولونية في ماء الشرب، يؤخذ كدليل على تلوث هذه المياه، بمياه المجاري، إذ تعتبر هذه البكتريا كاشفات للتلوث، ويعني هذا، أن المياه التي يوجد بها كاشفات التلوث، يحتمل أن يوجد بها ميكروبات مرضية معوية، مثل التيفود، والكوليرا، والدوسنتاريا، والفيروسات المعوية، مثل المسببة لشلل الأطفال.

مجموعة بكتريا القولون، وتتصف أفراد هذه المجموعة، بأنها، عصوية قصيرة غير متجرثمة، متحركة، اختيارية للهواء، تحلل سكر اللاكتوز وتنتج حامضاً وغازاً. عند درجة حرارة ٣٧ °م خلال 24ساعه.

الأسباب التي دعت لاختيار المجموعة القولونية كدليل للكشف عن التلوث:

1. الكشف عنها سهل.
2. غير ممرضة، ولا تضر القائمين بالعمل.
3. ومصدرها برازي، وتوجد دائماً بالمياه الملوثة، مادامت البكتريا المرضية موجودة بها، وتعيش بالمياه لمدة أطول من الميكروبات المرضية.

ويجب أن تكون ٩٥ % من العينات التي يتم فحصها خلال العام خالية تماما من بكتيريا القولون في١٠٠ سم^{3} من العينة كما يجب أن لا تحتوى أي عينة من العينات على أكثر من 2 خلية /١٠٠ سم^{3}على أن لا يتكرر ذلك في عينتين متتاليتان من نفس المصدر.

وجود هذه البكتريا يعنى:

1. عدم كفاءة التنقية.
2. تلوث المياه بعد إضافة الكلور النهائي أي بعد خروج المياه من طرد المحطة.
3. أن المياه تحتوى على مواد عضوية أو غير عضوية تساعد على نمو البكتريا وتكاثرها.

4. أجراء الاختبار للكشف عنها هام في تقييم كفاءة خطوات التنقية وسلامة شبكة المياه.
5. خلو المياه من المجموعة القولونية لا يعنى خلوها من بعض الفيروسات المعوية وحويصلات بعض الطفيليات كالأميبة أو الجياردا حيث أنهم يقاومون جرعات الكلور العادية ويحتاجون لجرعات كلور أكبر، وأهم طريقة للتخلص من كل ذلك هو كفاءة خطوات التنقية وحماية المياه الخام من التلوث.
6. وتستخدم أوساط غذائية جاهزة لإنماء بكتريا المجموعة القولونية مثل مرق كبريتات اللوريل.

التجهيز للمزارع البكتريولوجية

كيفيه تجهيز وتعقيم الأدوات المستخدمة في الزرع البكتريولوجي

أولا غسيل وتعقيم الأدوات الزجاجية

- تغسل الزجاجيات جيدا بالماء الدافئ والصابون
- يعاد غسيلها مره أخرى بالماء الدافئ فقط للتخلص من أثار الصابون
- تغسل بالماء المقطر جيدا
- زجاجات العينات تغسل بالطريقة السابقة ويوضع في كل زجاجة (حجم 120 مل) 0.1 مل من محلول 3% ثيوكبريتات الصوديوم السابق تجهيزه لمعادله الكلور الحر المتبقي الموجود بالعينة وتغطى الزجاجة بالغطاء المخصص لها مع عدم احكام غلق الغطاء.
- تعقم الأدوات الزجاجية في فرن التعقيم عند درجه حراره 170° م لمده لا تقل عن ساعة كاملة.
- بعد التعقيم يحكم غلق الزجاجات جيدا وتحفظ مغلقه لحين ملئها بالعينة
- الماصات الزجاجية واطباق بترى المصنوعة من الزجاج توضع في حاويات من الاستليس ستيل يتم تعقيمها لمده لا تقل عن ساعتين وعند درجه حراره 170°م وفي حالة وضعهم بدون الحاوية يكون الزمن الازم للتعقيم ساعة واحدة عند نفس درجه الحرارة.

ثانيا غسيل وتعقيم الأدوات المصنوعة من البلاستيك (بولي بروبيلين)

- تغسل كما تغسل الأدوات المصنوعة من الزجاج.
- تعقم بعد حل الغطاء في الاوتوكلاف عند درجه حراره 121 ْم ولمده 15 دقيقه.

