برنامج المسار الوظيفي للعاملين بقطاع مياه الشرب والصرف الصحي

دليل المتدرب

البرنامج التدريبي كيميائي مياه

التحاليل البكتريولوجية للمياه – الدرجة الثالثة

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

الفـهـرس

مقدمة: ٢
الخصائص العامة للبكتيريا: ٣
أشكال البكتيريا ٦
الظروف الملائمة لتكاثر البكتيريا ونموها ٧
تكاثر البكتيريا: ٩
التعقيم Sterilization ١٠
طرق فيزيائية: Physical method ١٠
طرق كيميائية Chemical method : ١١
طرق ميكانيكية Mechanical method: ١١
الأمراض التي يحملها الماء Waterborne Diseases ١٢
التحاليل البكتريولوجية للمياه ١٣
أدوات وأجهزة المعمل الميكروبيولوجي Equipment and Instruments ١٦
المزارع البيكتيرية ٣٧
الأساسيات في مكونات البيئات الغذائية: ٣٨
العوامل التي تؤثر على البيئات الغذائية وتأثيرها على الخصائص المشجعة للنمو ٣٨
البيئات الغذائية Culture media ٣٨
العوامل التى تؤثر على النمو في البيئات الغذائية ٤١
عبوات المزارع البيئية Culture Media ٤٢
تعقيم البيئات ٤٣
استعمال الآجار والمرق Agar and Broths ٤٤
تخزين المزارع البيئة Storage of media ٤٥
التعقيم Sterilization ٤٦
خصائص البيئات Media Specifications ٤٧
مياه التخفيف Dilution Water ٤٧
حفظ وتخزين العينات Preservation and Storage ٤٨
احتياطات الأمان داخل المعمل البكتريولوجى: ٤٩
المعايير الميكروبيولوجية ٥٠

أهداف البرنامج التدريبى

<u>فى نهاية البرنامج التدريبى يكون المتدرب قادر على :-</u>

١ -إلمام المتدرب بالخصائص العامه للبكتريا واشكالها وتكاثرها

٢ -تعريف المتدرب بطرق التعقيم المختلفه

٣ -تعريف المتدرب بالامراض التى يمكن ان تسببها المياه الملوثه

٤ -المام المتدرب بطرق التحاليل البكترولوجيه للمياه

٥ -تعريف المتدرب بالبيئات الغذائيه اللازمه لنمو البكتريا

٦ -المام المتدرب بطرق حفظ وتخزين العينات للتحاليل البكترولوجيه

٧ -إلمام المتدرب باحتياطيات الامان داخل معمل البكترولوجى

مقدمة:

- **ما هي البكتيريا Bacteria(أنواعها وأشكالها):**
- **البكتيريا:** هي مجموعة الكائنات بدائية النواه ، تعامل معها الإنسان دون أن يراها فقد عرف أنها تسبب المرض وأستعمل بعضها في عمليات تخمر مختلفة.
- ولقد كان لإكتشاف الميكروسكوب الأثر الكبير في التعرف عليها.
- أول من اكتشف وجود البكتيريا العالم الكيميائي الفرنسي "باستير" حيث أكتشف البكتيريا الهوائية واللاهوائية من خلال تجاربه على التخمر وأكتشف أيضاً بعض خصائصها وأرتبط أسمه بعملية البسترة لقتل الكائنات الحية المجهرية التي يمكن أن توجد بالسوائل وخاصة الحليب وهي ما عرفت بعملية التعقيم sterilization
- أما العالم الألماني روبرت كوخ فقد أسهم في أكتشاف علاقة البكتيريا بالمرض وأول من عمل مزارع نقية للبكتيريا .Bacterial cultures
- ولقد أرتبط أسم البكتيريا كثيراً بالأمراض التي تسببها للإنسان ولكن الأكتشافات الحديثة والتقدم السريع الذي حدث في العلوم التطبيقية أظهرت أن البكتيريا تلعب دوراً هاماً في كثير من الصناعات الغذائية والدوائية والتخلص من المواد العضوية وغير العضوية وكذلك معالجة مياه الصرف والمعالجة الحيوية لمخلفات المزارع وأستخدامها في إنتاج الطاقة وغاز الميثان.

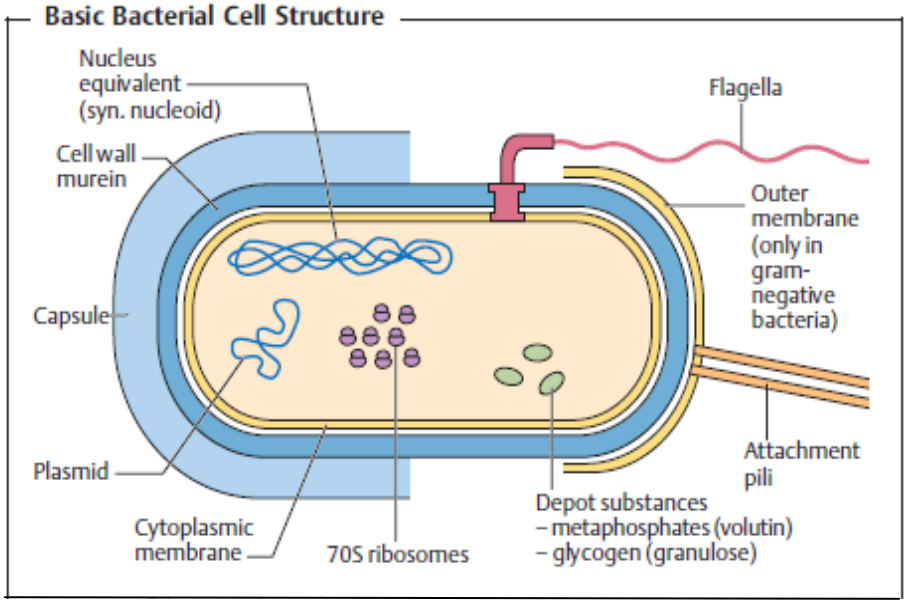
الخصائص العامة للبكتيريا:

١. كائنات دقيقة مجهرية بدائية النواه

٢. تتميز ببساطة التركيب:

إذ تتركب من جدار وغشاء خلويين يحيطان بالسيتوبلازم الذي يحوي كروموسوماً حلقياً واحد DNA ولا يحتوي على بروتين الهستون وقد يحتوي على واحد أو اكثر من جزيئات DNA على شكل دوائر صغيرة تسمى البلازميدات وتتكاثر بصورة مستقلة عن الكروموسوم ، والرايبوسومات وبعض الأجسام التخزينية.

٣. تأتي صلابة جدارها لوجود متعدد الببتيد (ببتيدوجلايكان peptedoglycon) ويكون هذا الجدار متعدد الطبقات في البكتيريا موجبة الجرام Gram positive stain، أو رقيقاً محاطاً بغلاف خارجي مكون من سكريات دهنية وبروتينات في البكتيريا سالبة الجرامGram negative stain



٤. توجد أغلفة خارج الجدار الخلوي مثل الأغمدة – وقد تحاط بعض أنواعها بطبقة مخاطية تسمى المحفظة Capsule تشكل غطاء وتخزن المواد الغذائية وتزيد من قدرة بعض أنواع البكتيريا في إحداث المرض

٥. يختلف حجم الخلية البكتيرية فمنها ما هو متناهي الصغر كما في الميكوبلازما يتراوح قطر الخلية بين ١٠٠–٢٠٠ نانومتر ومنها ما هو كبير قد يصل إلى ٥٠٠ نانومتر كما في بكتيريا القولون العصوية

٦. تتكاثر بالإنشطار الثنائي البسيط

٧. تتغذى على المواد العضوية وغير العضوية تحت الظروف الهوائية واللاهوائية وبعضها ذاتي التغذية Autotroph

٨. 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 سوط في كل قطب أو مجموعة من الأسواط على أحد القطبين أو كلاهما أو قد تحيط الاسواط بجسم الخلية.

٩. 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.

١٠. ولكي تتم رؤية خلايا البكتيريا بوضوح تحت الميكروسكوب فنحتاج إلى إستعمال أصباغ مختلفة وهي:

أ) الأصباغ العادية:

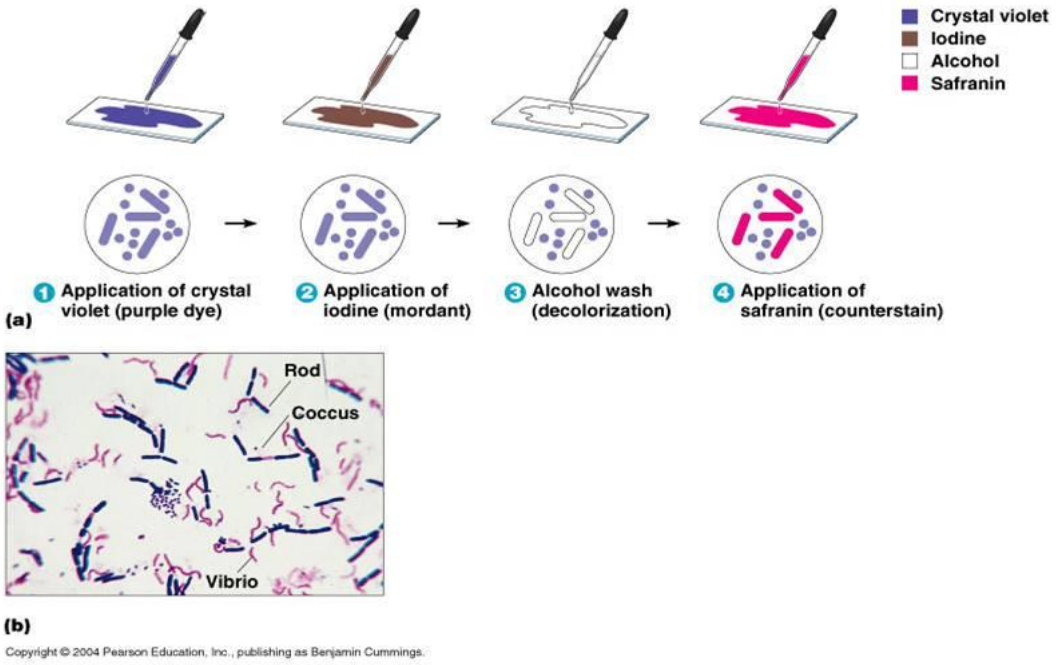
مثل أزرق المثيلين وهو أكثرها استعمالاً تظهر البكتيريا مصبوغة باللون الأزرق

ب) صبغة جرام Gram Stain:

وهي تتلخص في إستعمال صبغتين مختلفتين هما:

البنفسج البلوري Crystal violet والصفرانين Safranin

و. تأخذ بعض أنواع البكتيريا الصبغة البنفسجية فقط وتسمى موجبة لصبغة الجرام. بينما تأخذ أنواع أخرى صبغة الصفرانين وتظهر حمراء أو زهرية وتسمى بكتيريا سالبة لصبغة الغرام وبذلك يمكن تمييز هذين النوعين من البكتيريا وتصنيفها ويعتمد ذلك على تركيب الجدار الخلوي لكل نوع



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

ج) الصبغة المقاومة للحمض acid fast stain: كالمستخدمة في بكتيريا السل.

