شركة الصرف الصحى
للقاهرة الكبرى

شركة المقاولون العرب لتشغيل
وصيانة المرافق والخدمات

مشروع التدريب على أعمال التشغيل والصيانة بمحطتى معالجة مياه الصرف الصحى والرى بحلوان - عقد ٥

الدورة التدريبية عن

مراقبة وضبط الجودة لأعمال التحاليل المعملية لمياه الصرف الصحى

إعداد
كيمونكس مصر للاستشارات

HWWTP8-17(A)

أكتوبر ٢٠١٠

تقديـم

ضمن أعمال برنامج التدريب الفني الذي تنفذه "كيمونكس مصر للاستشارات" لصالح شركة المقـاولون العرب لصيانة وتشغيل الخدمات والمرافق في تطوير أداء العاملين بمشروعات الشركة المتخصصة في المجالات المتنوعة لتشغيل المرافق وخاصة تلك المرتبطة بأعمال التشغيل والصيانة لدى الغير، تـأتي هذه الدورة ضمن خطة التدريب على أعمال التشغيل والصيانة بمحطة معالجة مياه الصرف الـصحي ومحطة الري بحلوان عقد (٥) – شركة الصرف الصحي للقاهرة الكبرى، وذلك بناءًا على الاحتياجات التدريبية للفئات المستهدفة بكلتا المحطتين.

هذا الدورة عن "مراقبة وضبط الجودة وأعمال التحاليل المعملية لمياه الصرف الصحي " تغطي بصورة نتمنى أن تكون كاملة، احتياجات تطوير أداء العاملين فى التشغيل والـصيانة بمحطـة معالجـة ميـاه الصرف الصحى بحلوان كجزء من خطة إنجاز أهداف شركة القاهرة للصرف الصحى من حيث تطبيق نظم فنية مستدامة فى الأداء العام للشركة تراعى مستقبل العمل وحتمية تجديد وتطوير أدواتـه ومـن أهمها العاملين فى مجال التشغيل والصيانة وتحديث إمكانياتهم والاستعداد لذلك بتأهيل وبنـاء قـدرات العاملين بالشركة.

ويتضمن هذا الكتيب محتويات الدورة السابعة عشر من سلسلة الدورات التدريبية التي تقدمها كيمونكس مصر، وهى إحدى الدورات التي يشملها المجال الهندسي والفني.

وتهدف هذه الدورة إلى وضع أسس ضبط الجودة فى أعمال التحاليل المعملية لمنشآت مياه الشرب والصرف الصحى.

يتكون الكتيب من سبعة فصول، يقدم الفصل الأول منها مراقبة وتأكيد جودة النتائج. ويعرض الفصل الثانى ضمان جودة وصلاحية العينة للتحليل. بينما يتناول الفصل الثالث البرنامج العام للمعمل. فى حين يتعرض الفصل الرابع لدقة نتائج التحاليل ويناقش الفصل الخامس كفاءة نتائج التحاليل. ويقدم الفصل

السادس التحليل البكتريولوجى باستخدام طريقة الأنابيب المتعددة. ويتعرض الفصل السابع والأخير للتحليل البكتريولوجى باستخدام طريقة الترشيح الغشائي.

وقد ألحق بموضوعات الدورة ملحقان المحلق الأول للطرق القياسية للتحاليل الكيميائية والبيولوجية. والملحق الثاني للتحاليل الواجب إجراؤها على مياه الصرف فى محطات المعالجة المختلفة.

ونأمل أن يحقق هذا الكتيب الغرض الذي أعد من أجله، وأن تحقق الدورة أهدافها، والله الموفق.

المحتويـــــات

الفصل الأول: مراقبة وتأكيد جودة النتائج	**١ - ١**
مقدمة	١ - ١
مراقبة الجودة	١ - ٢
برنامج مراقبة الجودة	١ - ٣
برنامج ضمان الجودة	١ - ٣
الفصل الثاني: ضمان جودة وصلاحية العينة للتحليل	**٢ - ١**
مقدمة	٢ - ١
تقنية جمع العينات	٢ - ٢
أهداف برنامج جمع العينات	٢ - ٢
جمع العينات	٢ - ٦
ضمان ومراقبة الجودة	٢ - ٧
الفصل الثالث: البرنامج العام للمعمل	**٣ - ١**
مقدمة	٣ - ١
النظافة	٣ - ١
إمدادات المعمل	٣ - ٢
طرق التحاليل	٣ - ٢
الأجهزة المعملية	٣ - ٢
الأمان	٣ - ٦
الفصل الرابع: دقة نتائج التحاليل	**٤ - ١**
مقدمة	٤ - ١
حساب بيانات الدقة	٤ - ١
رسومات التحكم البيانية	٤ - ٢
تفسير النتائج	٤ - ٧

الفصل الخامس: كفاءة نتائج التحليل **٥-١**
مقدمة ٥-١
حساب نتائج الكفاءة ٥-١
رسومات التحكم البيانية ٥-٢
تفسير النتائج ٥-٥

الفصل السادس: التحليل البكتريولوجى باستخدام طريقة الأنابيب المتعددة **٦-١**
المبدأ الأساسى ٦-١
التلقيح ٦-٣
التجهيزات ٦-٤
البيئات وماء التخفيف ٦-٧
التطبيق على المياه غير الملوثة ٦-٩
التطبيق على المياه الملوثة بطريقة التخفيف ٦-١٦
الطريقة المباشرة لفحص القولونيات الغائطية ٦-٢٤
فحص البكتريا السبحية المعوية ٦-٢٧
فحص بكتريا سودوموناس ايروجنوزا ٦-٣٠
فحص بكتريا المكورات العنقودية ٦-٣٢

الفصل السابع: التحليل البكتريولوجى باستخدام طريقة الترشيح الغشائى **٧-١**
المبدأ الأساسى ٧-١
حجم عينة الماء المعدة للترشيح ٧-١
المستنبتات وماء التخفيف ٧-٣
دلائل وجود مياه الشرب ٧-٥
مراقبة الجودة ٧-٩

الفصل الثامن: أسس التحكم في المعالجات البيولوجية لمياه الصرف باستخدام نتائج التحاليل الكيميائية **٨-١**
كمية الأكسجين المذاب وكفاءة عملية تقليب السائل المخلوط ٨-١
نسبة المواد العضوية على كمية الكائنات الحية ٨-٢
عمر الحمأة ٨-٣

معدل الترسيب ٨-٥
معدل صرف الحمأة الزائدة ٨-٦
الطريقة الأولى ٨-٧
الاستفادة من التجارب المعملية في المرشحات الزلطية ٨-١١
حساب الحمل الهيدروليكي على الوحدة ٨-١١
حساب الحمل العضوي على الوحدة ٨-١٢
معدلات التحميل النموذجية ٨-١٣
حساب كفاءة المرشحات ٨-١٣
كفاءة المروق النموذجي ٨-١٤
الاختبارات المعملية للمرشحات ٨-١٤
الفحص المجهري للكائنات الحية في الحمأة ٨-١٥

الملاحق

ملحق رقم (١)
الطرق القياسية للتحاليل الكيميائية والبيولوجية

الفصل الأول

مراقبة وتأكيد جودة النتائج

الفصل الأول

مراقبة وتأكيد جودة النتائج

مقدمـــــــــة

يناقش هذا الفصل خطط مراقبة وتأكيد جودة نتائج التحاليل فى المعامل. وبدئاً يفترض أن العينة المراد تحليلها أخذت بعناية وحُفظت وفقاً للقواعد المحددة فى طرق أخذ العينات ثم أرسلت إلى المعمل بغرض التحليل باستخدام طرق قياسية معترف بها وان النتائج والسجلات لنتائج التحليل سوف تجرى بطريقة منظمة ومتجانسة.

ويجب التأكيد على أن برنامج مراقبة الجودة يبدأ مع تجميع العينات ولا ينتهي إلا بعد إظهار النتائج. وتتمثل أهمية برنامج ضبط الجودة ومراقبتها المؤسس بدقة والمدعم بالوثائق الكاملة فى تقديم نتائج تحاليل معتمدة وموثقة رسمياً يمكن الرجوع إليها لاتخاذ القرارات السليمة لتعزيز وحماية البيئة.

ويهدف برنامج مراقبة وتأكيد جودة النتائج إلى:

١- التعرف على مصادر المشاكل عند جمع العينات أو تحليلها قبل تسجيل البيانات.
٢- إصدار السجلات اللازمة لتأكيد صحة نتائج التحاليل.
٣- تحديد مدى دقة وكفاءة التحاليل.
٤- إصدار البيانات المعتمدة لاستخدامها فى أى قرارات.

مراقبة الجودة

تُعرف مراقبة الجودة بأنها هى النشاطات والتقنيات التى تستخدم لاستيفاء المتطلبات اللازمة لجودة النتائج مثل اشتراطات الأيزو ٩٠٠٠ ومثل إصدار السجلات التى تشتمل على:

١- نتائج التجارب الغفل (Blanks).
٢- نتائج قياسات التركيزات المتطابقة المتكررة (Duplicates).
٣- تحليل عينات عمياء (Blind Samples).
٤- تحليل عينات مضاف إليها تركيزات معلومة (Spiked).
٥- إصدار الرسومات البيانية الخاصة بنوعية التحاليل.
٦- استخدام عينات قياسية أو مرجعية.

وكجزء من نظام الجودة ورصد كفاءة التحاليل يومياً من سلسلة من العينات إلى أخرى يجب على معامل التحاليل اعتماد نظام مراقبة الجودة الداخلي وذلك بالاشتراك فى اختبارات الكفاءة (Proficiency testing) وكذلك استخدام عينات ضبط الجودة عالية الثبات.

وتعتبر مراقبة الجودة جزءاً هاماً من برامج ضمان الجودة وهى عبارة عن نظام مخطط لضمان الجودة وتأكيد إمكانية الاعتماد على النتائج المعملية. ويشمل نظام مراقبة الجودة اختبار مدى دقة وكفاءة إجراءات التحاليل وإعداد السجلات.

يتم استخدام نتائج اختبارات الدقة والتحاليل اليومية فى تقييم مدى جودة الأداء وذلك عن طريق مقارنتها بنتائج عينات معروفة أو بنتائج سابقة. كما يتم استخدام الرسومات البيانية الخاصة بالدقة والكفاءة فى تحديد مدى اقتراب العينة من مستوى الجودة المطلوب.

ويوجد بكل رسم بياني خاص بالدقة والكفاءة حدود لمناطق الكفاءة وحدود لمناطق الإنذار (Limits for Control & Warning) وفى حالة ملاحظة أن بعض النتائج الخاصة بالقياسات والتحاليل المختلفة مشكوك فى صحتها أو

غير مقبولة يتم إيقاف التحاليل واتخاذ إجراء تصحيحي تجاه المشكلة والأهم من ذلك تحديد سبب ظهورها.

برنامج مراقبة الجودة

يقوم برنامج مراقبة الجودة الناجح بالآتي:

* التحليل الدوري لعينات مجهولة Unknowns وعينات غفل Blancks والتركيزات المتطابقة Duplicates وعينات قياسية Standards.
* تأكيد قدرة المعمل على تقديم نتائج مقبولة وذلك عن طريق مقارنة نتائج التحاليل عند اقتسامها مع معامل أخرى Split Sample.
* إصدار وتقييم الرسومات البيانية الخاصة بالدقة والكفاءة.

برنامج ضمان الجودة

وهو مجموعة الأعمال المنتظمة اللازمة لإعطاء نتائج على درجة عالية من الجودة بما يتوافق مع متطلبات الأيزو ٩٠٠٠ مثل:

١- معايرة الأجهزة.
٢- التدريب.
٣- صيانة الأجهزة.
٤- التفتيش والمراجعة.

مسئوليات برنامج مراقبة وضمان الجودة:

* يقوم مدير المحطة بمراجعة جميع بيانات مراقبة وضمان الجودة مع مدير المعمل بصفة دورية.

* يقوم مدير المعمل (يتولى عنه/ عنها هذه المسئوليات فى غياب مدير المحطة) بمسئوليات برنامج وضمان الجودة التالية:

- إدارة برنامج مراقبة وضمان الجودة بصفة دورية لضمان سلامة وصحة نتائج التحاليل.
- التحقق من سلامة واكتمال السجلات الخاصة بجمع العينات وتحليلها.
- التخلص من العينات التي تم جمعها وتحليلها طبقاً للطرق المتفق عليها.
- تدريب المستخدمين المعنيين على برنامج مراقبة وضمان الجودة.

- الاحتفاظ بسجلات دائمة للتحاليل لاستخدامها فى إصدار الرسومات البيانية الخاصة بتقييم النتائج.
- مراجعة البيانات وتحديد مدى دقة وكفاءة نتائج التحاليل.
- اتخاذ القرار اللازم فوراً لمعالجة أي خطأ فى حالة تسجيل نتائج تحاليل خارج النطاق أو تسجيل نتائج متضاربة.
- تقييم ومناقشة نتائج مراقبة وضمان الجودة مع المسئولين المعنيين.
- الاحتفاظ بالرسومات البيانية وتقديمها عند الحاجة.

* يقوم المحلل الكيميائي بالمعمل بالمسئوليات التالية:
  - القيام بالتحاليل طبقاً للطرق المتفق عليها.
  - القيام باختبارات الجودة المطلوبة.
  - مراجعة النتائج للاطمئنان على سلامة سير التحاليل.
  - استكمال السجلات الخاصة بتحاليل العينات وفقاً للطرق المتفق عليها.
  - البحث - التعرف على - تصحيح سبب أي خطأ.
  - اتخاذ القرار اللازم فوراً عند ملاحظة خطأ بالرسومات البيانية.

* يقوم العمال بالمعمل، الفنيين، المحلل الكيميائي، العمال المكلفين بجمع العينات بالمسئوليات التالية:
  - جمع العينات من الأماكن المحددة.
  - جمع العينات باستخدام أدوات جمع نظيفة وعبوات سليمة ونظيفة.
  - جمع العينات متبعين الطرق المتفق عليها بدقة.
  - استكمال السجلات الخاصة بجمع العينات.

ويمكن القول بأن كل فني، عامل، ومحلل كيميائي يعتبر مشاركاً فى المسئولية عن برنامج ضمان ومراقبة الجودة فى موقعه. فكل شخص شارك فى تحديد جودة القياسات الفيزيائية والكيميائية والبيولوجية علاوة على مناولة النتائج وتسجيلها وتوثيقها مسئول عن التعرف على وجود أي مشكلة وبحثها كجزء من واجبه لتحسين جودة العينة ومصداقية نتائج المعمل.

يتم التعرف على وجود مشكلة ما بالعينة عن طريق اختبارات الجودة والكفاءة التي تستخدم نتائجها فى إصدار سجلات بيانية بها حدود لمناطق الكفاءة وحدود لمناطق الإنذار تحدد مدى جودة العينة. واستمرار برنامج التحكم يعتمد على استمرارية هذه الإجراءات بصفة يومية.

وبزيادة التدريب والخبرة تزيد ثقة الأشخاص المعنيين فى أدائهم لعملهم - تزيد يقظتهم - ينمو إدراكهم وسعة إطلاعهم واهتمامهم بجميع نواحي العملي مما يؤدى بالتالي إلى تحسين أدائهم ومصداقيتهم.

يستطيع فريق العمل المدرب جيداً أن يحدد أي تغيير دقيق يحدث فى حالة العينة أو نتائج التحاليل قبل أن يتطور الوضع ويصبح خارج نطاق التحكم.

الفصل الثانى

ضمان جودة وصلاحية العينة للتحليل

الفصل الثاني

ضمان جودة وصلاحية العينة للتحليل

مقدمـــــــــــة

يجب التأكد عند جمع أى عينة للتحليل المعملي أنها عينة تمثل حقيقة الموقع أو مجرى الصرف الذى يتم اختباره. ويعتبر هذا فى غاية الأهمية - لأنه فى حالة كون العينة غير ممثلة لحقيقة الموقع الذى يتم أخذها منه فإن جميع الاستنتاجات والقرارات والإجراءات التى يتم اتخاذها ستتأثر بهذا الخطأ. كما يجب مراعاة أن يتم جمع العينات وتناقلها وحفظها بالمواد المناسبة وتخزينها بحيث لا يحدث أى تغيير فى مواصفاتها سواء بالزيادة أو النقصان خلال الفترة الزمنية ما بين جمعها وتحليلها فى المعمل.

يعتمد برنامج التشغيل الناجح لأي محطة معالجة مياه أو صرف صحي على وجود نتائج سليمة للتحاليل المعملية وجمع العينات يعتبر الخطوة الأولى للحصول على النتائج والتى عادة ما تسبب أكبر قدر من الأخطاء.

تعتمد صلاحية نتائج التحاليل بالدرجة الأولى على الاهتمام بالتفاصيل التالية:

* التأكد من أن نوع العينة ومكان أخذها يمثلان حقيقة وواقع مجرى الصرف الذى يتم اختباره.
* استخدام التقنيات السليمة لأخذ العينات.
* استخدام النوع الصحيح من العبوات النظيفة وفى حالة الحاجة إلى إضافة المواد الحافظة يتم إضافة المواد الملائمة.

تقنية جمع العينات قبل البدء فى عملية جمع العينات يجب أن يتعاون المعمل وإدارة التشغيل سوياً لوضع برنامج متطور يشمل:

* تحديد مكان جمع العينة.
* مواعيد جمع العينات.
* نوع العينات التى يتم جمعها (مركبة - بسيطة).
* جمع العينة - نوع المواد الحافظة - نوع العبوات.
* طريقة جمع العينات.
* مواد حفظ العينات.
* إجراءات تناقل المسئولية عن العينات.

أهداف برنامج جمع العينة

* الحصول على عينات نموذجية.
* حفظ العينات فور جمعها لتجنب أى تغيرات سريعة قد تحدث فى مواصفاتها.
* القيام بتحليل العوامل التى تطرأ عليها تغيرات كيميائية سريعة فى موقع أخذ العينة مثل اختبارات درجة الحرارة - الأكسجين الذائب DO - الرقم الهيدروجينى pH - سرعة السريان.
* نقل العينة إلى المعمل وتسجيل المعلومات التوصيفية الخاصة بها فى سجل دائم يشمل مكان جمع العينة - توقيت الجمع - حالة العينة.... إلخ.

لا يمكن الحصول على معلومات دقيقة ونتائج يعتمد عليها من المعمل مهما بلغت درجة الدقة والكفاءة التى يتم إجراء التحاليل بها ما لم يتم اتباع الإجراءات الدقيقة فى جمع العينة وتسجيل البيانات الخاصة بها.

ومن مسئوليات فريق المعمل التأكد من مراجعة تقنيات جمع العينة السليمة مع فريق جمع العينات بصفة دورية.

قواعد جمع ونقل العينة القواعد التالية هي القواعد اللازم اتباعها لتأمين عملية جمع ونقل العينة:

* يجب اتباع إجراءات الأمان واستخدام أدوات الحماية الشخصية المناسبة مثل ارتداء القفازات والنظارات الواقية.

* يجب وضع علامات واضحة عند أماكن أخذ العينات حتى يسهل جمع العينة من المكان السليم.

* يجب اختيار أماكن جمع العينات بدقة بحيث يتوافر بها الآتى:
  - طريقة مناسبة وآمنة لجمع العينة.
  - ضمان المزج والخلط التام للعينة.

* يجب جمع العينات من مركز السريان حيث تكون السرعة عالية ولا تتأثر بأى رواسب سابقة أو تيارات جانبية متداخلة.

* حتى يتم عمل تمثيل صحيح لمواصفات العينة يجب مراعاة اختيار مواعيد ملائمة لأخذ مجموعة من العينات البسيطة التى تكون فى النهاية عينة مركبة بحيث تمثل حقيقة متوسط التغير الحادث خلال فترة زمنية محددة. فمثلاً العينات التى يتم جمعها صباح الاثنين تمثل فى الحقيقة مياه صرف مساء الأحد.

* يجب أن تكون المعدات الملائمة لجمع العينات متوافرة ونظيفة.

* يجب شطف وعاء جمع العينة مرتين أو ثلاثة بالعينة التى يتم جمعها. ما عدا فى حالات جمع عينات للاختبارات البكتريولوجية أو عينة لاختبار الشحوم والزيوت فإنه يتم جمعها مباشرة فى زجاجة العينة.

* فى حالة استخدام جامع العينات الأوتوماتيكي فإنه يتم ضبطه بحيث يقوم بعملية الشطف (Purge) أتوماتيكياً قبل جمع العينة وذلك للتأكد من خلو أنابيب السحب من أى رواسب أو تراكمات سابقة.

* يجب تجنب سحب أى مواد طافية قدر الإمكان وذلك عن طريق غمس فتحة إناء جمع العينات تحت مستوى سطح الماء ويتم التخلص من أى أجزاء يزيد حجمها عن ربع بوصة.

* يتم جمع العينة المناسبة (عينة بسيطة - عينة مركبة) طبقاً لنوع التحاليل التى يتم إجراءها.

* يتم جمع عينة بسيطة عند اختبار: الرقم الهيدروجينى pH - درجة الحرارة - السيانيد - سلفيد الهيدروجين - الكلورين الحر - بعض المواد الصلبة - الزيوت والشحوم - الاختبارات البكتريولوجية. من الأفضل عند إجراء اختبار الأكسجين الذائب DO قياسية مباشرة وذلك لأن أبسط حركة للعينة أو نقلها من الموقع إلى المعمل تغير فى نسبة الأكسجين الذائبة.

* يتم جمع عينات بسيطة أيضاً فى الحالات التالية:
  - مجرى الصرف الذى يتم اختباره غير جارى بصفة مستمرة.
  - ملاحظة حالة غير عادية أو غير مرغوبة.
  - الحالة التى يجرى اختبارها منتظمة وقصيرة المدى.
  - مواصفات مياه الصرف ثابتة خلال فترات زمنية ممتدة.
  - لتحديد تركيز وثبات السائل المخلوط أو الحمأة المنشطة الراجعة.
  - لتحديد ما إذا كانت العينة المركبة عبارة عن متوسط مجموعة من العينات البسيطة المتفاوتة بشدة فى قيمتها (مثل المعادن) الأمر الذى قد يضر نظام المعالجة.

* العينة البسيطة يتم جمعها من مياه الشرب عن طريق مأخذ المحطات، الوصلات المنزلية.

* العينة المركبة عبارة عن مجموعة من العينات البسيطة التى يتم جمعها فى فترات زمنية ومعدل سريان محددان خلال فترة لا تتعدى ٢٤ ساعة. يتم أخذ العينات المركبة عند الرغبة فى إصدار بيانات تمثل متوسط حالة الموقع. وهذه المجموعة من العينات البسيطة، باستخدام المواد الحافظة الملائمة لا تفسد ولا تتغير خلال الفترات الطويلة. هذا وتكون جمع العينات المركبة مفيد فى حالة كون نوعية وكمية مياه الصرف المعالجة غير متغير.

* فريق المعمل مسئول عن وضع بطاقات على أوعية جمع العينات وعليها رقم الموقع ونوع العينة (بسيطة - مركبة) وتاريخ الجمع وذلك قبل بدء فريق جمع العينات فى عملهم.

* يتم صب العينة فى وعاء الجمع المناسب طبقاً لنوع التحاليل التى يتم إجراءها - يجب الحرص عند ملء العينة حتى لا تنسكب - وخصوصاً فى حالة احتوائها على مواد حافظة.

* يتم جمع حجم مناسب من العينة يكفى جميع الاختبارات التى يتم اجراءها وخصوصاً فى حالة العينات البسيطة التى يصعب الحصول على عينة مماثلة لها لاستكمال التحاليل فى أى وقت آخر بعد جمع العينة لأول مرة.

* يتم استخدام تقنيات حفظ العينات الملائمة طبقاً لما ورد فى كتاب التحاليل القياسية لاختبار مياه الشرب والصرف الصحى.

* نظراً للتغير السريع الذى يحدث فى نسبة المواد الصلبة أثناء دورة الرفع فإنه يتم جمع كميات صغيرة من العينات البسيطة على فترات متقاربة (كل نصف دقيقة) لتكوين عينة مركبة.

* للحصول على مصداقية أكثر للنتائج يتم تحليل العينة فى أسرع وقت بعد جمعها قدر الإمكان وبعض التحاليل يتم إجرائها فى موقع الجمع نظراً للتغير الذى يحدث فى مكوناتها قبل وصولها للمعمل مثل الأكسجين الذائب DO.

جمع العينات

طرق جمع العينات يجب أن تكون ملائمة وأماكن الجمع ثابتة وذلك حتى يمكن ضمان صلاحية النتائج. بعد تحديد البيانات اللازمة وتحديد العوامل التى سيتم تحليلها يتم تحديد أماكن جمع العينات ومواعيد جمعها ثم بعد ذلك يستخدم الرسم التخطيطي للمحطة فى تحديد هذه الأماكن ويوضع هذا الرسم فى أماكن تواجد فريق جمع العينات وفى المعمل.

يجب على فريق المعمل مراجعة جدول جمع العينات يومياً مع إدارة التشغيل لعمل الجدول الخاص باليوم التالي.

تخزين العينة وحفظها

يعتبر الحفظ الكامل لأي عينة بغض النظر عن مصدرها - تقريباً مستحيل ولا يمكن تحقيقه لجميع مكونات العينة. تقنيات الحفظ تستطيع فقط - على أحسن تقدير - الإبطاء من عمليات التغير الكيميائي والبيولوجي التي تحدث منذ جمع العينة من الموقع وحتى الانتهاء من تحليلها.

الغرض من حفظ العينة

- إبطاء التفاعل البيولوجي.
- إبطاء تحلل المركبات الكيميائية.
- تقليل درجة تطاير المركبات.

طرق حفظ العينة:

* تثبيت الرقم الهيدروجينى.
* إضافة كيماويات حافظة.
* الحفظ فى ثلاجة أو التثليج.

يعتبر حفظ العينة لدرجات تبريد قرب التثليج أو أقل من أفضل تقنيات الحفظ ولكن لا يمكن تطبيقه عادة على كل أنواع العينات.

ضمان ومراقبة الجـــــودة

يتم اتباع ضمان الجودة (Quality Assurance) فى جمع العينات للحد من الأخطاء الشائعة التى قد تحدث مثل عدم إتباع الطرق الملائمة فى جمع العينات وعدم اتباع الطرق السليمة فى الحفظ أو عدم خلط العينة أثناء جمعها أو تحليلها.

التحكـــم فى جـــــودة الأدوات

يتم إجراء الاختبارات الغفل (Blanck Tests) لإظهار مدى نظافة أدوات الجمع. حيث تستخدم أدوات جمع العينات بصفة دورية فى جمع عينات من مياه التخفيف بدلاً من العينة نفسها. يمكن القيام بذلك عن طريق وسيلتين وذلك تبعاً للطريقة المستخدمة فى جمع العينات.

الأدوات المستخدمة لجمع العينات يدوياً:

ضع مياه التخفيف فى أداة جمع العينة ثم اسكبها فى وعاء جمع العينة. يتم تحليل هذه المياه كأنها عينة خام حقيقية. كما يتم تحليل كمية جديدة من مياه التخفيف ويتم قياس الفرق فى النتيجتين. هذا الفرق يحدد مدى نظافة الأدوات وكمية المواد العالقة بها. لذلك فإنه من الأفضل جعل الشخص المسئول عن جمع العينة يقوم بهذا الاختبار. ويجب التأكد من أنه يقوم بشطف أدوات جمع العينة ثلاث مرات بمياه التخفيف كما لو كان يقوم بجمع عينة حقيقية من المياه الخام.

الأدوات المستخدمة لجمع العينات أتوماتيكياً:

يتم وضع جامع العينات الأوتوماتيكي بجانب وعاء ممتلئ بمياه التخفيف ويتم برمجته بحيث يسحب عينة من هذا الوعاء. تحلل هذه العينة كما تحلل عينة من مياه التخفيف ثم يتم قياس الفرق فى النتيجتين. القيم التى يتم قراءتها عند تحليل هذه العينة من مياه التخفيف التى تم سحبها بجامع العينات الأوتوماتيكي تظهر مدى نظافة أدوات جمع العينة. وعليه فإنه من الأفضل جعل الشخص المسئول عن جمع العينات يقوم بهذا الاختبار. يتم برمجة جامع العينات الأوتوماتيكي فى هذه الحالة ليقوم بعملية شطف لخطوط السحب (Purge) قبل وبعد جمع العينة كما لو كان يجمع عينة حقيقية من مجرى الصرف.

معايرة أدوات الموقع

فى سجلات الصيانة ومعايرة الأجهزة التى يتم حفظها فى المعمل يجب القيام بتسجيل يومى لدرجات الحرارة الخاصة بجامع العينات الأتوماتيكى والثلاجات المستخدمة لحفظ العينات.

يتم قياس درجات حرارة مجرى الصرف مرة كل ثلاثة أشهر باستخدام جهاز اختبار الأكسجين الذائب (DO) وجهاز اختبار الرقم الهيدروجينى(pH) الخاص بالموقع وترمومتر. ثم يتم مقارنة قراءات درجات الحرارة للثلاثة أجهزة وقياس مدى تطابقهم.

التحكم فى جودة تداول العينـــــــــــة

العينات المتطابقة:

هى الحصول بصفة دورية على عينة من نفس الموقع فى نفس التوقيت وذلك عن طريق ثلاثة طرق

- تكليف اثنان من العاملين بجمع عينة يدوية من نفس المكان ونفس التوقيت، ويفضل أن تكون من نوع العينة المركبة.
- تكليف عامل بجمع عينة مركبة يدوياً فى نفس المكان والتوقيت الذى يقوم فيه جامع العينات الأوتوماتيكي بجمع نفس العينة.
- ضبط جهازي جمع العينات أتوماتيكياً بحيث يقوما بجمع عينتين من نفس المكان وفى نفس التوقيت.

اقتسام العينة:

يتم جمع عينة دورية من موقع محدد ثم اقتسامها إلى جزءين يتم تحليلهم كأنهم عينتين مختلفتين. هذه الطريقة تحدد مدى جودة خلط العينة قبل اقتسامها. يفضل أن يتم اختبار هذه العينة المقتسمة فى معملين مختلفين لإجراء نفس التحاليل عليها ثم مقارنة الفرق فى النتائج بين المعملين. وتعتبر هذه الطريقة المثلى لاقتسام العينات وتؤدى إلى تنمية روح التعاون بين المعامل المشتركة فى هذا البرنامج.

قياس التحكم فى الجودة:

* يتم عمل رسوم تحكم بيانية لكل إجراء من إجراءات التحكم فى الجودة يتم استخدامه فى برنامج جمع العينات.

* يتم تخفيف المحاليل الحمضية أو القاعدية بكميات كبيرة من الماء قبل التخلص منها فى خطوط الصرف.

* لا يسمح لأي شخص غير مدرب بتشغيل أو إصلاح أى أدوات أو أجهزة.

الفصل الثالث

البرنامج العام للمعمل

الفصل الثالث

البرنـــامج العـــام للمعمـــل

مقدمـــــــــة

يشمل برنامج ضمان ومراقبة الجودة استخدام الوسائل الملائمة للإجراءات اليومية للمعمل مثل طرق النظافة وتحضير المحاليل، الاحتفاظ بالسجلات ونتائج التحاليل. يعتبر القيام بهذه الإجراءات اليومية بطريقة سليمة فى نفس أهمية برنامج ضمان ومراقبة الجودة لجمع العينات والتحليل، إذ أن نظافة الأدوات والمعمل ودقة التحاليل والسجلات السليمة كلها عوامل تؤثر على كل عينة وكل تحليل.