حفظ وتخزين عبوات المزارع البكتريولوجية

- تحفظ عبوات الأوساط الغذائية محكمة الغلق وبعيدة عن أشعة الشمس في مكان مظلم وعند درجة حرارة أقل من 30 ْم وفي جو خالي من الرطوبة وبعيدا عن أبخره المواد الكيميائية.
- لاستخدم العبوات التي انتهت فترة صلاحيتها أو التي تغير لونها أو التي فقدت خواصها الفيزيقية.

حفظ وتخزين المزارع البكتريولوجية

بعد تحضير الأوساط الغذائية (المزارع البكتريولوجية) وتعبئتها تعقم في الأوتوكلاف في نفس يوم تعبئتها عند درجه حراره 121ْم ولمده 15 دقيقه ولا يتم تخزين المزارع التي لم يتم تعقيمها في الاوتوكلاف.

مزرعة البكتريا العادية Total count bacteria

بعد تحضير الآجار (من الأوساط الغذائية الصلبة) يعبأ في أنابيب بغطاء قلاووظ بعد التعقيم في الاوتوكلاف يمكن تخزينه لمده 3 أشهر بعيدا عن ضوء الشمس وفي جو خالي من الرطوبة ومن الممكن تخزينه في الثلاجة وعند الاستخدام تستبعد الأنابيب التي حدث بها نمو بكتيري.

مزرعة بكتريا المجموعة القولونية Coliform bacteria

- بعد تحضير مرق كبريتات اللوريل (من الأوساط الغذائية السائلة) تعبأ في أنابيب التخمر التي بها الدراهم وتغطى بغطاء القلاووظ بحيث يوضع في كل أنبوبه 9 مل من المرق ويتم تعقيم الأنابيب في الاوتوكلاف.
- تخزن الانابيب عند درجه حراره 25 ْم لمده أسبوع ولكن يراعى استبعاد الأنابيب التي حدث بها تبخير والتي قل حجم السائل بها.
- يمكن حفظ هذه المزارع في الثلاجة (عند درجه حراره منخفضه) ولكن قبل الاستخدام يتم تحضين هذه المزارع في الحضانة عند درجه حراره 35 ْم طوال الليل وتستبعد الانابيب المحتوية على فقاقيع هوائية.
- عند تحضير مرق كبريتات اللوريل يحضر منه:

1. مزارع أحاديه التركيز والتي يتم زراعه مياه النيل والمروقات بها.
2. مزارع مزدوجة التركيز والتي يتم زراعه مياه المرشحات والخزانات والطرود والشبكة بها.

تجهيز المياه المستخدمة في تحضير المزارع البكتريولوجية

- تعقم المياه المقطرة في الاوتوكلاف عند درجه حراره 121 ْم ولمده 15 دقيقه لضمان خلوها من أي بكتريا.
- توضع المياه المعقمة في حاويه زجاجيه ويحكم غلق الحاوية ولا تخزن هذه المياه لفترات طويله.

(2) تجهيز المياه المستخدمة في تخفيف عينة النيل

المواد المستخدمة:

1. فوسفات البوتاسيوم الهيدروجينية (KH_2PO_4)
2. كلوريد الماغنسيوم ($MgCl_2.6H_2O$)
3. ماء مقطر سبق تعقيمه.
4. محلول 1 عياري من هيدروكسيد الصوديوم.

الأدوات المستخدمة:

1. 2 كأس زجاجي سعه لتر
2. 3 دورق عياري سعه لتر
3. ماصه مدرجه 5 مل و2 مل
4. 100 أنبوبه زجاجيه بغطاء قلاووظ

خطوات إجراء التجهيز:

1. زن في الكأس الزجاجي على ميزان برقمين عشريين 34 جم من فوسفات البوتاسيوم الهيدروجينية.
2. أذب الوزنة السابقة في 500 مل من الماء المقطر السابق تعقيمه.
3. اضبط الاس الهيدروجيني للمحلول السابق بحيث يكون 7.2±0.5 بواسطه محلول هيدروكسيد الصوديوم.
4. قم بوضع المحلول السابق في دورق عياري وأكمل الحجم الى لتر بالماء المعقم.
5. حضر محلول كلوريد الماغنسيوم بوزن 81.1 جم من كلوريد الماغنسيوم وأذب الوزنة السابقة في قليل من الماء المعقم وأنقل المحلول السابق الى دورق عياري ثم اكمل الحجم الى لتر بالماء السابق تعقيمه.
6. خذ 1.25 مل من محلول الفوسفات المركز باستخدام الماصة 2 مل وضعه في الدورق العياري وضع عليه 5 مل من محلول كلوريد الماغنسيوم السابق باستخدام ماصه 5 مل ثم اكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر السابق تعقيمه.