د) أصباغ خاصة تساعد على إظهار بعض التراكيب الخلوية: مثل الجراثيم ، والأسواط أو المحفظة.

أشكال البكتيريا

أ) **بكتيريا كروية** Cocci :

وقد تكون مفردة أو على شكل سلاسل مثل بكتيريا إلتهاب الرئة أو تجمعات ثنائية أو رباعية أو أكثر بأشكال غير منتظمة

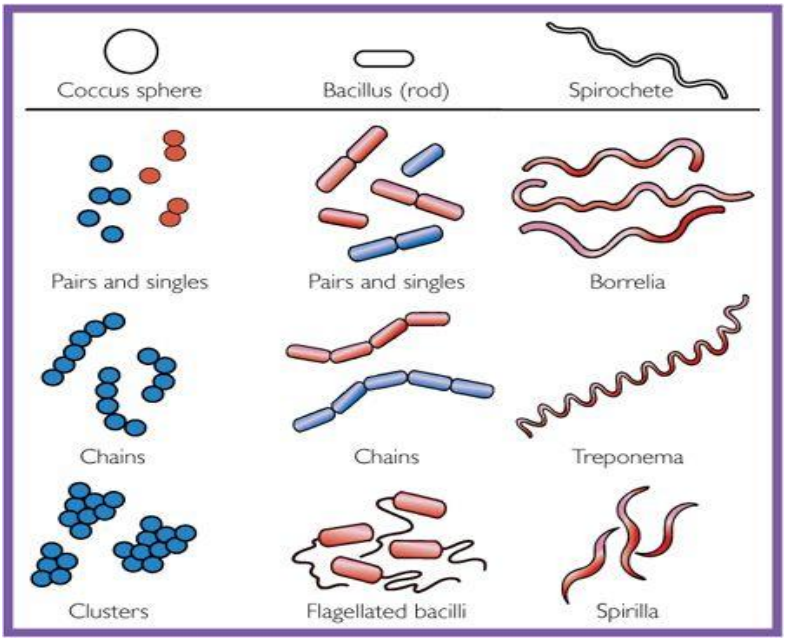
ب) **بكتيريا عصوية** Bacilli :

وقد تكون مفردة أو على شكل سلاسل أو واوية الشكل مثل بكتيريا الكوليرا.

ج) **بكتيريا لولبية**:Spirochete

وهي أكبرها حجماً مثل بكتيريا مرض الزهري.

كما أن هناك العديد من الأشكال المختلفة



الظروف الملائمة لتكاثر البكتيريا ونموها

تتميز البكتيريا بمقدرتها على التأقلم حسب الظروف المحيطة ومما تحتاجه البكتيريا:

1) **الغذاء:**

تقسم البكتيريا حسب طريقة تغذيتها إلى:

أ) **ذاتية التغذية:** Autotroph

حيث تقوم بتجهيز إحتياجاتها الغذائية من عناصر أو مركبات غير عضوية ومنها:

• **ذاتية التغذية الضوئية:** تستخدم الطاقة الشمسية للقيام بعملية البناء الضوئي و من أمثلتها بكتريا اليخضور.

• **ذاتية التغذية الكيمائية:** حيث تستخدم الطاقة الكيميائية الناتجة من أكسدة العناصر والمواد الكيميائية لتثبيت ثاني أكسيد الكربون وبناء إحتياجاتها من المواد العضوية مثل أكسدة النيتروجين أو الكبريت أو مركباتهما مثل بكتريا النتروسوموناس و بكتريا النتروبكتر.

ب) **غير ذاتية التغذية**Heterotroph:

أي عضوية التغذية وتحصل على الطاقة اللازمة لها عن طريق التحليل الكيميائي للمركبات العضوية كالكربوهيدرات والدهون والبروتينات كما يحدث في عملية التخمر (التنفس اللاهوائي) أو إستخدام الأكسجين مباشرة كما في التنفس الهوائي للحصول على الطاقة اللازمة. و من أمثلتها:

البكتيريا الطفيلية: و تحصل على غذائها من الكائنات الحّية الأخرى و كثيرا ما تسبب أمراض خطيرة للأنسان و الحيوان و النبات.

البكتيريا الرمّية: و تحصل على غذاءها من كائنات ميتة أو من بقاياها.

البكتيريا المتكافلة: وهى تعيش متكافلة مع غيرها كما يحدث بين البكتريا العقدية و جذور النباتات البقولية.

2) **الماء:**

يعد الماء وسطاً مناسباً لنشاط البكتيريا وتكاثرها حيث يشكل ٨٠% من كتلتها الخلوية ولذلك فإن عملية التجفيف تساعد في حفظ الغذاء أطول فترة ممكنة حيث لا تتمكن البكتيريا من التكاثر بعيداً عن الرطوبة.

3) **درجة الحرارة:**

تزداد أنشطة البكتيريا الأيضية بإزدياد درجة الحرارة إلى أن تصل إلى حد تعيق فيه نمو البكتيريا فتثبطه "درجة الحرارة العظمى" حيث تؤثر في الأنزيمات والحمض النووي DNA والريبوسومات فتحد من نشاطها وتقتلها أما درجات الحرارة الصغرى فتحد من نمو البكتيريا ونشاطها دون أن تقتلها. وبصفة عامة فإن أغلب الخلايا البكتيرية (غير المتجرثمة) تموت في درجة حرارة (55°C) إما البكتيريا المتجرثمة فإنها تقاوم الحرارة العالية حتى أنها يمكنها أن تظل حية في بعض الأحيان إذا وضعت في ماء يغلي لعدة ساعات.

4) **الرقم الهيدروجيني: (pH)**

تنمو غالبية أنواع البكتيريا في الوسط المتعادل إلا أن بعضها ينمو في أوساط حمضية فتسمى البكتيريا الحمضية ، وأنواع أخرى تنمو في أوساط قاعدية وتسمى البكتيريا القاعدية.

5) **الأكسجين:**

يمكن تقسيم البكتيريا إلى ثلاثة أنواع رئيسية حسب إحتياجها للأكسجين:

أ. **بكتيريا هوائية:**

تحتاج إلى وجود كمية من الأكسجين كعامل رئيسي في عمليات الأيض والتحول الغذائي لإنتاج الطاقة.

ب. **بكتيريا لاهوائية:**

ويعد الأكسجين ساماً لها – حيث تعتمد في عمليات التنفس اللاهوائية على إختزال مركبات غنية بالأكسجين أما عند وجود الأكسجين فإنه ينتج مواد كيميائية مؤدية إلى تلف أجزاء الخلية وأنزيماتها وتؤدي إلى موتها.

ج. **بكتيريا لاهوائية اختيارية:**

تستطيع العيش بوجود الأكسجين أو عدمه.

6)تأثير المضادات الحيوية والمواد المطهرة:

وجود هذه المواد لها أثر فعّال في تثبيط نمو البكتيريا والقضاء عليها وكذلك بالنسبة للمواد الكيماوية المعقمة antiseptics

٧.) 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 وفى حيويتها فقد دلت التجارب على أن الأشعة فوق البنفسجية ذات أثر فعال في قتل البكتريا.

تكاثر البكتيريا:

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

– تتفاوت سرعة الإنقسام من نوع إلى آخر.

– تتراوح المدة اللازمة لإنقسام الخلية الواحدة بين ٢٠ دقيقة وأكثر من يوم واحد

–يمر نمو الخلايا بمراحل يطلق عليها أطوار النمو وهي:

1. **طور الركود Lag phase:**

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

2. **طور النمو Log (exponential) phase:**

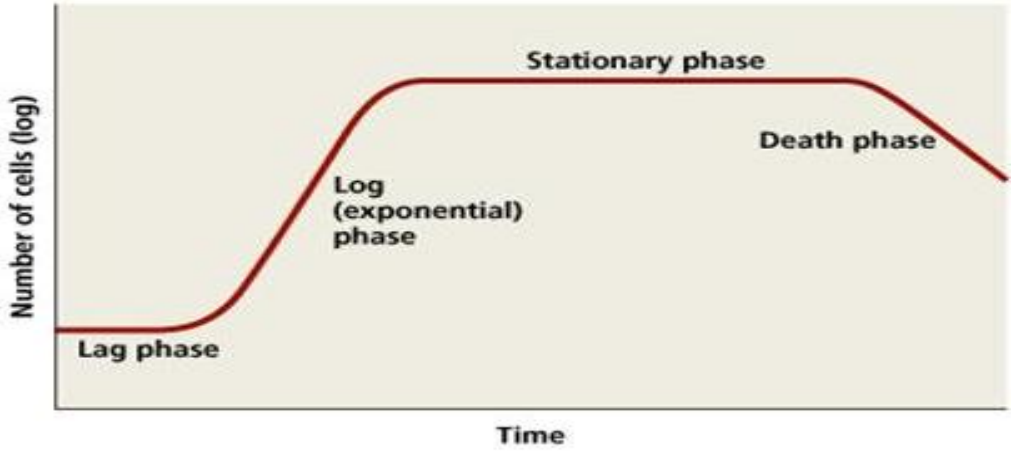
(الطور اللوغاريتمي) وتكون سرعة إنقسام الخلايا بنسب هندسية متصاعدة.