النظافـــــــة

نظافة المعمل هامة جداً لمنع حدوث تلوث للعينة، كما يجب الاهتمام الشديد بنظافة أدوات جمع العينات، زجاجات العينات، الأدوات الزجاجية وأدوات وأجهزة التحاليل، الثلاجات، والحضانات، منضدة التحاليل، الرفوف والأرضيات.

زجاجات جمع العينات والأدوات الزجاجية (ما عدا تلك المستخدمة لاختبار الأكسجين الحيوي الممتص (BOD) يجب غسلها بعد كل استخدام بمنظف جيد ثم شطفها جيداً بمياه منزوعة الأيونات (Deionized). كما يتم شطف هذه الزجاجات بحمض الهيدروكلوريك المخفف ١ : ١ على الأقل مرة أسبوعياً ثم تشطف ثلاث مرات بمياه منزوعة الأيونات (Deionized).

نفس طرق النظافة يتم إتباعها مع الأدوات المستخدمة لاختبار الأكسجين الحيوي الممتص (BOD) مع تجنب استخدام المنظفات ويتم شطفها بالحمض بعد كل استخدام. الأدوات الزجاجية المستخدمة فى الاختبارات البكتيريولوجية يجب أن تكون نظيفة وملفوفة جيداً فى ورق ألومنيوم. ويتم تعقيمها فى

الأوتوكلاف بعد كل استخدام. كما يجب ترك ورق الألومنيوم على الأدوات الزجاجية حتى الاستخدام التالي لحمايتها من التلوث.

إمدادات المعمل جميع إمدادات المعمل يجب أن تكون على أعلى مستوى جودة ممكن لضمان المعايرة السليمة للمعدات والأجهزة وتجنب حدوث أى تلوث. كما يجب استخدام المياه المعالجة بدرجة عالية لتحضير المحاليل وتخفيف العينات وغسيل الأدوات. جدول (٣-١) يوضح مواصفات درجات المياه الثلاثة الملائمة للاستخدام بالمعمل والاستخدامات المناسبة لكل نوع. فى جميع الاختبارات البكتريولوجية لا يستخدم إلا الأدوات والمحاليل والإمدادات المعقمة.

طرق التحاليل يتم أخذ طرق التحاليل عن كتاب التحاليل القياسية لاختبار المياه ومياه المجارى. يفضل أيضاً الاحتفاظ بسجل صيانة ومعايرة (جدول رقم ٣-٢) هذا السجل يحتوى على التقرير اليومي والمعايرة وضبط درجات الحرارة للأجهزة والأدوات المعملية. يجب أن يقوم شخص مسئول يومياً بمراجعة درجات حرارة الأفران، الثلاجات، الحضانات. فى حالة استخدام جهاز جمع عينات أوتوماتيكي بثلاجة فإنه يتعين على جامع العينات القيام بقراءة درجات حرارة جهاز جمع العينات الأوتوماتيكي وإبلاغها للشخص المسئول عن سجلات الصيانة والمعايرة. كما يجب تسجيل درجات الحرارة والمعايرات عند القيام بالتحاليل المعملية للموازين - أجهزة التعقيم - أجهزة الـــ pH - أجهزة الأكسجين الذائب.

الأجهزة المعملية

الموازين يتم التأكد يومياً من قراءة الصفر لكل ميزان عن طريق إتباع إرشادات الشركة المصنعة ويتم كتابة التاريخ وتوقيع الشخص الذى قام بتصفير الجهاز فى سجل الصيانة والمعايرة ويجب التأكد من إجراء المعايرة ٤ مرات سنوياً باستخدام مجموعة الأوزان القياسية مع كتابة التاريخ وتوقيع الشخص الذى تأكد من معايرة الجهاز. يتم معايرة الجهاز بمجموعة أوزان فى نفس نطاق الأوزان التى تستخدم يومياً بالمعمل.

جدول رقم (٣ - ١)

مواصفات درجات المياه الثلاثة الملائمة للاستخدام بالمعمل

المواصفات	النوع I	النوع II	النوع III
المواصفات	لا تحتوى على أي تركيزات لمواد يمكن قياسها. أقل نسبة من الأملاح المتداخلة وأعلى نسبة دقة.	يمكن تقبل وجود بكتريا	يستخدم فى غسيل الأدوات • التحاليل الكيفية • ومصدر لتحضير النوعين السابقين
طريقة التحضير	بالتقطير أو الضغط الأسموزى العكسي ثم deionization يتبعها إمرار المياه على غشاء ٠,٢ ميكرون.	بالتقطير أو الضغط الأسموزى العكسي	
عوامل الجودة			
- البكتريا (CFU/ml)	١٠	١٠٠٠	لا تختبر
- الأس الهيدروجينى pH	لا تختبر	لا تختبر	٥ - ٨
- المقاومة ٢٥ م Megohm - cm	١٠ <	١ <	٠,١١
- التوصيل الكهربى ٢٥ م umhos/cm	٠,١ >	١	١٠
- السليكا ومللجرام / لتر	٠,٠٥ >	٠,١ >	١ >
- الأملاح الذائبة وميللجرام / لتر	٠,١	١	٥
- الكربون العضوى القابل للأكسدة TOC	٠,٠٥ >	٠,٢ >	١ >
- مدة التخزين والأوعية المناسبة	لا تخزن - تستخدم فوراً بعد التحضير.	أقل مدة تخزين ممكنة فى أوعية تمنع تلويثها مثل التفلون أو الزجاج فى حالة التحاليل العضوية والبلاستك فى حالة تحليل المعادن.	يمكن تخزينها فى أوعية تحميها من التلوث.
استخدام مياه deionized فى التحاليل يمكن أن تضيف مواد عضوية بالمياه. هذه المواد العضوية لن يمكن قياسها عن طريق اختبارات المقاومة resistivity والتى لا تكشف عن المواد العضوية أو المواد غير المتأينة، وعليه يجب القيام باختبارات منفصلة للـ TOC و SiO_2 والعد البكتيري.			

جدول رقم (٣-٢)

سجل الصيانة والمعايرة

نوع الجهاز	العدد	المورد	الشركة المصنعة / بلد المنشأ	الموديل	تاريخ بدء تشغيله	صيانة / إصلاح		* حالة الجهاز الآن	التاريخ	مدير المعمل	ملاحظات
						تاريخ	بمعرفة				

* ممتاز : الجهاز يقوم بالأداء فى الحدود المقبولة بدون الحاجة إلى أى معايرة أو ضبط للحرارة.

* جيد : الجهاز يقوم بالأداء فى الحدود المقبولة مع الحاجة للمعايرة وضبط دورى للحرارة.

* ضعيف : الجهاز لا يقوم بالأداء فى الحدود المقبولة - المعايرة وضبط درجات الحرارة غير ثابتة.

* متوقف : الجهاز لا يعمل

يحتفظ بوعاء صغير به مادة مجففة desiccant لامتصاص الرطوبة من الميزان - يمكن استخدام كأس ٥٠ مللى به مادة ماصة للرطوبة. كما يمكن استخدام نفس المادة المستخدمة فى الـــ desiccator المستخدم بالمعمل مع التأكد من تغييرها كلما تغير لونها يتم كتابة التاريخ وتوقيع الشخص الذى قام بالتأكد من سلامة المادة المجففة فى السجلات. تأكد من قيام شركة متخصصة بتنظيف الميزان وصيانته على الأقل مرة سنوياً ويتم كتابة اسم الشركة ومسئول الصيانة الذى قام بهذه العملية.

جهاز التعقيم

يجب الحرص على كتابة التاريخ والوقت والأدوات التى تم تعقيمها فى كل دورة تعقيم فى سجل الصيانة والمعايرة. فى حالة تواجد Sterilization Indicator Tape يتم استخدامهم فى كل دورة تعقيم. كما يتم تسجيل درجة حرارة الترمومتر لكل دورة تعقيم.

الثلاجـــات وأدوات جمـــع العينـــــات الأوتوماتيكية المثلجة

يجب أن تحتفظ جميع الثلاجات أو أدوات جمع العينات الأوتوماتيكية المثلجة بدرجات حرارة ٤م أو أقل بدون تجميدها. يتم تسجيل التاريخ والزمن ودرجة الحرارة يومياً. إذا كانت درجة الحرارة فى نطاق غير ملائم يتم ضبطها واختبارها ثانية. يجب تسجيل كل مرة يتم فيها ضبط الجهاز.

الحضانات والأفران

يتم يومياً تسجيل التاريخ والوقت ودرجات الحرارة. وفى حالة ملاحظة أن درجات الحرارة فى نطاق غير ملائم يتم ضبطها واختبارها ثانية. يجب تسجيل كل مرة يتم فيها ضبط الجهاز.

حمامات المياه

يتم يومياً تسجيل التاريخ والوقت ودرجات الحرارة. وفى حالة ملاحظة أن درجات الحرارة فى نطاق غير ملائم يتم ضبطها واختبارها ثانية. يجب تسجيل كل مرة يتم فيها ضبط الجهاز. كما يتم تفريغ حمامات المياه وتنظيفها ثم إعادة ملأها بمياه مقطرة مرة أسبوعياً وتسجيل ذلك فى سجلات الصيانة والمعايرة.

أجهـــزة قيـــاس الأكسجين الذائب

يتم معـــايرة الجهاز قبل كل استخدام طبقاً لإرشادات الشركة المصنعة. ويتم معايرته مرة أسبوعياً باستخدام Winkler Titration.

أجهزة الـــ pH

يتم معايرة الأجهزة طبقاً لإرشادات الشركـــة المصنعـــة وكذلـــك باستخدام المحاليل القياسية فى حالة توافرها.

ويبين جدول (٣-٣) سجلاً لمراقبة ومعايرة أجهزة التحاليل.

المحـــاليل الكاشفـــة والمحاليل القياسية

جميـــع الكيماويات والمحاليل الكاشفة والمحاليـــل القياسيـــة يجب التأكد من معايرتها قبل الاستخدام. يتم لصق بطاقات على جميع المحاليل تشمل اسم المحلول، تاريخ تحضيره، تاريخ انتهاء صلاحيته، وتوقيع الكيميائي الذى قام بتحضير المحلول. كل الكيماويات التى يتم طلبها يكتب عليها تاريخ تسليمها للمعمل وكذلك تاريخ بدء استخدامها.

الأمـــــــــان

قبل بدء العمل بالمعمل، يتم التأكد من أن كل العاملين قد تم إعطائهم الإرشادات اللازمة لكيفية استخدام أدوات الأمان وكذلك كيفية اجراء التحاليل الكيميائية بطريقة سليمة وآمنة.

الإجراءات التالية هي إجراءات الأمن التى يجب وضعها فى الاعتبار كجزء من برنامج ضمان ومراقبة الجودة لأنها تؤثر فى جودة العينة ونتائج التحاليل.

* لا يجب التعامل مع أى مواد كيميائية إلا بعد معرفة مدى اشتعالها وقدرتها على التفاعل وقدرتها على التسبب فى الصدأ ومدى سميتها.
* عند تخفيف الحمض بالماء يتم دائماً إضافة الحمض المركز ببطء إلى الماء مع التقليب المستمر.
* المعمل والمنطقة الخاصة به لا تستخدم فى الأكل أو الشرب أو التدخين.
* لا يتم استخدام الفم فى شفط المحاليل الكيميائية أبدا ويستخدم لذلك الشافط الأوتوماتيكي.

جدول رقم (٣-٣)
سجل مراقبة صيانة ومعايرة أجهزة التحاليل

بيانات السجل				اسم الموقع			
المحلل الكيميائي							
التاريخ							
معايرة الـ pH ٤ & ١٠ قراءة الـ pH عند ٧,٠١ درجة الحرارة							
الميزان المعايرة اختبار الأوزان القياسية							
جهاز الأكسجين الذائب المعايرة							
حمام ماء اختبار الـ Coliform درجة حرارته ٤٤,٥ + / - ٠,٢ م تم تغيير الماء نعم / لا							
درجات حرارة فرن التجفيف ١٠٣ + / - ١٠٥ م نعم / لا							
درجات حرارة فرن التبخير ٥٥٠ + / - ٥٠ م نعم / لا							
درجات حرارة حضانة الـ BOD ٢٠ + / - ١ م نعم / لا							
درجة حرارة ثلاجة العينات ٤ > - م نعم - لا							
درجة حرارة ثلاجة الـ Coliform ٤ > - م نعم - لا							
جهاز قياس التوصيل الكهربي والأملاح الذائبة أختبر نعم - لا							
المادة المجففة هل سليمة المجفف نعم / لا							
المادة المجففة بالميزان سليمة نعم / لا							
جهاز التعقيم: درجة الحرارة ١٢١ م نعم / لا الشريط مضبوط نعم / لا الأجهزة التى تم تعقيمها							

"تابع" جدول رقم (٣-٣)
سجل مراقبة صيانة ومعايرة أجهزة التحاليل

بيانات السجل				اسم الموقع			
المحلل الكيميائي							
التاريخ							
جامع العينات الأوتوماتيكي درجة الحرارة - < ٤ م نعم / لا							
وحدة الترشيح اختبر نعم /لا							
جهاز قياس الطيف اختبر نعم / لا							
جهاز قياس العكارة اختبر نعم /لا							
جهاز Jar - Test اختبر نعم /لا							

* يتم التأكد من أن جميع الأدوات الزجاجية فارغة ونظيفة قبل وضعها جانباً كما يتم تحديد وقت معين لنظافة الأدوات فى نهاية كل يوم. ويفضل عدم ترك أى أدوات زجاجية غير نظيفة فى نهاية أى دورية وفى حالة استمرار العمل بالمعمل لأكثر من دورية يومياً يتم تحديد وقت معين فى نهاية كل دورية لغسيل الأدوات.
* أى أدوات زجاجية مشطوفة أو مكسورة لا تستخدم وتوضع بعيداً حتى يتم التخلص منها أو إصلاحها.
* يجب التأكد من وجود بطاقات تفصيلية على جميع الكيماويات بالمعمل شاملة التحذيرات المناسبة وإجراءات الأمان.
* لا تترك العينات فى أماكن غير آمنة بحيث يستطيع أى شخص - من غير المسئولين عن المعمل - الوصول إليها.

الفصل الرابع

دقة نتائج التحاليل

الفصل الرابع

دقة نتائج التحاليل

مقدمـــــــــــة لضمان الحصول على نتائج تحاليل معملية يمكن الاعتماد عليها، يجب أن تكون هذه النتائج دقيقة. وتُعرف الدقة بأنها القدرة على تكرار إجراء ما والحصول على نفس النتائج كل مرة يتم فيها تكراره (Reproducible). على المعمل أن يقوم بوضع قواعد لدقة كل تحليل معملي يتم القيام به وكذلك لأي إجراء آخر مثل جمع العينات. يتم قياس الدقة عن طريق تحليل العينات المتطابقة (Duplicate Sample).

حساب بيانات الدقة الدقة عبارة عن قياس لمدى القدرة على تكرارية إجراء ما والحصول على نفس النتائج كل مرة ويتم التعبير عنها بنسبة الانحراف.

نسبة الانحراف = [القيمة المطلقة (أ-ب) ÷ (أ+ب) ÷٢] × ١٠٠
(القيمة المطلقة = القيمة العدادية للأكبر - القيمة العدادية للأصغر)

% deviation = [(absolute value of (A-B) ÷ ((A+B) ÷ 2)])× 100

حيث أ، ب عينة متطابقة.

يتم اختبار دقة عينة واحدة على الأقل لكل ١٠ عينات وذلك لكل نوع من أنواع التحاليل التى يتم إجراؤها بالمعمل، (١٠% من العينات يتم إجراء اختبار الدقة لها) وذلك عن طريق تحليل عينة متطابقة (Duplicate).

مثـــــال:

فى حالة تحليل ٧ عينات/ يتم تحليل عينة متطابقة لعينة واحدة

فى حالة تحليل ١٤ عينة / يتم تحليل عينتين متطابقتين

فى حالة تحليل ٢٧ عينة / يتم تحليل ٣ عينات متطابقة

يُستخدم متوسط العينات لتحديد النتيجة النهائية التى تُسجل وكذلك نسبة الانحراف. كما هو موضح بالجدول رقم (٤-١).

(أ-ب) ÷ [(أ+ب)/٢] × ١٠٠ = نسبة الانحراف

(٦٠ - ٥٩,٥) ÷ [(٦٠ + ٥٩,٥) /٢] × ١٠٠ = ٠,٨% انحراف

رسومات التحكم البيانية

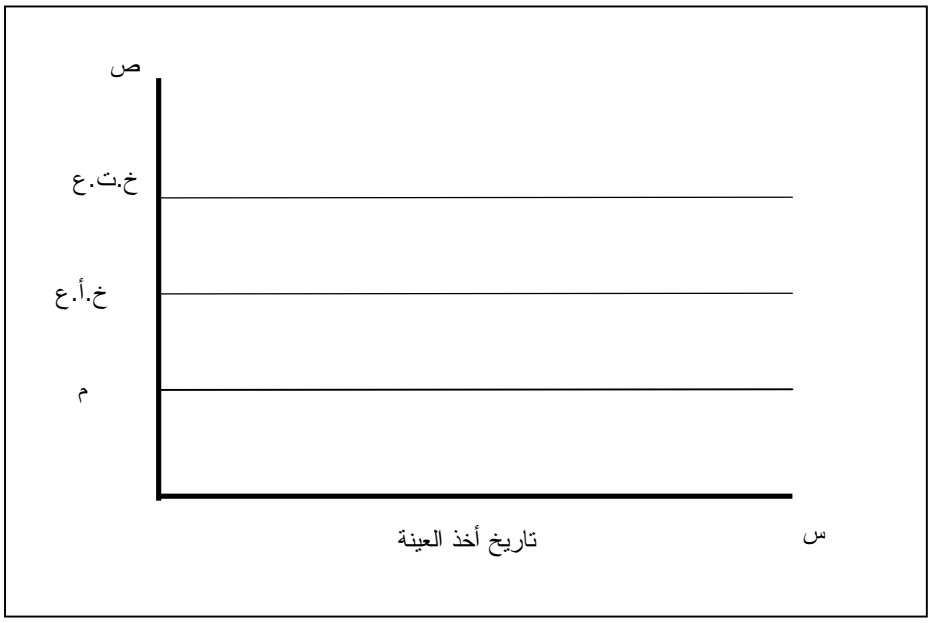
الهدف من عمل رسومات التحكم البيانية هو تقييم الأداء، وبعد الحصول على العدد المناسب من نتائج الدقة يتم تحديد شكل الرسم البيانى، وهذه الرسومات البيانية لها حدود تدل على النتائج المقبولة والنتائج المرفوضة، وهذه الحدود تُسمى حدود التحكم وحدود الإنذار، ويعرض الشكل رقم (٤-١) مثالاً لرسم دقة بياني فارغ، ويكون كل رسم دقة البياني من:

- محور سينى يمثل ترتيب أخذ النتائج (تاريخ أخذها مثلاً).
- محور صادى ينقسم إلى أجزاء تمثل وحدة القياس المستخدمة فى الاختيار.

المحور الصادى يشمل:

- خط المتوسط : م
- خط الإنذار العلوي : خ.أ.ع
- خط التحكم العلوي : خ.ت.ع

هذه الخطوط يتم حسابها من البيانات الفعلية التى يتم تسجيلها.



شكل (٤ - ١)

رسم دقة بياني فارغ

وحتى يمكن تحديد خطوط الإنذار وخطوط التحكم لرسومات الدقة البيانية، يجب الحصول على نتائج تحاليل ٢٠ عينة متطابقة على الأقل لكل نوع من أنواع التحاليل المطلوب اختبار دقتها (مثلاً نسبة المواد العالقة فى عينة الصرف المبدئى TSS). متوسط الـــ ٢٠ نتيجة يتم حسابه ويُحدد كخط المتوسط على المحور الصادي.

<u>الانحراف المعياري لعدد ٢٠ نتيجة يتم حسابه كالخطوات التالية، وكما هو موضح بالجدول رقم (٤ - ١):</u>

- سجل على الأقل ٢٠ زوج من النتائج المتطابقة فى العمود (أ)، (ب).
- احسب الانحراف المعياري لكل نتيجة عينة متطابقة من العشرين نتيجة، ثم سجل ذلك فى العمود [س].

  [أ-ب] ÷ [(أ + ب) ÷٢] × ١٠٠
- عدد البيانات فى العمود س = ن
- اجمع النتائج فى العمود س لتحصل على مجموع س.
- اقسم مجموع س على عدد النتائج ن لتحصل على المتوسط س ̄ .

اطرح س ً من كل قيمة من قيم س.
(اطرح الرقم الأصغر من الرقم الأكبر لتحصل على قيمة مطلقة)
سجل النتائج فى عمود (س - س ً).

- يتم تربيع كل رقم موجود فى الخانة (س - س ً)، وتسجل النتائج فى العمود (س - س ً)^{٢}
- يتم جمع النتائج فى العمود (س - س ً)^{٢} للحصول على مجموع (س - س ً)^{٢}
- الانحراف المعيارى = أ.ع.

= الجذر التربيعى [مجموع (س - س ً)^{٢} ÷ (ن - ١)]

جدول رقم (٤ - ١)

حساب الانحراف المعياري

القراءات		نسبة الانحراف		
أ	ب	س	(س - س ً)	(س - س ً)^{٢}
٥٩,٥	٦٠	٠,٨٤	٢,٤٦	٦,٠٥
٦١	٦٣	٣,٢٠	٠,١٠	٠,٠١
٥٨	٦٠,٥	٤,٢٢	٠,٦٢	٠,٨٥
٦٢,٣	٥٩	٥,٤٤	٢,١٤	٤,٥٨
٦١	٦٠	١,٦٥	١,٦٥	٢,٧٢
٦٢	٦٣,٧	٢,٧٠	٠,٦٠	٠,٣٦
٦٠	٦٠	٠,٠٠	٣,٣٠	١٠,٩٠
٦٥	٦١	٦,٣٠	٣,٠٠	٩,٠٠
٦٢	٦٣	١,٦٠	١,٧٠	٢,٩٠
٦٣,٤	٦٥	٢,٤٩	٠,٨١	٠,٦٦
٥٧	٦١	٦,٨٠	٣,٥٠	١٢,٢٠
٥٩,٣	٦٢	٤,٤٠	١,١٠	١,٢٠
٦٠	٦٢	٣,٣٠	٠,٠٠	٠,٠٠

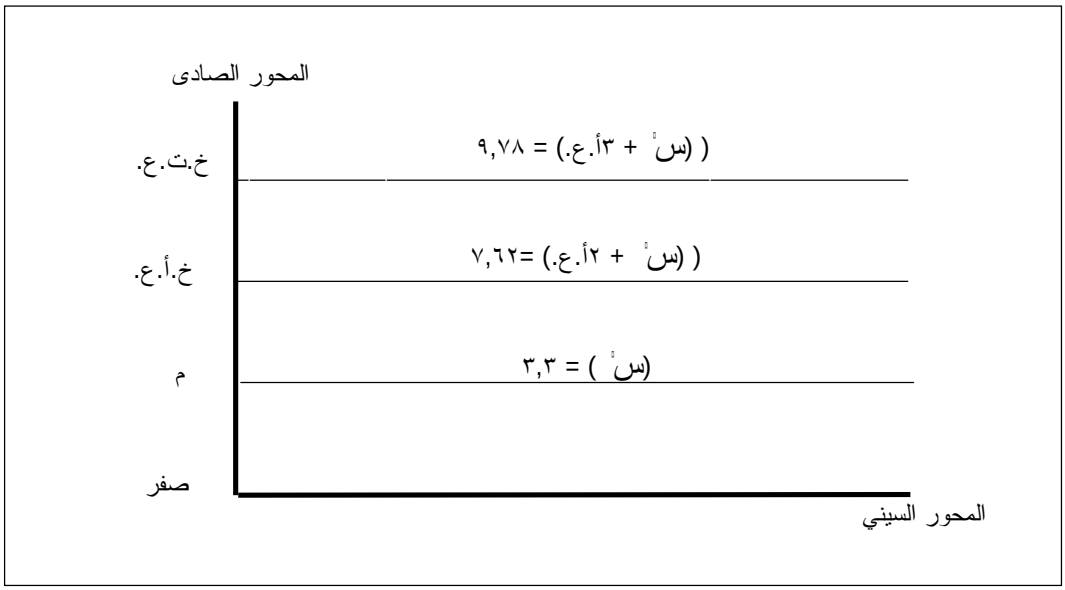
"تابع" جدول رقم (٤ - ١)
حساب الانحراف المعياري

القراءات		نسبة الانحراف		
أ	ب	س	(س - س̄)	(س - س̄)٢
٦١,٧	٦١,٩	٠,٣٢	٢,٩٨	٨,٨٨
٦٢	٦٤	٣,٢٠	٠,١٠	٠,٠١
٦٥	٥٨	٨,١٠	٤,٨٠	٢٣,٠٠
٥٧	٥٥	٣,٦٠	٠,٣٠	٠,٠٩
٥٩	٥٨,٤	١,٠٠	٢,٣٠	٥,٣٠
٥٨	٥٦	٣,٥١	٠,٢١	٠,٠٤
٥٩	٦١	٣,٣٣	٠,٠٣	٠,٠٠
مجموع س = ٦٦,٠٠ س̄ = ٣,٣٠			مجموع (س - س̄)٢ = ٨٨,٨٢ أ.ع. = ٢,١٦	
ن = # عدد البيانات = ٢٠ مجموع س = ٦٦,٠٠ س̄ = مجموع س ÷ ن = ٣,٣٠			أ.ع= √(مجموع (س - س̄)٢ ÷ (ن-١) = ٢,٣٥	

يتم إنشاء رسم الدقة البياني الفارغ (لم تسجل فيه أى بيانات بعد) عن طريق تحديد الخطوات التالية:

* خط المتوسط : م = س̄
* خط الإنذار العلوي: خ.أ.ع = (س̄ + ٢أ.ع)
* خط التحكم العلوي: خ.ت.ع = (س̄ + ٣أ. ع)

وتوقع هذه النتائج على الرسم البياني كما هو فى شكل رقم (٤ - ٢).



شكل (٤-٢)

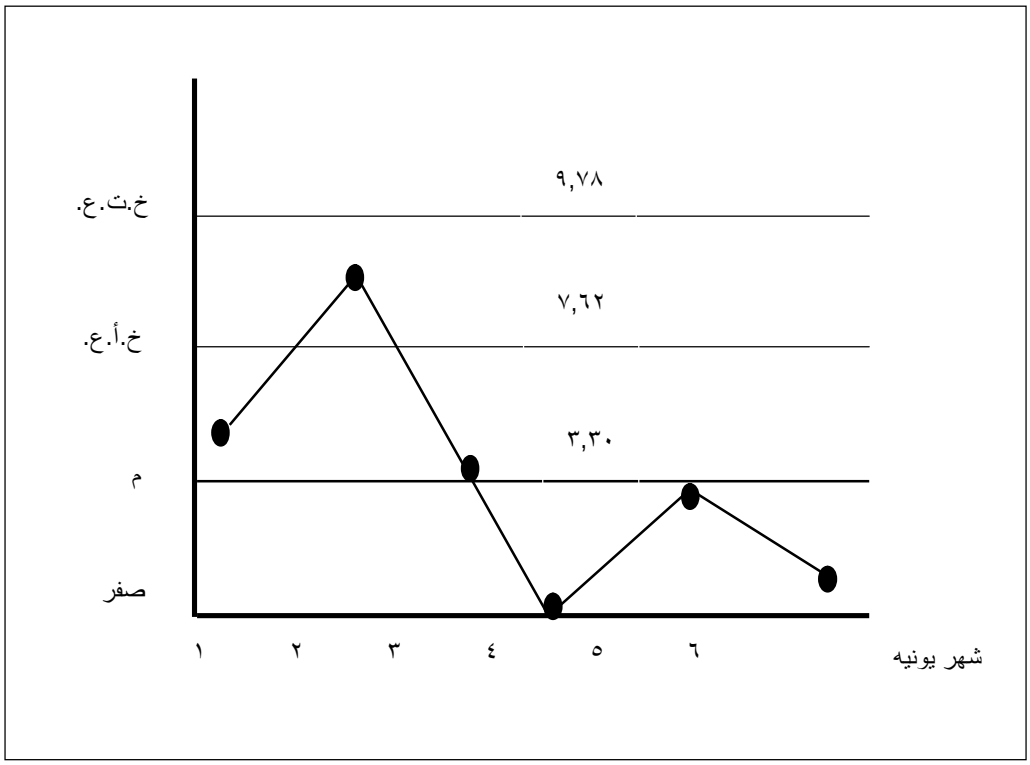
رسم الدقة البياني

ويوضح الجدول رقم (٤-٢) بعض نتائج تحاليل نسبة المواد العالقة لـــ ٦ عينات متطابقة (Duplicate) للصرف المبدئى، ويتم حساب نسبة الانحراف وتسجيلها على الرسم البياني كما فى الشكل رقم (٤-٣) وذلك فى كل مرة عند تحليل عينة متطابقة.

جدول رقم (٤-٢)

نتائج التحاليل المسجلة خلال ٦ أيام

تاريخ التحليل	القراءات		نسبة الانحراف (س)
	أ	ب	
١ يونيه	٥٩,٢٠	٦٢,٠٠	٤,٤٠
٢ يونيه	٦٥,٠٠	٥٨,٠٠	٨,١٠
٣ يونيه	٥٧,٠٠	٥٥,٠٠	٣,٦٠
٤ يونيه	٦٠,٠٠	٦٠,٠٠	٠,٠٠
٥ يونيه	٦١,٠٠	٦٢,٠٠	٣,٢٠
٦ يونيه	٥٩,٠٠	٥٨,٤٠	١,٠٠



شكل (٤-٣)

نسبة الانحراف لنتائج القراءات بعد تسجيلها على الرسم البياني

تفسير النتائج

- النتيجة التى تسجل ما بين خط الإنذار وخط التحكم يتم قبولها ولكنها يجب أن تكون مدعاة للاهتمام، ولا يتحتم إعادة تحليل العينة ولكن على المحلل الكيميائي أن يهتم أكثر بإجراء التحاليل.
- النتيجة التى تسجل فوق خط التحكم هي نتيجة "خارج نطاق التحكم"، وفى هذه الحالة يتم إيقاف التحليل حتى تحدد المشكلة ويتم حلها. وبعد ذلك يجب زيادة التركيز على إجراءات جودة التحاليل. ثم يجب التعرف على المشكلة وحلها واتخاذ اللازم لتصحيحها وكتابة ذلك بدقة فى السجلات. وفى حالة إعادة تحليل العينة يتم تسجيل النتيجة التى كانت فوق خط التحكم والنتيجة الجديدة، ومن المفضل أن يتم تحليل نسبة ١٠% من الاختبارات ونسبة ٥% من اختبارات الموقع (مثل جمع العينات، الأس الهيدروجينى pH) كعينات دقة. مما يعنى تحليل عينة متطابقة على الأقل (Duplicate)

كل ١٠ عينات بالمعمل. ولكل اختبار خارج المعمل يتم تحليل عينة متطابقة كل ٢٠ عينة.