7. يتم تعبأه المحلول السابق في الأنابيب الزجاجية بحيث تحتوى كل أنبوبه على 9 مل من المحلول السابق وتحكم غلقها بالغطاء القلاووظ.
8. يتم تعقيم الأنابيب السابقة في الاوتوكلاف لمده 15 دقيقه عند درجه حراره 121 °م

(3) مزرعة البكتريا العادية Plate count agar

طريقة الصب في الأطباق

خطوات إجراء التجهيز:

1. يعقم البنش جيدا بقطنه مبلله بمحلول مطهر مثل الديتول او السافلون.
2. قم بإسالة الآجار المحضر في حمام مائي بحيث لا تزيد درجه الحرارة عن 45- 46 °م
3. جهز أطباق بترى بعدد العينات المراد زرعها.
4. باستخدام ماصة 1 مل معقمة ضع في كل طبق 1 مل من العينات المراد زرعها.
5. صب 9 مل من الآجار السائل في الطبق البتري وقم بتحريك الطبق.
6. يترك الطبق قليلا حتى يبرد الآجار به بحيث لا يزيد الوقت عن 20 دقيقه بين صب العينة وصب الآجار.
7. اكتب مصدر العينة بالقلم الفلومستر على غطاء الطبق.
8. حضن الأطباق المزروعة في الحضانة عند درجة حرارة 37 °م لمده 24 ساعة مع مراعاة أن توضع الأطباق مقلوبة في الحضانة (الغطاء الى اسفل).
9. يراعى ألا يزيد الفقد في الرطوبة أثناء التحضين عن 15 % ضع إسفنجة مبللة بالماء في الحضانة إذا لزم الأمر.
10. بعد 24 ساعة من التحضين تعد الأطباق على عداد بكتيري.

(4) طريقة المرشح الغشائى (Membrane Filter (MF:

تتخلص الطريقة ببساطة في القيام بترشيح حجم معلوم من العينة على غشاء ترشيح قطره 47 ملليمتر وثقوبه 45 ميكرون وسطحه مقسم إلى مربعات وبعد تمام عملية الترشيح والغسيل عدة مرات ينقل الغشاء من قمع الترشيح إلى طبق بتري Petri Dish من البلاستيك ويحتوي على مخدة مثل الإسفنج مشبعة بالمحلول الغذائى المخصص لكل نوع من البكتيريا لكي تنمو وتنتج مستعمرات مميزة لنوع البكتريا.

وللكشف عن البكتيريا القولونية Total Coliform يستعمل المحلول الغذائى M– Endo Culture Media ويوضع في حضانة على درجة حرارة 35±0.5 ْم لمدة 24

ساعة فإذا ظهرت مستعمرات من الكائنات الحية ذات لون أخضر ذهبي معدني لامع Golden Green Sheen فيدل ذلك على وجود البكتيريا القولونية.

الفحص البيولوجي Biological investigation

عند فحص المياه ميكروسكوبيا يجب أن تكون خالية تماما من البروتوزوا وجميع أطوار الديدان المسببة للأمراض والطحالب الزرقاء المخضر Blue green algae

يستخدم الميكروسكوب العادي للبحث عن الكائنات الحية الدقيقة التي لا ترى بالعين المجردة سواء كانت نباتية أو حيوانه مثل الطحالب والبروتوزوا الحية.

الطحالب هي كائنات دقيقة تحتوي علي الكلوروفيل (المادة الخضراء) وذات ألوان متعددة والطحـــــالب ذاتية التغذية (تصنع غذاءها بنفسها) وحيدة الخلية أو مستعمرات (ثابتة أو متحركة) وتختلف أنواع الطحالب الموجودة في مياه النيل باختلاف درجات الحرارة.