3. **طور التوقف Stationary phase:**

أو الثبات و فيه يكون "عدد الخلايا الناتجة = عدد الخلايا الميتة"

4. **طور الهبوط أو الموت Death phase:**

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



منحنى النمو Growth Curve

التعقيم Sterilization

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

- يوجد ثلاثة طرق للتعقيم هي:

طرق فيزيائية: Physical method

١) التسخين:

١ -التسخين الجاف

- **أفران الهواء الساخن:** تستخدم في تعقيم الأدوات الزجاجية مثل أطباق بترى والماصات والدوراق وأنابيب الإختبار وأفضل درجة حرارة من ١٦٠ إلى ١٨٠°م لمدة ٤ إلى ٥ ساعات.

- **اللهب المباشر:** بإستخدام لهب بنزن لتعقيم أبر التلقيح المصنوعة من البلاتنيوم.
- **لهب الكحول:** يستخدم في تعقيم الأدوات المصنوعة من Stainless steel مثل الملاقط forcipes أو القواطع cutters حيث يغمر في الآيثانول ثم يعرض للهب.

٢ -**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 وإعدام المزارع البكتيرية القديمة قبل التخلص منها.

٣ -**الإشعاع:**

بإستخدام الأشعة فوق البنفسجية من ٢٦٠٠ إلى ٢٧٠٠ انجستروم ($Å=10^{-7}mm$) بإستخدام مصباح معين وتستخدم طريقة الإشعاع في تعقيم المعامل و غرف العمليات.

طرق كيميائية Chemical method :

بإستخدام مواد كيميائية:

١. **الآيثانول:** بتركيز ٥٠ – ٧٠ % لتعقيم الأيدى.
٢. **الفينول:** بتركيز ٢– ٥ % لتعقيم البنشات وأرضية المعامل والمستشفيات.
٣. **الديتول:** بتركيز ٢– ٥ % لتعقيم البنشات والأسطح.

طرق ميكانيكية Mechanical method:

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 ٠,٠١ إلى ٤ ميكرون تمنع مرور الكائنات الدقيقة من خلالها.

الأمراض التي يحملها الماء Waterborne Diseases

ومن بين الأمراض الشائعة التي يحملها الماء التيفود، والكوليرا، والزحار/ الدوسنتاريا، والنزلات المعوية ، والإلتهاب الكبدي الوبائي.

وتنشأ هذه الأمراض عندما تدخل الإخراجات البشرية والحيوانية إمدادات المياه وتلوثها.

وكثير من الأمراض التي يحملها الماء هي أمراض إسهال، بما في ذلك الكريبتوسبوريديوسيس و الجيارديا سيس.

الإضطرابات المعوية تسببها الكائنات أحادية الخلايا الكريبتوسبوريديوم والجيارديات، وهي طفيليات مجهرية تعيش في الماء.

وعلاوة على الإسهال الحاد، قد تسبب هذه الأمراض أيضا الحمى، والتقلصات، والغثيان، وفقدان الوزن، والجفاف.

ويمكن أن تشكل هذه الأمراض خطرا على حياة من هم مرضي بالفعل أو أشخاص مثل الأطفال أو كبار السن، قد تكون أجهزة المناعة لديهم ضعيفة.

الكوليرا إحدى الأمراض التي يحملها الماء، تسببها بكتيريا تتسبب في تفشي مشاكل صحية وبائية في كثير من العالم النامي لا سيما في آسيا وأفريقيا.

ويمكن أن تسبب الكوليرا إسهالا مميتا، ورغم أن الكثير من الأشخاص ينجون من الإصابة، فإن خطرها يكون بالغ الخطورة بالنسبة للمصابين بسوء التغذية.

التيفود مرض يحمله الماء يصيب نحو ١٧ مليون شخص كل سنة، وينجم عن بكتيريا مسببة للمرض تصيب الجهاز المعوي والدورة الدموية للمصاب.

ومن بين أعراض التيفود الحمى الحادة، التوعك، الصداع، الإمساك، أو الإسهال، وبقع بالصدر، وتضخم الكبد والطحال.

ويتفشى التيفود عن طريق الإخراجات البشرية، والمياه الملوثة بالمخلفات في المناطق التي لا تتوفر فيها سلوكيات الصحة العامة الوقائية.

التحاليل البكتريولوجية للمياه

- الهدف الأساسي من الإختبارات الميكروبيولوجية لمياه الشرب هو الوقوف على نوعية المياه وتأكيد خلوها من مسببات الأمراض لتوفير الحماية الصحية للمستهلك.
- قد تحتوي المياه الغير معالجة أو المعالجة بطرق غير كافية على كائنات دقيقة مسببة لكثير من الأمراض، ويستغرق الكشف عن هذه المسببات المرضية البكتيرية والتي تسبب أمراضا مثل الدوسنتاريا الباسيلية والتيفويد وغير ذلك وقتا طويلا وتحتاج لمجهود أكثر حيث تتطلب أختبارات كثيرة.
- لذا يستعاض عن الكشف عن تلك المسببات المرضية سواء كانت فيروسية بكتيرية أو طفيلية والتي قد يحتمل وجودها في الماء بالكشف عن وجود الدلائل البكتيرية Indicators مثل العد الكلي البكتيري عند درجتي حرارة ٣٥ °م – ٣٧°م، ٢٠°م – ٢٢°م – وبكتيريا القولون الكلية وبكتريا القولون البرازية وكذلك E Coli والبكتريا السبحية البرازية.

- **الصفات العامة للدليل المثالي:**

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

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

٣. يجب ألا تتكاثر (تتضاعف) في المياه الطبيعية.

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

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

٦. مدي أستجابتها لعمليات المعالجة يجب أن يكون أكثر مقاومة من أستجابة الميكروبات المرضية المعوية.

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

لذلك نعتمد على نظام وجود أو عدم وجود عدة دلائل بكتريولوجية لتحديد نوعية وجودة المياه ومدي درجة تلوثها وخطورتها على الصحة العامة.

- **وعموما تقسم الدلائل البكتريولوجية إلى:**

١ – دلائل كفاءة عمليات المعالجة Process Indicators:

- العد الكلي البكتيري (Heterotrophic Plate Count)
- بكتريا القولون الكلية Total coliforms

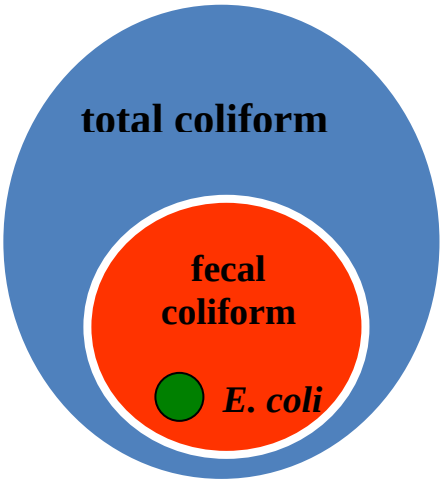
٢ – دلائل تدل على نوعية المياه بصفة عامة General Indicators:

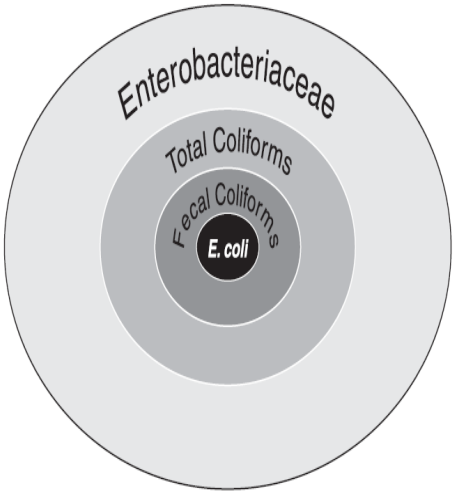
- العد الكلي البكتيري. Heterotrophic Plate Count
- بكتريا القولون الكلية. Total coliforms

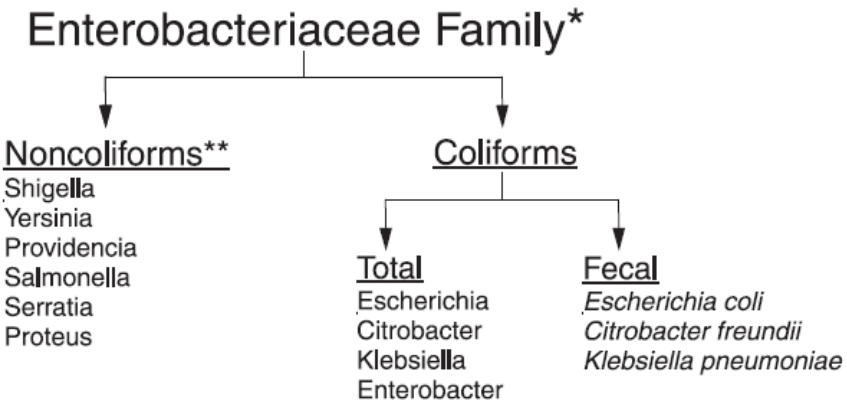
٣ – دلائل تدل على التلوث االبرازي في المياه Fecal Pollution:

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

وتعتبر الـ Escherichia Coli مؤشر جيد لوجود أو غياب بكتريا Salmonella أو Shigella في المياه.