ويجب مراعاة ما يلى:

١) فى حالة استخدام وحدة القياس جزء فى المليون ppm أو ملليجرام/لتر، يجب أن تقل نسبة الانحراف عن ١٠%.
٢) فى حالة استخدام وحدة القياس جزء فى البليون ppb أو ميكروجرام/ لتر، يجب أن تقل نسبة الانحراف عن ٢٠%.
٣) فى حالة ملاحظة خمس نتائج خارج نطاق التحذير لا يتم تسجيل القراءة الخامسة فقط.
٤) لا يتم تسجيل أى قراءة خارج نطاق التحكم.
٥) يتم إيقاف التحاليل لتحديد سبب خروج النتيجة عن النطاق.
٦) بعد تحديد السبب تستكمل التحاليل ويتم إعادة تحليل العينة فى حالة إمكانية ذلك (فى حالة عدم انتهاء صلاحيتها).
٧) فى حالة عدم تحديد سبب المشكلة: يتم إيقاف التحاليل وتطلب مساعدة خارجية لتحديد وحل هذه المشكلة.
٨) يتم مراجعة حدود نطاق التحكم والإنذار - إذا كانت هذه الحدود ضيقة يتم تكوين حدود جديدة باستخدام نتائج تحاليل جديدة.
٩) لا يتم مواصلة التحاليل إلا بعد تحديد المشكلة والتعرف عليها وحلها.
١٠) حدود التحكم يجب تجديدها على الأقل كل ٣ شهور.
١١) يتم وضع حدود التحكم الجديدة باستخدام كل النتائج التى تم الحصول عليها خلال الثلاث شهور الأخيرة وتحديد خط المتوسط، خط إنذار، خط تحكم جُدد بناء على هذه النتائج.

الفصل الخامس

كفاءة نتائج التحاليل

الفصل الخامس

كفاءة نتائج التحاليل

مقدمـــــــــة

بالرغم من أن اختبارات الدقة تؤكد مدى القدرة على تكرار إجراء ما والحصول على نفس النتائج كل مرة إلا أنها لا تؤكد الكفاءة.
والكفاءة هي مقياس مدى اقتراب نتائج التحاليل من القيمة الحقيقية ويتم التعبير عنها بنسبة الاستعادة (Percent Recovery).

ويتم هذا عن طريق تحليل العينات القياسية (وعينات (Spike) هي العينات التي يتم إضافة محلول قياسي (Standard) معلوم التركيز إليها قبل تحليلها).

وكما هو الحال فى اختبارات الدقة فإنه من المفضل أن يتم إجراء ١٠% على الأقل من الاختبارات المعملية و ٥% من اختبارات الموقع (مثل جمع العينة) كاختبارات كفاءة.

حساب نتائج الكفاءة

يتم تحليل عينة قياسية (Standard) أو عينة (Spike) ثم يتم مقارنة نتيجة التحليل بالنتيجة الحقيقية المعروفة سابقاً لهذه العينة.
هذه المقارنة تحدد "نسبة الاستعادة" (Percent Recovery) ويتم حسابها كالتالي:

نسبة الاستعادة = (ب ÷ أ) × ١٠٠

أ = القيمة الحقيقية المعلومة للمحلول القياسى (ملليجرام/ لتر)

ب= نتيجة التحليل (ملليجرام/ لتر).

مثال:

القيمة الحقيقية للمحلول القياسى = ١٩ ميللجرام/ لتر

نتيجة التحليل = ١٨ ميللجرام/ لتر

نسبة الاستعادة = ١٨÷١٩ × ١٠٠ = ٩٥% استعادة

حتى يمكن إعداد حدود التحذير وحدود التحكم لرسومات الكفاءة البيانية يجب توافر على الأقل ٢٠ نتيجة، يتم تحليل ٢٠ عينة قياسية لكل نوع من أنواع التحاليل مطلوب اختبار كفاءته. ومثلاً نسبة المواد العالقة فى عينة الصرف المبدئى. ويعرض الجدول رقم (٥-١) حساب الانحراف المعياري ل٢٠ عينه قياسية.

رسومات الكفاءة البيانية

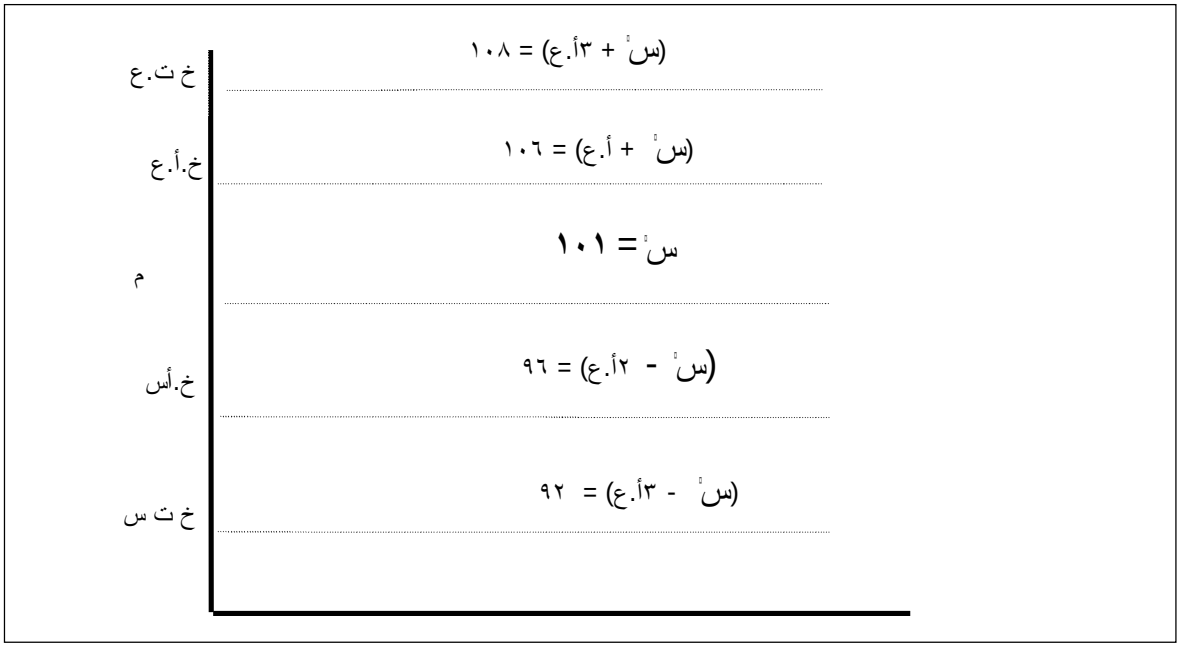
يتم تحديد رسومات الكفاءة البيانية بصورة مشابهة لطريقة تحديد رسومات الدقة البيانية، ماعدا أن رسومات الكفاءة البيانية تشمل حدود تحكم وإنذار عليا وأخرى سفلى.

شكل رقم (٥-١) عبارة عن رسم كفاءة بياني فارغ جاهز لتسجيل البيانات عليه.

- س = خط المتوسط = م
- (س + ٢أ.ع) = خط الإنذار العلوي = خ.أ.ع
- (س + ٣أ.ع) = خط التحكم العلوي = خ.ت.ع
- (س - ٢أ.ع) = خط الإنذار السفلى = خ.أس
- (س - ٣أ.ع) = خط التحكم السفلى = خ.ت س

جدول رقم (٥ - ١)
حساب الانحراف المعياري

القيمة الحقيقية		نتيجة التحليل		
أ	ب	س	(س - س̄)	(س - س̄)٢
٨٠	٧٦	٩٩	٢	٤
٨٠	٧٨	٩٨	٣	٦
٨٠	٧٩	٩٩	٢	٤
٨٠	٨٤	١٠٥	٤	١٦
٨٠	٨٣	١٠٤	٣	٩
٨٠	٨٤	١٠٥	٤	١٦
٨٠	٨٢	١٠٢	١	١
٨٠	٧٧	٩٦	٥	٢٥
٨٠	٨٠	١٠٠	٠	٠
٨٠	٨١	١٠١	١	١
٨٠	٧٩	٩٩	٢	٤
٨٠	٧٨	٩٨	٣	٩
٨٠	٧٩	٩٩	٢	٤
٨٠	٧٩	٩٩	٢	٤
٨٠	٨١	١٠١	٠	٠
٨٠	٨٠	١٠٠	١	١
٨٠	٨٢	١٠٢	١	١
٨٠	٨١	١٠١	٠	٠
٨٠	٨٠	١٠٠	١	١
٨٠	٨٣	١٠٤	٣	٩
ن = # عدد النتائج = ٢٠ مجموع س = ٢٠١٢ س̄ = مجموع س ÷ ن =١٠١			(س - س̄)٢ =مجموع (س - س̄)٢= ١١٨ أ.ع= √مج (س - س̄)٢ ÷ (ن-١) =٢,٤٩	



شكل رقم (٥-١)

رسم كفاءة بياني فارغ جاهز لتسجيل البيانات عليه

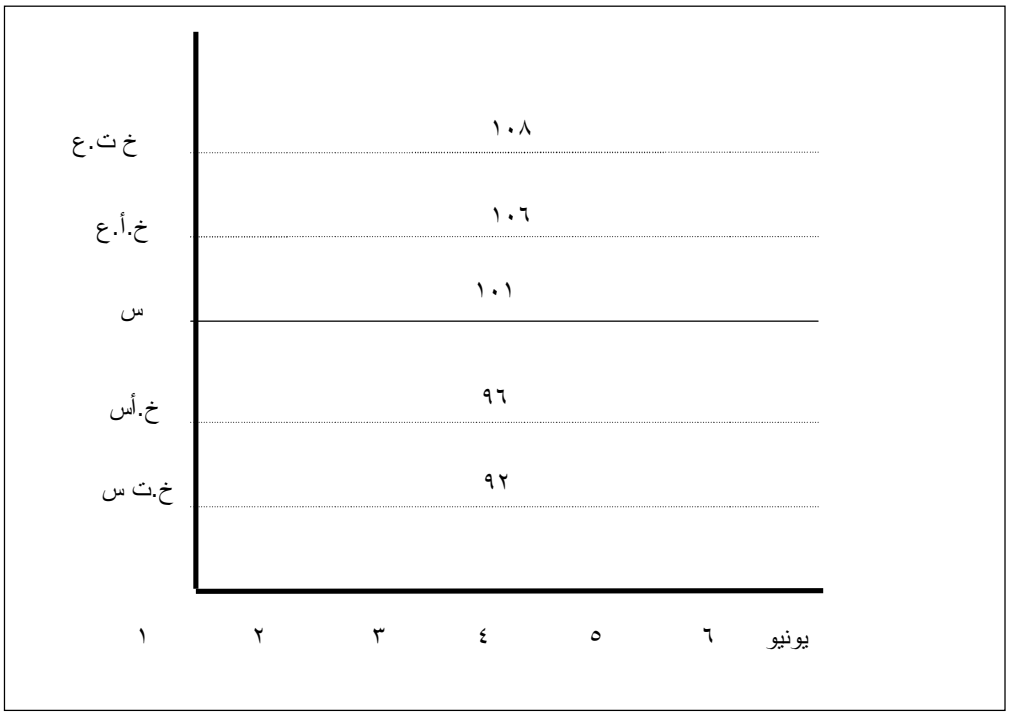
الآن أصبح لدينا رسم كفاءة بياني كاملاً بالحدود اللازمة لتقييم كفاءة النتائج ويمكن تسجيل أى نتيجة "نسبة استعادة" عينة جديدة فيه والبيانات التالية هى النتائج الخاصة بتحليل نسبة المواد العالقة لعدد ٦ عينات قياسية للصرف الابتدائى، ويعرض الجدول رقم (٥-٢) نتائج التحليل المسجلة خلال ٦ أيام.

جدول رقم (٥-٢)

نتائج التحليل المسجلة خلال ٦ أيام

تاريخ التحليل	القرارات		نسبة الاستعادة
	أ	ب	
١ يونيه	٨٠	٧٢	٩٠
٢ يونيه	٨٠	٨٢	١٠٢
٣ يونيه	٨٠	٨١	١٠١
٤ يونيه	٨٠	٨٠	١٠٠
٥ يونيه	٨٠	٧٩	٩٩
٦ يونيه	٨٠	٧٨	٩٨

ويوضح الشكل رقم (٥-٢) هذه النتائج بعد تسجيلها على رسم الكفاءة البياني.



شكل رقم (٥ - ٢)

رســـــــــم الكفاءة البياني

فى كل مرة يتم فيها القيام بتحليل لعينة قياسية يتم حساب نسبة الاستعادة وتسجيلها على رسم الكفاءة البيانى.

تفسير النتائج

- النتيجة التى تسجل ما بين خط الإنذار وخط التحكم يتم قبولها ولكنها يجب أن تكون مدعاة للاهتمام. لا يتحتم إعادة تحليل العينة ولكن على المحلل الكيميائي أن يهتم أكثر بإجراءات التحليل.
- النتيجة التى تسجل فوق خط التحكم هي نتيجة "خارج نطاق التحكم". وفى هذه الحالة يتم إيقاف التحليل حتى تحدد المشكلة ويتم حلها. بعد ذلك يجب زيادة التركيز على إجراءات جودة التحاليل.

يجب التعرف على المشكلة وحلها واتخاذ اللازم لتصحيحها ثم كتابة ذلك فى السجلات بدقة.

فى حالة إعادة تحليل العينة يتم تسجيل النتيجة التى كانت خارج خط التحكم والنتيجة الجديدة.

ويراعى ما يلى:

١) فى حالة استخدام وحدة القياس جزء فى المليون ppm أو ميلليجرام/ لتر، يجب أن تكون نسبة الاستعادة فى الحدود ٩٠- ١١٠.
٢) فى حالة استخدام وحدة القياس جزء فى البليون ppb أو ميكروجرام/ لتر، يجب أن تكون نسبة الاستعادة فى الحدود ٨٠- ١٢٠
٣) فى حالة ملاحظة خمس نتائج خارج نطاق التحذير لا يتم تسجيل القراءة الخامسة فقط.
٤) لا يتم تسجيل أى قراءة خارج نطاق التحكم.
٥) يتم إيقاف التحاليل لتحديد سبب خروج النتيجة عن نطاق التحكم.
٦) بعد تحديد السبب تستكمل التحاليل ويتم إعادة تحليل العينة فى حالة إمكانية ذلك (فى حالة عدم انتهاء صلاحيتها).
٧) فى حالة عدم تحديد سبب المشكلة:

- تتوقف التحاليل ويتم طلب مساعدة خارجية لتحديد وحل هذه المشكلة.
- يتم مراجعة حدود نطاق التحكم والإنذار - إذا كانت هذه الحدود ضيقة يتم تكوين حدود جديدة باستخدام نتائج تحاليل جديدة.
- لا يتم مواصلة التحاليل إلا بعد تحديد المشكلة والتعرف عليها وحلها.
- رسوم الكفاءة البيانية يجب تجديدها على الأقل كل ثلاثة أشهر باستخدام كل النتائج التى يتم الحصول عليها خلال الثلاث شهور الأخيرة.

باستخدام جدول رقم (٥-٣) سجل الشكل البياني الذى يحدد كفاءة ودقة النتائج.

جدول رقم (٥-٣)
تحديد كفاءة ودقة النتائج

المجموعات	س١	س٢	ر	س̿
١	٤٩١	٤٩٣	٢	٤٩٢,٠
٢	٤٩٧	٤٩٧	٠	٤٩٧,٠
٣	٤٩٨	٥٠١	٣	٤٩٩,٥
٤	٤٩٢	٤٨٥	٧	٤٨٨,٥
٥	٤٩٨	٤٩٣	٥	٤٩٥,٥
٦	٥١٠	٥٠٨	٢	٥٠٩,٠
٧	٥٠٦	٥١٢	٦	٥٠٩,٠
٨	٤٩٢	٤٨٧	٥	٤٨٩,٥
٩	٤٩١	٤٨٨	٣	٤٨٩,٥
١٠	٤٩٧	٥٠٣	٦	٥٠٠,٠
١١	٥٠٠	٤٩٤	٦	٤٩٧,٠
١٢	٥٠٦	٥١١	٥	٥٠٨,٥
١٣	٥٠٦	٥٠١	٥	٥٠٣,٥
١٤	٤٨٧	٤٩٧	١٠	٤٩٢,٠
١٥	٤٩١	٤٩١	٠	٤٩١,٠
١٦	٥٠٠	٤٩٩	١	٤٩٩,٥
١٧	٤٩١	٥٠٧	١٦	٤٩٩,٠
١٨	٤٩٥	٤٩٨	٣	٤٩٦,٥
١٩	٥٠٢	٥٠٠	٢	٥٠١,٠
٢٠	٤٩٥	٤٩٢	٣	٤٩٣,٥

الشكل البياني ر: R- chart:

بحساب قيمة ر َ نجد أنها ٤,٥، وحيث أن خط التحكم العلوي = د٤ × ر (قيمة د٤ = ٣,٢٦٧)

فإن:

خط التحكم العلوي = ٣,٢٦٧ × ٤,٥ = ١٤,٧

وبذلك فإن نتيجة التجربة رقم ١٧ تُعتبر خارجة عن هذا الحد ويجب استبعادها، وفى هذه الحالة فإن قيمة ر ̄ = ٣,٨٩

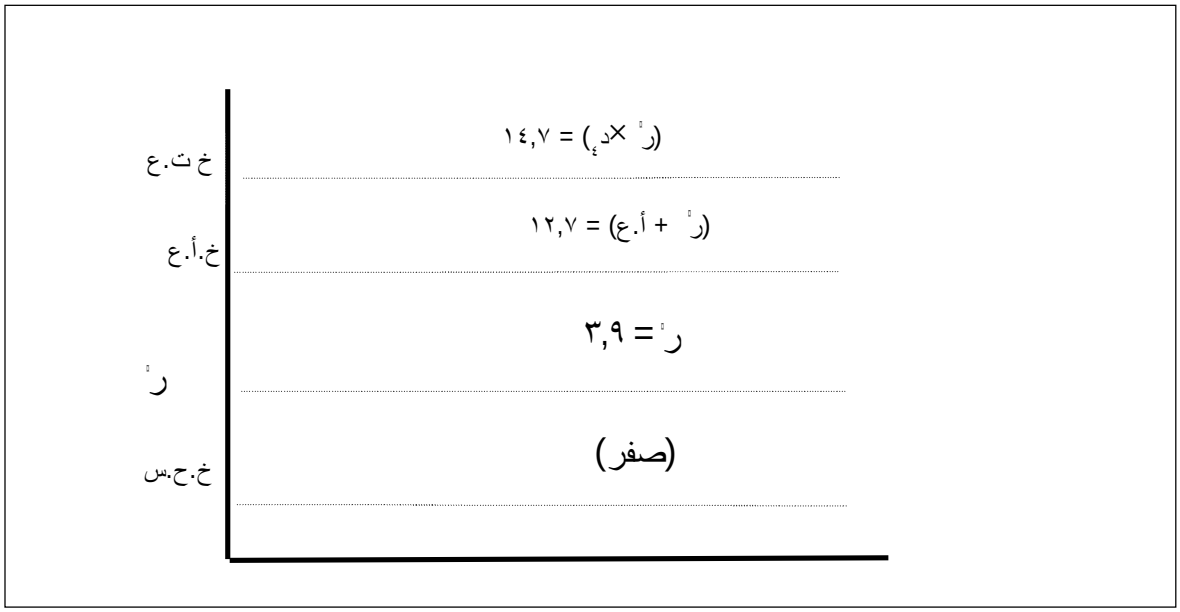
وعليه فإن:

خط المتوسط = ٣,٩

خط الإنذار العلوي = ٣,٩ × ٣,٢٦٧ = ١٢,٧

خط الحد السفلى = صفر

وبذلك فإن الشكل رقم (٥-٣) يبين كيف يبدو الرسم ر ْ.



شكل رقم (٥-٣)

رسم بياني لقيمة ر ْ

الشكل البياني س ً (X - chart):

يحسب الحيود القياس

$$ح^{٢}_{س} = \frac{\text{مجموع } (س - س_{أ})^{٢}}{ن - ١}$$

وباستخدام الأرقام فى شكل رقم (٥-٥) فى هذه المعادلة

فإن ح = ٦,٥٩

س′ = ٤٩٧,٥

حد الإنذار = س′ ± ٢ح

= ٤٩٧,٥ ± (٦,٥٩ × ٢)

خط الإنذار العلوي = ٥١٠,٧ (خ.أ.ع)

خط الإنذار السفلى = ٤٧٧,٧

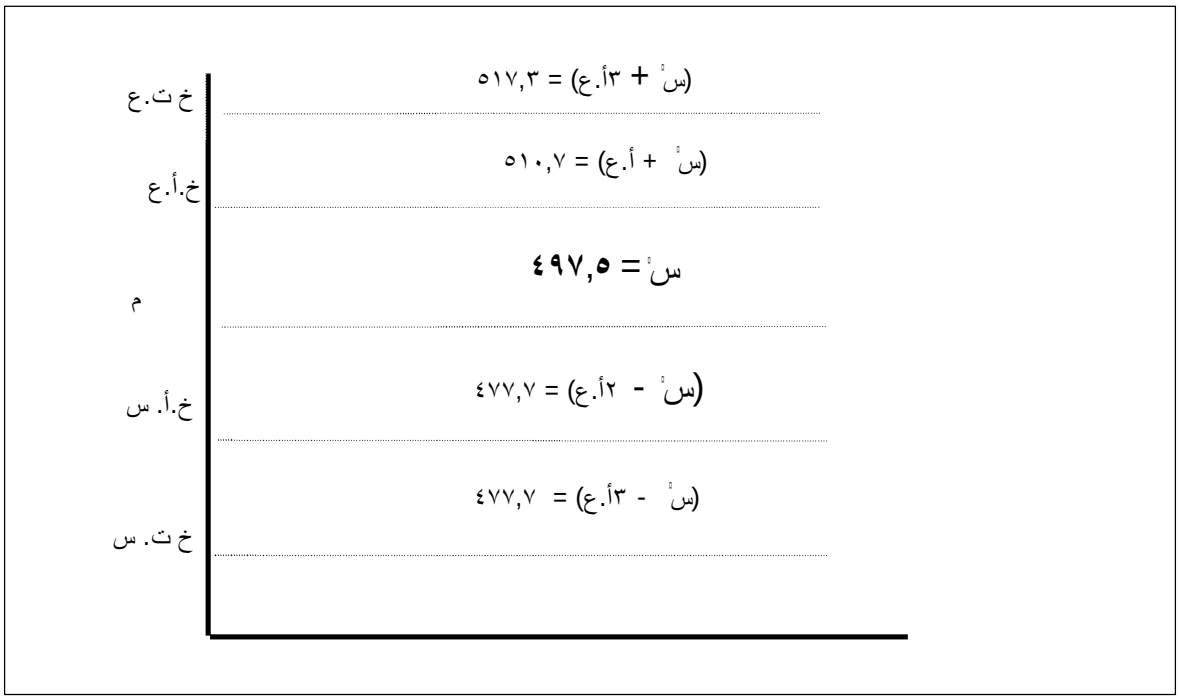
خط التحكم = س ± ٣ح

= ٤٩٧,٥ ± (٦,٥٩ ×٣) = ١٩,٧٧

خط التحكم السفلى = ٤٧٧,٧

خط التحكم العلوي = ٥١٧,٣

وشكل رقم (٥-٤) الشكل البياني س′.



شكل رقم (٥ - ٤)

رســـــــم البياني س̿

الفصل السادس

التحليل البكتريولوجى باستخدام طريقة الأنابيب المتعددة

الفصل السادس

التحليل البكتريولوجى باستخدام طريقة الأنابيب المتعددة

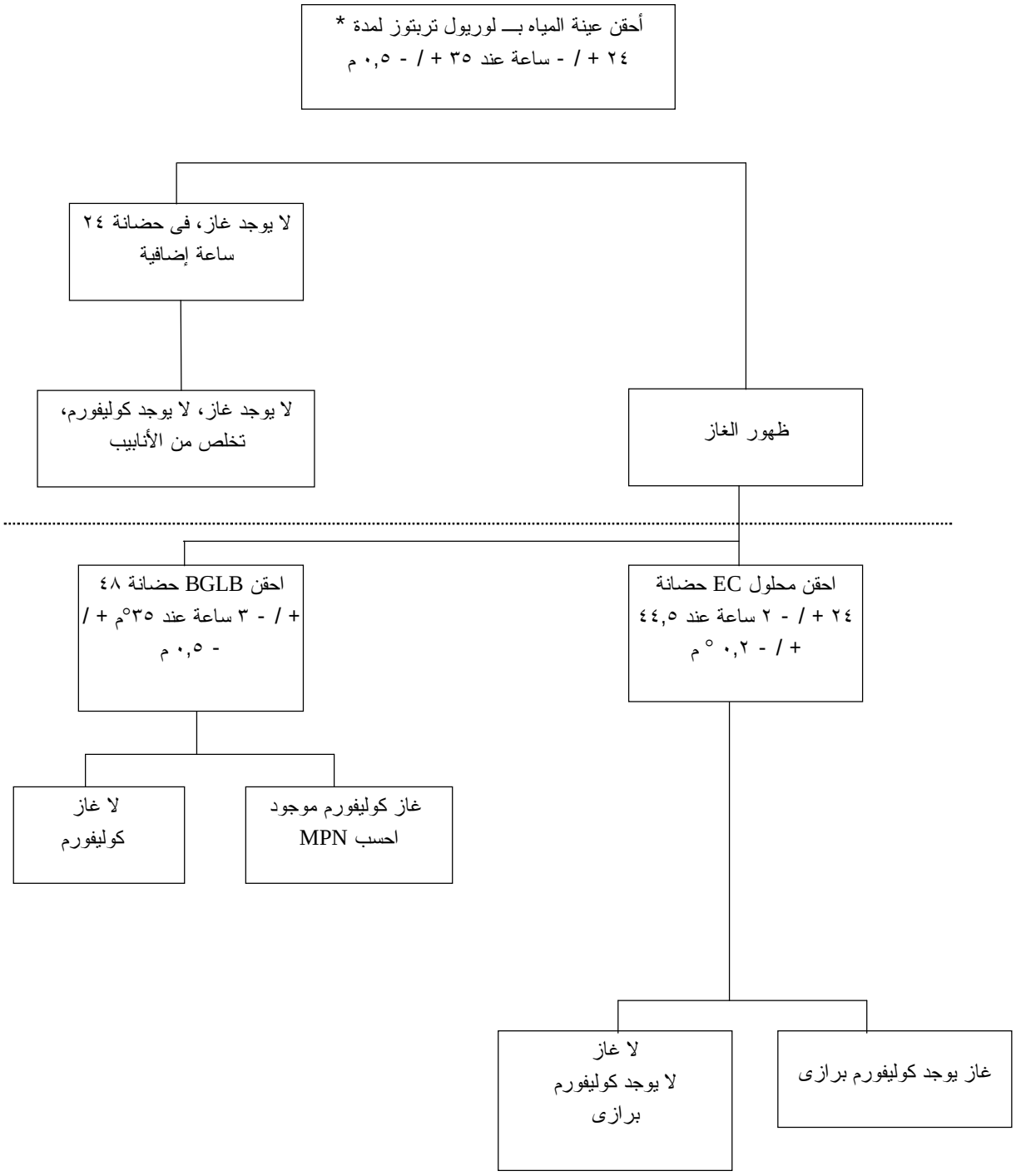
المبدأ الأساسى

فى طريقة الأنابيب المتعددة، تلقح سلسلة من الأنابيب المحتوية على مستنبت مرقى مناسب بمقادير اختبارية من عينة الماء.

وبعد مدة حضانة معينة فى درجة حرارة محددة، يعتبر كل أنبوب يتكون به غاز "إيجابياً ظنياً" Presumptive positive لأن هذا يدل على احتمال وجود قولونيات. ولكن بما أن الغاز قد ينتج بواسطة جراثيم أخرى، يستصوب تأكيد ذلك بإجراء اختبار لاحق. ويعرف الاختباران بالاختبار الظني والاختبار المؤكد على التوالى.

ففى حالة الاختبار المؤكد، يلقح مستنبت أكثر انتقائية بمواد مأخوذة من الأنابيب الإيجابية. وبعد فترة مناسبة تفحص الأنابيب لمعرفة ما إذا كان قد تكون غاز. وعندها يمكن تقدير درجة تركز الجراثيم فى العينة من عدد الأنابيب الملقحة وعدد الأنابيب الإيجابية فى الاختبار المؤكد. ويمكن تقدير العدد الأكثر احتمالا Most Probable Number (MPN) للجراثيم الموجودة باستخدام جداول إحصائية مبتكرة خصيصاً لهذا الغرض. وتعرف هذه الطريقة بطريقة العدد الأكثر احتمالا MPN.

ويبين الشكل (٦-١) الإجراءات التى ينطوي عليها التحليل الجرثومي لعينة من الماء، بالإضافة إلى مدد الحضانة ودرجات الحرارة المناسبة. ويتطلب هذا التحليل تخفيفات مختلفة للعينة المفحوصة وفقاً لنوع الماء الذى يجرى تحليله.



شكل رقم (٦ - ١)

مخطط توضيحي للكوليفورم الكلى باستخدام الأنابيب المضاعفة بطريقة التخمير

* يمكن استبدالها بمرق الماكونكى

التلقيـــــــح يمكن استخدام مقادير اختبارية مختلفة لتوفير سلسلة من التخفيفات العشرية، وتتوقف التخفيفات على إعداد جراثيم القولونيات المتوقعة فى عينة الماء التى يجرى فحصها. وتعتمد معولية Reliability النتيجة التى يتم الحصول عليها على عدد الأنابيب الملقحة بكل مقدار اختباري. وفى حالات معينة يمكن خفض هذا العدد إلى ثلاثة أنابيب فى كل خطوة من خطوات التخفيف. ولكل مجموعة من الأنابيب الملقحة جدولها الخاص من قيم الأعداد الأكثر احتمالاً MPN.

المياه غير الملوثة يمكن بصورة عامة افتراض وجود تلوث قليل، أو لا تلوث، فى المياه التى تدخل الشبكة أو المياه الموجودة فيها. وفى هذه الحالة يحتاج الأمر إلى تلقيح خمسة أحجام من ماء العينة، كل منها ١٠ ميليلتر، فى خمسة أنابيب يحتوى كل منها على ١٠ ميليلتر من مستنبت مزدوج القوة Double-strength.

المياه الملوثة المياه التى يشتبه بأنها أكثر تلوثاً، مثل المياه غير المعالجة التى تجلب من مصادر معينة للماء الخام، تحتاج للفحص باستخدام أحجام تلقيح مختلفة فى تخفيفات عشرية. وفيما يلى التلقيحات التى تجرى فى العادة:

١- ١٠ ميليلتر من العينة فى كل من خمسة أنابيب يحتوى كل منها على ١٠ ميليلتر من مستنبت مزدوج القوة.
٢- ١,٠ ميليلتر من العينة فى كل من خمسة أنابيب يحتوى كل منها على ١٠ ميليلتر من مستنبت مفرد القوة.
٣- ١,٠ ميليلتر من تخفيف ١ : ١٠ من العينة (أى، ٠,١ ميليلتر من العينة) فى كل من خمسة أنابيب يحتوى كل منها على ١٠ ميليلتر من مستنبت مفرد القوة.

وإذا كان من المتوقع أن تكون العينة مفرطة التلوث، تلقح مقادير متساوية حجمها ١,٠ ميليلتر من تخفيفات عشرية متسلسلة من كل خطوة تخفيف فى خمسة أنابيب تحتوى على ١٠ ملليلتر من مستنبت مفرد القوة.

وإذا كان عبء العمل ثقيلاً جداً والوقت المتاح محدوداً، يمكن خفض عدد الأنابيب إلى ثلاثة فى كل سلسلة. ولكن تلقيح خمس أنابيب بكل حجم من العينة يعطى نتيجة بالعدد الأكثر احتمالاً MPN يوثق بها إحصائياً أكثر من النتيجة التى يُحصل عليها بتلقيح ثلاث أنابيب فحسب.