أهمية عد الطحالب والتعرف على أنواعها

1. نظرا لما تسببه من رائحة وطعم غير مستساغ في المياه وهذه الروائح تختلف تبعا لكمية ونوع هذه الطحالب.
2. تحدث متاعب كبيرة في عمليات التشغيل إذ تتسبب في سد مسام رمل المرشحات بسرعة تدعو إلى وقف تشغيل المرشحات في فترات متقاربة لغسلها وإعدادها للتشغيل مره أخرى.
3. تستهلك كميات اكبر من الكلور.

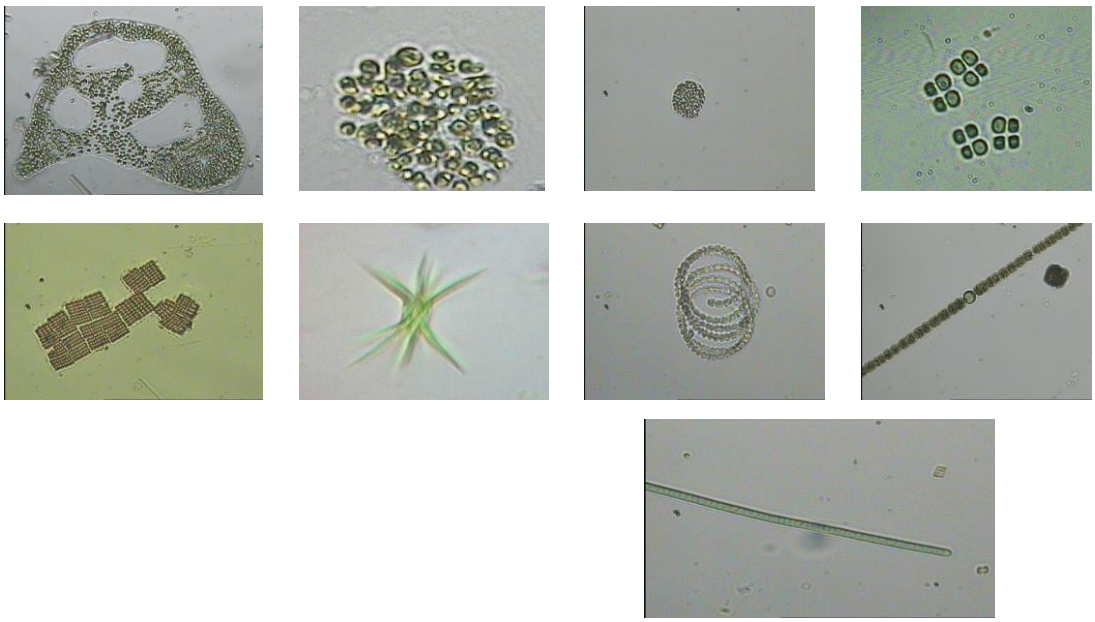
ولذلك يجب التخلص من اغلب الطحالب في عمليات الترويق لرفع كفاءة عمليه الترشيح.

تصنف الطحالب إلى:

1. دياتومات.
2. الطحالب الخضراء.
3. الطحالب الخضراء المزرقه.

Diatoms

Blue green

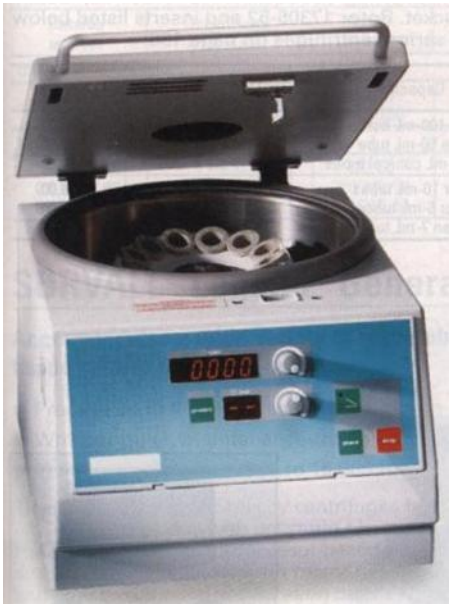


Green

تجهيز العينات للفحص الميكرسكوبى Microscopically examination

الهدف من التجهيز:

تركيز العينة من مياه النيل والمروقات والمرشحات والخزنات والطرود والشبكة تمهيدا لفحصها تحت الميكرسكوب.