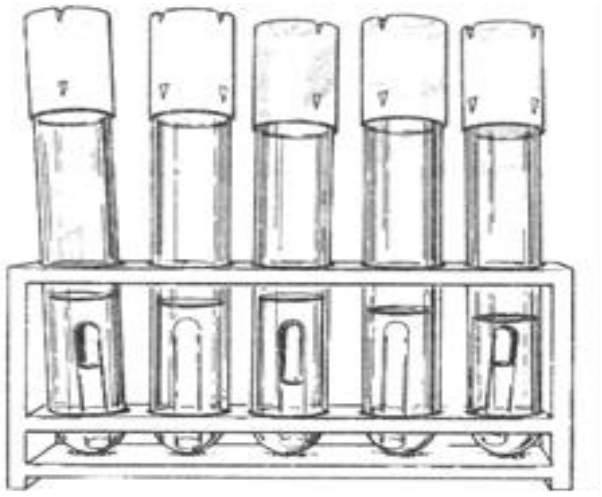


وعلى ذلك فهناك طريقتان قياسيتان للإختبار والكشف عن بكتريا المجموعة القولونيه (دليل التلوث):

١. إختبار أنابيب التخمر المتعددة: Most Probable Number – MPN

و يعبر عن نتيجتها ليس في صورة أعداد مطلقة ولكن كدليل للعدد الأكثر أحتمالا (Most Probable Number (MPN) Index).

وهو دليل لعدد بكتريا القولون الأكثر أحتمالا عن أي عدد آخر، وهو ليس عدد فعلى ناتج عن تنمية البكتريا.



إختبار أنابيب التخمر المتعددة

٢. طرق الزراعة المباشرة مثل الفلتر الغشائى: Membrane Filter – MF

وعلى العكس فإنها تسمح بالحصول على عدد مباشر لمستعمرات بكتريا القولون.

- وفي كلتا الطريقتين تسجل كثافة بكتريا القولون إصطلاحيا كعدد أكثر إحتمالا MPN أو عدد مطلق بالمرشحات الغشائية / ١٠٠ مل، على أن أستخدام أي من الطريقتين يسمح بتقييم نوعية المياه وتقدير كفاءة عمليات المعالجة.
- وتستخدم البكتريا السبحية البرازية Fecal Streptococci هي الأخرى ككشاف أو دليل على التلوث البرازي ويتم عدها بطريقتي العدد الأكثر أحتمالا و الترشيح الغشائي.
- ربما يقدر عدد البكتريا الهتيروتروفية Heterotrophic Plate Count بطريقة الأطباق المصبوبة Pour plate، والفرد على الأطباق Spread plate، أو المرشحات الغشائية Membrane filter، وهى تعطى أعداد تقريبية لكل البكتريا الحية(البكتريا العادية الكلية) والتي ربما تعطى تفاصيل قيمه عن نوعية المياه وربما تعطى بيانات مدعمة عن مغزى نتائج إختبار بكتريا القولون.

أدوات وأجهزة المعمل الميكروبيولوجي Equipment and Instruments

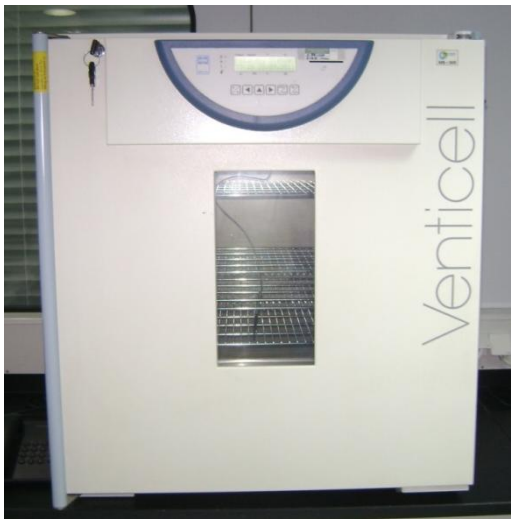
١.الحضانات Incubators

- يجب أن توفر الحضانات حرارة متجانسة وثابتة على طول الوقت في جميع الأجزاء والتي لا يجب أن تختلف أكثر من ±٠,٥ °م.
- تزود الحضانات بأرفف من السلك المفتوح أو ألواح مثقبة بينها مسافات لضمان أنتظام الحرارة خلال الغرفة.
- تترك مسافة ٢,٥ 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 ماء أو جليسرين إلى علامة الساق، ولأفضل النتائج يستعمل ترمومتر متصل بمسجل مع نظام إنذار.
- ويجب أن توضع الحضانة في منطقة حرارتها ما بين ١٦ إلى ٢٧°م.

٢.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 (١٧٠ ± ١٠ °م) وتكون مزودة بترمومتر مناسب.
- يختبر الأداء كل ٣ شهور بإستخدام المتاح سواء شريط الجراثيم أو معلق الجراثيم

Spore strips or spore suspensions (Bacillus.subtilis)

- وتراقب درجة الحرارة بترمومتر دقيق عند مجال ١٦٠–١٨٠ °م وتسجل النتائج.
- وتستعمل أشرطة بيان الحرارة Heat–indicating tape لبيان صحة عملية التعقيم لأي مواد تعرض لحرارة التعقيم.

٣.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 ١٢١ °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 ٣٠ 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).

٤. أجهزة العد البصرية Optical Counting Equipment

أ. للأطباق المصبوبة أو المفرود عليها:Pour and spread plates

- يستخدم جهاز لعد المستعمرات من نوع Dark–fields، يوفر١،٥ مرة تكبير طبيعي مع وضوح الرؤية والإضاءة الكافية.

ب. للمرشحات الغشائية Membrane filters:

- يستخدم ميكروسكوب Binocular بقوة تكبير ١٠ – ١٥ مرة و يمكن توفير مصدر ضوء فلورسنت بزاوية ٦٠ إلى ٨٠ درجة أعلى المستعمرات، وإستخدام الإضاءة بزاوية منخفضة للمستعمرات الغير ملونة.

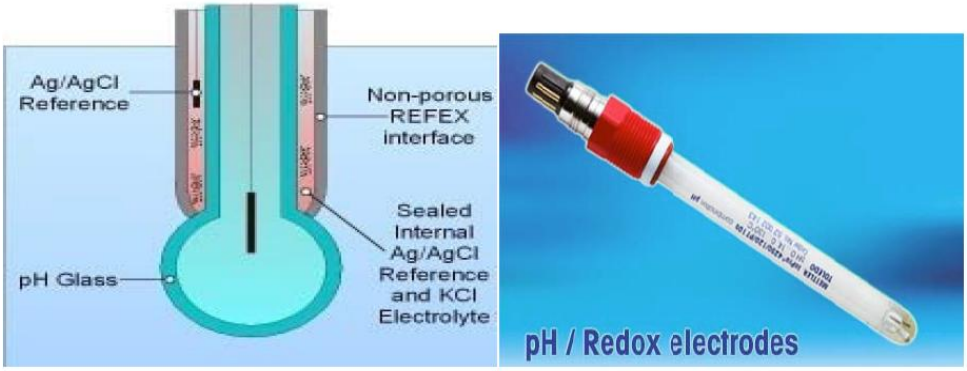
ج- أجهزة الحصر Tally equipment: لا تستخدم عدادات المستعمرات التلقائية Automatic colony counters عند تحديد العد لأغراض الأمتثال Compliance purposes أو عند تعداد الأطباق المصبوبة، التي تحتوي عادة على مستعمرات دقيقة مغمورة في الأوساط الغذائية الشفافة الملونة.

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

٥. جهاز قياس تركيز أيون الأيدروجين pH Equipment

جهاز قياس الأس الأيدروجينى

- أستعمل جهاز كهربي لقياس تركيز أيون الأيدروجين، دقته على الأقل ٠،١ وحدة pH لتقدير قيم الـ pH للبيئات الغذائية ويحتوي على تعويض تلقائي لدرجة الحرارة.
- يستخدم القطب المناسب appropriate probes لتقدير الـ pH للسوائل ومزارع الآجار الصلبة.



أقطاب قياس الأس الأيدروجينى

- يستعمل قبل كل سلسلة من الإختبارات محلول قياسي من محلولين منظم Standard buffers عند pH ٤ ، ٧ أو ١٠ وتعوض أو تكافيء الحرارة.
- يكتب على المحاليل المنظمة Standard buffers التي تم فتحها تاريخ الفتح وتضبط شهريا بإستعمال جهاز آخر لقياس pH.

- ويفضل إستخدام pH meter رقمي Digital

٦. الموازين Balances

الميزان الإليكترونى والميزان علوي التحميل

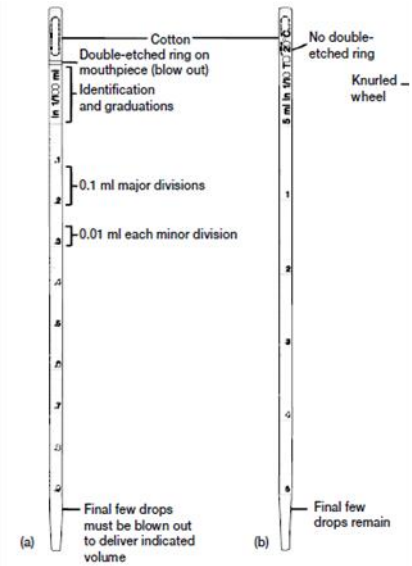
- يستعمل ميزان يمكن أن يوفر حساسية ٠,١ جرام على الأقل عند أحمال ١٥٠ جرام.
- استعمل ميزان حساس Analytical balance له حساسية ١ ملجم عند حمل ١٠ جرام لوزن كميات بسيطة (أقل من ٢ جرام) من المواد.
- والميزان ذو الكفة الواحدة هوالأكثر ملاءمة.
- يلزم إجراء الخدمة الروتينية والمعايرة سنويا أو أطول حسب تغير الحالة آو حدوث مشاكل وذلك بواسطة فنى من قبل المصنع.
- 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.

٧. 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 البيئة.