التجهيزات من الضروري توفر التجهيزات المختبرية الأساسية التالية:

أ- **فرن هواء ساخن**: يجب أن يتسع هذا الفرن بشكل كافٍ ليستوعب كافة الممصات Pipettes، وأنابيب الاختبار، وزجاجات العينات، والأدوات الزجاجية الأخرى والأجهزة التى تحتاج إلى تعقيم بواسطة التسخين الجاف، ومن الضروري دوران الهواء الساخن بحرية داخل الفرن لتأمين التعقيم الصحيح. ويجب أن تضبط درجة حرارة الفرن عند 170°م، كما يجب استعمال مقياس حرارة للتحقق من درجة الحرارة. ومدة التعقيم المطلوبة ساعة واحدة.

ب- **جهاز التعقيم (الموصدة) Autoclave**: يجب أن تكون الموصدة كبيرة بالقدر الكافى لتسمح بجريان طليق للبخار حول الحمولة العادية المراد تعقيمها، وأن تزود بمقياس للضغط ومقياس للحرارة، على أن يكون الجزء الأكبر من مقياس الحرارة فى مخرج الموصدة (مما يقلل من فرص تحطم مقياس الحرارة). ويجب تشغيل الموصدة وفقاً لتعليمات الصانع المشددة؛ ويجب أن يكفل ذلك أن يحل البخار محل الهواء الموجود فى غرفة الهواء برمته. على أن يتم التعقيم خلال مدة لا تزيد على ٣٠ دقيقة. ويوصى التقيد بحزم بدرجات الحرارة ومدد التعقيم المحددة للأنواع المختلفة من المستنبتات.

جـ- **الحاضنة**: يجب أن تزود الحاضنة بضابط للحرارة قادر على الحفاظ على حرارة منتظمة صحيحة إلى ± ٠,٥°م. ويجب أن يكون داخل الحاضنة واسعاً إلى حد يسمح بجريان طليق للهواء عندما تكون

الحاضنة مليئة. كما يجب أن توضع مقاييس الحرارة فى نقاط ممثلة فى الحاضنة وأن ترصد الحرارة دورياً (من المستحسن يومياً).

د- **الحمام المائى**: يجب أن يزود الحمام المائى بمنظم للحرارة Thermostat للحفاظ على حرارة منتظمة قدرها ٤٤ ± ٠,٥مْ لزرع القولونيات الغائطية، وبرفوف من الفولاذ غير القابل للصدأ وأن تسخن بالكهرباء.

هـ- **مقياس الرقم الهيدروجينى pH**: هذا المقياس ضرورى للتحقق من الرقم الهيدروجينى للمستنبت.

و- **ميـــــــزان**: هذا الميزان ضرورى لوزن المستنبت المسحوق والمواد الكيميائية المستعملة فى تحضير المحاليل. ومعظم الوزنات تتراوح بين ١ - ١٠٠ جرام ويجب أن تكون دقة الميزان ± جرام واحد عند وزن ثقل قدره ١٥٠ جرام.

ز- **جهاز تقطير الماء Water Deionizer**: هذا الجهاز مطلوب لإنتاج ماء غير سام، أى ماء خالٍ من أية مواد قد تتداخل فى عملية النمو الجرثومي.

ح- **زجاجات التخفيف**: الزجاجات ذات الأغطية اللولبية الخالية من مواد سامة قابلة للذوبان ممتازة لهذا الغرض. ويجب أن تكون هذه الزجاجات كبيرة بحيث تسمح بحيز كافٍ من الهواء فوق السائل يكفل مزجاً جيداً عند الرج. ويتوقف الحجم على نسبة التخفيف المفضلة. فإذا كانت نسبة التخفيف ١ : ١٠ هى المفضلة، تستعمل فى العادة زجاجات تحتوى على محلول مخفف قدره ٩ ميليلتر (لتلقى مقادير متساوية Aliquots كل منها ١ ميليلتر من العينة) أو ٩٠ ميليلتر (لتلقى مقادير متساوية كل منها ١٠ ميليلتر من العينة)؛ ويجـــب أن تكـــون

الزجاجات كبيرة إلى حد يسمح بالحفاظ على هذه الأحجام بعد التعقيم لمدة ٢٠ دقيقة فى درجة حرارة ١٢١مْ.

ط- **ممصات**: هناك حاجة إلى حجمين من الممصات (١ ميليلتر و١٠ ميليلتر) المزودة بسدادات قطنية عند الطرف الفمى Mouthpiece. ويجب أن تدرج الممصات سعة ١ ميليلتر بزيادات قدر كل منها ٠,١ ميليلتر. أما الممصات المتشظية Chipped أو المكسورة فيجب أن تطرح جانباً. ويجب أن تحفظ الممصات فى وضع ملائم فى حاوية معدنية قابلة للتعقيم، وأن تستخدم حاوية منفصلة لكل حجم من الممصات. ويمكن أيضاً لف الممصات بمفردها بالورق وتعقيمها بالتسخين.

ى- **أجهزة تحضير البيئات**: هذه تتطلب حاويات من الزجاج أو الفولاذ غير القابل للصدأ. ويجب أن تكون أجهزة التسخين وأدوات التحريك المستخدمة فى تحضير المستنبتات نظيفة وخالية من المواد السامة القابلة للذوبان.

ك- **مشعل غازي**: يعتبر مشعل بنسين Bunsen أو أى نوع ممائل وافياً بالغرض.

ل- **أنابيب زرع تحتوى على بالات Vials مقلوبة (أنابيب دورهام) Durham**: يجب أن تكون الأنابيب والبالات ذات أحجام تسمح بملء البالة تماماً بالمستنبت وتغطيسها فى الأنبوب.

م- **رفوف أنابيب الاختبار**: يجب أن تكون كبيرة بحيث تتسع لأنابيب المستنبتات الأكبر قطراً.

ن- **أبرة تلقيح (Loop) ومقبضها**: يجب استخدام قطع من السلك عيار ٢٤ و ٢٦ (٧,٥ - ١٠ سم). ويعتبر سلك النيكروم Ni-Chrome مقبولاً ولكن يفضل عليه السلك المكون من البلاتين والأيريدوم Platinum-

Iridium. وتثبت قطع السلك (العروات) فى مقابض معدنية أو زجاجية ذات قطر مماثل لقطر القلم. ولعمل عروة التلقيح يثنى السلك على شكل دائرة قطرها ٣ - ٤ ميليمتر.

س- **أجهزة مختبرية عامة**: هناك حاجة إلى قوارير Flasks مستديرة وقوارير ايرلنماير Erlenmeyer ودوارق Beakers والحوامل العدنية Stands، الخ مختلفة.

البيئـــــــات وماء التخفيف

الأوســاط Media المجففة المتاحــة فى الأســواق تبسط عملية تحضير مرق الزرع، ولذلك يوصى باستعمالها فى المختبر. وينتج هذه الأوساط صانعون مختلفون كمساحيق يمكن وزنها بسهولة وإذابتها فى ماء مقطر ووضعها فى أطبق وأنابيب الزرع تمهيداً لتعقيمها.

وهناك مستنبتات مختلفة متعددة متاحة للاختبار الظني، مثل:

- مرق لوريل تربتوز (LTB).
- مرق ماك كونكى MacConkey.
- مرق لاكتوز Lactose.

واستعمال هذه الأوساط الثلاثة شائع فى بلدان عديدة. وتعتمد انتقائية مرق ماك كونكى ومرق لوريل تربتوز على التوالى على وجود أملاح الصفراء Bile salts والعامل السطحي النشاط Surface-active، كبريتات اللوريل؛ أما مرق لاكتوز فهو وسط غير انتقائي.

ويستعمل مرق لاكتوز الصفراء الأخضر اللامع (BGB) أو مرق الماكونكى على نطاق واسع كوسط تأكيدي Confirmatory medium لفحص إجمالي القولونيات.

ولتأكيد وجود القولونيات الغائطية يستخدم إما مرق BGB أو مرق القولونية البرازية (FC).

تحضير الأوساط

يجب أن تحضر الأوساط بموجب تعليمات الصانع، على الوجه التالى:

أ- أذب الكمية المعينة من الوسط المجفف فى ماء مقطر للحصول على وسط ظني مزدوج أو مفرد القوة (فى حالة التحليل التأكيدي يستعمل الوسط المفرد القوة فحسب).

ب- وزع الحجم المطلوب فى أنابيب زرع تحتوى على أنبوب (Durham) مقلوب، وغط أنابيب الزرع.

جـ- عقم الأنابيب فى جهاز التعقيم أو آنية طهي بالضغط Pressure Cooker فى درجة حرارة ١١٤مْ لمدة ١٠ دقائق (أو حسب مواصفات الصانع). ومن المهم بصفة خاصة عدم وضع الأوساط التى تحتوى على مواد ثنائية السكريد Disaccharides، مثل اللاكتوز، فى جهاز التعقيم، وفى درجات حرارة أكثر ارتفاعاً.

د- يجب أن يخزن الوسط المعقم فى درجة حرارة الغرفة (٢٥مْ تقريباً)، للإبقاء على عقامته. وبالإضافة إلى ذلك يجب وقاية المحلول من التعرض للضوء لأن هنالك صبغات متعددة حساسة للضوء.

تحضير ماء التخفيف يستعمل محلول منظم Buffered ومعقم خصيصاً لتحضير تخفيفات عينات للتلقيح فى المستنبتات. ويحضر الماء من محلول أصلى Stock مركز من محلول منظم فوسفاتى Phosphate Buffer. ولعمل المحلول الأصلى، أذب ٤٣,٠ جراماً من فوسفات ثنائي هيدروجين البوتاسيوم (KH_2PO_4) فى ٥٠٠ مل من الماء المقطر. ويجب أن يكون الرقم الهيدروجينى pH للمحلول ٧,٢ (ينبغى التحقق من ذلك بواسطة مقياس الرقم الهيدروجينى). ويمكن زيادة الرقم الهيدروجينى إذا لزم ذلك بإضافة قطرات من محلول هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) تركيزه مول واحد باللتر (٤,٠ جرام مذاب فى ١٠٠ ميليلتر من الماء المقطر). ثم أضف قدراً كافياً من الماء المقطر حتى يصبح الحجم لتراً واحداً. وعند عدم استعمال المحلول المختزن ينبغى حفظه فى

زجاجة محكمة الإغلاق فى درجة حرارة ٤ - ١٠مْ، وذلك لتأخير النمو الجرثومي.

تحضير ماء التخفيف رقم (٢):

يوزن ٥٠ جرام الماغنسيوم كلوريد أو كبريتات وتضاف إلى ١ لتر من ماء مقطر ثم يحضر محلول التخفيف المستعمل وقت إجراء التجربة على النحو التالى:

- ١,٢٥ ملل من المحلول رقم (١)
- ٥ ملل من المحلول رقم (٢)
- ١٠٠٠ ملل ماء مقطر

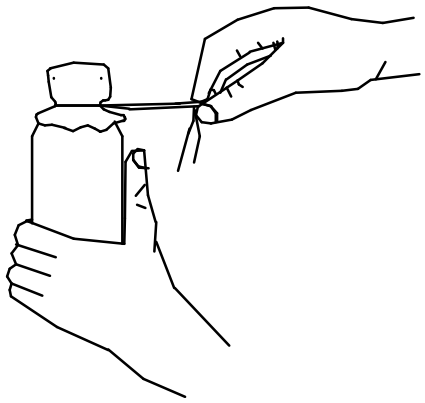
ثم يصب فى أنابيب ٩سم^{٣} فى كل أنبوبة ويعقم فى جهاز التعقيم لمدة ١٥ دقيقة.

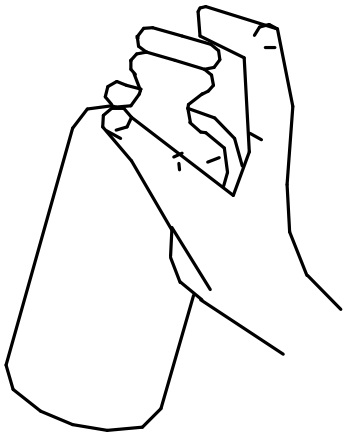
التطبيق على المياه غير الملوثة

الطريقة:

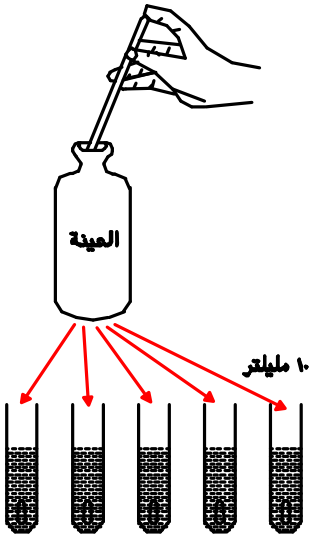
الطريقة التى تستعمل لفحص مياه غير ملوثة نسبياً، كالمياه المعالجة فى شبكات المياه، مبينة فيما يلى:

أ- انزع الورق الملفوف على زجاجة العينة.

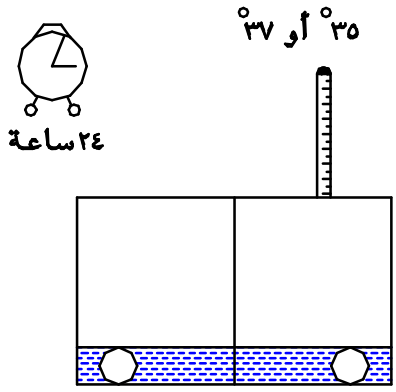




ب- رج الزجاجة بقوة بينما السدادة فى موضعها وذلك حتى تتوزع الجراثيم توزيعاً متساوياً (وإذا كانت الزجاجة ممتلئة فانزع السدادة وأفرغ منها ٢٠ - ٣٠ ميليلتر، وبعد ذلك ضع السدادة ورج الزجاجة حتى تمام المزج.

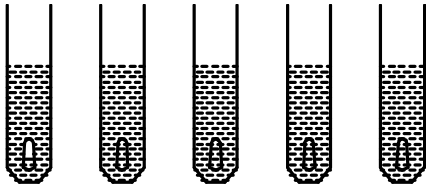


جـ- باستعمال ممص معقم سعته ١٠ ميليلتر، ضع ١٠ ميليلتر من العينة فى كل أنبوبة من خمس أنابيب تحتوى على ١٠ ميليلتر من مرق الفحص الظني (مزدوج القوة). ومن المستحسن رج الأنابيب بهدوء حتى تتوزع العينة بالتساوى فى المستنبت كله.

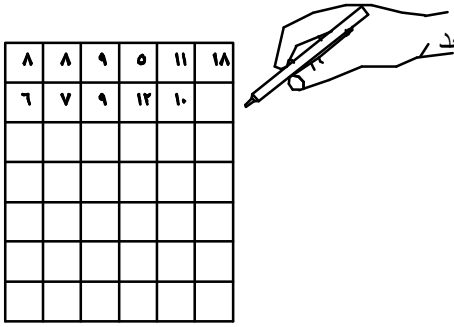


د- احضن الأنابيب فى الحاضنة فى درجة حرارة 35°م أو 37°م لمدة ٢٤ ساعة.

هـ- عند انتهاء ٢٤ ساعة من الحضانة، افحص كل أنبوب بحثاً عن الغاز. فإذا كان هناك غاز فسوف يمكن رؤيته فى أنبوبة Durhan، أما إذا لم يوجد غاز فترج الأنبوبة بهدوء، فإذا شوهد فوران من الفقاعات الصغيرة، تعتبر الأنبوبة إيجابية.

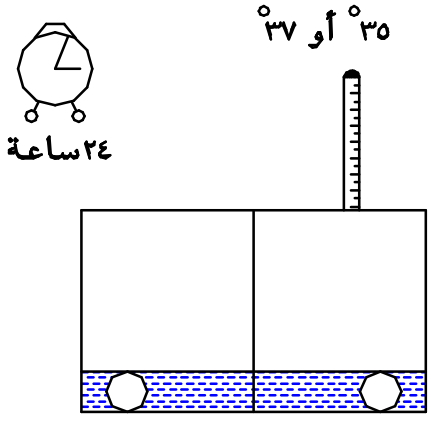


و- سجل عدد الأنابيب الإيجابية بعد ٢٤ ساعة فى جدول.

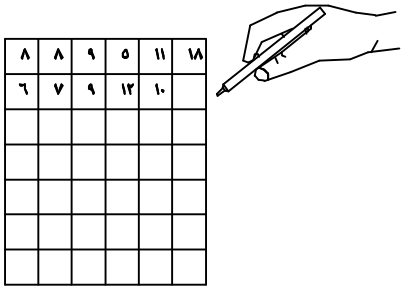


١٨	١١	٥	٩	٨	٨
	١٠	١٢	٩	٧	٦

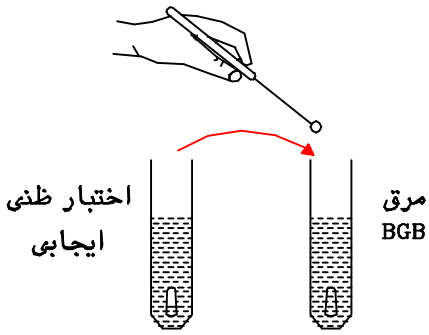
ز- اعد حضانة الأنابيب السلبية لمدة ٢٤ ساعة أخرى وبعد انتهاء هذه المدة افحص الأنابيب من جديد بحثاً عن الغاز كما فى الخطوة هـ ويعتبر الغاز المنتج فى نهاية ٢٤ ساعة أو ٤٨ ساعة من الحضانة تأكيد عن وجود قولونيات فى العينة.



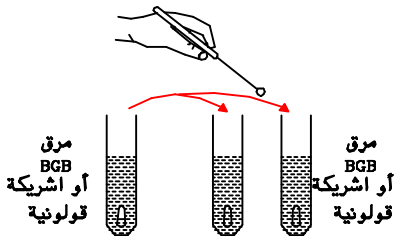
ح- سجل عدد الأنابيب الإيجابية بعد ٤٨ ساعة على الجدول.



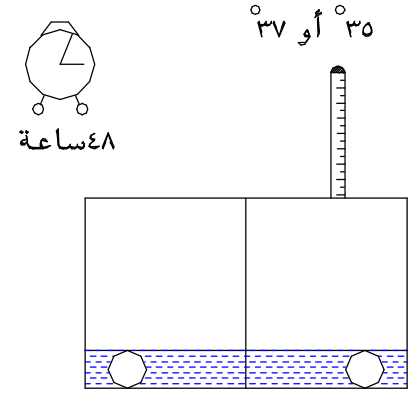
١٨	١١	٥	٩	٨	٨
	١٠	١٢	٩	٧	٦



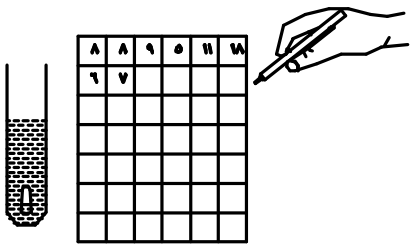
ط- يجرى الفحص التأكيدي فى نهاية كل من الحضانة لمدة ٢٤ ساعة ولمدة ٤٨ ساعة على السواء. وباستعمال عروة انقل نقطة أو نقطتين من كل أنبوبة ذات نتيجة ايجابية ظنية إلى أنبوبة مقابلة معقمة تأكيدية حجمها ١٠ ميليلتر وتحتوى مثلاً على مرق لاكتوز الصفراء الأخضر المتألق BGB. وقبل كل عملية نقل تعقم العروة على لهب ثم تترك لتبرد.



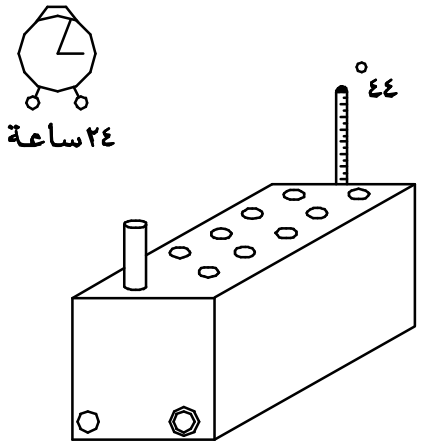
ى- إذا أُريد أيضاً تحرى وجود القولونيات الغائطية تزرع مزارع ثانوية فى أنبوبتين تحتويان على مرق تأكيدي (مثل مرق لاكتوز الصفراء الأخضر المتألق BGB)، وتحضران من كل من الأنابيب الإيجابية الظنية. وفى بعض المناطق يفضل استعمال مستنبت الاشريكة القولونية للتأكد من وجود القولونيات الغائطية.



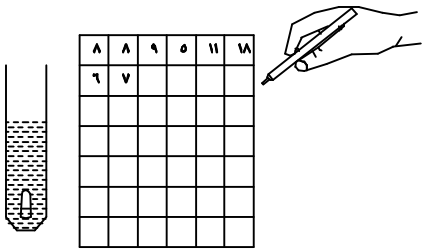
ك- لتأكيد وجود القولونيات احضن فى الحاضنة أنبوبة مزرعة ثانوية من كل أنبوبة إيجابية ظنية لمدة ٤٨ ساعة فى درجة حرارة 35°م أو 37°م.



ل- افحص الأنابيب فى نهاية ٤٨ ساعة من الحضانة فإذا وجد غاز فإن ذلك يؤكد وجود القولونيات فى العينة. سجل النتائج فى الجدول.



م- لتأكيد وجود القولونيات الغائطية احضن فى الحاضنة أنبوبة مزرعة ثانوية أخرى من كل أنبوبة إيجابية ظنية لمدة ٢٤ ساعة فى درجة حرارة ٤٤ - 45°م.



ن- إذا وجد غاز فى الأنابيب بعد حضانة لمدة ٢٤ ساعة، فإن ذلك يؤكد وجود قولونيات غائطية.

تعيين العـــدد الأكثر احتمالاً

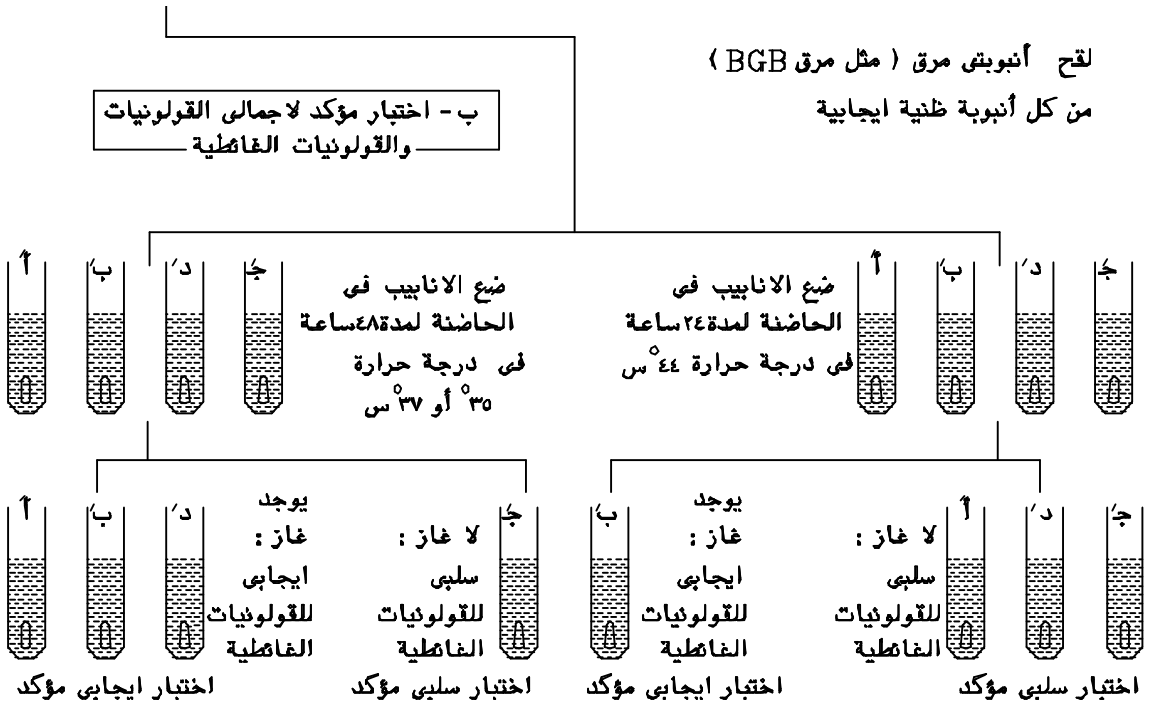
فى حالة الماء المعالج، حيث تلقـــح ٥ أجـــزاء من العينـــة حجـــم كل منها ١٠ ميليلتر، يمكن معرفة العدد الأكثر احتمالاً MPN من نتائج الاختبار بواسطة الجدول رقم (٦-١).

جدول رقم (٦-١)

الأعداد الأكثر احتمالاً MPN لتوافيق مختلفة من نتائج إيجابية وسلبية عند استعمال ٥ أجزاء من العينة كل منها ١٠ ميليلتر

عدد الأنابيب ذات التفاعل الإيجابي من ٥ أنابيب سعة كل منها ١٠ ميليلتر	العدد الأكثر احتمالاً MPN
صفر	٥
١	٢
٢	٥
٣	٩
٤	١٦
٥	أكثر من ٢٣

وفى الشكل رقم (٦-٢) مثال لكيفية تفسير نتائج الاختبار. ويظهر من ذلك أن ثلاثة أنابيب إيجابية مؤكدة تم الحصول عليها بالنسبة لمجموعة إجمالى القولونيات. ومن الجدول يمكن أن نرى أن القيمة المقابلة للعدد الأكثر احتمالاً MPN هى ٩,٢ إجمالى قولونيات فى كل ١٠٠ ميليلتر من العينة. وفيما يختص بالقولونيات الغائطية، لم يكن هناك سوى أنبوبة إيجابية واحدة مؤكدة فحسب. وبالتالى فإن قيمة العدد الأكثر احتمالاً MPN هى ٩,٢ اجمالى قولونيات فى كل ١٠٠ ميليلتر من العينة. وفيما يختص بالقولونيات الغائطية. لم يكن هناك سوى أنبوبة إيجابية واحدة مؤكدة فحسب. وبالتالى فإن قيمة العدد الأكثر احتمالاً MPN لهذه المجموعة هى ٢,١ فى كل ١٠٠ ميليلتر.



شكـــــــــل رقم (٦ - ٢)

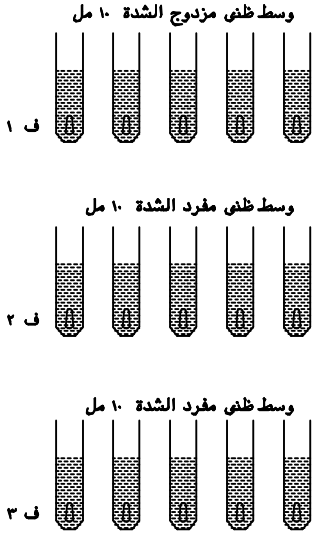
كيفية تفسير نتائج الاختبار

التطبيق على المياه
الملوثة (بطريقة التخفيف)

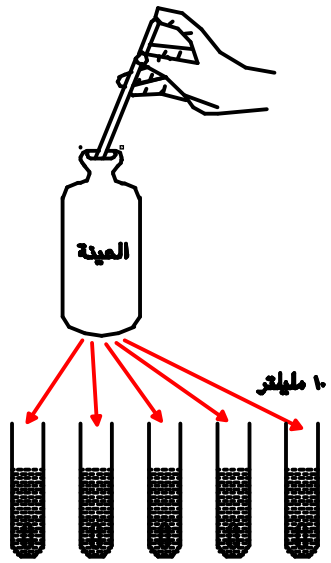
الطريقة

الطريقة التى تستعمل لفحص مياه يتوقع أن تكون ملوثة حتى ولو كان قد سبق معالجتها مبينة فيما يلى، وهى فى جوهرها مماثلة للطريقة الموصوفة سالفاً، باستثناء استعمال تخفيفات متعددة فى هذه الطريقة.

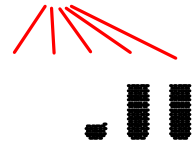
أ- رتب ثلاثة صفوف يتألف كل منها من خمس أنابيب فى رف لأنابيب الاختبار. يحتوى كل كل من الأنابيب فى الصف الأول (ف١) على ١٠ مل من وسط ظني مزدوج القوة، بينما تحتوى كل أنبوبة فى الصفين الثانى والثالث (ف٢، ف٣) على ١٠ مل من وسط ظني مفرد القوة.

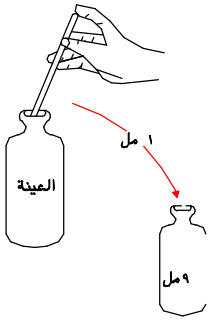


ب- ضع ١٠ مل من العينة فى كل من الأنابيب الخمسة فى الصف ف١ باستعمال ماصة معقمة.

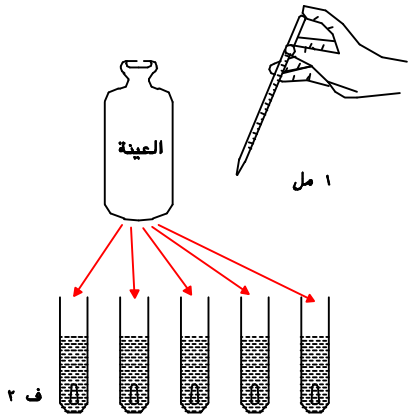


جـ- ضع ١ مل من العينة فى كل من الأنابيب الخمسة فى الصف ف٢ باستعمال ماصة معقمة.

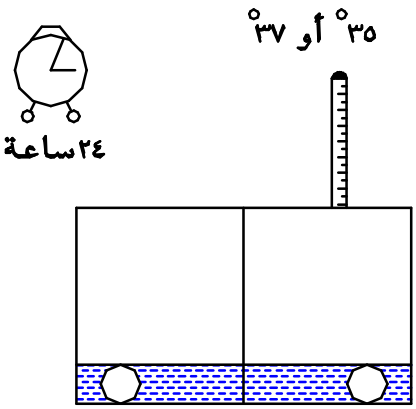




د- حضر محلول ١ : ١٠ من العينة بإضافة ٩ مل من الماء المخفف (استعمل ماصة معقمة سعة ١ مل). سد ثانية الزجاجة المحتوية على العينة المخففة ورجها بقوة.



هـ- أضف ١ مل من السائل المخفف ١ : ١٠ بواسطة ماصة معقمة أخرى إلى كل من الأنابيب الخمس فى الصف ف٣.



و- بعد رج الأنابيب برفق لمزج الزرعة Incoulum، ضع الرف ومعه الخمس عشرة أنبوبة فى درجة حرارة 35°م أو 37°م لمدة ٢٤ ساعة فى الحاضنة. وبعدها تابع الطريقة الخاصة بالماء غير الملوث.

تعيين العدد الأكثر احتمالاً

يتم التوصل إلى العدد الأكثر احتمالاً بطريقة مماثلة للطريقة الموضحة القسم (٥-٢)، ولكن بالنظر للعدد الكبير من الأنابيب، يتعين استخدام الجدول (٦-٢) الأكثر تعقيداً.

ويبين المثال التالى كيفية الحصول على النتائج:
لنفرض أنه تم الحصول على النتائج التالية بعد تأكيد وجود إجمالى القولونيات:

- ٥ أنابيب إيجابية فى الصف ف١ (حجم العينة الملقحة ١٠ مل).
- ٣ أنابيب إيجابية فى الصف ف٢ (حجم العنية الملقحة ١ مل).
- أنبوبة إيجابية واحدة فى الصف ف٣ (حجم العينة الملقحة ٠،١ مل).