الأدوات والأجهزة المستخدمة:

1. جهاز الطرد المركزي (centrifuge)
2. أنابيب زجاجيه شفافة مدوره من أسفل سعه 15 مل

خطوات إجراء التجهيز:

1. تجلب العينات في زجاجات سعه لتر وتغطى بغطائها ثم ترج جيدا ثم تترك قليلا.
2. يتم التخلص من الماء الموجود في الزجاجة مع مراعاة ترك حجم قدره حوالى 20 مل في قاع الزجاجة.
3. أملأ الأنبوبة الزجاجية بـــــــــــــ10 مل من العينة.
4. ضع الأنابيب الزجاجية في الأماكن المخصصة لها في الجهاز بحيث لا يقل عدد الانابيب عن عدد الأماكن وإذا كانت عدد العينات أقل يتم وضع أنابيب بها ماء مقطر للمحافظة على اتزان الجهاز أثناء دوان الحلة الداخلية للجهاز.
5. شغل الجهاز على سرعة RCF=1000g ولمدة 20 دقيقة
6. بعد انتهاء وقت التشغيل افتح غطاء الجهاز وتخلص من محتويات الأنبوبة بحيث لا يتبقى بها إلا جزء قليل جدا من العينة في أسفلها (تمثل نقطة واحدة عند وضعها على الشريحة).

ضع الأنابيب الزجاجية في حامل معد للأنابيب بجوار جهاز الميكروسكوب.

1.2. طرق وتحاليل ملوثات الصرف الصحي والمأخذ

من المعروف أن كل مستعمرة تنتج من بكتيريا واحدة، وبواسطة حساب عدد المستعمرات الموجودة في ملليلتر من العينة يمكن معرفة مدى تلوث العينة وينصح دائما بعمل تخفيف ملائم للعينة قبل ترشيحها بحيث لا يزيد عدد المستعمرات المستنبطة على سطح الغشاء عن 80 مستعمرة ليسهل عدها.

1.2.2. الأدوات والكيماويات المستخدمة

- جهاز التعقيم الأوتوكلاف Autoclave sterilizer.
- حضانة Incubator يمكن ضبط حرارتها أوتوماتيكيا على درجات حرارة من 35 إلى 44°م.
- ميزان حساس Analytical Balance.
- جهاز قياس الأس الهيدروجيني pH–Meter.
- مضخة تفريغ الهواء Vacuum Pump.
- كئوس Beakers سعة 50–100–1000–2000 ملليلتر.
- مخبار Cylinder سعه 100ملليلتر.
- دورق مخروطي بغطاء بلاستيك سعه 250 ملليلتر.
- سخان كهربائي / قلاب مغناطيسى Hot Plate&Stirrer.

سخان كهربائي / قلاب مغناطيسى Hot Plate&Stirrer

- ماصات من 1 مل إلى 10 مل.
- زجاجات عينات.
- زجاجات تخفيف عينة.
- ملقاط من الحديد الغير قابل للصدأ Stainless Steel Forceps.
- دوارق الترشيح بالتفريغ مزودة بخرطوم التوصيل لمضخة التفريغ.
- قمع الترشيح بقاعدة قطرها 47 ملليمتر.
- موقد بالكحول أو الغاز.
- ميكروسكوب للتكبير 10-20 مرة.
- غشاء الترشيح Membrane Filter بقطر 47 ملليمتر وثقوبه 45 ميكرون.
- أطباق بتري Petri Dishes مزودة بمخدات إسفنجية Pads قطرها 47 ملليمتر.
- محلول M-Endo Culture Media حقن 2 ملليلتر
- محلول M-FC حقن 2 ملليلتر.

الميكروسكوب والميزان الحساس

- حامض روزالك Rosalic Acid.
- ملح كلوريد الماغنسيوم $MgCl_2$.
- ملح ثيوسلفات الصوديوم $Na_2S_2O_3$.
- هيدروكسيد الصوديوم NaOH.
- كحول الإيثانول.
- ماء مقطر.

يمكن شراء الأدوات مثل أطباق بتري والمخدات معقمة وجاهزة للعمل بالإضافة إلى محاليل الغذائية معبأة في حقن 2 ملليلتر وربما يكون شراءها ارخص في التكاليف عن تحضيرها في المعمل وتعقيمها.