٨. الماصات و الماصات الدقيقة والمخابير المدرجة:

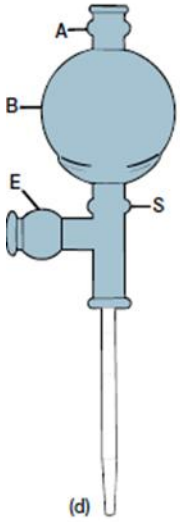
(Pipets, Micropipets, and Graduated Cylinders)



الماصات (Micropipets)

- استعمل ماصات بأي حجم مناسب، بحيث يمكنها أن تمدك بالحجم المطلوب بدقة وبسرعة.
- خطأ التدريج لا يجب أن يزيد عن ٢،٥ %.
- 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.

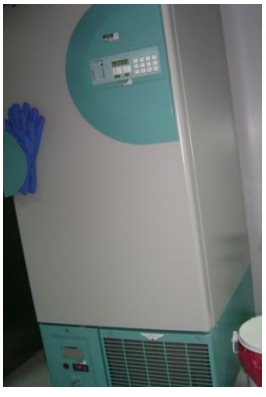
٩. علب الماصات Pipette Cans

- استعمل علب من الألومنيوم أو الاستنلس ستيل، مقاسها من ٥ الى ٧،٥ سم، اسطوانية أو مستديرة وطولها حوالي ٤٠ 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.

١٠. الثلاجات Refrigerators

- استعمل ثلاجة توفر درجة حرارة بين ٢ – ٨ درجة مئوية لتخزين البيئات، والعينات، والأدلة وغيرها.
- لا تحفظ المذيبات المتطايرة، أغذية، أو مشروبات 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 كل ٣ شهور.

١١. الفريزر Freezer



- وسيتم تحديد مدى درجة حرارة الفريزر بواسطة الإحتياجات التحليلية ، على سبيل المثال، لتخزين المزارع.
- قد يكون مدى فريزر المختبر القياسي من (−١٠ إلى −٢٠ درجة مئوية ± ٥ °م) إلى درجة حرارة منخفضة للغاية مثل (−٧٠ إلى −٩٠ °م).
- تراقب درجة حرارة هذه الوحدات، يختبر وتسجل الحرارة يوميا، ومن الأفضل إستخدام ترمومتر بمسجل مع نظام إنذار Alarm.
- ويصنف ويكتب التاريخ على المواد المخزنة،
- ويسال الثلج المتكون وينظف الفريزر كل ٦ شهور.
- ويتم التخلص من المواد التي تخطت فترة التخزين.

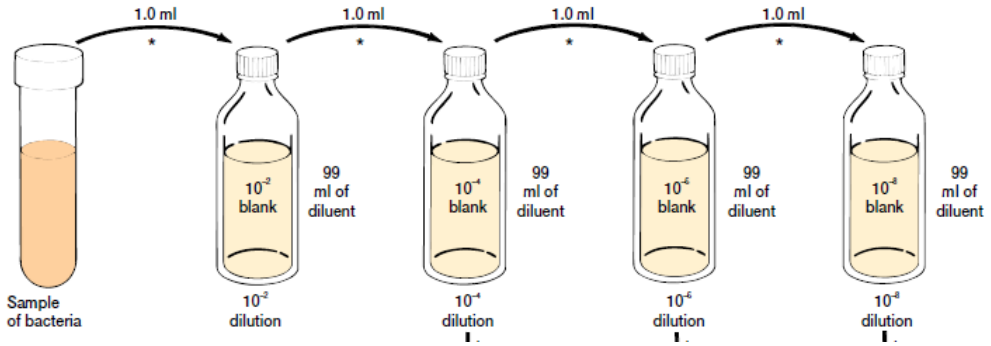
١٢. وسائل مراقبة وتسجيل الحرارة Temperature-Monitoring Devices

- تستعمل ترمومترات زجاجية أو معدنية مدرجة إلي ٠،٥ °م لمراقبة الحضانات والثلاجات.

ترمومتر Data Logger

- تستعمل ترمومترات تدريجها ٠،١ °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.

١٣. زجاجيات أو أنابيب التخفيف Dilution Bottles



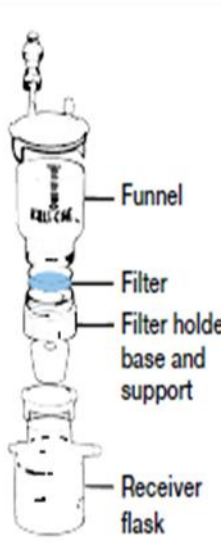
- أستعمل زجاجات أو أنابيب من زجاج مقاوم، يفضل البوروسليكات تغلق بغطاء زجاجي مسنفر أو غطاء قلاووظ مزود ببطانة لا ينتج عنها بالتعقيم مركبات سامة أو معوقة لنمو البكتريا.
- لا تستعمل سدادات القطن.
- يجب أن تكون مستويات التدريج على جدران أنابيب التخفيف غير قابلة للمحو، وتأكد من دقة التدريج بالمستوى المطلوب.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

١٤. أطباق بترى Petri Dishes

- أستعمل للعد البكتيري أطباق بتري زجاجية أو بلاستيكية (١٠٠ x ١٥ مم) أو (١٥٠x٢٠ مم).

- 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 (٦٠ X ١٥ مم) ذات غطاء حر أو ذات غطاء محكم (٥٠ X ١٢ مم).
- عقم الأطباق وأحتفظ بها في علب معدنية (ألومنيوم أو استنلس ستيل ولكن ليست نحاسية) ، أو لفها في ورق كرافت (Kraft) قبل التعقيم.

١٥. جهاز الترشيح الغشائي Membrane filtration equipment



جهاز الترشيح الغشائي

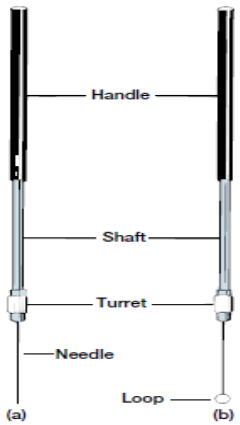
- استعمل قمع ترشيح وحامل المرشح مصنوع من ستانلس ستيل الغير ملحوم، أو الزجاج، أو بلاستيك القابل للتعقيم في الأوتوكلاف ، ولا يسرب وغير معرض للتآكل.
- يمكن أستعمال أجهزة خارج المعمل Field laboratory kits،
- ويستخدم في المعمل أجهزة الترشيح والطرق القياسية.
- يركب الجهاز قبل الإستعمال، ويختبر للتسرب، وتستبعد 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.

١٦.أنابيب التخمر و الدراهم Fermentation Tubes and Vials

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

١٧.معدات التلقيح Inoculating Equipment

- استعمل لوب من السلك ٢٢ أو ٢٤ من سبيكة نيكل كروم أو بلاتين للتعقيم باللهب.
- استعمل لوب ذات قطر ٣ 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 (٠،٢ – ٠،٣ سم) ، و أطول من الأنبوبة على الأقل بمقدار ٢,٥ 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.

١٨.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 الأوعية الزجاجية ذات الغطاء المسنفر، ذات الفوهة الواسعة والمصنوعة من الزجاج المقاوم، والأوعية 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، 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.
- قبل التعقيم، غط قمة ورقبة زجاجة العينة والتي لها غطاء زجاجي برقائق الألومنيوم أو ورق كرافت سميك.

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

٢٠. كابينة الأمان Laminar Flow Hoods/Biological Safety Cabinets

- يتم شراء وحدات مصممة لتلبية الإحتياجات التحليلية.
- في وحدات التدفق Laminar–flow يتدفق الهواء إلى الخارج وفي إحدى الإتجاه unidirectional air flow يهب الهواء المعقم نحو المشغل.

- وهذه الوحدات لا تحمي البيئة ما لم يتم تثبيت مرشحات عوادم.
- وتصنف كابينة الأمان البيولوجية (BSCS) Biological Safety Cabinets وفقا لدرجة الحماية لكل من الفني والنشاط الميكروبيولوجي والبيئة.
- خزانات Class I cabinets لديها نظام تدفق الهواء إلى الداخل ويتم فلترة العادم.
- وتحتوي الـ BSCS المتبقية على فلاتر HEPA في أنظمة دخول وخروج الهواء على حد سواء.
- ولكن تتطلب الدرجة الثالثة Class III كمية دخول هواء أكبر ولديها وجهة مغلقة تماما مزودة بقفازات.
- تعقم جميع الوحدات بعد كل استخدام، ويتم التحقق من تدفق الهواء شهريا، وصيانته وحدات سنويا.
- وتعرض شهريا لأطباق من الآجار Plate count agar للهواء المنساب من الكابينة لمدة ساعة، وتحضن الأطباق عند ٣٥ °م لمدة ٤٨ ساعة ويختبر التلوث (لا نمو على البيئة إذا كانت الكابينة تعمل جيدا).
- يفك لمبات الأشعة الفوق بنفسجية وتنظف شهريا بقماش مبلل بكحول الإيثانول. ويكشف عن كفاءة اللمبات بقياس قوة الإشعاع الناتج كما هو مبين سابق.

٢١.لمبات التعقيم بالأشعة الفوق بنفسجية Ultraviolet Lights

- يمكن أستخدام لمبات التعقيم بالأشعة الفوق بنفسجية (254–nm) UV lights للأغراض الصحية ولتقليل تلوث الحامض النووي.

- وتستخدم لمبات التعقيم بالأشعة الفوق بنفسجية طويلة الموجات Long-wave UV lights (365-366-nm) لأكتشاف الفلوروسينت للطرق الأنزيمية.
- تفك الوحدة شهريا وتنظف اللمبات بإستعمال قطعة قماش مبللة بكحول الإيثانول، وتختبر اللمبة شهريا بجهاز قياس الأشعة الفوق بنفسجية، وتستبدل إذا كانت تشع أقل من ٧٠% من أصل قوتها أو إذا عرضت لها مياه ذات محتوى من الكائنات الدقيقة يتراوح بين ٢٠٠ – ٢٥٠ مستعمرة ولم يتم خفضها بواقع ٩٩% خلال دقيقتين من التعرض للأشعة.