وهكذا يمكن أن يرمز للنتائج بالأرقام ٥ - ٣ - ١، وهى تمثل الاختبار المؤكد للقولونيات. ويشير الجدول (٦-٢) بأن النتيجة المشفرة ٥ - ٣ - ١ (٥ × ١٠ مل إيجابى، ٣ × ١ مل إيجابى، ١ × ٠،١ مل إيجابى) تعطى قيمة العدد الأكثر احتمالاً وقدرها ١١٠، أى أن عينة الماء تحتوى على ما يقدر بـــ ١١٠ قولونيات فى كل ١٠٠ مل.

ويجرى الاختبار المؤكد للقولونيات الغائطية بنقل ما تحمله أبرة التعقيم من كل أنبوبة اختبار إيجابية ظنياً إلى أوساط تأكيدية، ووضعها فى الحاضنة فى درجة ٤٤ $\pm$ ٠،٥°م لمدة ٢٤ ساعة. ولنفرض أن هذا الاختبار يعطى قيمة مشفرة هى ٤ - ٣ - صفر. عندما يعطى الجدول (٦-٢) قيمة العدد الأكثر احتمالاً وقدرها ٢٧ أى وجود قولونية غائطية فى كل ١٠٠ ميليلتر من العينة.

ثم لنأخذ مثالاً لماء مفرط التلوث. فقد تعطى الطريقة الموضحة أعلاه نتيجة مشفرة قدرها ٥-٥-٥. ونتيجة كهذه لا تعطى قيمة محددة للعدد الأكثر احتمالاً. فعند الاشتباه بتلوث شديد كهذا تلقح عادة أكثر من ثلاثة تخفيفات عشرية التركيز. ويجب عمل سلسلة التخفيفات العشرية Tenfold هذه بطريقة ما بحيث يحتمل حدوث نتيجة سلبية لأعلى تخفيف ملقح على الأقل. فإذا لقح

فى البداية ٥ × ١،٠ مل، ٥ × ٠،١ مل، ٥ × ٠،٠١ مل و ٥ × ٠،٠٠١ مل وتم الحصول على نتيجة مشفرة مؤكدة قدرها ٥-٥-٤-١، عندها يتعين استخدام ثلاث فقط من هذه النتائج للحصول على قيمة العدد الأكثر احتمالاً من الجدول (٦-٢). وينبغى انتقاء هذه النتائج بأخذ أصغر حجم للعينة (فى هذه الحالة ٠،١ مل) تعطى فيه كافة الأنابيب نتيجة إيجابية، والتخفيفين الأعلى اللذين يليانه مباشرة. وعندها تستعمل النتيجة المشفرة للأحجام الثلاثة للحصول على قيمة العدد الأكثر احتمالاً من الجدول (٦-٢). ففى المثال المذكور أعلاه تختار النتيجة ٥-٤-١ التى تمثل الأحجام ٠،١، ٠،٠١، ٠،٠٠١ مل من العينة. وقيمة العدد الأكثر التى يتم الحصول عليها من الجدول (٦-٢) يجب أن تضرب فى ١٠٠ للحصول على العدد الأكثر احتمالاً لهذه العينة بالذات (أنظر أدناه)؛ وتكون هذه النتيجة فى هذه الحالة هى ١٧٠٠٠ لكل ١٠٠ مل.

وأحياناً قد يجد عامل المختبر صعوبة فى تعيين معامل الضرب لاستخدامه فى الحصول على العدد الأكثر احتمالاً MPN المناسب للعينة التى جرى فحصها. فالطريقة البسيطة لتعيين العدد الأكثر احتمالاً هى تقسيم قيمته التى يتم الحصول عليها من الجدول (٦-٢) على حجم العينة ممثلاً بالعدد الأوسط فى الرمز المختار. فعلى سبيل المثال، خذ رمزاً Code قدره ٥-٢-صفر يمثل فيه العدد ٢ حجم عينة قدرها ٠،٠١ مل [أنظر الجدول (٦-٣)]. فالعدد الأكثر احتمالاً للرمز ٥-٢-صفر من الجدول ٢ هو ٤٩. لهذا تكون قيمة العدد الأكثر احتمالاً للعينة المفحوصة = ٩/ ٠،١ = ٤٩ × ١٠٠ = ٤٩٠٠.

جدول رقم (٦-٢)

الأعداد الأكثر احتمالاً MPN لنتائج توافيق مختلفة إيجابية وسلبية عند استخدام ٥ مقادير كل منها ١٠مل، و٥ مقادير كل منها ١ مل و٥ مقادير كل منها ٠،١ مل

عدد الأنابيب التى تعطى تفاعلاً إيجابياً من أصل			العدد الأكثر احتمالاً	عدد الأنابيب التى تعطى تفاعلاً سلبياً من أصل			العدد الأكثر احتمالاً
٥ كل منها ١٠ مل	٥ كل منها ٠،١ مل	٥ كل منها ١ مل		٥ كل منها ١٠ مل	٥ كل منها ٠،١ مل	٥ كل منها ١ مل	
صفر	صفر	صفر	< ٢	٤	٢	١	٢٦
صفر	صفر	١	٢	٤	٣	صفر	٢٧
صفر	١	صفر	٢	٤	٣	١	٣٣
صفر	٢	صفر	٤	٤	٤	صفر	٣٤
١	صفر	صفر	٢	٥	صفر	صفر	٢٣
١	صفر	١	٤	٥	صفر	١	٣١
١	١	صفر	٤	٥	صفر	٢	٤٣
١	١	١	٦	٥	١	صفر	٣٣
١	٢	صفر	٦	٥	١	١	٤٦
٢	صفر	صفر	٥	٥	١	٢	٦٣
٢	صفر	١	٧	٥	٢	صفر	٤٩
٢	١	صفر	٧	٥	٢	١	٧٠
٢	١	١	٩	٥	٢	٢	٩٤
٢	٢	صفر	٩	٥	٣	صفر	٧٩
٢	٣	صفر	١٢	٥	٣	١	١٠٩
٣	صفر	صفر	٨	٥	٣	٢	١٤١

"تابع" الجدول رقم (٦-٢)

الأعداد الأكثر احتمالاً MPN لنتائج توافيق مختلفة إيجابية وسلبية عند استخدام ٥ مقادير كل منها ١٠مل، و٥ مقادير كل منها ١ مل و٥ مقادير كل منها ٠،١ مل

عدد الأنابيب التى تعطى تفاعلاً إيجابياً من أصل			العدد الأكثر احتمالاً	عدد الأنابيب التى تعطى تفاعلاً سلبياً من أصل			العدد الأكثر احتمالاً
٥ كل منها ١٠ مل	٥ كل منها ٠،١ مل	٥ كل منها ١ مل		٥ كل منها ١٠ مل	٥ كل منها ٠،١ مل	٥ كل منها ١ مل	
٣	صفر	١	١١	٥	٣	٣	١٧٥
٣	١	صفر	١١	٥	٤	صفر	١٣٠
٣	١	١	١٤	٥	٤	١	١٧٢
٣	٢	صفر	١٤	٥	٤	٢	٢٢١
٣	٢	١	١٧	٥	٤	٣	٢٧٨
٣	٣	صفر	١٧	٥	٤	٤	٣٤٥
٤	صفر	صفر	١٣	٥	٥	صفر	٢٤٠
٤	صفر	١	١٧	٥	٥	١	٣٤٨
٤	١	صفر	١٧	٥	٥	٢	٥٤٢
٤	١	١	٢١	٥	٥	٣	
٤	١	٢	٢٦	٥	٥	٤	١٩٠٩
٤	٢	صفر	٢٢	٥	٥	٥	> ٢٤٠٠

ويبين الجدول (٦-٣) امثلة للعوامل التى تستخدم لضرب قيمة العدد الأكثر احتمالاً المستخرج من الجدول (٦-٢) للحصول على العدد الأكثر احتمالاً الملائم للتخفيفات المختلفة.

جدول رقم (٦-٣)

أمثلة لعوامل الضرب لتعيين العدد الأكثر إحتمالاً للتخفيفات المختلفة للعينة

المثال	عدد الأنابيب التى تعطى تفاعلاً إيجابياً من أصل					النتيجة	عامل الضرب
	٥ كل منها ١ مل	٥ كل منها ٠،١ مل	٥ كل منها ٠،٠١مل	٥ كل منها ٠،٠٠١ مل	٥ كل منها ٠،٠٠٠١ مل	المشفرة المختارة	للعدد الأكثر احتمالاً
١	٥	٥	٢	صفر	صفر	٥- ٢ - صفر	١٠٠
٢	٥	٥	٤	١	صفر	٥ - ٤ -١	١٠٠
٣	٥	٣	صفر	صفر	صفر	٥ - ٣ - صفر	١٠
٤	٥	٥	٥	٣	١	٥ - ٣- ١	١٠٠٠
٥	صفر	١	صفر	صفر	صفر	صفر-١- صفر	١٠

التطبيق على المياه الملوثة (الطريقة "المختصرة")

إن إجراءات الطريقة المختصرة هى فى الواقع مثيلة للطريقة المذكورة فى سابقاً، والفرق الوحيد هو أن ثلاثة أنابيب فقط من كل حجم تلّقح بدلاً من من خمسة أنابيب، مما يجعل من الضرورى استخدام جدول مختلف الجدول رقم (٦-٤) لتعيين العدد الأكثر احتمالاً.

انتقاء الأنابيب للاختبار المؤكد

يجب أن يتضمن كل تحليل جرثومى الاختبار المؤكد Confirmed Test.

فإذا اقتصر الفحص على خمس فقط من حجم ١٠ ميليلتر، يتعين إجراء الاختبار الموكد الخاص بالقولونيات والقولونيات الغائطية فى جميع الأنابيب التى يتكون فيها الغاز. ولكن إذا تضمن التلقيح خمسة أنابيب أو ثلاثة لكل من أحجام العينات التى تزيد عن ثلاثة (مثلاً، ١،٠، ٠،١، ٠،٠١، ٠،٠٠١ مل) عندها لا يكون من الضرورى إجراء الاختبارات التأكيدية على كل النابيب الإيجابية.

ويعرض الجدول (٦-٤) الأعداد الأكثر احتمالاً لتوافيق مختلفة من النتائج الإيجابية والسلبية عند استعمال ثلاثة مقادير كل منها ١٠ مل، وثلاثة مقادير كل منها ١ مل، وثلاثة مقادير كل منها ٠،١ مل (الطريقة "المختصرة").

جدول رقم (٦ - ٤)
الأعداد الأكثـــــر احتمالاً

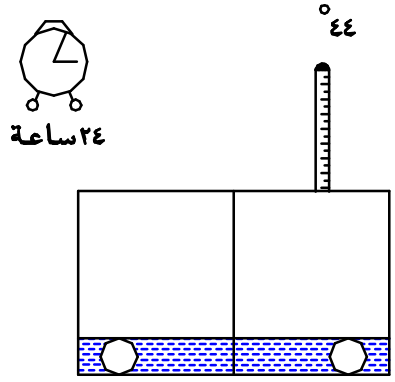
عدد الأنابيب التى تعطى تفاعلاً إيجابياً من أصل			
٣كل منها ١٠ مل	٣ كل منها ١ مل	٣ كل منها ٠،١ مل	العدد الأكثر احتمالاً
صفر	صفر	صفر	< ٣
صفر	صفر	١	٣
صفر	١	صفر	٣
١	صفر	صفر	٤
١	صفر	١	٧
١	١	صفر	٧
١	١	١	١١
١	٢	صفر	١١
٢	صفر	صفر	٩
٢	صفر	١	١٤

إذا كانت الأنابيب الخمسة (الثلاثة) كلها إيجابية فى تخفيفين متتاليين أو أكثر. عندها يتعين انتقاء مجموعة الأنابيب التى تمثل الأصغر بين أحجام العينة التى تكون فيها الأنابيب جميعها إيجابية. ويجب إجراء الاختبار المؤكد على جميع هذه الأنابيب وجميع الأنابيب الايجابية المتطابقة مع الأحجام التالية الأدنى. وفيما يلى مثال يوضح هذه الطريقة: بعد وضع الأنابيب فى الحاضنة لمدة ٢٤ ساعة كانت النتائج ايجابية فى خمسة أنابيب سعة كل منها ١٠ مل، وخمسة أنابيب سعة كل منها ١،٠ مل،وخمسة أنابيب سعة كل منها ٠،١ مل، وأربعة أنابيب سعة كل منها ٠،٠١ مل، وأنبوبة واحدة سعة ٠،٠١ مل وهكذا وإجراء الاختبار المؤكد على الأنابيب التى لقحّت فى البداية بمقادير من العينة مقدارها ٠،١ مل و ٠،٠١ مل و ٠،٠٠١ مل.

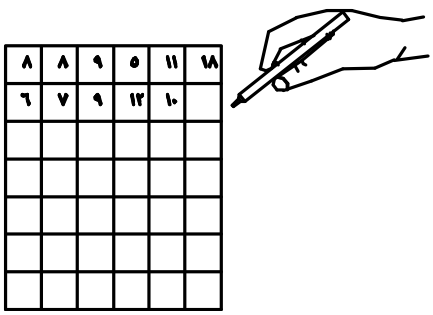
الطريقة المباشرة لفحص القولونيات الغائطية

فى حالة فحص ماء غير مكلور من مرفق مياه مجتمعى صغير، ويكون فيه الاهتمـــام منصباً على القولونيات الغائطية فحسب، يمكـــــن استخدام طريقة متعددة الأنابيب مباشرة لفحص القولونيات الغائطية. ويمكن أن تستخدم هذه الطريقة فى البلدان النامية أو أثناء الاستقصاءات الميدانية إذا كان المكان والقوى العاملة وتسهيلات الحضانة محدودة. وتقوم هذه الطريقة على طريقة العدد الأكثر احتمالاً العادية التى يستخدم فيها مرق لاكتوز كوسط للفحص الظنى، ولكن تتم حضانة الأنابيب فى حمّام مائى فى درجة ٤٤ + ٠،٥°م بدون فحص مسبق لإجمالى القولونيات فى درجة 35°م أو 37°م لمدة ٢٤ ساعة.

وهذه الطريقة مماثلة لتلك المذكورة فيما يتعلق بفحص الماء الملوث، ولكن يستخدم فيها مرق لاكتوز أو مرق ماك كونكى كوسط ظنى، حضّر ١٥ أنبوبة من كل من العينة والوسط كما هو موضح سابقاً.

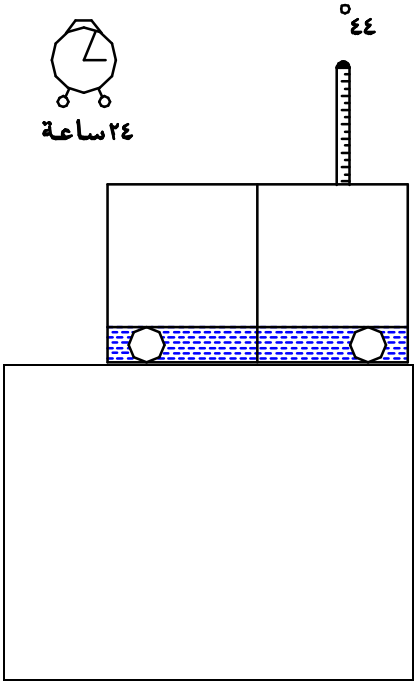


أ- بعد رج الأنابيب برفق لخلط المحتويات ضع الخمس عشرة أنبوبة فى درجة ٤٤ °م ± ٠،٥°م فى الحاضنة لمدة ٢٤ ساعة.



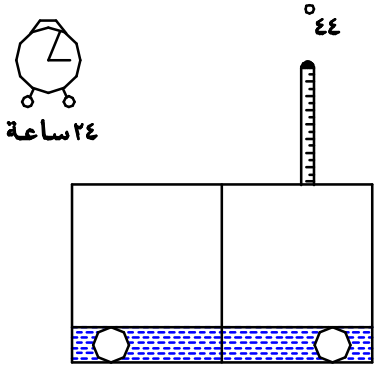
٨	٨	٩	٥	١١	١٨
٦	٧	٩	١٣	١٠	

ب- افحص كل أنبوبـــــة لاكتشاف وجود غاز فيها ثم سجّل عـــدد الأنابيب الإيجابية بعد ٢٤ ساعة فى الجدول المناسب.



ج- يجب أن توضع الأنابيب السلبية فى الحاضنة ثانية لمدة ٢٤ ساعة أخرى، وأن تفحص بعد ذلك بحثاً عن وجود غاز فيها.

د- تأكد من النتائج الظنية بعد ٢٤ ساعة و٤٨ ساعة بنقل جزء من المرق بواسطة العروة إلى مرق تأكيدى ووضعه فى الحاضنة فى درجة 44°م لمدة ٢٤ ساعة.



هـ- يتأكد وجود القولونيات الغائطية إذا تكّون غاز فى المرق التأكيدى بعد ٢٤ ساعة فى درجة حرارة 44°م. عيّن العدد الأكثر احتمالاً MPN من الجدول رقم (٦-٢).

استمـــــارات التسجيـــــل

التحليل الذى يُجرى لعينة معينة يعطى نتـــائج متعـــــددة. وينبغى أن تكون الاستمارة التى تعد لتسجيل هذه النتائج كاملة، وليس بالضرورة معقدة. وينبغى أن يتضمن النموذج معطيات عن العينات Sampling تساعد أيضاً فى التعرف على العينات، ومعطيات مسجلة على استمارة إرسال العينة، وأخرى عن التحليل الجرثومى نفسه. ويبين الشكل ٣ استمارة شاملة مقترحة. وحال إتمام التحليل، ينبغى للمختبر الذى يقوم بالفحص أن يسجل النتائج التى يتم الحصول عليها فى استمارة قياسية (بروتوكول)؛ على أن يتمشى هذا مع التوصيات المقترحة فى الفصل الثانى. ويمكن أن يكون هذا البروتوكول تقريراً بسيطاً جداً تسجل فيه المعلومات الخاصة بالتعرف على العينة

بالإضافة إلى نتيجة التحليل والتصنيف الملائم للماء.ويبين الشكل رقم (٦-٣) نموذجاً لمثل هذا البروتوكول.

برنامج مراقبة جودة المياه

(المحافظة .....)

تحليل المياه الجرثومى

المنطقة : رقم العينة :

الموقع الذى جمعت من العينة :

المكان :

المصدر :

المرسل :

تاريخ أخذ العينة : _____/ _____ / _____

الوقت :

تاريخ التحليل : _____/ _____ / _____

الوقت :

الكلور الحر المتبقى | | ملليجرام/لتر

النتائج

اجمالى القولونيات /١٠٠ مل

القولونيات الغائطية (باسيل القولون النموذجى) /١٠٠ مل

المياه من الناحية الجرثومية .....

فنى المختبر

جيدة / غير مقبولة .....

(توقيع)

مدير المختبر

شكـــــل رقم (٦-٣)

نموذجـــــاً للبروتوكـــــول.

فحص البكتريـــا السبحية المعوية

ويجرى الاختبار بطريقة العد الاحتمالى (Most brobale number) باستخدام بيئة الأزيد دكستروز بروث (Azide dextrose broth)، وفى حالة استخدام ١٠ مل من العينة للفحص نستخدم بيئة مضاعفة التركيز وتركيبها كالآتى:

٩ جم	خلاصة لحم
٣٠ جم	تربتون
١٥ جم	جلوكوز
١٥ جم	ملح طعام
٠،٤ جم	صوديوم أزيد

٢ مل بروموكريزول بربل (بعد إزابة ١،٥ جم فى ١٠٠ مل كحول).
١٠٠٠ مل ماء مقطر

فى حالة استخدام البيئة السابقة يوزن ٧٠ جم / لتر.

تحضير البيئة

تخلط المقادير جيداً وتعقم بعد ضبط الرقم الهيدروجينى ٧،٢ – ٧،٤ وتعبأ فى أنابيب معقمة ١٠ مل فى كل أنبوبة.

إجراء الاختبار

أ- تحقن خمس أنابيب من المستنبت المضاعف التركيز بعشرة مل من العينة المراد فحصها فى كل أنبوبة بواسطة ماصة معقمة وتُحضّن عند درجة ٣٧ ْم لمدة ٤٨ ساعة.

تقرأ الأنابيب التى أعطت عكارة والتى من المحتمل احتوائها على بكتريا المجموعة السبحية المعوية، ويلزم بعد ذلك إجراء الاختبارات التأكيدية التالية:

الاختبار التأكيدى الأول

باستخدام بيئة كانااميسين اسكولين أزيد أجار. وتركيبه كالآتى:

٢٠ جم	تربتون
٥ جم	خلاصة خميرة
١ جم	كلوريد الصوديوم

١ جم	صوديوم سترات
١ جم	أسكولين
٥ جم	سترات أمونيوم أحادية
٠،١٥جم	صوديوم أزيد
١٠ جم	ماء مقطر

وفى حالة استعمال البيئة السابقة التجهيز يوزن ٤٢،٦ جم / لتر.

طريقة تحضير البيئة تخلط المكونات ويضبط الرقم الهيدروجينى ٧،٢ وتعقم وتبرد إلى درجة 42°م ثم يضاف إليها زجاجة واحدة من كاناميسين لكل ٥٠٠ جم من البيئة ويصب ١٠ مل من المستنبت فى أطباق بترى معقمة وتحفظ فى الثلاجة.

طريقة إجراء الاختبار التأكيدى:

يزرع من كل أنبوبة إيجابية (بها عكارة) على طبق كاناميسين أسكولين أزيد أجار بواسطة أبرة زرع، ويحضن الطبق عند درجة 37°م لمدة ٢٤ ساعة، وتفحص الأطباق للمستعمرات سوداء اللون ويجرى لها اختبار فوق أكسيد الهيدروجين (Catalase test) باستعمال محلول فوق أكسيد الهيدروجين تركيز ٣ % بوضع نقط قليلة منه على شريحة زجاجية وإذابة المستمرة فيها على الشريحة وملاحظة تكون فوران وحدوث فقاعات غازية من عدمه، وتكون العينة سالبة إذا لم يحدث فقاعات وفوران باستخدام فوق أكسيد الهيدروجين (Catalase negative)، كما تحضر أفلام من المستعمرات التى لونها أسود على أطباق كاناميسين أسكولين أزيد أجار وتصبغ بصبغة "الجرام" وتفحص تحت الميكروسكوب لوجود المكورات السبحية الإيجابية لجرام.

وتعتبر العينة إيجابية للبكتريا السبحية البرازية إذا:

أ- فى الاختبار التمهيدى أعطت عكارة على مستنبت أزيد دكستروز بروث.

ب- ثم أعطت مستعمرات سوداء اللون على أطباق كانا ميسين أزيد أجار فى الاختبار التأكيدى.

حـــ- إذا كانت المستعمرات سوداء اللون فى الاختبار التأكيدى سلبية الاختبار (Catalase).

الفحص المجهرى للمستعمرات سوداء اللون سلبية الاختبار (Catalase).

والمصبوغة بصبغة الجرام إيجابية تكون تلك المستعمرات على شكل مكورات ثنائية أو رباعية أو سلاسل قصيرة (Short chain)، بعد ذلك تقرأ النتائج للأنابيب فى الاختبار التمهيدى.

د- وكانت كل الاختبارات التأكيدية السابقة إيجابية - ويعرض الجدول رقم (٦-٥)

جدول رقم (٦-٥)

العـــــــدد الاحتمـــــــــــــالى

عدد الأنابيب الإيجابية فى الاختبار التمهيدى والاختبارات التأكيدية	العدد الاحتمالى للبكتريا السبحية المعوية
أنبوبة واحدة	٢
٢	٥
٣	٩
٤	١٦
٥	أكثر من ٢٣

وتكون العينة صالحة للاستهلاك الآدمى إذا كانت خالية من البكتريا السبحية المعوية.

ملحوظة:

فى حالة استخدام البيئة سابقة التجهيز تتبع تعليمات الشركة المنتجة.

طريقة تحضير البيئة:

تخلط المقادير حتى الذوبان وتعقم عند درجة ْ120م لمدة نصف ساعة ثم تبرد وترشح عند درجة ْ100م وتضاف إليها ١٥ جم أجار فى فصل الشتاء ومن ٢٠ - ٢٥ جم فى فصل الصيف وبعد إذابة الأجار يضبط الرقم الهيدروجينى ٧،٤ – ٧،٦ ويرشح مرة أخرى ويعبأ فى أنابيب ١٠ مل فى كل أنبوبة ويعاد التعقيم عند درجة ْ120م لمدة نصف ساعة، وعند الاستعمال يوضع فى حمام مائى عند درجة ْ45م.

فحص بكتريا سودوموناس ايروجنوزا

لإجراء عملية الفحص لهذه البكتريا (Pseudomonas aeruginose) سودوموناس ايروجنوزا تستخدم طريقة العد الاحتمالى (MPN) باستعمال بيئة الاسبارجين.

وتركيبها كالآتى:

ملحوظة:
فى حالة فحص عينة من الماء ١٠ سم^3 فأكثر تحضر البيئة مضاعفة التركيز أى تضاعف الكميات الآتى بيانها:

٣ جم	اسبارجين
٠،٥ جم	كبرياتات ماغنسيوم
١٠ جم	كبريتات بوتاسيوم
	ثنائى فوسفات أحادى
١ جم	هيدروجين البوتاسيوم
١٠٠٠ جم	ماء مقطر

تحضير البيئة

تخلط المكونات جيداً أو ترج وتوضع على درجة ١٠٠ْم فى الأوتوكلاف ويضبط الرقم الأيدروجينى ما بين ٦،٩ – ٧،٢ وتعبأ فى أنابيب.

طريقة إجراء الاختبار

١- خمسة أنابيب فى كلاً منها ٥٠ مل من البيئة مضاعفة التركيز + ٥٠ مل من العينة المراد فحصها.
٢- خمسة أنابيب فى كلاً منها ١٠٠ مل من البيئة مضاعفة التركيز + ١٠ مل من العينة المراد فحصها.
٣- خمسة أنابيب فى كلاً منها ١٠ مل من البيئة مضاعفة التركيز + ١ مل من العينة المراد فحصها.
وتحضن بعد مزجها عند درجة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة.
٤- تقرأ الأنابيب الإيجابية السودوموناس ذات اللون الأخضر البراق.

الاختبار التأكيدى

يجرى عليها الاختبار التأكيدى التالى باستخدام بيئة الاسيتاميد أجار (Aceetamid agar) تركيبها كالآتى:

١٠ جم	اسيتاميد
١٥ جم	أجار
١،٤ جم	أحادى هيدروجين ثنائى بوتاسيوم
٠،٠٧ جم	ثنائى هيدروجين أحادى بوتاسيوم
٥ جم	ملح طعام
٠،٥ جم	كبريتات ماغنيسيوم
٠،٠١٢ جم	دليل أحمر فينول
١٠٠٠ مل	ماء مقطر

تحضير البيئة:

تخلط المقادر السابقة وتعقم فى الأتوكلاف مع ضبط الرقم الهيدروجينى عند ٦،٩ – ٧،٢ تصب فى أنابيب ٨ مل فى كل أنبوبة وتترك للتصلب مائلة بحيث تعطى سطح مائل من البيئة.

طريقة إجراء الاختبار التأكيدى:

يتم فرد ٠،١ مل من الأنابيب الموجبة ذات اللون الأخضر البراق على سطح بيئة الاستاميد وتحضن عند درجة ٣٧°م لمدة من ٢٤ ساعة إلى ٣٦ ساعة.

تعتبر الأنبوبة موجبة فى حالة ارتفاع الرقم الهيدروجينى للبيئة وذلك بتغيير لون الاستاميد إلى اللون القرمزى، وتقرأ النتائج من جدول العد الاحتمالى.

فحص بكتريـــــا المكورات العنقودية

لفحص هــذا النوع من البكتريا (Staphlococcus aureus) تستخدم طريقة العد الاحتمالى (MPN) على بيئة (M. Staphlococcus broth) ستافيلوكوكس مانيتول بروث

ملحوظة:
فى حالة فحص عينة من الماء ١٠ سم^{٣} فأكثر تحضر البيئة مضاعفة التركيز أى تضاعف الكميات الآتى بيانها:

١٠ جم	تربتون
٢،٥ جم	خلاصة خميرة
٢ جم	لاكتوز
١٠ جم	مانيتول
٥ جم	ثنائى بوتاسيوم أحادى هيدروجين فوسفات
٧٥ جم	ملح طعام
٠،٠٤٩جم	صوديوم أزيد
١٠٠٠ جم	ماء مقطر

تحضير البيئة

تذاب المكونات وتعقم فى الأوتوكلاف عند درجة 120°م لمدة ١٥ دقيقة ويضبط الرقم الهيدروجينى ما بين ٧،٤ – ٧،٦ وتبرد حتى درجة 50° م ويضاف ٥٠ مل من (Egg yolk tellurite) لكل لتر من البيئة ثم يصب فى أطباق للاستعمال.

لاختبار التأكيدى

١- تزرع الطباق من العينات الإيجابية فى الاختبار الأول التى أعطت عكارة بواسطة أبرة الزرع، ثم تحضن الأطباق عند 37°م لمدة ٤٨ ساعة وتكون الأطباق إيجابية إذا أعطت نموات لها لون غامق (Opaque) ومحاطة بمساحة صفراء اللون حولها (Yellow zone).

٢- سجرى لهذه النموات اختبار الـــ Catalase وتكون العينة إيجابية إذا كانت (Catalase positive).

٣- يعمل أفلام وتصبغ بصبغة الجرام وتفحص تحت الميكروسكون لإظهار البكتريا العنقودية موجبة الجرام (Staplylscocci).

الفصل السابع

التحليل البكتريولوجى باستخدام طريقة الترشيح الغشائي

الفصل السابع

التحليل البكتريولوجى باستخدام طريقة الترشيح الغشائي

المبدأ الأساسى

بعكس طريقة الأنابيب المتعددة، تعطى طريقة الترشيح الغشائي (MF) عداً مباشراً لإجمالي القولونيات وللقولونيات الغائطية الموجودة فى عينة معينة من الماء. وتقوم هذه الطريقة على ترشيح حجم معروف من الماء خلال مرشح غشائي يتكون من مركب سيلولوزى ذي مسام منتظمة قطر كل منها ٠,٤٥ مكرومتر؛ تُحتجز الجراثيم على سطح المرشح الغشائي. وعندما يوضع الغشاء الذى يحتوى على الجراثيم فى مستنبت تفريقي انتقائي فى حاوية معقمة تُحفظ فى حاضنة درجة حرارتها مناسبة، تنشأ مستعمرات مميزة من القولونيات والقولونيات الغائطة يمكن عدها مباشرة.

حجم عينة الماء المعدة للترشيح

حيث أن مساحة الترشيح صغيرة نسبياً، فهي تعـــزز نمو عدد محدود مـــن المستعمرات فحسب. والعدد الأمثل هو بين ٢٠ و٨٠ مستعمرة، يصل بحد أقصى قدره ٢٠٠ مستعمرة. وفى حالة تخطى هذا الرقم، قد تنشأ مستعمرات غير نمطية أو متراكبة Superimposed صغيرة جداً، أو قد يحدث تثبيط Inhibition للنمو بسبب التكاثر الجرثومى المفرط. ويعتمد اختيار حجم العينة التى يُراد ترشيحها على نوع الماء.

ويوضح الجدول رقم (٧-١) الحجوم المقترحة للمرشح الغشائى.