2.2.2. طريقة تحضير محلول M-Endo Culture Media

- زن 4.8 جـــــــرام من المسحوق.
- في مخبار مدرج سعه 100 ملليلتر أضف 2 ملليلتر كحول الإيثيل المركز 95% وأكمل بالماء المقطر إلى 100 ملليلتر.
- ضع حوالي 20 ملليلتر من محلول الكحول المخفف في الكأس المخروطي ذو السدادة البلاستيكية وأضف إليها ما تم وزنه من مسحوق أم – إندو وابدأ في التحريك والرج.
- أضف الكمية الباقية بالمخبار المدرج من الكحول المخفف وامزج الخليط بشدة.
- ضع الكأس المخروطي ومحتوياته في حمام مائي مع مراعاة ترك الغطاء غير محكم الربط على الكأس وابدأ في رفع درجة الحرارة بدون السماح للمحلول بالغليان.
- استمر في التسخين لمدة تتراوح ما بين 3-5 دقيقة بدون السماح للمحلول بالغليان.
- ابدأ في التبريد لدرجة حرارة 45 °م وقس درجة الأس الهيدروجيني لتكون 7.1-7.3.
- أضف 2 ملليلتر من محلول الوسط الغذائى على المخدات الجاهزة داخل أطباق بتري.
- يمكن الاحتفاظ بالكمية الباقية من المحلول الغذائى في ثلاجة مبردة لدرجة حرارة 2-10°م ولمدة 96 ساعة فقط.

3.2.2. طريقة تحضير محلول M-FC Culture Media

يستعمل هذا المحلول لمستعمرات البكتيريا القولونية البرازية ويمكن تحضيره كما يلي:

- زن 3.7 جرام من مسحوق M-FC اللامائي M-FC Dehydrated Media.
- ضع 100 ملليلتر من الماء المقطر في الدورق المخروطي ذو السدادة البلاستيكية وأضف إليها مسحوق M-FC.
- في دورق آخر قم بإضافة 100 ملليلتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم قوة 0.020 عياري (100 ملليلتر ماء مقطر + 0.8 جرام من مسحوق هيدروكسيد الصوديوم) إلى 1 جرام حامض روزالك Rosalic Acid لتكوين حامض روزالك قوة 1%.
- أضف 1 ملليلتر من محلول حامض روزالك 1% إلى محلول M-FC.
- ابدأ بالتسخين لدرجة الغليان مع ترك غطاء الدورق المخروطى مكشوف.
- ابدأ في تبريد المحلول لدرجة حرارة 45°م واضبط درجة الأس الهيدروجيني 7.4.
- أضف 2 ملليلتر من محلول الوسط الغذائى أطباق بتري ذات الوسادة.
- يمكن الاحتفاظ بالكمية الباقية من محلول الوسط الغذائى في ثلاجة مبردة 2-10 °م ولمدة 96 ساعة فقط.

4.2.2. طريقة تحضير محلول الفوسفات المنظم Phosphate Buffer

يستعمل هذا المحلول في غسل غشاء الترشيح عدة مرات بعد تمام عملية ترشيح العينة وكذلك يستعمل في عمل التخفيف الملائم للعينات عند اللزوم ويمكن تحضيره كما يلي:

محلول رقم (1):

قم بتذويب 34 جرام من ثنائي فوسفات البوتاسيوم (KH_2PO_4) Potassium Dehydrogenate Phosphate في 500 ملليلتر ماء مقطر ثم اضبط الرقم الهيدروجيني إلى 7.2 وبعد ذلك أكمل حجم المحلول إلى 1 لتر بواسطة إضافة كمية من الماء المقطر ثم ضع هذا المحلول في الثلاجة وعند إعادة استخدامه لاحظ وجود أي عكارة، وفي حالة وجود العكارة لا يستعمل.

محلول رقم (2):

قم بتذويب 38 جرام من كلوريد الماغنسيوم اللامائي أو 81.4 جرام من كلوريد الماغنسيوم المائي في لتر من الماء المقطر.

محلول الغسيل أو التخفيف:

اخلط 1.35 ملليلتر من محلول رقم (1) مع 5 ملليلتر من محلول رقم (2) وأكمل الحجم إلى واحد لتر بالماء المقطر وامزج الخليط جيدا ويجب تعقيم المحلول قبل الاستعمال.