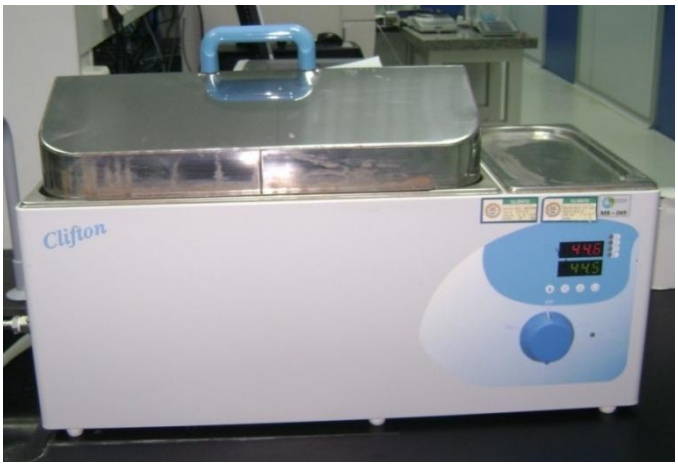
تحذير: على الرغم أن الأشعة فوق البنفسجية ذات الموجات القصيرة (٢٥٤ نانومتر) معروف أنها أكثر خطورة من تلك ذات الموجات الطويلة (٣٦٥ نانومتر)، كلا النوعين يمكن أن يضر العين والجلد وهى مسرطنه قويه (Schmitz et al., 1994). احم عينيك والجلد من التعرض للأشعة الفوق بنفسجية.

٢٢.وسائل توزيع البيئات Media and Solution Dispensers

- تضبط دقة الحجوم الموزعة بوحدة التوزيع بإستخدام مخبار مدرج 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.

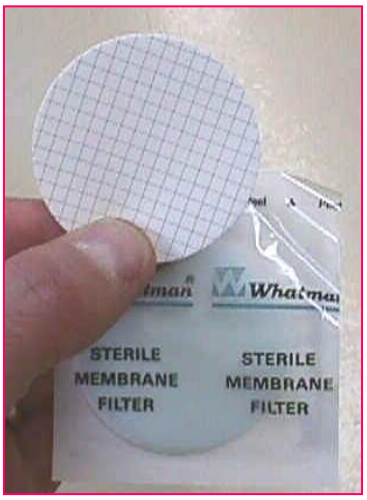
- ومع نهاية العمل اليومي، يتم فك الجهاز إلى أجزاء، ويغسل، ويشطف بمياه من نوعية Reagent water ويجفف، وتشحم Lubricate الأجزاء طبقا لتعليمات المصنع أو على الأقل مرة كل شهر.

٢٣.حضانة الحمام المائي Water bath incubator



- يتم التأكد من أن حضانة الحمام المائي تعطى حرارة الإختبارات عند درجة ٣٥ ± ٠،٥°م أو ٤٤،٥ ± ٠،٢ °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.

٢٤.المرشحات الغشائية والوسائد Membrane filters and pads



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

- قطر المرشح (الفلتر) ٤٧ مم، وقطر الثقوب ٠،٤٥ ميكرون، ويجب أن تكون الثقوب على الأقل ٧٠ % من مساحة المرشح.
- وعندما تطفو المرشحات على Reagent water ، تنتشر المياه بإنتظام خلال المرشحات خلال ١٥ ثانية بدون مناطق جافة على المرشحات.
- يجب أن تكون معدلات الإنسياب Flow rates خلال المرشحات على الأقل ٥٥ مل/الدقيقة/سم^{٣} عند ٢٥ °م والضغط التفاضلي Differential pressure يعادل ٩٣ 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 ٩٠ % على الأقل من المتوسط الحسابي للعدد على خمسة أطباق معدة بطريقة الفرد السطحي Spread plates وبإستعمال نفس الحجم من العينة وبيئة الآجار.
- أن تحجز المرشحات الكائنات من ١٠٠ مل من معلق بكتيريا Serratia marcesens يحتوى على ٣١٠ خلية.

- ألا يزيد المستخلص المائي للمرشح عن ٢,٥ % بعد غليان المرشح في ١٠٠ ملل ماء لمدة ٢٠ دقيقة، ويجفف، ويبرد، ويصل إلى وزن ثابت.
- قطر الوسادة الماصة Absorbent pad ٤٧ مم، والسمك ٠،٨ مم، وقدرة الامتصاص ٢ ± ٠،٢ مل من مرق الأندو Endo broth.
- تخرج الوسائد Pads أقل من ١ ملجم من الحموضة الكلية مقدرة على صورة كربونات كالسيوم $CaCO_3$ عندما تعادل بإستخدام ٠،٠٢N من الصودا الكاوية NaOH مع الفينول فيثالين – Phenolphthalein.
- إذا كان المرشح والوسادة الماصة غير معقمة يجب أن لا تتحلل بالتعقيم عند ١٢١ °م لمدة ١٠ دقائق. أكد التعقيم بغياب النمو عند وضع المرشح والوسادة مشبعة بمرق أو آجار مستخلص التربتون جلوكوز Tryptone glucose extract والتحضين على ٣٥ °م لمدة ٢٤ ساعة.

٤. التعقيم Sterilization

- عقم الأدوات الزجاجية، عدا إذا كانت في آنية معدنية، لمدة لا تقل عن ساعة عند درجة ١٧٠ °م، وإذا كانت الحرارة متماثلة في الفرن عندئذ يمكن أستعمال ١٦٠ °م.
- إذا كانت الأدوات الزجاجية محفوظة في علب معدنية تعقم عند ١٧٠ °م لمدة ساعتين.
- عقم زجاجات العينات الغير مصنعة من البلاستيك في الأوتوكلاف عند ١٢١ °م لمدة ١٥ دقيقة.
- في حالة الأوعية البلاستيكية أفتح الغطاء قليلا ولا تنزعه قبل التعقيم في الأوتوكلاف لمنع تشوهها.

٢٥.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.

المزارع البكتيرية

زراعة الكائنات الدقيقة تعتمد أساسا على عوامل هامة:

١ -المواد الغذائية القابلة للإستخدام.

٢ -توفر الرطوبة اللازمة للنمو.

٣ -توفر الأكسجين أو الظروف اللاهوائية (غازات أخري) التي يحتاجها الميكروب لنموه.

٤ -أستخدام درجة الحرارة المناسبة درجة الحموضة pH المناسبة للنمو.

٥ -منع التلوث للبيئة أي تكون معقمة.

الأساسيات في مكونات البيئات الغذائية:

١ – مصدر كربوني للحصول على الطاقة مثل المواد الكربوهيدراتية سكر الجلوكوز والمالتوز واللاكتوز....

٢ – مصدر نتروجين مثل الببتون ومشتقاته.

٣ – مصدر للفوسفات والكبريت: الفوسفور يستخدم في تخليق نيكلوتيز ونيكلوسيد والأحماض النووية والفوسفولبيدات والكبريت لتكوين الأحماض الأمينية الكبريتية.

٤ – الأملاح المعدنية مثل الصوديوم والبوتاسيوم والمغنسيوم والكالسيوم وأيون الفوسفور وبعض المعادن بكمية ضئيلة جدا مثل الزنك وغيره والمنجنيز والتي تستخدم في نمو البكتريا.

٥ – الماء عنصر مهم لتكوين البروتوبلاست للخلية البكتيرية الماء الحر يجب أن يكون قابل للإستخدام ونقل المواد الغذائية.

٦ – عوامل النمو مثل الفيتامينات والأحماض الأمينية والقواعد النتروجينية البيورين والبيربمدين.

العوامل التي تؤثر على البيئات الغذائية وتأثيرها على الخصائص المشجعة للنمو

- تعتمد البكتريا قدرتهما على النمو على بعض العوامل الفيزيقية والكيميائية.
- فالنمو يكون أساسا على تكاثر الخلايا البكتيرية وزيادة كثافتها في البيئة الغذائية.
- فإستخدام البيئة المناسبة والمحتوية على مواد غذائية وعوامل النمو التي تشجع زيادة أعداد البكتيرية وكل ذلك معتمد على عوامل أخري تؤثر على النمو في البيئة.

البيئات الغذائية Culture media

البيئة الغذائية:

- هي تلك البيئة 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 مصدر كربوني والتي يحصل عليها من الكربوهيدرات ومصدر آزوتي ويحصل عليه من أملاح الأمونيوم والنترات وبعضها يتطلب آزوت عضوي ويفضل إستخدام الببتون.
- وتضاف للبيئة الغذائية أملاح معدنية والماء ومواد النمو الإضافية اللازمة لنمو الأحياء الدقيقة.
- ويجب توفر جميع العوامل الضرورية للنمو كتوفر نسبة الرطوبة وتركيز أيون الهيدروجين pH والضغط الأسموزي والتوتر السطحي وحالة الأكسدة والإختزال.

أنواع البيئات الغذائية		
بيئة غذائية سائلة Nutrient broth تصلح لتنمية أنواع كثيرة من البكتريا الهوائية. (ببتون + مستخلص اللحم) أحيانا يضاف لها مستخلص الخميرة		بيئة الآجار المغذي Nutrient Agar يكون في حالة صلبة في درجة حرارة الغرفة ٢٥°م يمكن إسالته بالتسخين و يستخدم لنمو المستعمرات البكتيرية والخميرة بيئة غذائية سائلة Nutrient broth + آجار 1.5% Agar

تصنف البيئات الغذائية للأنواع التالية:

١ -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.

٢- 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.

٣- البيئات المميز ة للميكروبات Differential Media:

ينتج عن إضافة بعض الأصباغ والمواد الكيماوية مع المنبت الغذائي تغير لبعض أنواع الكائنات المجهرية بعد الزرع و التحضين 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 و يعد ظهور بقعة شفافة حول مستعمرة البكتريا هي برهان ثابت على عملية تحلل الدم Blood Hemolysis.

٤- 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.

٥- بيئات عد البكتريا Media for Enumeration of bacterial:

بعض البيئات الغذائية تستخدم لإحصاء العد الكلي البكتيري في المياه.