جدول رقم (٧-١)
الحجوم المقترحة للمرشح الغشائي للكوليفورم الكلى

	الحجم × المرشح سم^3							
مصدر المياه	١٠٠	٥٠	١٠	١	٠،١	٠،٠١	٠،٠٠١	٠،٠٠٠١
مياه شرب	×							
حمامات سباحة	×							
آبار، عيون	×	×	×					
بحيرات، وخزانات	×	×	×					
مآخذ مياه			×	×	×			
خليج للسباحة			×	×	×			
مياه أنهار				×	×	×	×	
ماء صرف مكلور				×	×	×		
ماء صرف خام					×	×	×	×

وإذا لم يكن أصل العينة معروفاً، وكان محتواها المحتمل من الجراثيم غير محدد المقدار، يجب ترشيح أحجام من الماء تختلف بمقدار عامل عشرى (Factor of ten) للتوصل إلى نطاق ملائم للتحليل. وإذا كان حجم الماء المراد ترشيحه أقل من ١٠ مل، يجب وضع ٢٠ مل على الأقل من ماء تخفيف معقم فى القمع قبل الترشيح.

التجهيزات

بالإضافة إلى التجهيزات والأواني الزجاجية الأساسية المستخدمة فى طريقة الأنابيب المتعددة (MT) (أنظر الفصل السادس)، من الضروري توفر المواد التالية لإجراء طريقة الترشيح الغشائي (MF):

(أ) شفاط مائي Water aspirator، أو مفرغ هواء Vacuum pump كهربائي أو أية طريقة ملائمة لإحداث فراغ جزئي يساوى نصف الضغط الجوى على الأقل.

(ب) قارورة ايرلنماير (ذات مقبض جانبي) سعة لتر واحد وأنبوبة مطاطية متصلة بها ذات سمك حاف لمنع انطواء الأنبوبة عند إحداث الفراغ.

(ج) دعامة للمرشح مكونة من قاعدة أو دعامة مسامية Porous يوضع عليها المرشح ويمكن تثبيتها بقارورة ايرلنماير بواسطة سدادة مطاطية، بالإضافة إلى حاوية علوية يمكن تثبيتها بالدعامة المسامية. ويجب لف قطعتي دعامة المرشح بالورق على حدة وتعقيمها فى الحاضنة لمدة ١٥ دقيقة على الأقل فى درجة حرارة °121م.

(د) أطباق بترى Petri زجاجية أو بلاستيكية بمقياس ٦٠×١٥ ميليمتر (ويمكن أيضاً استعمال علب مرهم من الحجم نفسه).

(هـ) مراشح غشائية، قطرها ٤٧-٥٠ ميليمتر، وقطر مسامها ٠،٤٥ مكرومتر. وأكثر المراشح الغشائية ملاءمة المغلفة منها على انفراد والمعقمة سلفاً. ويمكن أيضاً استعمال مراشح غشائية غير معقمة ولكن يجب لفها فى رزم صغيرة وبأعداد ملائمة (حسب عدد العينات المراد فحصها)؛ وعندها تعقم فى الحاضنة وتجفف بالسحب السريع للبخار.

(و) رفائد ماصة مغذية Nutrient pads تتكون من أقراص من ورق الترشيح سمكها نحو ١ ميليمتر، وقطرها مطابق لقطر المراشح الغشائية.

(ز) ملقط.

(ح) عدسة مكبرة، قدرتها على التكبير ٤ أو ٥ أضعاف، لفحص وعد المستعمرات على المراشح الغشائية.

المستنبتات وماء التخفيف

يمكن استخدام أوساط متعددة لفحص الجراثيم القولونية بطريقة الترشيح الغشائى. منها غراء لاكتوز تيرغيتول، ولاكتوز TTC ، وغراء تيرغيتول، ومرق لاكتوز سلفات اللوريل، التى يمكن استخدامها فى فحص الجراثيم القولونية فى درجة حرارة °35م أو °37م، وفى فحص جراثيم القولونيات الغائطية فى درجة °44م. ويجب استعمال أوساط من النوع Endo-type فحسب فى عد القولونيات فى درجة °35م أو °37م ومرق MFC فى درجة °44م لعد القولونيات الغائطية. ومع أن كافة هذه الأوساط تعتمد على اختمار

اللاكتوز لاكتشاف الجراثيم القولونية الظنية، يختلف التفاعل المميز باختلاف المستنبت. ويعتمد اللمعان المعدني المميز للمستعمرات فى الأوساط التى من النوع Endo-type على تكون الألدهايد.

ورغم أنه بالإمكان تحضير الأوساط من المقومات Ingredients الأساسية، فقد يكون ذلك غير عملي بالنسبة لمختبر صغير. ولذا يوصى باستخدام أوساط مجففة لهذا الغرض. ويمكن تحضير الأوساط على شكل مرق واستعمالها مع رفائد ماصة مغذية (Nutrient) ، أو كصفائح غراء جامدة. ويمكن تجميد الأمراق بإضافة ١,٢-١,٥% من الغراء قبل الغلي.

فعلى سبيل المثال تبين فيما يلى الإجراءات الخاصة بتحضير كميات صغيرة من الأوساط المتعلقة بمرق M-Endo MF ومرق MFC:

(أ) مرق M-Endo MF:

(١) أذب ٢,٤ غراماً من مستنبت مجفف فى ٥٠ مل من الماء المقطر وأضف ١ مل من الكحول الإثيلى ٩٥%.
(٢) عقم بالتسخين برفق إلى مجرد نقطة الغليان.

ويمكن تخزين الوسط لغاية ٤ أيام فى الثلاجة، ويكفى نحو ٥٠ مل من الوسط لإجراء ٢٥ اختباراً تقريباً.

(ب) مرق MFC:

(١) أذب ١,٩ جراماً من الوسط المجفف فى ٥٠ مل من ماء مقطر يحتوى على ١,٠% من حمض الروزوليك فى ٠,٢ مول/لتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم.
(٢) سخن الوسط إلى نقطة الغليان.
(٣) أبعده عن الحرارة بسرعة وبرده إلى ما دون 45°م.

ويجب عدم تعقيم الوسط المحضر بواسطة الحاضنة. هذا ويمكن تخزينه لمدة ٤ أيام فى الثلاجة.

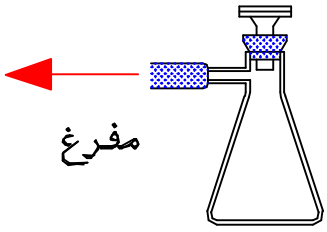
ويتعين تحضير ماء التخفيف كما هو موضح فى الفصل السادس.

الطريقة:

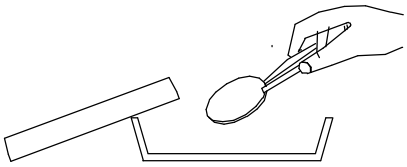
توضح هنا الطرائق العامة، ولكن توجد هناك أنواع مختلفة من وحدات الترشيح والأجهزة الأخرى.

دلائل جودة مياه الشرب

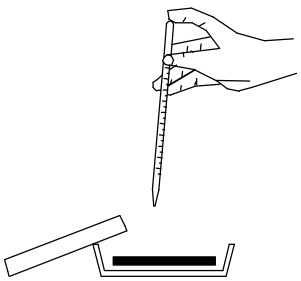
تعيين إجمالي القولونيات:



(أ) أوصل قارورة ايرلنماير جانبية المقبض Side-arm إلى مصدر الفراغ (المقفول) وضع الدعامة المسامية Porous فى مكانها. وفى حالة استخدام مضخة كهربائية، يستحسن وضع قارورة ثانية بين قارورة ايرلنماير ومصدر الفراغ، وتقوم القارورة الثانية مقام محبس للماء وهكذا تحمى المضخة الكهربائية.

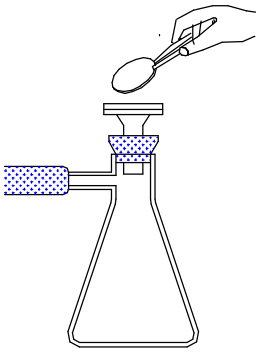


(ب) افتح طبق بتري وضع فيه رقيقة.

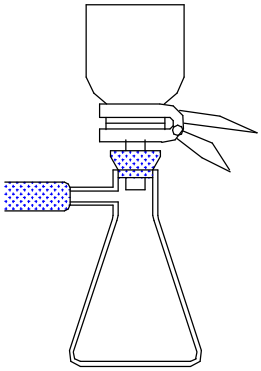


(ج) أضف ٢ مل من وسط انتقائي مرقى بواسطة ماصة معقمة لإشباع الرفادة.

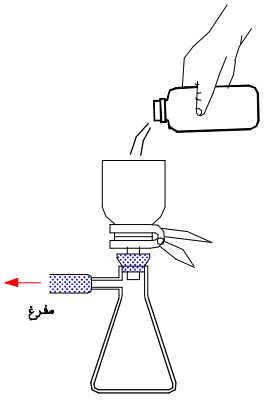
(د) ركب وحدة الترشيح بوضع مرشح غشائي معقم فوق الداعمة المسامية، مستخدماً ملقطاً معقماً بالنار.



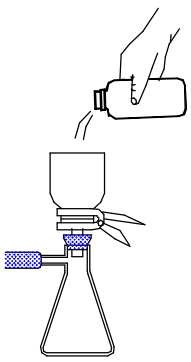
(هـ) ضع الحاوية العلوية فى مكانها وثبتها بواسطة المشابك الخاصة (يتوقف نوع المشبك المستخدم على نوع الأجهزة).



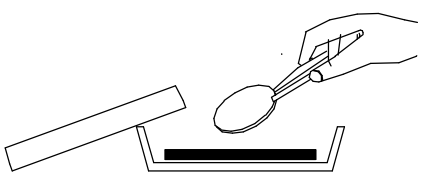
(و) صب كمية العينة التى تم اختيارها على أنها مثالية وفقاً لنوع الماء، فى الحاوية العلوية. وإذا كان حجم عينة الاختبار أقل من ١٠ مل، يضاف ٢٠ مل على الأقل من ماء التخفيف المعقم إلى الحاوية العلوية قبل الترشيح. شغل مفرغة الهواء.



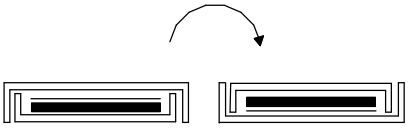
(ز) بعد إمرار العينة خلال المرشح، افصل مفرغ الهواء واشطف الحاوية بواسطة ٢٠-٣٠ مل من ماء التخفيف المعقم. كرر الشطف بعد ان يكون جميع ماء الشطف الأول قد مر خلال المرشح.



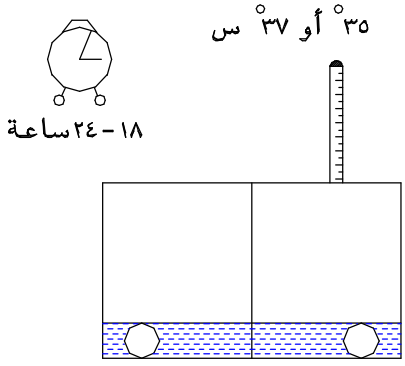
(ح) فك وحدة الترشيح باستعمال الملقط، وضع المرشح الغشائي فى طبق بتري على الرفادة على أن يكون الجانب الشبكي إلى أعلى وتأكد من عدم احتجاز فقاقيع هوائية بين الرفادة والمرشح.



(ط) اقلب طبق بتري تمهيداً لوضعه فى الحاضنة.



(ى) ضع طبق بتري فى الحاضنة فى درجة ٣٥م أو ٣٧م لمدة ١٨-٢٤ ساعة فى نسبة رطوبة ١٠٠% (لضمان ذلك ضع قطعة قطنية مبتلّة فى الحاضنة). وفى حالة استعمال حاويات مرهم أو أطباق بلاستيك ذات أغطية محكمة، لا حاجة حينئذ للترطيب.

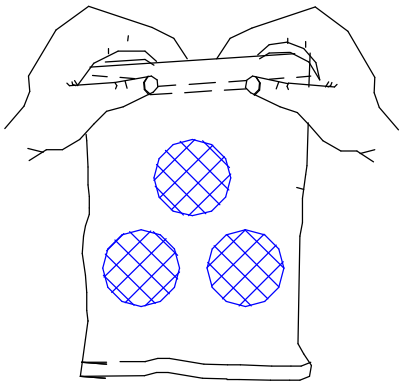


يكون لون مستعمرات الجراثيم القولونية متوسط الحمرة أو داكن الحمرة، ولها لمعان سطحي ذهبي ضارب للخضرة أو معدني. وقد يغطى هذا اللمعان المستعمرة برمتها، أو يظهر فقط فى وسط المستعمرة. ويجب عدم عد المستعمرات التى من أنواع أخرى. ويمكن عد المستعمرات بالاستعانة بعدسة. وعندها يمكن التوصل إلى عدد إجمالي القولونيات فى كل ١٠٠ مل كما يلى:

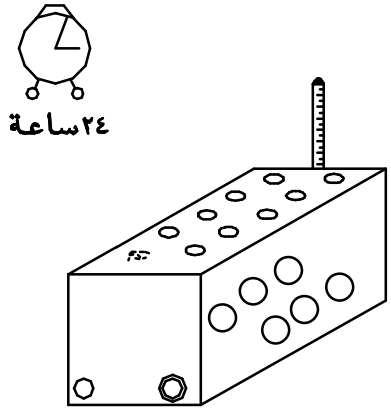
$$\text{إجمالي القولونيات فى كل ١٠٠ مل} = \frac{\text{عدد المستعمرات القولونية التى يتم عدها}}{\text{عدد الميليلترات من العينة المرشحة}} \times ١٠٠$$

تعيين عدد القولونيات الغائطية:

الطريقة المتبعة فى تعيين عدد القولونيات الغائطية مماثلة للطريقة المتبعة فى تعيين عدد إجمالي القولونيات. رشح العينة كما هو موضح، وضع المرشح الغشائي على الرفادة المشبعة، على سبيل المثال، بوسط MFC.



(أ) ضع الأطباق فى حاضنة فى درجة ٤٤± ٠،٥°م لمدة ٢٤ ساعة فى درجة رطوبة ١٠٠%. وكبديل لذلك، يمكن وضع أطباق بتري محكمة الإغلاق أو مختومة فى أكياس بلاستيك صامدة للماء تمهيداً لوضعها فى الحاضنة.



(ب) غطس الأكياس فى حمام مائي يحتفظ به فى درجة حرارة ٤٤± ٠،٥°م لمدة ٢٤ ساعة ويجب أن تبقى الأكياس تحت سطح الماء طوال فترة الحضانة ويمكن إبقاؤها مغمورة بالماء بواسطة ثقل مناسب مثل رف معدني.

يكون لون مستعمرات جراثيم القولونيات الغائطية أزرق فى حين أن مستعمرات القولونيات غير الغائطية ذات لون رمادي أو أصفر شاحب Cream ويمكن عد المستعمرات بالاستعانة بعدسة مكبرة وعندها يمكن التوصل لعدد القولونيات الغائطية كما يلى:

عدد القولونيات الغائطية فى كل ١٠٠ ملليلتر:

$$\frac{\text{عدد المستعمرات القولونية التى يتم عدها}}{\text{عدد الملليلترات من العينة المرشحة}} \times ١٠٠$$

ويوضح الشكل رقم (٧-١) الخطوط التوضيحية للكوليفورم الكلى باستخدام المرشح الغشائي

مراقبة الجودة

١- يجب أن يكون المعمل نظيفاً وذي درجة حرارة ورطوبة مسيطر عليها. المعمل الجيد التهوية مرغوب فيه للسيطرة على الأتربة والتهوية. كما يلزم تواجد إضاءة مناسبة (١٠٠٠ لوكس) وما لا يقل عن ٦ قدم فراغ على ترابيزة المعمل لكل كيماوي أو قائم بالتحليل لخطة التجربة. وكذلك يوصى بتوفير ٥-٦ قدم من مسطح منضدة التحاليل تكون فراغاً احتياطياً لكل قائم بالتحليل، ماء، غاز، مخارج كهربية، أجهزة تفريغ كل هذا يلزم توفيره.

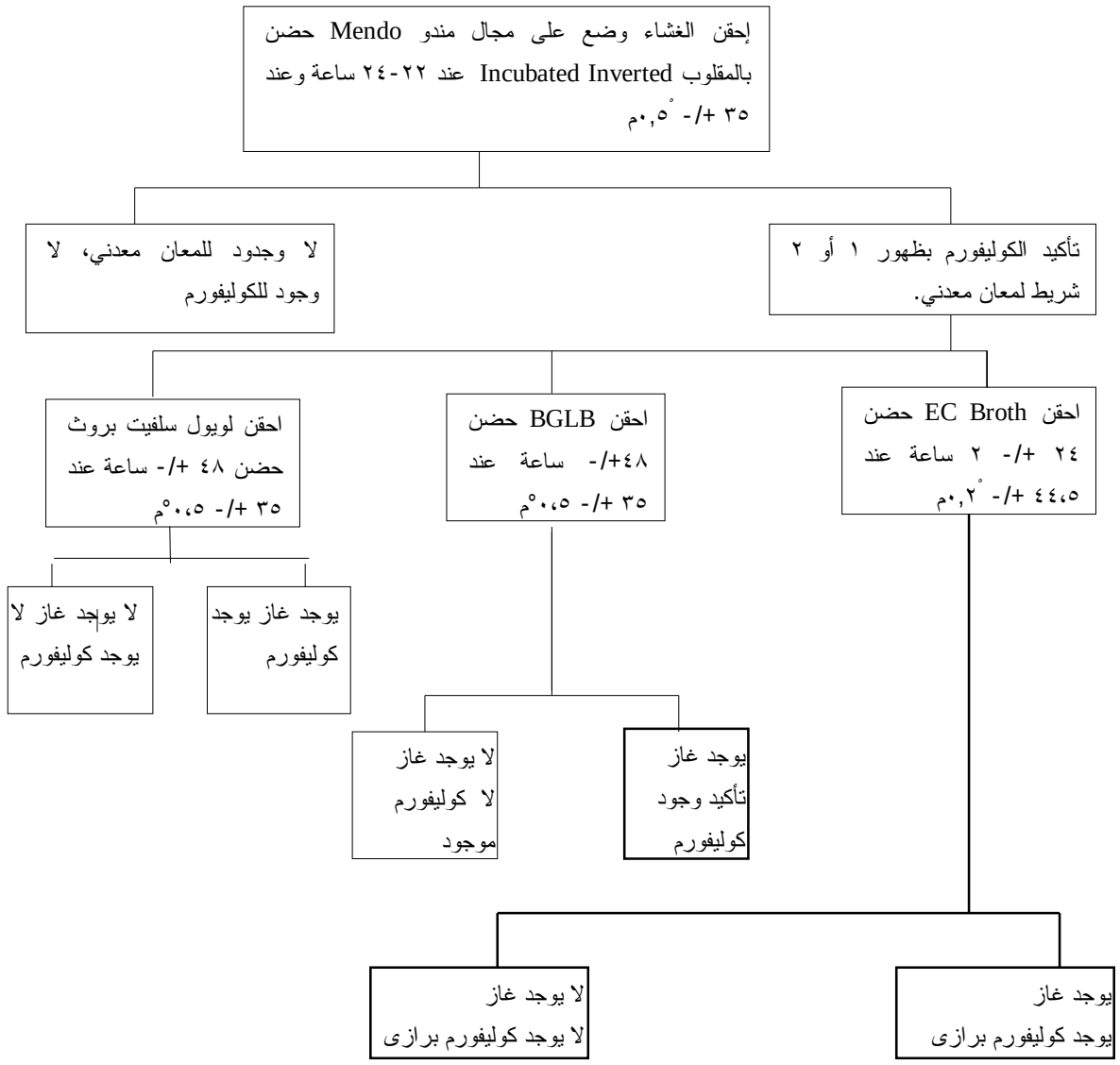
٢. يلزم تواجد وصفات مكتوبة لبرنامج مراقبة الجودة والتى يحوى تسجيل للسيطرة على الاختبارات، مراقبة على الواقع، المواد، المعدات المتوفرة لمدة خمس سنوات.

٣. اختبارات مراقبة الجودة:

أ. حضر عينة ضامنة معقمة، تُختبر كل عشر عينات فى المرشح الغشائي وفى حالة ظهور تلوث على العينة الضامنة، تُعتبر كل البيانات لهذا اليوم غير مطابقة مما يتطلب إعادة أخذ العينات.

ب. مياه مقطرة معملية تُستخدم فى تحضير المحاليل، وماء التخفيف ويلزم تحليلها شهرياً بمراقبة الاتصال الكهربي، الرقم الهيدروجيني، الكلور المتبقي، وفى حالة وجود أى نتائج تزيد عن القياسي، يلزم البحث عن ماء آخر، كما يلزم مراجعة آثار

المعادن مثل الرصاص، الكادميوم، الكروم، النحاس، النيكل، الزنك.



شكل رقم (٧-١)

الخطوط التوضيحية للكوليفورم الكلى باستخدام المرشح الغشائي

ج. المعامل تقوم بتحليل عينة غير معروفة لإثبات الكفاءة (Performance Sample) سنوياً.

د. لمراقبة تلوث المياه ذات التخفيف الحر أو الشطف (Free Dilution or Rinse Water) أضف ٢٠ سم^{٣} إلى زجاجة العينة، ٢٠ سم^{٣} من نيترانت بروث (Nutrient Broth) إلى الزجاجة. ضع فى حضانة ٣٥ ± ٠،٥° م لمدة ٢٤ ساعة. فى حالة وجود ترسيب أو سحب (عكارة)، فإن ماء التخفيف/ الشطف يكون ملوثاً ويجب عدم استخدامه.

هـ. راجع زجاجة عينة لكل كمية معقمة. ٢٥ سم^{٣} من نيترنت بروث إلى الزجاجة. ضع فى حضانة عند ٣٥ ± ٠،٥° م لمدة ٢٤ ساعة. راجع الزجاجة لملاحظة التعقيم أو النمو. فى حالة الإيجابية، فإن كمية الزجاجات يلزم إعادة غسلها وتعقيمها ثانياً.

و. بيانات ظروف الاستخدام (Media List) يلزم توفرها مع تاريخ الاستلام، تاريخ الفتح، تاريخ تسلسل الحيازة، على كشف البيانات (Data Sheet). المجال المفتوح (Opened Medium) يلزم تخزينه فى مجفف (Desicator) لإطالة فترة التخزين إلى ١٢ شهر، وإلا، تخلص من العينة بعد ستة أشهر.

ز. كل بيانات ظروف العمل يلزم تسجيلها فى كتاب والذى يحوى اسم القائم بالتحضير، التاريخ، اسم ورقم العينة، كمية الوزن، الحجم الذى تم تحضيره، وقت التعقيم والحرارة، الرقم الهيدروجينى، المراجعات الموجبة والسالبة.

ح. عند تسجيل بيانات ظروف العمل الإيجابية والسلبية للبكتيريا لهذا المجال يتم تحليلها للنمو قبل الاستخدام.

ط. فى حالة تواجد أكثر من كيماوي، كل كيماوي يقوم بعد القرص من ٣٠-٣٠٠ الكوليفورم الكلى على الأقل مرة فى الشهر من المزارع اللاحقة. وعدد المستعمرات يجب أن يتطابق مع ١٠%.

ي. راجع تعقيم أغشية المرشح بالتشرب باستخدام ٥٠ سم^{٣} من نيتريت بروث. ضع فى حضانة عند ٣٥ ± ٠،٥° م وراقب نمو البروث بعد ٢٤ ساعة. فى حالة إيجابية للنمو، المرشحات لا يمكن استخدامها.

ك. عند استخدام MPN، راجع ظروف التعقيم بأخذ أنبوبة من العينات المعدة وضع فى حضانة عند ٣٥ ± ٠،٥° م لمد ٢٤-٤٨ ساعة. فى حالة وجود عتامة أو غازات، الكمية كلها (Batch) لا تُستخدم ويتم التخلص منها.

ل. بيانات المبخرة (Autoclave Sheet) تحوى التاريخ، ووقت الدخول ووقت الخروج، درجة الحرارة، محتويات جهاز التعقيم بالتبخير (Autoclave).

م. جهاز التعقيم بالتبخير يلزم مراجعة درجة الحرارة، الدائرة الزمنية وتسجيلها كل ٤ شهور.

ن. درجة حرارة الثلاجة أو حمام الماء والحضانات يلزم تسجيلها يومياً وأن يكون فى حدود مجال درجة الحرارة.

س. رقم عينة الغشاء وتاريخ الاستلام يلزم تسجيله.

ع. لاصقات حساسة للحرارة، وشرائط متقطعة أو أمبولات متقطعة يلزم استخدامها عند التعقيم.

ف. كل الكيماويات والمحاليل يلزم تعليمها (Labeled) للتعرف على التركيز، مطالب الحفظ، تاريخ انتهاء الصلاحية، وكل شئ آخر.

الفصل الثامن

أسس التحكم في المعالجات البيولوجية لمياه الصرف باستخدام نتائج التحاليل الكيميائية

الفصل الثامن

أسس التحكم فى المعالجات البيولوجية لمياه الصرف باستخدام نتائج التحاليل الكيميائية

للتحكم فى كفاءة العملية البيولوجية فى نظام المعالجة بالحمأة المنشطة الراجعة، يجب مراعاة الأسس الآتية:

١- كمية الأكسجين المذاب وكفاءة عملية تقليب السائل المخلوط.
٢- نسبة المواد العضوية (F) إلى كمية الكائنات الحية (M) .
٣- عمر الحمأة.
٤- معدل الترسيب.

كمية الأكسجين المذاب وكفاءة عملية تقليب السائل المخلوط

تعتمد عملية المعالجة بالحمأة المنشطة على البكتريا والكائنات الحية الهوائية التى يلزم لحياتها توفر الأكسجين المذاب. ولكى تضمن استمرار العملية بكفاءة حاول الاحتفاظ بمقدار ٣ مليجرام/لتر أكسجين مذاب فى محتويات حوض التهوية وحوالى ثلث مليجرام/ لتر فى الحمأة المعادة من المروق الثانوى إلى أحواض التهوية. وللاعتماد على نتيجة الأكسجين ومقارنتها بالقراءات السابقة يجب قياسها من نفس المكان فى حوض التهوية.

هذا بالإضافة إلى ضرورة مراعاة أن التهوية تعمل على التقليب الكامل لمحتويات أحواض التهوية فانسداد ناشرات الهواء فى بعض الأماكن أو تعطُل المحركات الميكانيكية تقلل من عملية الخلط وبذلك تنخفض قدرة الحمأة المنشطة على استهلاك المواد العضوية والتجمع مع بعضها.

نسبة المواد العضوية إلى كمية الكائنات الحية

تتغذى الكائنات الحية على المواد العضوية فإذا توفرت كمية المواد العضوية يــزداد تكاثــر ونمو وحركــة الكائنــات الحية، وبالتالى تزداد الحاجــة إلى الأكسجين اللازم لحياتها، وبالعكس إذا انخفضت كمية المواد العضوية يموت كثير من الكائنات الحية.

ونظراً لأن معدل نمو البكتريا الحية يتوقف على كمية المواد العضوية المتوفرة فلذلك يلزم الاحتفاظ بكمية من المواد العضوية متناسبة مع كمية الكائنات الحية اللازمة لاستهلاكها، ويتم حساب هذه النسبة من المعادلة التالية.

$$\frac{\text{المواد العضوية (F)}}{\text{الكائنات الحية (M)}} = \frac{\text{وزن المواد العضوية بالكيلوجرام}}{\text{وزن الكائنات الحية بالكيلوجرام}}$$

مثال:

احسب نسبة F/M من المعلومات التالية:

- كمية التصرف إلى أحواض التهوية ١٥٠٠٠ متر مكعب فى اليوم.
  تركيز الأكسجين الحيوى المستهلك (B.O.D) ، وهو يعبر عن المواد العضوية الداخلة لأحواض التهوية ١٥٠ مليجرام/لتر.
- تركيز المواد العالقة المتطايرة فى السائل المخلوط (MLVSS) ٢٤٠ مليجرام/لتر.
- حجم حوض التهوية ٢١٠٠م^{٣}

طريقة الحساب:

كمية المواد العضوية فى (B.O.D.) اليوم =

$$\frac{١٥٠٠٠ \times ١٥٠ \times ١٠٠٠}{١٠٠٠ \times ١٠٠٠} = ٢٢٥٠ \text{ كجم/يوم}$$

(نضرب × ١٠٠٠ لكى يكون فى م^{٣}، ونقسم على ١ ٠٠٠ ٠٠٠ للتحويل من مليجرام إلى كجم)

وزن الكائنات الحية فى حوض التهوية (MLVSS)

$$= \frac{٢١٠٠ \times ١٠٠٠ \times ٢٤٠٠}{١٠٠٠ \times ١٠٠٠} = ٥٠٤٠ \text{ كجم}$$

$$\frac{F}{M} = \frac{٢٢٥٠}{٥٠٤٠} = ٠,٤٤ \text{ كجم/يوم/كجم حمأة}$$

ونظراً لأن هذه النسبة هى التى تتحكم فى معدل النمو المطلوب فلذلك يجب حفظها فى الحدود التى تضمن كفاءة التشغيل وهى حوالى ٠,٣ إلى ٠,٦ وذلك فى المحطات التى تعمل بطريقة الحمأة المنشطة الراجعة التقليدية وليس بطريقة الحمأة المنشطة الراجعة ذات التهوية الممتدة حيث تكون الحدود فيها ٠,٠٥ إلى ٠,١

ولذلك يجب على العاملين مراعاة الانتظام فى حساب هذه النسبة، وإذا كانت هذه النسبة عالية فهذا يدل على أن كمية التغذية متوفرة وبالتالى يرتفع استهلاك الأكسجين المذاب، وتكون هذه النسبة فى انخفاض لأن ذلك يدل على نقص فى كمية المواد العضوية، ثم يبدأ الجوع الذى يقتل كمية من الكائنات الحية وينخفض معدل استهلاك الأكسجين وتقل حركة ونشاط الكائنات الحية الموجودة.

عمر الحمأة

عندما تكون الكائنات الحية حديثة التكوين فهى بذلك تكون كالأطفال صغار السن تأكل جيداً وتتميز بخفة الوزن وكثرة الحركة، لذلك يصعب ترسيبها. بعكس ما إذا كانت الكائنات الحية باقية لمدة طويلة فى أحواض التهوية وتصبح فى حالة الكهولة فيقل استهلاكها للغذاء وتقل حركتها فلا تقدر على تكوين مجموعات وترسب بسرعة زائدة عن المطلوب.

والمطلوب لاستمرار كفاءة عملية التنقية الاحتفاظ بأكبر عدد من الكائنات الحية فى طور الشباب (عمر من ٣ إلى ٥ أيام) فى حالة محطات الحمأة المنشطة الراجعة بالطريقة التقليدية. أما فى حالة استخدام طريقة التهوية الممتدة فيكون عمر الكائنات الحية من ٢٠ إلى ٣٠ يوم، حيث تتوافر فى هذا العمر جميع الشروط من حيث الاستهلاك الجيد للمواد العضوية كتغذية وزيادة فى الوزن والحركة البسيطة عند الترسيب، والتى تسمح باستخدامها كمرشح فى المروق الثانوى، فعندما تكون درجة الرسوب إلى القاع بطيئة يمكن لهذه المجموعات أن تلتقط معها ما يتبقى من المواد العالقة وهذا ما يجعل كفاءة التنقية تصل إلى أكثر من ٩٠%.