5.2.2. طريقة تحضير محلول ثيوكبريتات الصوديوم 3%

يستعمل هذا المحلول لوقف مفعول الكلور الحر وفي قتل البكتيريا عند أخذ العينات للفحص البكتيريولوجي فإذا ترك الكلور الحر في العينة سوف يقتل البكتريا الموجودة ويعطي نتيجة زائفة ويحضر كما يلي:

- زن 3 جرام من ملح ثيوكبريتات الصوديوم.
- قم بتذويب الملح في 25 ملليلتر ثم أكمل المحلول إلى 100 ملليلتر وأحفظ المحلول في زجاجة سعة 125 ملليلتر محكمة الغلق.
- يستعمل هذا المحلول بإضافة 0.1 مل إلى زجاجة عينات سعة 125 ملليلتر ويجب التأكد بأن هذه الكمية كافية لمعادلة الكلور الحر و تعقم الزجاجة بالمحلول قبل ملئها بالعينة.

6.2.2. طـــــــرق التعقيم

كلمة (تعقيم) تعني قتل جميع الجراثيم وفي عمليات الفحص البكتيريولوجي يلزم تعقيم جميع الأدوات والمحاليل قبل القيام بأي تحليل للعينات ومن الأجهزة الأكثر استعمالا في المعامل هي الأوتوكلاف حيث يتم التعقيم بواسطة الحرارة والبخار المضغوط بالإضافة إلى أجهزة تعقيم بالأشعة فوق البنفسجية أو بواسطة الإشعاع.

التعقيم باستعمال الأوتوكلاف:

يستعمل جهاز الأوتوكلاف في التعقيم بواسطة الحرارة الرطبة تحت الضغط، وقبل استخدام جهاز الأوتوكلاف يمكن قتل جميع الكائنات الحية في درجة حرارة 121 °م تحت درجة ضغط 15 رطل على البوصة المربعة في مدة 15 دقيقة ومن المهم ضرورة الالتزام بتعليمات طرق التعقيم حتى لا تعرض بعض محاليل الأوساط الغذائية إلى التحلل وبالأخص البكتيريا مثل اللكتوز في درجات الحرارة العالية أو طول مدة التسخين. وتتلخص طريقة عمل الأوتوكلاف فيما يلي:

- سخن الماء ليعطي بخار.
- يطرد بخار الهواء إلى الخارج.
- تغلق فتحة خروج البخار عند تمام طرد الهواء.

- ارتفاع الحرارة يرفع الضغط إلى 15 رطل على البوصة المربعة وعند هذا الضغط تصبح درجة حرارة البخار 121 °م.
- يحافظ على الضغط والحرارة لمدة من الزمن المحدد وبعد ذلك يبدأ في تصريف البخار ببطيء حتى تصل إلى الضغط الجوي ومن المهم أن نوضح هنا أن التصريف السريع للبخار يسبب غليان السوائل.
- ترفع المواد المعقمة وتترك لتبرد.

- ملحوظة:

يجب ملاحظة أن جميع الأوعية الزجاجية والأدوات التي سيتم تعقيمها تكون ملفوفة في ورق كرافت وأن لا تكون الأغطية على الزجاجات التي تحتوي محاليل محكمة الغلق بل يجب تركها مغطاة بغير إحكام ولا يستعمل إطلاقا أي سدادات من المطاط.

التعقيم بواسطة الغليان:

يمكن تعقيم الأدوات قبل استعمالها بغمرها في ماء مغلي لمدة 10 دقائق وعقب استخراجها من الماء المغلي تغلف في رقائق الألمنيوم الذي تم حرقة في النار ويتم استخدام مثل هذه الأدوات بعد تبريدها.

التعقيم بواسطة الكحول:

يمكن التعقيم بواسطة كحول الإيثيل بتركيز 70%.

المراجع

- **تم الإعداد بمشاركة المشروع الألماني GIZ**
- **و مشاركة السادة :-**

➢ د/ سناء أحمد الإله	شركة مياه الشرب والصرف الصحى بالفيوم
➢ د/ شعبان محمد على	شركة مياه الشرب والصرف الصحى بالفيوم
➢ د/ حمدى عطيه مشالى	شركة مياه الشرب والصرف الصحى بالغربية
➢ د/ سعيد أحمد عباس	شركة مياه الشرب والصرف الصحى بالغربية
➢ د/ عبدالحفيظ السحيمى	شركة مياه الشرب بالقاهرة الكبرى
➢ د/ مى صادق	شركة مياه الشرب بالقاهرة الكبرى

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

للاقتراحات والشكاوى قم بمسح الصورة (QR)