٦- البيئات المستخدمة لبيان صفات البكتريا Characterization:

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

٧-البيئات الخاصة:

تحضر أنواع من البيئات الغذائية المختلفة لأجل إكثار وعزل والتعرف على أنواع مختلفة من الأحياء المجهرية.

العوامل التى تؤثر على النمو في البيئات الغذائية

١ - درجة الحموضة pH

كل مجموعة من الكائنات لها حدود معينة من الأس الأيدروجينى في نموها ولها حد أمثل لكي تعطي أقصي نمو لها. لذلك يجب ضبط pH للبيئة. وهناك أنواع مختلفة من pH indicator مثل: Thymol blue, Methyl red, phenol red, etc.

كما يجب إضافة أملاح منظمة phosphate buffer.

٢ - جهد الأكسدة والاختزال Oxidation Reduction Potential

- فمثلا تحتاج البكتريا الهوائية للأكسجين واللاهوائية تستخدم الحالات المختزلة (ظروف لا هوائية) وبالتالي غياب الأكسيجين المذاب.

٣ - درجة الحرارة:

- كل عمليات النمو تعتمد على التفاعلات الكيميائية ومستوي هذه التفاعلات تتأثر بدرجة الحرارة وبالتالي يتأثر نمو البكتريا بدرجة الحرارة ولكل نوع من البكتريا يوجد لها حدود من درجات الحرارة وكذلك لها درجة حرارة مثلي.

٤ - الضغط الأسموزي: Osmotic pressure

يؤثر الضغط الأسموزي تأثير مباشر على سرعة واتجاه تيار الماء من الوسط الخارجي والكائن الدقيق وقد يؤثر على مقدار استفادة الكائن من الرطوبة وتحرك المحاليل لداخل الخلية وخارجها مرتبط بالغشاء البلازمي والجدار الخلوي للخلية و تركيز الأملاح خارج الخلية 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.

٥ – الرطوبة Moisture:

- النشاط المائي Water activity

فيكون الماء متوفرا في مصادر البيئات وتعتبر البكتريا من صور الحياة المائية Aquatic forms لأنها تتغذي بالإنتشار الغشائي فيذيب الماء المواد الغذائية اللازمة لها ويحمل نواتج الآيض لخارج الخلية، ويجب المحافظة على رطوبة البرتوبلازم، فالماء يمثل ٧٠-٩٠% من مكونات الخلية، فكمية الرطوبة الحرة هي التي تحدد نمو ومدي نشاط البكتريا وليست كمية الرطوبة الكلية، فالنشاط المائي للماء النقي = ١ ، ثم تقل كلما ارتفع تركيز المواد المترابطة بماء الوسط، والحد الأدنى للنشاط المائي اللازم لنمو البكتريا العادية = ٠,٩١.

عبوات المزارع البيئية Culture Media

- أطلب البيئات بكميات محددة بحيث لا تبقى لديك أكثر من عام.
- استعمل البيئات على أساس أن ما يرد أولا يستعمل أولا.
- إذا كان عمليا ، أطلب البيئات في عبوات (١00 جرام) فهي أفضل من عبوات (500 جرام) للمحافظة على البيئة مغلقة أطول وقت ممكن.
- سجل نوع، كمية، مظهر البيئة الواردة، رقم التشغيلة Lot number، تاريخ التوريد، تاريخ الفتح.
- راجع قائمة الجرد كل ٣ 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، قارن قدرتها على الإسترجاع Recovery لمزرعة نقية حديثة وعينة طبيعية بإستعمال البيئة القديمة وبيئة جديدة (تشغيلة جديد).
- استعمل عبوات البيئات المفتوحة خلال ٦ شهور بعد الفتح وطالما فتحت العبوة احفظها في مجفف Desecrator مباشرة بعد الفتح.

تحضير المزارع البيئية

- 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.
- بعد التحضير والتخزين، تصهر بيئات الآجار في حمام مائى أو تيار بخار.
- راجع pH كل بيئة بعد التعقيم والتبريد.
- راجع pH البيئة المتصلبة بواسطة مجس سطحي Surface probe. سجل النتائج. اجر الضبط البسيط في pH البيئة (أقل من ٠,٥ وحدة) بواسطة محلول صودا كاويه أو حامض هيدروكلوريك طبقا لما هو محدد في تركيب البيئة. إذا كان الفرق في pH البيئة أكبر من ٠،٥ وحدة، أهمل هذه التشغيلة وأعد التحضير.
- قيمة pH البيئة 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.

تعقيم البيئات

- تعرض البيئات لحرارة التعقيم (١٢١ – ١٢٤ °م) أقل وقت محدد للتعقيم.
- لا تعرض البيئات المحتوية على سكريات للحرارة المرتفعة أكثر من ٤٥ دقيقة. مدة التعرض تحدد من وقت دخول الأوتوكلاف إلى وقت خروجها منه.
- اخرج البيئات المعقمة من الأوتوكلاف عقب وصول الضغط إلى الصفر.
- لا تعيد تعقيم البيئة مطلقا.
- التعقيم عند ١٢١ °م لمدة ١٥ دقيقة يقتل الجراثيم، إذا حدث نمو للجراثيم المعالجة بالأوتوكلاف وبعد التحضين في بيئة Trypticase soy broth عند ٥٥ °م لمدة ٤٨ ساعة فإن التعقيم يعتبر غير ناجح.

- عقم المحاليل أو البيئات التي لا تعقم في الأوتوكلاف بالترشيح خلال مرشحات قطر ثقوبها ٠،٢٢ ميكرون بحيث يستقبل الراشح في إناء معقم. رشح ووزع البيئة في كابينة أمان أو Biohazard hood إذا كانت متاحة.
- عقم الأدوات الزجاجية (الماصات، الأطباق، زجاجات العينات) في الأوتوكلاف أو فرن عند ١٧٠ °م لمدة ساعتين.
- هناك أنماط من الأوتوكلاف تعمل أوتوماتيكيا وتشمل الإنزلاق الرأسي ، الغلق المحكم والفتح الأوتوماتيكي بعد انتهاء التعقيم وطبقا لبرنامج يتم ضبطه كذلك هناك إمكانية تتبع التغير في الحرارة والضغط مسجلين طوال فترة التعقيم.
- هناك أيضا إمكانية التبريد السريع من خلال مرور تيار ماء بارد في الأوتوكلاف بعد إنتهاء التعقيم كذلك هناك إمكانية إزالة البخار. إذا توافر التبريد وإزالة البخار في هذه الحالة فإن الألتزام بمدة ٤٥ دقيقة كحد أقصى للتعرض للحرارة المرتفعة لا يلتزم بها.
- عقم الأدوات والأجهزة والمواد الصلبة الأخرى أو المواد الجافة الحساسة للحرارة بالتعريض للإيثيلين أكسيد Ethylene oxide في معقم زجاجي. استعمل شرائط الجراثيم المتاحة تجاريا أو المعلقات من البكتريا لضبط التعقيم.

أستعمال الآجار والمرق Agar and Broths

- يضبط Temper الآجار المنصهر Melted agar في حمام مائي عند ٤٤ – ٤٦ °م حتى وقت الآستعمال ولكن لا يترك في الحمام المائي أكثر من ٣ ساعات.
- لمراقبة حرارة الآجار، عرض زجاجة من الماء لنفس ظروف التسخين والتبريد مثل الآجار. آغمس ترمومتر في زجاجة المراقبة لتقدير متى تصل الحرارة إلى ٤٤ – ٤٦ °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 ١٥ دقيقة على الأقل لمنع التلوث.

تخزين المزارع البيئة Storage of media

- حضر البيئة المعقمة بكميات تستعمل خلال فترة قصيرة، ويفضل تحضير البيئات في نفس يوم استعمالها.
- 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.
- إذا بردت أنابيب بيئة التخمر حتى وقت الأستعمال، حضن الأنابيب قبل الأستعمال حتى لا يكون هناك نتائج إيجابية غير صحيحة. حضر البيئات التي تخزن لمدة أطول من أسبوعين في أنابيب محكمة ذات غطاء قلاووظ لمنع فقد الرطوبة وإذا لم تتوافر تلك النوعية من الأنابيب تستعمل أنابيب عادية وتوضع في أكياس بلاستيكية محكمة الغلق.
- وللكشف عن الفقد في الرطوبة من أنابيب المرق Broth tubes ضع علامة على مستوى البيئة ولاحظ الفقد في الرطوبة. و إذا كان الفقد أكثر من ١٠% استبعد الأنابيب.
- احمي البيئات التي تحتوى على الصبغات من الضوء، إذا تغير اللون استبعد البيئة ولا تستعمل.
- 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.

التعقيم Sterilization

- بعد إذابة البيئة تجزأ وتعقم خلال ساعتين.
- لا تخزن البيئة الغير معقمة.
- عقم البيئات، عدا مرق السكريات في الأوتوكلاف عند ١٢١ °م لمدة ١٥ دقيقة. بعد وصول الحرارة إلى ١٢١°م.
- عند وصول الضغط إلى صفر، افتح الأوتوكلاف واخرج البيئة ، بردها بسرعة لمنع تحلل السكريات مع طول التعرض للحرارة.
- استعمل أوعية صغيرة للبيئة أثناء التعقيم، لتسمح بالتسخين المتماثل وسرعة التبريد.
- عقم مرق السكريات عند ١٢١ °م لمدة ١٢ – ١٥ دقيقة.
- أطول مدة لتعرض مرق السكريات لآي حرارة (من وقت غلق الأوتوكلاف إلى تفريغه) هو ٤٥ دقيقة.
- يفضل استعمال الأوتوكلاف مزدوج الجدار للسماح بالتسخين المبدئي قبل الملأ لخفض الزمن اللازم ليكون في حدود ٤٥ دقيقة المحددة.