ولحساب عمر الحمأة نستخدم المعادلة التالية:

$$\text{عمر الحمأة} = \frac{\text{وزن المواد العالقة فى حوض التهوية (كجم)}}{\text{وزن المواد العالقة الخارجة من المروقات الابتدائية (كجم/ يوم)}}$$

$$= \frac{\text{حجم حوض التهوية} \times \text{تركيز المواد العالقة فى حوض التهوية}}{\text{التصرف} \times \text{تركيز المواد العالقة الخارجة من المروقات الابتدائية}}$$

مثال:

احسب عمر الحمأة من المعلومات الآتية:

- حجم حوض التهوية ٢١٠٠ م^3
- كمية التصرف الداخلة ١٥٠٠٠ م^3/ يوم
- تركيز المواد العالقة فى المياه الخارجة من المروق الابتدائى ٧٠ مليجرام/ لتر.
- تركيز المواد العالقة فى حوض التهوية ٢٤٠٠ مليجرام/ لتر.

الحل:

وزن المواد العالقة فى حوض التهوية =

$$\frac{\text{٢٤٠٠ مليجرام/لتر} \times \text{١٠٠٠} \times \text{٢١٠٠ متر مكعب}}{\text{١٠٠٠} \times \text{١٠٠٠}} = \text{٥٠٤٠ كيلوجرام}$$

وزن المواد العالقة الخارجة من المروق الابتدائى فى اليوم

$$= \frac{\text{٧٠ مليجرام/لتر} \times \text{١٠٠٠} \times \text{١٥٠٠ متر مكعب/يوم}}{\text{١٠٠٠} \times \text{١٠٠٠}}$$

= ١٠٥٠كجم/يوم

$$\text{عمر الحمأة} = \frac{\text{٥٠٤٠ كيلوجرام}}{\text{١٠٥٠ كيلوجرام/اليوم}} = \text{٤,٨ يوم}$$

معدل الترسيب

إذا أخذنا عينة من السائل المخلوط من أحواض التهوية ووضعناها فى مخبار مدرج إلى علامة اللتر، تبدأ الرواسب فى النزول إلى أسفل وبعد ٣٠ دقيقة من الزمن نلاحظ أن حجم ما ترسب فى قاع المخبار يختلف باختلاف العينات. فمنها مثلا ما يصل حجمه إلى ٥٠٠ مللى لتر وأخرى ٢٥٠ مللى لتر، وغيرها تصل إلى ١٠٠ مللى لتر مثلا، ويدل ذلك على أن معدل الترسيب فى مدة ٣٠ دقيقة يختلف باختلاف تكوين الحمأة.

ولشرح نتائج هذه التجربة نجد أن معدل الترسيب البطىء (٥٠٠ مللى لتر مثلاً) بعد ٣٠ دقيقة يدل على أن الحمأة أخف وزناً مما أعطى ترسيب ٣٥٠ مللى لتر، والتجربة التى أعطت ١٠٠ مللى لتر بعد ٣٠ دقيقة تعتبر أثقلهم فى الوزن. بمعنى أن الحمأة الخفيفة تدل على أنها حديثة التكوين (صغيرة السن) والثقيلة التى ترسب بسرعة تكون كبيرة السن. ولكى نتمكن من التحكم فى معدل الترسيب يجب أن نحسب معدل حجم الحمأة الذى يمكن حسابه من المعادلة التالية وتسمى (SVI):

$$\text{معدل حجم الحمأة (SVI)} = \frac{\text{حجم الحمأة المترسبة بعد ٣٠ دقيقة بالمللى لتر}}{\text{تركيز المواد العالقة فى نفس العينة (مجم/لتر)}}$$

مثال:

احسب معدل حجم الحمأة فى حالة الحصول على حمأة حجمها ٢٥٠ مللى لتر بعد ٣٠ دقيقة، ودرجة التركيز للمواد العالقة بها ٢٠٠٠ مليجرام/لتر.

الحل:

$$\text{معدل حجم الحمأة (SVI)} = \frac{\text{٢٥٠ مللى لتر}}{\text{٢٠٠٠ مليجرام/لتر}} \times ١٠٠ = ١٢٥$$

وقد لوحظ أنه إذا كانت النتيجة بين ٨٠ - ١٢٠، فيكون معدل الترسيب جيد. وإذا زادت النتيجة عن ١٢٠ تكون الحمأة خفيفة (صغيرة السن)، وإذا نقصت النتيجة عن ٨٠ تكون الحمأة ثقيلة (كبيرة السن)، وعن طريق تطبيق هذا القانون يتم استبعاد أكثر للحمأة المنشطة أو عدم استبعادها حسب النتائج النهائية للمياه المعالجة.

الخلاصة:

من القوانين السابقة وتطبيقاتها العملية يمكن التحكم فى عمليات التشغيل فى محطات تنقية مياه الصرف الصحى التى تعمل بطريقة الحمأة المنشطة الراجعة ذات الطريقة التقليدية أو ذات التهوية الممتدة، وتشمل هذه القوانين نتائج التجارب التى تتم فى المعمـــل مثل (B.O.D) ، (MLSS)، (MLVSS)، (SV30) وغيرها من التجارب التى تؤثر فى تحديد طريقة تشغيل المحطة.

معدل صرف الحمأة الزائدة

من المعروف أن المروقات الثانوية قد تمتلىء تماماً بالحمأة فى حالة عـــــدم صرف الحمأة الزائدة. فالحمأة هى المنتج النهائى لعمليات المعالجة ويجب سحبها باستمرار أثناء العملية. ومن الطبيعى أن تكون عملية صرف الحمأة الزائدة أداة تحكم أساسية فى عملية المعالجة.

وهناك ثلاثة طرق يمكن استخدامها لتحديد معدل صرف الحمأة الزائدة وهى:

١- الاحتفاظ بمستوى ثابت لتركيز المواد الصلبة العالقة القابلة للتطاير فى السائل الممزوج (MLVSS).
٢- الاحتفاظ بمستوى ثابت لنسبة الغذاء إلى الكائنات الحية الدقيقة (F/M).
٣- الاحتفاظ بمستوى ثابت لمتوسط عمر الحمأة (SA).

الطريقة الأولى وهى أبسط الطرق وتعتمد على خبرة القائم على التشغيل فى تحديد التركيز الأمثل للمواد الصلبة العالقة القابلة للتطاير فى محطته.

وفى حالة زيادة تركيز المواد الصلبة العالقة القابلة للتطاير عن القيمة المثلى فى أحواض التهوية يتم صرف المزيد من الحمأة الزائدة. أما فى حالة انخفاضها عن تلك القيمة فيتم خفض معدل صرف الحمأة الزائدة.

ومن مميزات هذه الطريقة سهولة خطواتها وبساطة الإجراءات المعملية التى تحتاج إليها، كما أن النتائج تكون جيدة فى حالة ثبات خصائص المياه الواردة للمحطة.

مثال:

كان تركيز المواد الصلبة العالقة فى السائل الممزوج والتى تعمل المحطة عليها دائما هو ٣٠٠٠ مليجرام/ لتر وعند قياسها فى أحد الأيام كانت ٤٠٠٠ مليجرام/ لتر.

احسب حجم الحمأة الزائدة التى يجب التخلص منها إذا علم أن:

- تركيز المواد الصلبة العالقة فى الحمأة الزائدة هو ٨٠٠٠ مليجرام/لتر
- حجم أحواض التهوية ٦٧٢م^3
- تصرف الطلمبة ٤٠ م^3/ ساعة

الحل:

وزن الحمأة الزائدة =

$$\frac{\text{حجم أحواض التهوية} \times (\text{التركيز الجديد للمواد العالقة} - \text{التركيز الثابت})}{١٠٠٠}$$

$$= ٦٧٢ \times ١٠٠٠ \times \frac{١٠٠٠}{١٠٠٠} = ٦٧٣٠٠٠ \text{ جم} = ٦٧٢ \text{ كجم}$$

حجم الحمأة الزائدة =

$$= \text{الوزن} \times \frac{١٠٠٠}{\text{التركيز}} = ٦٧٢ \times \frac{١٠٠٠}{٨٠٠٠} : ٨٤ \text{ م}^٣$$

$$\text{مدة تشغيل الطلمبة} = \frac{\text{الحجم}}{\text{التصرف}} = \frac{٨٤}{٤٠} = ٢,١ \text{ ساعة/ يوم}$$

وفى هذه الطريقة أهمل الاحتفاظ بنسبة ثابتة من الغذاء إلى الكائنات الدقيقة (F/M) وهذا يؤدى إلى حدوث مشاكل فى التشغيل.

ولمزيد من الإيضاح نتصور حدوث زيادة كبيرة فى تركيز الأكسجين الحيوى المستهلك (B.O.D) على مدار عدة أيام، فإذا كان التحكم عن طريق مراقبة تغير تركيز المواد الصلبة القابلة للتطاير فى السائل الممزوج فقط، فقد يقوم مشغل المحطة بصرف المزيد من الحمأة بالرغم من زيادة الحمل العضوى والمعبر عنها بزيادة تركيز الأكسجين الحيوى المستهلك (B.O.D) وهذا بدوره يؤدى إلى زيادة نسبة الغذاء إلى الكائنات الحية الدقيقة (F/M) عن القيمة التى يجب أن تكون عليها، مما يؤدى إلى تخفيض كفاءة المعالجة.

الطريقة الثانية وهى الاحتفاظ بنسبة ثابتة من الغذاء إلى الكائنات الحية الدقيقة (F/M) وذلك بزيادة أو خفض تركيز المواد الصلبة العالقة القابلة للتطاير فى السائل الممزوج تبعاً لزيادة أو نقص تركيز الأكسجين الكيميائى المستهلك (C.O.D) وليس الأكسجين الحيوى المستهلك (B.O.D).

واعتماداً على خبرة القائم على التشغيل يتم تحديد النسبة المثلى التى تؤدى إلى الحصول على أفضل نتائج للمحطة، ثم يعقب ذلك الاحتفاظ بهذه النسبة الثابتة مع معرفة خصائص المياه الواردة إلى المحطة وخاصة الأكسجين الكيميائى المستهلك.

وكمثال لما سبق عندما نعلم أن غداً هو اليوم الذى تصل فيه مياه الصرف الصحى وبها أعلى مستوى للأكسجين الكيميائى المستهلك (C.O.D) ، فهذا يمكننا من اتخاذ القرار التالى:
يتم خفض معدل صرف الحمأة الزائدة ليلاً للاحتفاظ بمستوى ثابت لنسبة الغذاء للكائنات الدقيقة على مدار اليوم التالى (يوم الحمل المرتفع).

الطريقة الثالثة يتم تحديد معدل صرف الحمأة الزائدة مع الاحتفاظ بقيمة ثابتة لمتوسط عمر الحمأة. وهناك بعض المعلومات الهامة لحساب معدل صرف الحمأة الزائدة على أساس الاحتفاظ بمتوسط عمر الحمأة ثابتاً وهى:

- حجم حوض التهوية (V)
- تركيز المواد الصلبة العالقة القابلة للتطاير فى السائل الممزوج (MLVSS)
- متوسط عمر الحمأة (SA)
- تركيز المواد الصلبة العالقة فى الحمأة الزائدة (VSS in WAS)
- معدل تصرف المحطة (Q)

ويمكن كتابة المعادلة المستخدمة كما يلى:

معدل صرف الحمأة الزائدة =

$$\frac{\text{حجم حوض التهوية} \times \text{تركيز المواد الصلبة القابلة للتطاير فى السائل الممزوج}}{\text{تركيز المواد الصلبة العالقة فى الحمأة الزائدة} \times \text{متوسط عمر الحمأة}} -$$

$$\frac{\text{تركيز المواد الصلبة العالقة القابلة للتطاير فى المياه الخارجة} \times \text{معدل تصرف المحطة}}{\text{تركيز المواد الصلبة العالقة القابلة للتطاير فى الحمأة الزائدة}}$$

أو

$$\text{معدل صرف الحمأة} = \frac{MLVSS \times V}{SA \times VSS \text{ in } WAS} - \frac{Q \times MLVSS}{VSS \text{ in } WAS}$$

مثال:

إذا كانت لدينا المعطيات التالية، احسب معدل صرف الحمأة الزائدة

- حجم حوض التهوية = ٦٠٠٠ م^3
- MLVSS = ٢١٠٠ مليجرام/ لتر
- SA = ٢١ يوم
- VSS in WAS = ٦٩٠٠ مليجرام/ لتر
- VSS = ٢٠ مليجرام/ لتر
- Q = ١٦٠٠٠ م^3/ يوم

الحل:

معدل صرف الحمأة الزائدة =

$$\frac{MLVSS \times V}{SA \times VSS \text{ in } WAS} - \frac{Q \times MLVSS}{VSS \text{ in } WAS}$$

$$= \frac{٢١٠٠ \times ٦٠٠٠}{٢١ \times ٦٩٠٠} - \frac{١٦٠٠٠ \times ٢٠}{٦٩٠٠}$$

$$= \frac{١٢٦٠٠٠٠٠}{٢١ \times ٦٩٠٠} - \frac{٣٢٠٠٠٠}{٦٩٠٠}$$

= ٨٦,٩ - ٤٦,٤ = ٤٠,٦ م^{٣}/ يوم

الاستفادة من التجارب المعملية فى المرشحات الزلطية

يمكن الاستفـــادة من التجارب المعملية فى المرشحات الزلطيـــة فى حساب الحمـــل الهيدروليكى على الوحـــــدة، وفى حساب الحمـــــل العضوى على الوحدة.

حساب الحمل الهيدروليكى على الوحدة

مثال:

احسب الحمل الهيدروليكى لمرشح قطره ٣٠,٥ متر وتدفـــــع المياه إليـــــه بواسطة طلمبة سعتها ٠,١٣٢ متر مكعب فى الثانية.

طريقة الحساب:

- الحمل الهيدروليكى (متر مكعب/يوم/متر مربع) =

$$\frac{\text{كمية التصرف بالمتر المكعب فى يوم}}{\text{مساحة السطح بالمتر المربع}}$$

- كمية التصرف فى اليوم (متر مكعب/ يوم)

= ٠,١٣٢ متر مكعب × ٦٠ ثانية × ٦٠ دقيقة × ٢٤ ساعة

= ١١٤٠٥ متر مكعب فى يوم

- مساحة السطح بالمتر المربع =

$$\frac{٣,١٤}{٤} \times ٣٠,٥ \text{ متر} \times ٣٠,٥ = ٧٣٠,٣ \text{ متر مربع}$$

حيث مساحة الدائرة = $\frac{٣,١٤}{٤} \times (\text{القطر})^{٢}$

- الحمل الهيدروليكى (متر مكعب/ يوم/متر مربع)

$$= \frac{\text{١١٤٠٥ متر مكعب/ يوم}}{\text{٧٣٠,٣ متر مربع}} = \text{١٥,٧ متر مكعب/ يوم/ متر مربع}$$

حساب الحمـــل العضوى على الوحدة

مثال:

احسب الحمل العضوى على المرشح من المعلومات التالية:

مساحة السطح = ٧٣٠,٦ متر مربع

عمق الوسط = ٠,٩٠ متر

كمية التصرف = ١١٤٤٧ متر مكعب/اليوم

تركيز المواد العضوية فى المياه الداخلة (B.O.D.) = ١٠٠ مليجرام/لتر

طريقة الحساب:

- حجم الوسط (متر مكعب) = المساحة (متر مربع) × العمق (متر)

= ٧٣٠,٦ متر مربع × ٠,٩٠ متر = ٦٥٧,٥ متر مكعب

- الحمل العضوى (كجم/يوم)

$$= \frac{\text{١٠٠ مليجرام/لتر} \times \text{١١٤٤٧ متر مكعب/ يوم}}{\text{١٠٠٠}} = \text{١١٤٤,٧ كجم/يوم}$$

- الحمل العضوى على المرشح (كجم B.O.D. / يوم/ متر مكعب)

$$= \frac{\text{١١٤٤,٧ كجم BOD/ يوم}}{\text{٦٥٧,٥ م}^3} = \text{١,٧ كجم B.O.D./ يوم/ م}^3$$

ومن هذه الطريقة يتم تحديد هل الحمل العضوى زاد على المرشح أم قـــل وتربط هذه العلاقة بالتشغيل ككل.

معدلات التحميل النموذجيـــة

مرشح المعدل النمطى:

وسط الترشيح: العمق من ٢ - ٢,٥ متر

الحمل الهيدروليكى: من ١ إلى ٤ م^{٣}/ يوم/ م^{٢}

الحمل العضوى: من ٨٠ - ٤٠٠ جم B.O.D/ يوم/ م^{٣}

مرشح المعدل المرتفع:

وسط الترشيح: العمق من ١-١,٥ متر

الحمل الهيدروليكى: من ٤ إلى ٤٠ م^{٣}/ يوم/ م^{٢}

الحمل العضوى: من ٤٠٠ - ٢٤٠٠جم B.O.D/ يوم/ م^{٣}

حساب كفاءة المرشحـــات

تحسب الكفاءة للمروقات الابتدائية والمرشحات وللمحطة كلها وذلك للحمل العضوى S.S.، C.O.D.، B.O.D. .....الخ.

مثال:

إذا كان تركيز الأكسجين الحيوى المستهلك (B.O.D) لتيار الماء الداخل إلى أحد المروقات الابتدائية هو ٢٠٠ مليجرام/لتر وكان تركيز الأكسجين الحيوى المستهلك لتيار الماء الخارج هو ١٤٠ مليجرام/لتر، احسب كفاءة المروق الأولى فى إزالة التركيز المعادل للأكسجين الحيوى المستهلك.

الحل:

$$\text{الكفاءة \%} = \frac{\text{الدخول - الخروج}}{\text{الدخول}} \times ١٠٠ \%$$

$$= \frac{\text{٢٠٠مليجرام/لتر - ١٤٠ مليجرام/لتر}}{\text{٢٠٠مليجرام/لتر}} \times ١٠٠\%$$

$$= \frac{\text{٦٠ مليجرام/لتر}}{\text{٢٠٠مليجرام/لتر}} \times ١٠٠\%$$

$$= ٠,٣ \times ١٠٠\%$$

= ٣٠ %

كفاءة المروق النموذجى

يوضح الجدول رقم (٤-١) بياناً لبعض النسب المئوية لكفاءات المروقات الأولية.

جدول رقم (٤-١)
النسب المئوية لكفاءات المروقات الأولية

البيان	كفاءة الإزالة المتوقعة
المواد الصلبة القابلة للترسيب	٩٠% إلى ٩٥%
المواد الصلبة العالقة	٤٠% إلى ٦٠%
اجمالى المواد الصلبة	١٠% إلى ١٥%
الأكسجين الحيوى المستهلك B.O.D.	٢٥% إلى ٣٥%

الاختبارات المعملية للمرشحات

يوضح الجدول رقم (٤-٢) معدل الاختبارات لمياه الصرف فى محطات المعالجة أو حسب تصميم المحطات المختلفة

جدول رقم (٤-٢)
معدل الاختبارات لمياه الصرف فى محطات المعالجة

الاختبارات	المعدل	المكان
الأكسجين المذاب (DO)	يومياً	الداخل للمحطة - الخارج من المروق الابتدائى - الخارج من المرشح - الخارج من المحطة
المواد الصلبة القابلة للترسيب	يومياً	الداخل - بعد فاصل الرمل - الخارج من المروق الابتدائى -الخارج من المحطة
الرقم الأيدروجينى (pH)	يومياً	الداخل للمحطة - الخارج من المروق الابتدائى - الخارج من المحطة
درجة الحرارة	يومياً	الداخل للمحطة - الخارج من المروق الابتدائى
الأكسجين الحيوى المستهلك (B.O.D.)	مرة أسبوعياً على الأقل	الداخل للمحطة - بعد المروق الابتدائى - الخارج من المحطة

"تابع" جدول رقم (٤-٢)

معدل الاختبارات لمياه الصرف فى محطات المعالجة

الاختبارات	المعدل	المكان
الأكسجين الكيميائى المستهلك (C.O.D.)	مرتين أسبوعياً	الداخل للمحطة - بعد المروق الابتدائى - الخارج من المحطـــة
المواد الصلبة العالقة (SS)	ثلاث مرات أسبوعياً	الداخل للمحطة - بعد المروق الابتدائى - الخارج من المحطـــة
الكلور المتبقى	يومياً	الخارج من المحطـــــة
بكتريا المجموعة القولونية	مرة أسبوعياً	الخارج من المحطـــــة

الفحص المجهـــرى للكائنات الحية فى الحمأة

إن الفحص الميكروبيولوجى، يعنى ببساطة التعرف على أنواع الكائنـــــات الدقيقة المختلفة التى توجد بالحمأة المنشطة ومعرفة تأثير كل منها علـــــى العملية البيولوجية.

ومن أهم الكائنات الدقيقة التى تتكون منها الحمأة المنشطة ما يلى:

١- البكتريا.
٢- البروتوزوا.
٣- الروتيفرز (الكائنات الدوارة).
٤- الكائنات الخيطية (بكتريا أو فطر).

ويوضح شكل رقم (٤-١) الأنواع الثلاثة الأخيرة منها.

شكل رقم (٤ - ١)

الفحص المجهرى للكائنات الحية الدقيقة

وكل من تلك الكائنات ينتعش وينمو ويتكاثر فى ظروف معينة، ويمكن عن طريق الفحص المجهرى معرفة الظروف السائدة فى وسط الحمأة المنشطة.

وُتعد البكتريا أهم تلك الكائنات وترجع أهميتها لكونها تقوم بالدور الأساسى فى أكسدة المواد العضوية فى مياه الصرف الصحى.

وهناك أنواع عديدة من البكتريا يمكن تواجدها فى مياه الصرف الصحـــى، وتبعاً لنوع وكمية المواد العضوية المتاحة تختلف أنواع البكتريا الموجودة.

وُتشَكِّل البرتوزوا ذات الأهداب أحد الكائنات الحية الهامة فى الحمأة المنشطة، وهناك نوعان منها يمكن التمييز بينهما تحت الميكروسكوب هما:

- البرتوزوا الهدبية العائمة.
- البرتوزوا الهدبية ذات العنق.

ولا تتغذى البرتوزوا على المواد العضوية المتوفرة فى مياه الصرف الصحى ولكنها تتغذى على البكتريا وبالتالى تساهم فى التخلص من البكتريا العائمة وتساعد على ترويق المياه، أما وجود الروتيفرز فى الحمأة المنشطة فإنه غير شائع فى العملية النمطية، لكن إذا وجدت فإن هذا يشير إلى إنخفاض نسبة الغذاء إلى الكائنات الدقيقة أو طول عمر الحمأة.

أما الكائنات الخيطية فتظهر تحت الميكروسكوب بشكل خصل الشعر أو حزم القش. وهى كائنات بطيئة الترسيب، وتواجدها بكثرة يعنى وجود ظروف غير ملائمة فى المعالجة البيولوجية وهذا يؤدى بالتالى إلى فشل عملية الترسيب وزيادة نسبة المواد الصلبة فى المياه الناتجة من المروق الثانوى. والكائنات الخيطية يمكن أن تكون أنواعاً من البكتريا أو الفطريات.

ويرتفع تركيز الكائنات الخيطية نتيجة للأسباب الآتية:

- انخفاض الرقم الهيدروجينى.
- انخفاض تركيز الأكسجين المذاب.
- ارتفاع تركيز المواد العضوية التى تصلح كغذاء للبكتريا.

مما سبق يمكن التعرف على أهم العناصر المكونة للحمأة والتى تلعب دوراً أساسياً فى عملية التحكم وضبط تشغيل المحطة.

ومن خلال الفحص الميكروسكوبى اليومى للحمأة يمكن اتخاذ قرارات صائبة بشأن مستوى المواد الصلبة فى الأحواض. فبملاحظة وجود أى تغيير فى أعداد البروتوزوا الهدبية العائمة أو ذات العنق أو التغيرات التى تطرأ على كمياتها فى الحمأة يمكن اتخاذ القرار المناسب، ومن المعروف أن انخفاض أعداد البروتوزوا الهدبية العائمة بالنسبة للبرتوزوا الهدبية ذات العنق يشير إلى انخفاض نسبة الغذاء إلى الكائنات الحية (F/M)، أو زيادة متوسط عمر الحمأة. وعند التأكد من هذا الوضع اعتماداً على بعض الاختبارات الأخرى مثل اختبار معدل القابلية للترسيب وقياس F/M، ومتوسط عمر الحمأة فإن هذا يتطلب خفض تركيز المواد الصلبة العالقة.

وعلى عكس ذلك فعندما تزيد كميات البرتوزوا الهدبية العائمة فإن هذا يشير إلى إرتفاع نسبة الغذاء إلى الكائنات الحية (F/M)، (وانخفاض متوسط عمر الحمأة)، وبالتالى يحتاج الأمر إلى رفع مستوى المواد الصلبة العالقة.

وعلى وجه العموم، فإن البكتريا تقوم بتثبيت المواد العضوية، كما أن وجود البروتوزوا العائمة ذات الأعناق هو مؤشر جيد عن استقرار عملية المعالجة.

الملاحـــق

ملحـــــق رقم (١)

الطرق القياسية للتحاليل الكيميائية والبيولوجية

ملحق رقم (١)

الطرق القياسية للتحاليل الكيميائية والبيولوجية

يحتوى هذا الجزء على بعض التجارب التى اعتمدها جهاز شئون البيئة لكى تستخدم فى تحليل المياه سواء كانت مياه الشرب أم مياه الصرف والطرق المذكورة فى هذا الملحق تتناول قياس:

١. الرقم الايدروجينى.
٢. الحامضية.
٣. القلوية.
٤. العسر.
٥. المواد الصلبة العالقة.
٦. المواد الصلبة الثابته والمتطايره.
٧. العكارة.
٨. الكلور المتبقى.
٩. نيتروجين الأمونيا.
١٠. نيتروجين النيتريت.
١١. نيتروجين (النيتريت والنترات)
١٢. الفوسفات.
١٣. الاكسجين الكيميائى المستهلك.
١٤. الاكسجين البيوكيميائى الممتص.
١٥. البكتريا القولونية الكليه.
١٦. البكتريا القولونية البرازية (الغائطية).

(A) Determination of Physical Parameters

Quality Control:

The following general guidelines may be applied to many of the methods in this part :

(1) Evaluate analyst performance for each method.

(2) Determine competence by analyses of samples containing known concentrations.

(3) Calibrate instruments and ensure that instrument measurements do not drift.

(4) Assess the precision of analytical procedures by analyzing at least 10% of samples in duplicate. Analyze a minimum of one duplicate with each set of samples.

(5) Determine bias of an analytical procedure in each sample batch by analysis of blanks, known additions with a frequency of at least 5% of samples, and, if possible, an externally provided standard.

pH Value
(Method A-1, Electrometry)

Principle:

The pH of a water sample is determined by the measurement of a voltage produced between an electrode responsive to hydrogen ions (glass electrode) and a reference electrode.
(usually calomel electrode) when both are immersed in the sample. A difference of 1 pH unit produces a potential change of 58.16 mV at 25°C. The pH-meter is calibrated to read a pH-value directly.

Equipment:

(1) pH-meter (accuracy 0.1 pH units).
(2) Combined glass/calomel, or glass/silver- silver chloride electrode.
(3) Magnetic stirrer.
(4) Teflon-coated stirring bar.

***Reagents*:**

(1) Standard pH buffer solutions (pH 4, 7 and 9).
(2) Bidistilled water.
(3) Soft tissue paper.

Procedure:

Rinse the electrode(s) with bidistilled water and dry by gentile wiping with a soft tissue paper. This should be done each time before applying the electrode to a new buffer solution or sample.

(1) If manual temperature compensation is provided, adjust it to the temperature of the buffer or sample to be measured.
(2) Calibrate the instrument by immersing the rinsed electrode(s) in a buffer solution of pH 7 and set the meter to read 7.00 by adjusting the asymmetry control.
(3) Rinse the electrode and repeat using a buffer solution of pH 4 or pH 9. Select the possibility which is coming closest to the pH of the sample to be measured.
(4) Adjust the reading to the appropriate number by the slope control and discard the portions of the buffer used in the calibration.
(5) Immerse the rinsed combination glass electrode and temperature corrected electrode in the unknown sample solution and take a reading after 30 seconds.
(6) Express the results to the nearest 0.1 pH unit. The temperature of the sample at the time of pH measurement should be indicated.

Precautions:

(1) Before making any measurement, rinse the electrodes with bidistilled water and dry with tissue paper.
(2) Always adjust the instrument to the temperature of the sample.
(3) Ensure an adequate level of filling solution in the reference electrode.
(4) For storage, always keep the electrode(s) in bidistilled water, never allow them to dry out.
(5) Preferable the pH of any sample should be established at the sampling site, or as soon as possible after taking the sample.

(6) No chemical preservation of the sample is permissible.
(7) In case salinity is high, a sodium ion error at pH 10 and above has to be compensated.

References:

(1) USEPA "Methods For Chemical Analysis of Water and Wastes", Ohio, 1983 (Method 150.1).
(2) "Standard Methods for Examination of Water and Wastewater", 19th Edition, American Public Health Association, Washington 1995 (Method 4500-H+).

Acidity
(Method A-4, Potentiometry)

Principle:

The pH of the sample is determined and a measured amount of standard acid is added, as needed , to lower the pH to 4 or less . Hydrogen peroxide is added, the solution boiled for several minutes, cooled, and titrated electrometrically with standard alkali to pH 8.2. The method covers the range from approximately 10 mg/L acidity to approximately 1000 mg/L as $CaCO_3$, using a 50 ml sample.

Equipment:

(1) pH meter.
(2) Titration equipment including pipettes and burettes.

Reagents:

(1) Hydrogen peroxide (H2O2 , 30% solution).
(2) Standard sodium hydroxide , 0.02 N.
(3) Standard sulfuric acid , 0.02 N.

Procedure:

(1) Pipette 50 ml of the sample into a 250 ml beaker.
(2) Measure the pH of the sample. If the pH is above 4.0, add standard 0.02 N sulfuric acid in 5.0 ml increments to lower the pH to 4.0 or less. If the initial pH of the sample is less than 4.0 , the incremental addition of sulfuric acid is not required.
(3) Add 5 drops of 30% hydrogen peroxide.
(4) Heat the sample to boiling and continue boiling for 2 to 4 minutes.
(5) In some instances, the concentration of ferrous iron in a sample is such that an additional amount of hydrogen peroxide and slightly longer boiling time may be required.
(6) Cool the sample to room temperature and titrate electrometrically with standard 0.02 N sodium hydroxide to reach a pH value of 8.2.

Calculations:

(1) Acidity , as $CaCO_3$,(mg/L) = $\frac{[(A \times B) - (C \times D)] \times 50000}{\text{ml sample}}$

Where:
A = volume of standard sodium hydroxide used in titration (ml).
B = normality of standard sodium hydroxide.

C = volume of standard sulfuric acid (ml) used to reduce pH to 4 or less.

D = normality of standard sulfuric acid.

Precautions:

(1) Suspended matter present in the sample, or precipitates formed during the titration may cause a sluggish electrode response.
(2) This effect may be offset by allowing a 15-20 second pause between additions of titrant or by slow dropwise addition of titrant as the endpoint pH is approached.

References:

(1) USEPA "Methods For Chemical Analysis of Water and Wastes", Ohio, 1983 (Method 305.1).
(2) " Standard Methods for Examination of Water and Wastewater", 19th Edition, American Public Health Association, Washington 1995 (Method 2310 B).

Alkalinity
(Method A-5, Potentiometry)

Principle:

An unaltered sample is potentiometrically titrated to pH 4.5. The sample must not be filtered, diluted, concentrated, or altered in any way. The method is suitable for all ranges of alkalinity.

Equipment:

(1) pH meter (sensitivity 0.05 pH units). If automatic temperature compensation is not provided , make titration at 25 ± 2°C.
(2) Use appropriate sized vessel to keep the air space above the solution at a minimum.
(3) Use a rubber stopper fitted with holes for the glass electrode, reference electrode (or combination electrode) and burette.
(4) Magnetic stirrer, pipettes, flasks and other standard laboratory equipment.
(5) Burettes, Pyrex 50, 25 and 10 ml.