الماء

- 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.
- عند استعمال الماء المكثف العائد يستعمل كمغذي للمقطر.
- الأمينات السامة أو مركبات الغلاية الأخرى ربما تتواجد في الماء المقطر.
- ربما يتواجدا 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 التسخين الزائد والسريع للمواد العضوية خلال التقطير، و الرواسب من الأنابيب الجديدة، التراب وأبخرة الكيماويات،
- و ربما يأتى التلوث من تخزين المياه في زجاجات غير نظيفة. خزن الماء المقطر بعيدا عن أشعة الشمس المباشرة لمنع نمو الطحالب.

خصائص البيئات 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.
- مصادر البروتين المعروفة في معظم البيئات مثل الببتون، التربتون، التربتوز إبتكرت بواسطة منشئي Developers البيئات، وربما تظهر البيئات كمنتجات تجارية. ومن الممكن استعمال المواد البديلة أو المشابهة طالما أنها تنتج نتائج مشابهة.

مياه التخفيف Dilution Water

أ. المياه المنظمة Buffered water:

- لتحضير رصيد Stock من الفوسفات المنظم ، أذب ٣٤ جرام بوتاسيوم فوسفات ثنائي الهيدروجين Potassium dihydrogen phosphate ($KH_2 PO_4$) في ٥٠٠ مل ماء مقطر، أضبط pH عند ٧،٢ ± ٠،٥ بواسطة محلول من صودا كاوية (NaOH) (1N) وخفف إلى لتر بماء مقطر.
- أضف ١,٢٥ مل من محلول الفوسفات المنظم و٠,٥ مل من محلول كلوريد ماغنسيوم ($MgCl_2.6H_2O$/L distilled water) (٨١،١ جرام كلوريد مغنسيوم إلى ١ لتر ماء مقطر. وزعها بكميات ٩٩ ± ٢،٠ مل أو ٩ ± ٠،٢ ملل بعد التعقيم في الأوتوكلاف لمدة ١٥ دقيقة.

ب. ماء الببتون:Peptone water

- حضر محلول ١٠ % من الببتون في ماء مقطر.
- خفف حجم معين ليعطى محلول تركيز ٠،١ %.
- أضبط الـpH عند ٦،٨.
- وزع كميات ٩٩ ±٢ مل أو ٩ ± ٠,٢ مل بعد التعقيم لمدة ١٥ دقيقة.
- لا تترك البكتريا في أي ماء تخفيف لمدة أطول من ٣٠ دقيقة على درجة حرارة الغرفة حتى لا يحدث موت أو تكاثر.

حفظ وتخزين العينات Preservation and Storage

- 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 ٦ ساعات.
- اجعل حرارة كل عينات النيل الملوثة و مياه الشرب تحت ١٠ درجة مئوية خلال فترة النقل وأقصاه ٦ ساعات.
- برد هذه العينات في الثلاجة وعند أستلامها في المعمل يتم تحليلها خلال ساعتين.
- عندما تستدعى الظروف المحلية تأخير وصول العينات عن ٦ 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 ٢٤ ساعة.
- في حالة عدم توافر التبريد للعينات الفردية المرسلة عن طريق الجو، أستعمل ترموس، والذى يمكن تعقيمه. سجل الوقت وحرارة التخزين لكل العينات مع الأخذ في الأعتبار التفاصيل في تفسير البيانات والنتائج.

احتياطات الأمان داخل المعمل البكتريولوجى:

١ - الحرص عند أستخدام مواد قابلة للأشتعال أو سامة.

٢ - التعرف على المخاطر المحتملة في الطرق المستخدمة إن وجدت.

٣ - تخصيص مكان ملائم للعمل يستوعب الأجهزة والمعدات ويسمح بسهولة الحركة.

٤ - تخصيص غرفة لجمع وإستلام العينات.

٥ - توضيح التعليمات بالتعامل مع الحوادث الطارئة مثل حدوث حريق.

٦ - عدم تناول مأكولات أو مشروبات داخل المعمل.

٧ - ارتداء المعطف مع إحكام قفل الأزرار.

٨ - ارتداء قفازات بلاستيكية أو مطاطية أثناء العمل.

٩ - عدم سحب السوائل بالفم.

١٠ - عدم وضع الأقلام في الفم.

١١ - المحافظة على نظافة المعمل.

١٢ - التخلص من المزارع القديمة بعد إعدامها في الأوتوكلاف.

١٣ - بعد الانتهاء من العمل يجب تنظيف البنشات وإعادة ترتيب مكان العمل وأخيرا يخلع المعطف وتغسل اليدين بالماء والصابون.

المعايير الميكروبيولوجية

أ – العد الكلى للبكتريا بطريقة الصب بالأطباق :

- هذا العد الكلى للبكتريا لا يمثل كل البكتريا الموجودة بالمياه ولكنه يمثل فقط البكتريا التى تستطيع النمو على الوسط الموجود بالأطباق تحت الظروف المعملية من درجة الحرارة والمدة التى تركت فيها الأطباق داخل الحضانات .
- تستخدم هذه الطريقة لتقييم المحتوى البكتيرى للمياه بصفة عامة .
- العد الكلى للبكتريا يتم فى درجة حرارة ٢٢ ° م لتحديد العد الكلى للبكتريا الموجودة بصورة طبيعية فى المياه وليس لها علاقة بالتلوث الأدمى " البراز " .
- أما العد الكلى للبكتريا فى درجة حرارة ٣٧ ° م يحدد العد الكلى للبكتريا الناتجة من تلوث المياه بالمواد البرازية الأدمية أو من الحيونات (Warm – blooded).
- العد البكتيرى عند درجة حرارة ٢٢ ° م ليس له أهمية من الوجهة الصحية ولكنه هام فى تقييم كفاءة المياه وخاصة خطوات الترويب والترسيب والترشيح والتعقيم حيث أن الهدف هو التخلص من جميع البكتريا إلى أقل عدد ممكن .
- وكذلك يفيد العد الكلى عند درجة ٢٢ ° م فى تقييم نظافة وسلامة شبكة توزيع المياه وملائمة المياه فى تصنيع الأطعمة والمشروبات حيث أن زيادة العد البكتيرى فى المياه يساعد على فساد الأطعمة والمشروبات .
- أية زيادة فى العد البكتيرى عند درجة ٣٧ ° م بالمقارنة بالنتائج السابقه يعتبر إشارة أو إنذار مبكر لبدء تلوث المياه .

المعيار :

١ – عند درجة ٢٢ ° م لمدة ٤٨ ساعة لا يزيد العد الكلى للبكتريا عن ٥٠ خلية / ١سم٣ .

٢ – عند درجة ٣٧ ° م لمدة ٢٤ ساعة لا يزيد العد الكلى للبكتريا عن ٥٠ خلية / ١سم٣ .

ب – أدله التلوث :

١ – بكتريا القولون الكلية :

- هى عصيات سالبة لصبغة الجرام وتنمو على أملاح الصفراء وتخمر سكر اللبن وينتج عنها غاز وحامض عند درجة حرارة ٣٥ ° – ٣٧ ° م خلال ٢٤ – ٤٨ ساعة .
- تم اختيار هذه البكتريا لوجودها في المواد البرازية للإنسان بكثرة ولسهولة الكشف عنها حيث تظل فى المياه لفترات أطول من البكتريا المسببه للأمراض .
- يجب أن تكون هذه البكتريا معدومة فى جميع المياه المعدة للشرب والإستهلاك الأدمى سواء كانت مرشحة ومعالجة أو جوفية .
- وجود هذه البكتريا يعنى :

١ – عدم كفاءة التنقية.

٢ – تلوث المياه بعد إضافة الكلور النهائى أى بعد خروج المياه من طرد العملية .

٣ – أن المياه تحتوى على مواد عضوية أو غير عضوية تساعد على نمو البكتريا وتكاثرها .

- هذا الفحص هام فى تقييم كفاءة خطوات التنقية وسلامة شبكة المياه .
- فى حالة إكتشاف بكتريا القولون الكلية فى المياه وعدم إكتشاف باسيل القولون النموذجى يتم فحص المياه للمؤشرات البكتيريه الأخرى مثل البكتريا السبحية البرازية أو الكلوستريديام بيرفرنجنز .

المعيار :

- يجب أن تكون ٩٥ % من العينات خلال العام خالية من هذه البكتريا فى ١٠٠ سم٣ من العينة.
- الأ تحتوى أى عينة على أكثر من ٣ خلية / ١٠٠ سم٣ ولا تتكرر فى عينتين متتاليتين من نفس المصدر .

٢ – بكتريا القولون البرازية (باسيل القولون النموذجى) :

- بكتريا القولون البرازية هى مجموعة البكتريا التى تستطيع أن تخمر سكر اللبن عند درجة حرارة مرتفعة ٤٤ – ٤٥ °م وتكون غاز وحامض .
- توجد هذه البكتريا فى المواد البرازية للإنسان ضمن المجموعة القولونية بأعداد كثيرة تصل إلى ١٠ ^٩ لكل جرام من المواد البرازية أو فى التربة الملوثة بالمواد البرازية . ووجودها فى المياه يعنى إحتمال وجود مسببات المرض ويعتبر خطرا داهما على الصحة العامة .
- تأكيد وجود بكتريا القولون البرازية فى المياه يحتاج لفحوص معملية إضافية .
- تعتبر الـ E. Coli البكتريا الإساسية لهذه المجموعة وهى توجد فى البراز الأدمى .

المعيار : معدوم فى ١٠٠ سم٣

٣ – البكتريا السبحية البرازية :

- توجد فى البراز الأدمى بأعداد أقل من البكتريا القولونية وباسيل القولون النموذجى .
- لا تتكاثر فى المياه الملوثة وهى أكثر مقاومة للعوامل الخارجية من باسيل القولون النموذجى والمجموعة القولونية .
- تستخدم لتقييم كفاءة خطوات التنقية . ولانها تقاوم الجفاف فإنها تستخدم لتقييم سلامة المياه بعد عمليات الإصلاح والإحلال لشبكات المياه .

المعيار : معدوم فى ١٠٠ سم٣ .

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