Reagents:

(1) Sodium carbonate solution, approximately 0.05 N: Place 2.5 ± 0.2 g Na2CO3 (dried at 250°C for 4 hours and cooled in desiccator) into a 1 liter volumetric flask and dilute to the mark.
(2) Standard acid (sulfuric or hydrochloric), 0.1 N: Dilute 3.0 ml of concentrated H2SO4 or 8.3 ml of concentrated HCl to 1 liter with distilled water. Standardize versus 40.0 ml of 0.05 N Na2CO3 solution diluted with about 60 ml distilled water by titrating potentiometrically to pH of about 5. Lift electrode and rinse into beaker. Boil solution gently for 3-5 minutes under a watch glass cover. Cool to room temperature. Rinse cover glass into beaker. Continue titration to the pH inflection point . Calculate normality using:

$$N = \frac{A \times B}{53.00 \times C}$$

Where:

A = weight of Na_2CO_3 (g) dissolved in 1 liter.
B = volume of Na_2CO_3 solution used for titration (ml).
C = volume of acid used to reach inflection point(ml).

(1) Standard acid (sulfuric or hydrochloric) , 0.02N : Dilute 200.0 ml of 0.1000 N standard acid to 1 liter with distilled water. Standardize by potentiometric titration of 15.0 ml 0.05 N Na_2CO_3 solution as above.

Procedure:

(1) Sample size:
   A. Use a sufficiently large volume of titrant (> 20 ml in a 50 ml burette) to obtain good precision while keeping

volume low enough to permit sharp end point .

B. For <1000 mg $CaCO_3$ / L, use a standard 0.02 N acid titrant.
C. For >1000 mg $CaCO_3$/L, use a standard 0.1 N acid titrant.
D. A preliminary titration is helpful.

(2) Potentiometric titration of normal alkalinity:
A. Place 25- 50 ml of the sample solution in flask by pipetting wpipette tip near bottom of flask.
B. Measure pH of sample.
C. Add standard acid (0.02 or 0.1 N), being careful to stir thoroughly but gently to allow needle to obtain equilibrium.
D. Titrate to pH 4.5 . Record volume of titrant.

(3) Potentiomettitration of low alkalinity:

A. For alkalinity of < 20 mg/L ,titrate 100 - 200 ml as above using a 10 ml microburette and 0.02 N acid solution.
B. Stop titration at pH in range of 4.3 - 4.7, record titrant volume and exact pH. Carefully add titrant to lower pH by exactly 0.3 pH units and record volume of titrant.

Calculations:

(1) Potentiometric titration to pH 4.5:

$$\text{Alkalinity as } CaCO_3\text{, (mg/L)} = \frac{A \times N \times 50{,}000}{\text{ml of sample}}$$

Where:

A = volume of standard acid consumed in the titration (ml).
B = normality standard acid.

(2) Potentiometric titration of low alkalinity :

$$\text{Total alkalinity, as } CaCO_3 \text{ (mg/L)} = \frac{(2B - C) \times N \times 50{,}000}{\text{ml of sample}}$$

where :
B = volume (ml) of titrant consumed to first recorded pH.
C = total volume (ml) of titrant used to reach pH 0.3 units lower.
N = normality of acid.

Precautions:

(1) The sample should be refrigerated at 4°C and run as soon as practical. Do not open sample bottle before analysis.
(2) Substances, such as salts of weak organic and inorganic acids present in large amounts, may cause interference in the electrometric pH measurements.
(3) For samples having high concentrations of mineral acids, such as mine wastes and associated receiving waters, titrate to an electrometric endpoint of pH 3.9.
(4) Oil and grease, by coating the pH electrode, may also interfere, causing sluggish response.

References:

(1) USEPA "Methods For Chemical Analysis of Water and Wastes", Ohio, 1983 (Method 301.1).

(2) "Standard Methods for Examination of Water and Wastewater", 19th Edition, American Public Health Association, Washington 1995 (Method 2320 B).

Hardness
(Method A-6, Visual Titrimetry)

Principle:

Calcium and magnesium ions in the sample are sequestered upon the addition of disodium ethylenediamine tetraacetate (Na_2EDTA). The end point of the reaction is detected by means of Eriochrome Black T indicator, which has a red color in the presence of calcium and magnesium and a blue color when the cations are sequestered. The method is suitable for all concentration ranges of hardness.

Equipment:

Standard laboratory titrimetric equipment.

Reagents:

(1) Buffer magnesium EDTA solution: Dissolve 1.179 g disodium EDTA (analytical reagent grade) and 780 mg $MgSO_4.7H_2O$ (or 644 mg $MgCl_2.6H_2O$) in 50 ml distilled water. Add this solution to a 250 ml volumetric flask containing 16.9 g NH_4Cl and 143 ml of concentrated aqueous ammonia solution with mixing and dilute to the mark with distilled water. Store in a tightly stoppered plastic bottle; stable for approximately one month. Dispense with bulb operated pipette. Discard when 1 or 2 ml added to sample fails to produce a pH of 10.0 ± 0.1 at end point of titration.

(2) Indicator: Mix together 0.5 g Eriochrome Black T and 100 g NaCl.

(3) Standard EDTA titrant, (0.02) N: Place 3.723 g analytical reagent grade disodium ethylenediamine tetraacetate dihydrate, $Na_2H_2C_{10}H_{12}O_8N_2.2H_2O$ in a 1 liter volumetric flask and dilute to the mark with distilled water. Check with standard calcium solution by titration. Store in polyethylene. Check periodically because of gradual deterioration.

A. Standard calcium solution 0.02 N: Place 1.000 g anhydrous calcium carbonate (primary standard low in metals) in a 500 ml flask. Add , 200 ml distilled water.Boil for a few minutes to expel CO_2. Cool , add a few drops of methyl red indicator and adjust to intermediate orange color by adding 3 N aqueous ammonia solution or (1 + 1) HCl as required. Quantitatively transfer to a 1 liter volumetric flask and dilute to mark with distilled water.

B. Hydrochloric acid solution, (1 + 1).

C. Methyl red indicator : Dissolve 0.10 g methyl red in distilled water in a 100 ml volumetric flask and dilute to the mark .

D. Aqueous ammonia solution ,(3 N): Dilute 210 ml of concentrated aqueous ammonia to 1 liter with distilled water.

E. Standardization titration procedure : Place 10.0 ml standard calcium solution in vessel containing about 50 ml distilled water . Add 1 ml buffer solution. Add 1-2 drops indicator or small scoop of dry indicator. Titrate slowly with continuous stirring until the last reddish tinge disappears; adding last few drops at 3-5 second intervals. At end point the color is blue. Total titration duration should be 5 minutes from the time of buffer addition.

$$\text{Normality of of EDTA} = \frac{0.2}{\text{ml of EDTA}}$$

(1) Aqueous ammonia (1 N): Dilute 70 ml of concentrated aqueous ammonia solution to 1 liter with distilled water.
(2) Inhibitor: Sodium cyanide (extremely poisonous).

Procedure:

(1) Pretreatment:
A. For drinking waters , surface waters , saline waters , and dilutions thereof , no pretreatment steps are necessary.
B. For most wastewaters , and highly polluted waters, the sample must be digested as given in the Atomic Absorption Methods section of this manual.

(2) Titration of sample-normal to high hardness:
A. Sample should require < 15 ml EDTA titrant, titration should be completed within 5 minutes after buffer addition.
B. Place 25.0 ml sample in titration vessels, neutralize with 1 N aqueous ammonia and dilute to about 50 ml.
C. Add 1 to 2 ml buffer solution to adjust to pH 10 ± 0.1.
D. If end point is not sharp (as determined by practice run) add about 250 mg of sodium cyanide inhibitor at this point.
E. Add small scoop of dried powder indicator formulation.
F. Titrate slowly with continuous stirring with standard EDTA titrant until last reddish tint disappears. Solution is normally blue at end point.

(3) Titration of sample of low hardness (less than 5 mg/L):
A. Use a larger sample volume (100 ml).
B. Use proportionately larger amounts of buffer, inhibitor and indicator.
C. Use a microburette and run a blank using bidistilled, distilled or deionized water.

Calculations:

Hardness (EDTA) expressed as

$$CaCO_3,(mg/L) = \frac{A \times N \times 50{,}000}{\text{ml sample}}$$

where :
A = volume (ml) of EDTA titrant .

N = normality of EDTA titrant.

Precautions:
Excessive amounts of heavy metals can interfere. This is usually overcomed by complexing the metals with cyanide. Routine addition of sodium cyanide solution (*caution:deadly poison*) to prevent potential metallic interference is recommended.

References:

(1) USEPA "Methods For Chemical Analysis of Water and Wastes", Ohio, 1983 (Method 130.2).

(2) " Standard Methods for Examination of Water and Wastewater", 19th Edition, American Public Health Association, Washington 1995 (Method 2340 C).

Total Suspended Solids
(Method A-8, Gravimetry)

Principle:

A well mixed sample is filtered through a glass fiber filter, and the residue retained on the filter is dried to constant weight at 103 - 105°C. The filtrate from this method may be used for dissolved solids. The practical range of the determination is 4 - 20000 mg/L.

Equipment:

(1) Glass fiber filter discs, without organic binder.
(2) Filter support: Filtering apparatus with reservoir and a coarse (40-60 microns) fritted disc as a filter support.
(3) Suction flask.
(4) Drying oven, 103 -105 °C.
(5) Desiccator.
(6) Analytical balance (0.1 mg sensitivity).

Reagents:

Deionized bidistilled water.

Procedure:

(1) Place the glass fiber filter on the membrane filter apparatus or insert into bottom of a suitable Gooch crucible with wrinkled surface up.
(2) While vacuum is applied, wash the disc with three successive 20 ml volumes of distilled water. all traces of water by continuing to apply vacuum after water has passed through.
(3) Remove filter from membrane filter apparatus or both crucible and filter if Gooch crucible is used, and dry in an oven at 103 -105 °C for one hour.
(4) Transfer to desiccator and store until needed.
(5) Repeat the drying cycle until a constant weight is obtained (weight loss is less than 0.5 mg) . Weigh immediately before use . After weighing , handle the filter ocrucible / filter with forceps or tongs only.
(6) For a 4.7 cm diameter filter, filter 100 ml sample. If weight of captured residue is less than 1.0 mg, the sample volume must be increased to provide at least 1.0 mg of residue. If other filter diameters are used, start with a sample volume equal to 7 ml/cm^3 of filter area and collect at least a weight of residue proportional to the 1.0 mg stated above.

(7) Assemble the filtering apparatus and begin suction. Wet the filter with a small volume of distilled water to seat it against the fritted support.
(8) Shake the sample vigorously and quantitatively transfer the sample volume to the filter using a graduated cylinder. Remove all traces of water by continuing to apply vacuum after sample has passed through.
(9) With suction on, wash the graduated cylinder, filter, non-filterable residue and filter funnel wall with three portions of distilled water allowing complete drainage between washing. Remove all traces of water by continuing to apply vacuum after water has passed through.
(10) Carefully remove the filter from the filter support. Alternatively, remove crucible and filter from crucible adapter. Dry at least one hour at 103 - 105°C. Cool in a desiccator and weigh. Repeat the drying cycle until a constant weight is obtained (weight loss is less than 0.5 mg).

Calculations:

$$\text{Total suspended solids, (mg/L)} = \frac{(A-B) \times 1{,}000}{C}$$

where :
A = weight (mg) of filter (or filter and crucible) + residue.
B = weight (mg) of filter (or filter and crucible).
C = volume (ml) of sample filtered.

Precautions:

(1) Non-representative particulates such as leaves , sticks , fish and lumps of fecal matter should be excluded from the sample if it is determined that their inclusion is not desired in the final result.
(2) Preservation of the sample is not practical; analysis should begin as soon as possible.
(3) Refrigeration or icing to 4°C, to minimize micro- biological decomposition of solids, is recommended.
(4) Filtration apparatus, filter material, pre-washing, post-washing, and drying temperature are specified because these variables have been shown to affect the results.
(5) Samples high in filterable residue (dissolved solids), such as saline waters, brines and some wastes, may be subject to a positive interference. Care must be taken in selecting the filtering apparatus so that washing of the filter and any dissolved solids in the filter minimizes this potential interference.

References:

(1) USEPA "Methods For Chemical Analysis of Water and Wastes", Ohio, 1983 (Method 160.2).
(2) " Standard Methods for Examination of Water and Wastewater", 19th Edition, American Public Health Association, Washington 1995 (Method 2540 D).

Fixed and Volatile Solids
(Method A-11, Gravimetry)

Principle:

The residue from the experiments: total solids, dissolved solids and suspended solids is ignited to constant weight at 550°C. The remaining solids represent the fixed total , dissolved or suspended solids while the weight lost on ignition is the volatile solids . The determination is useful in control of wastewater treatment plant operation because it offers a rough approximation of the amount of organic matter present in the solid fraction of wastewater , activated sludge , and industrial wastes .

Equipment:

See total dissolved and suspended solids .

Procedure:

(1) Warm up the muffle furnace to 550^{o}C before inserting samples.
(2) Ignite residual produced by the methods of total , dissolved or suspended solids to constant weight in a muffle furnace at a temperature of 550°C (usually , 15 - 20 min. ignition are required for 200 mg residue) . However, more than one sample and/or heavier residues may overtax the furnace and necessitate longer ignition times.
(3) Let dish or filter disk cool partially in air until most of the heat has been dissipated.
(4) Transfer to a desiccator for final cooling in a dry atmosphere. Do not overload desiccator.
(5) Weigh dish or disk as soon as it has cooled to balance temperature. Repeat cycle of igniting , cooling , desiccating , and weighing until a constant weight is obtained or until weight change is less than 4% or 0.5 mg , which ever is less .
(6) Duplicate determinations should agree within 5% of their average .

Calculations:

$$\text{Volatile solids , (mg/L)} = \frac{(A - B) \times 1000}{\text{Sample volume, ml}}$$

$$\text{Fixed solids , (mg/L)} = \frac{(B - C) \times 1000}{\text{Sample volume, ml}}$$

where :
A = weight of residue + dish before ignition (mg).
B = weight of residue + dish or filter after ignition (mg).
C = weight of dish or filter (mg) .

Precautions:

(1) Negative errors in the volatile solids may be produced by loss of volatile matter during drying .
(2) Determination of low concentrations of volatile solids in the presence of high fixed solids concentrations may be subjected to considerable error. In such cases, measure for suspect volatile components by another test , for example , total organic carbon .

References:

(1) USEPA "Methods For Chemical Analysis of Water and Wastes", Ohio, 1983 (Method 160.4).
(2) "Standard Methods for Examination of Water and Wastewater", 19th Edition, American Public Health Association, Washington 1995 (Method 2540 D).

Turbidity
(Method A-12, Nephelometry)

Principle:

Turbidity in water is caused by suspended matter and is an expression of the optical property that causes light to be scattered and absorbed rather than transmitted in straight lines through the sample. The most commonly used method is a nephelometric method. This method is based on a comparison of the amount of light scattered by a standard reference suspension under the same conditions. The more light is scattered the higher is the turbidity. The method is applicable in the turbidity range 0 - 40 NTU.

Equipment:

(1) Turbidity meter.
(2) Sample tubes.

Reagents:

(1) Stock turbidity suspension:

Solution (I):
Dissolve 1.00 g of hydrazine sulfate $(H_2N)_2H_2SO_4$ in distilled water and dilute to 100 ml.

Solution (II):
Dissolve 10 g hexamethylene-tetramine, $(CH_2)_6N_4$, in distilled water and dilute to 100 ml.

In a 100 ml volumetric flask, mix 5.0 ml of solution (I) and 5.0 of solution (II). Allow to stand for 24 hrs.Dilute to mark and mix. The turbidity of this suspension is 400 NTU (Nephelometric Turbidity Units). These suspensions can be stored for a month.

(2) Standard turbidity suspension:
Dilute 25 ml of stock turbidity suspension to 100 ml with distilled water. Prepare daily. This suspension has a turbidity equivalent to 100 NTU. Prepare another dilution by diluting the 100 NTU suspension 10 times to give a 10 NTU suspension.

Procedure:

(1) Calibrate the nephelometer with the 100 NTU suspension and verify the setting with a reading on the 10 NTU suspension.
(2) Thoroughly shake sample, wait until air bubbles disappear and pour sample into turbidity meter tube. Read turbidity directly from the instrument scale.
(3) In case the turbidity is going beyond the scale dilute the sample and measure the turbidity. The dilution factor should be taken into account for the final calculation of the result.

Calculations:

$$\text{Sample NTU} = \frac{\text{NTU measured}}{\text{proportion of sample in dilution}}$$

Precautions:

Rapidly settling sand, the presence of air bubbles, and dirty glassware are the main sources of interference and should be removed before analysis.

Referenc:

1. USEPA “Methods For Chemical Analysis of Water and Wastes”, Ohio, 1983 (Method 180.1).
2. “Standard Methods for Examination of Water and Wastewater”, 19th Edition, American Public Health Association, Washington 1995 (Method 2130 B).

(B) Determination of Inorganic Nonmetallic *Constituents*

Quality Control:

1. Detailed recommendations and general information concerning laboratory quality assurance, as well as specific details of applicable quality-control measures, should be followed.

2. Keep in mind the overall purpose of the measurements. Can duplicates (replicates) adequately establish precision and can recovery of known additions determine bias. Are suitable standards, control charts blanks, calibrations, and other necessary measures incorporated to assure the quality of data produced. Furthermore, can adequate documentation be presented to support these contentions.

The same degree of substantiation may not be necessary in all cases, e.g., requirements for an operational control determination may differ from those for data submitted for regulatory purposes. Therefore, the intended use of the data is an important factor in determining overall quality control as well as the accompanying quality assurance measures.

Chlorine, Total Residue
(Method B-3, Spectrophotometry)

Principle:

Chlorine (hypochlorite ion, hypochlorous acid) and chloramines stoichiometrically liberate iodine from potassium iodide at pH 4 or less. The liberated iodine reacts with N,N-diethyl-*p*-phenylenediamine (DPD) to produce a red colored solution with maximum absorbance at 515 nm. The method is applicable to the concentration range of 0.2-4 mg/L chlorine.

Equipment:

Spectrophotometer for use at 515 nm and cells of light path 1 cm or longer.

Reagents:

(1) Phosphate buffer solution: Dissolve 24 g anhydrous disodium hydrogen phosphate, Na_2HPO_4 , and 46 g anhydrous potassium dihydrogen phosphate , KH_2PO_4, in distilled water . Dissolve 800 mg disodium ethylenediamine tetraacetate dihydrate in 100 ml distilled water. Combine these two solutions and dilute to 1 liter with distilled water. Add 20 mg $HgCl_2$ as a preservative.

(2) N,N-Diethyl-*p*-phenylenediamine (DPD) indicator solution : Dissolve 1 g DPD oxalate or 1.5 g *p*-amino-N,N-diethylaniline sulfate in chlorine free distilled water containing 8 ml of 1 + 3 H_2SO_4 and 200 mg disodium ethylenediamine tetraacetate dihydrate . Dilute to 1 liter , store in a colored , glass-stoppered bottle . Discard when discolored . The buffer and indicator sulfate are available as a combined reagent in stable powder form .

(3) Sulfuric acid solution (1+3) : Slowly add one part of H_2SO_4 (sp.gr.1.84) to three parts of distilled water .

(4) Potassium iodide, KI crystals.

(5) Stock potassium permanganate solution : Place 0.891 g $KMnO_4$ in a volumetric flask and dilute to 1 liter .

(6) Standard potassium permanganate solution: Dilute 10.00 ml of stock potassium permanganate solution to 100 ml with distilled water in a volumetric flask . One milliliter of this solution diluted to 100 ml with distilled water is equivalent to 1.00 mg/L chlorine.

Procedure:

(1) Calibration:
- A. Prepare a series of permanganate standards covering the chlorine equivalent range of 0.05 to 4 mg/L.
- B. Place 5 ml phosphate buffer in a flask .
- C. Add 5 ml DPD reagent .
- D. Add 100 ml permanganate standard .
- E. Read at 515 nm on a spectrophotometer and record the absorbance.
- F. Return the contents of the cell to the flask .
- G. Titrate the contents of the flask with standard ferrous ammonium sulfate until the red color is discharged . Record the result.

(2) Sample analysis:
- A. Place 0.5 ml phosphate buffer in flask.
- B. Add 0.5 ml DPD reagent .

C. Add approximately 0.1 g KI.
D. Add 10 ml of sample.
E. Let stand 2 minutes.
F. Read at 515 nm spectrophotometer , and record the absorbance.

Calculations:

(1) Plot the absorbance of the standard permanganate solutions on the vertical axis versus the titrated concentration on the horizontal axis.
(2) Draw the line of best fit through the points.
(3) Locate the absorbance of the sample on the vertical axis.
(4) Read the concentration on the horizontal axis at the intersect of the absorbance and the calibration line .

Precautions:

(1) Interferences are caused by any oxidizing agent but these are usually present at insignificant concentrations compared to the residual chlorine concentrations .
(2) Turbidity and color will essentially prevent the colorimetric analysis .

References:

(1) USEPA "Methods For Chemical Analysis of Water and Wastes", Ohio, 1983 (Method 330.5).
(2) "Standard Methods for Examination of Water and Wastewater", 19th Edition, American Public Health Association, Washington 1995 (Method [4500-Cl (C)]).

Ammonia-Nitrogen
(Method B-6, Potentiometry)

Principle:

The ammonia-selective electrode uses a hydrophobic gas-permeable membrane to separate the sample solution from an electrode internal solution of ammonium chloride. Dissolved ammonia is converted to ammonia gas by raising the pH to above 11 with a strong base . Diffusion of ammonia through the membrane causes change of the pH of the internal solution that is sensed by a pH electrode inside the ammonia sensor. Sample distillation is unnecessary. The method covers the range from 0.03 to 1400 mg NH_3/L.

Equipment:

(1) Electrometer: A pH meter with expanded millivolt scale capable of 0.1 mV resolution between - 700 mV and + 700 mV or a specific ion meter.
(2) Ammonia-selective electrode.
(3) Magnetic stirrer, thermally insulated, with TFE-coated stirring bar.

Reagents:

.

(1) Ammonia free water.
(2) Sodium hydroxide, 10 N.
(3) NaOH/EDTA solution, 10 N : Dissolve 400 g NaOH in 800 ml water. Add 45.2 ethylenediaminetetraacetic acid, tetrasodium salt, tetrahydrate ($Na_4EDTA.4H_2O$) and stir to dissolve . Cool and dilute to 1000 ml.
(4) Stock ammonium chloride solution: Dissolve 3.819 g anhydrous NH_4Cl (dried at 100°C) in water, and dilute to 1000 ml ; 1.00 ml = 1.00 mg N = 1.22 mg NH_3.
(5) Standard ammonium chloride solutions.

Procedure:

(1) Preparation of standards: Prepare a series of standard solutions covering the concentration of 1000 , 100, 10, 1, and 0.1 mg NH_3-N/L by making decimal dilutions of stock NH_4Cl solution with water.
(2) Electrometer calibration: Place 100 ml of each standard solution in a 150 ml beaker. Immerse electrode in standard of lowest concentration and mix with a magnetic stirrer. Limit stirring speed to minimize possible loss of ammonia from the solution. Maintain the same stirring rate and a temperature of about 25°C throughout calibration and testing procedures . Add a sufficient volume of 10 N NaOH solution (1 ml is usually sufficient) to raise pH above 11. If the presence of silver or mercury is possible, use NaOH / EDTA solution in place of NaOH solution . If it is necessary to add more than 1 ml of either NaOH or NaOH / EDTA solution , note volume used , because it is require for subsequent calculations . Keep electrode in solution until stable millivolt reading is obtained. Do not add NaOH solution before immersing electrode, because ammonia may be lost from a basic solution repeat procedures with remaining standards, proceeding from lowest to highest concentration . Wait until the reading has stabilized (at least 2 to 3 minutes) before recording millivolts for standards and samples containing less than 1 mg NH_3-N/L.
(3) Preparation of standard curve*:* Using semi-logarithmic graph paper, plot ammonia concentration in milligrams NH_3-N per liter on the log axis vs. potential in millivolts on the linear axis starting with

the lowest concentration at the bottom of the scale. If the electrode is functioning properly a tenfold change of NH_3-N concentration produces a potential change of about 59 mV.

(4) Calibration of specific ion meter: Refer to manufacturer's instructions.

(5) Measurement of samples: Dilute if necessary to bring NH_3-N concentration to within calibration curve range. Place 100 ml sample in 150 ml beaker and follow procedure in the electrometer calibration above. Record volume of 10 N NaOH added. Read NH_3 -N concentration from standard curve.

Calculations:

$$NH_3\text{-N, (mg/L)} = A \times B \times \frac{100 + D}{100 + C}$$

Where:
A = dilution factor.
B = concentration of NH_3-N (mg/L) from calibration curve.
C = volume (ml) of 10 N NaOH added to calibration standards.
D = volume (ml) of 10 N NaOH added to sample.

Precaut:

(1) Amines are a positive interference.

(2) Mercury and silver interfere by complexing with ammonia, unless the NaOH /EDTA solution is used.

References:

(1) USEPA "Methods For Chemical Analysis of Water and Wastes", Ohio, 1983 (Method 350.3).

(2) " Standard Methods for Examination of Water and Wastewater",
19th Edition, American Public Health Association, Washington 1995 (Method [4500-NH_3(D)]).

Nitrite-Nitrogen (NO_2-N)
(Method B-7, Spectrophotometry)

Principle:

Nitrite reacts in strongly acid medium with sulphanilamide. The resulting diazo compound is coupled with N-(1-naphthyl)-ethylenediamine-dihydrochloride to form an intensely red-coloured azo-compound. The absorption of the dye is proportional to the concentration of nitrite present . The method is applicable in the range of 0.01 to 1.0 mg nitrite-nitrogen/L. Samples containing higher concentration must be diluted before analysis.

***Equipment*:**

(1) Spectrophotometer.
(2) Nessler tubes (50 ml) and 1.0 cm glass cuvettes.

Reagents:

1. Buffer-colour reagent: Put 105 ml of HCl in glass stoppered dark bottle.Add 5.0 g of sulphanilamide and 0.5 g of N(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride. Stire until dissolved. Add 136 g of sodium acetate and again stir until dissolved.Dilute to 500 ml with distilled water.This solution is stable for several weeks in the dark (wrap in aluminum foil).
2. Stock nitrite solution:Dissolve 0.4926 g of dried anhydrous sodium nitrite in distilled water and dilute to 1liter . Preserve with 2 ml chloroform (1.0 ml = 100 µg nitrite-N).
3. Working standard solution: Dilute 10.0 ml of the stock solution to 1 L of distilled water (1.0 ml = 1.0 µg nitrite-N).

Procedure:

(1) Filter the sample, if necessary, through a 0.45 um pore-size membrane filter.
(2) Put 10-50 ml of the sample in a 50 ml Nessler tube.
(3) Prepare a series of standards in 50 ml Nessler tubes (1.0-20.0 µg of nitrite-N per tube).
(4) Add 2 ml of buffer color reagent to each standard and sample, mix and allow color to develop for at least 15 min.
(5) Check the pH of the solution to ensure that the value is between pH 1.5 and 2.0.
(6) Measure the absorbance of standard and sample in the spectrophotometer at 540 nm against a blank.
(7) Plot the amount of nitrite-nitrogen per standard tube against the absorbance.
(8) Read the concentration of nitrite-nitrogen per sample tube from the calibration curve.

Calculations:

$$\text{Nitrite-nitrogen , (µg/L)} = \frac{1000 \times \text{reading graph (ug nitrite-nitrogen)}}{\text{volume of sample (ml)}}$$

Precautions:

(1) The nitrite concentration in collected samples can change very rapidly due to bacterial oxidative or reductive conversions and the analysis should be carried out as early as possible.

(2) Short time preservation for one or two days is possible by deep freezing (-20^{o}C) or the addition of 40 mg mercuric ion/ liter of sample with storage at 4^{o}C.

References:

1. USEPA "Methods For Chemical Analysis of Water and Wastes", Ohio, 1983 (Method 354.1).
2. "Standard Methods for Examination of Water and Wastewater", 19th Edition, American Public Health Association, Washington 1995 (Method [4500-NO_2^-(B)]).

(Nitrate and Nitrite)-Nitrogen
(Method B-8, Spectrophotometry)

Principle :

Nitrate is reduced to nitrite when a sample is passed over a column containing copper amalgamated cadmium granules or filings. The nitrite if originally present , plus reduced nitrate) is determined by the same method as described earlier for nitrite . The applicable range of this method is 0.01 to 1.0 mg/L nitrate-nitrite nitrogen . The range can be extended by sample dilution .

Equipment:

(1) Reduction columns: Constructed from three pieces of glass tubing joined end to end (as shown in the following figure 1).

(2) All glass ware needed for nitrite analysis.

(3) Spectrophotometer with 1.0 cm glass cuvettes.

Reagents:

(1) Prepare copper - cadmium granules by washing 25 g new or used 40 - 60 mesh cadmium metal (Cd) granules with 6 N HCl and rinse with water . Swirl Cd with 100 ml 2 % $CuSO_4$ solution for 5 minutes or until the blue color partially fades . Decant and repeat with fresh $CuSO_4$ until a brown colloidal precipitate begins to develop. Gently flush with water to remove all precipitated copper metal (Cu).

(2) Buffer - color reagent : Put 105 ml of hydrochloric acid in glass stoppered dark bottle. Add 5.0 g sulphanilamide and 0.5 g of N- (1 -naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride.Stir until dissolved . Add 136 g of sodium acetate and again stir until dissolved. Dilute to 500 ml with distilled water. This solution is stable for several weeks if stored in the dark (wrap in aluminum foil).

(3) Ammonium chloride - EDTA solution: Dissolve 13 g of NH_4Cl and 1.7 g of (EDTA) in 900 ml distilled water. Adjust the pH to 8.5 with concentrated aqueous ammonia and dilute to one litre.

(4) Diluted ammonium chloride-EDTA solution: Dilute 300 ml NH_4Cl-EDTA solution to 500 ml with water.

(5) Hydrochloric acid: HCl , 6 N.

(6) Copper sulphate solution, 2%.

(7) Stock nitrite solution: Dissolve 0.4926 g of dried anhydrous sodium nitrite (24 hrs. In desiccator) in distilled water and dilute to one litre. Preserve with 2 ml chloroform per litre(1.0 ml = 100 µg nitrite-N).

(8) Test nitrite solution:Working standard solution is prepared by diluting: Dilute 10.0 ml of the stock solution to 1 litre of distilled water (1.0 ml = 1.0 µg nitrite - N).

(9) Stock nitrate solution : Dissolve 7.218 g of KNO_3 in distilled water, and dilute to 1 litre . Addition of 2 ml of chloroform allows for storage up to 6 months (1.0 ml = 1.0 mg NO_3-N).

(10) Standard nitrate solution: Dilute 10 ml of stock nitrate solution to 1 litre (1.0 ml = 10 µg NO_3-N)

Procedure:

(1) Preparation of reduction column : Plug the bottom of the reduction column and fill with water. Add sufficient Cu-Cd granules to produce a column of 18.5 cm long. Maintain the water level above Cu-Cd

granules to prevent entrapment of air. Wash the column with 200 ml of diluted NH_4Cl-EDTA solution. Activate the column by passing through it, at least 100 ml of a solution composed of 25 % 1.0 mg NO_3-N/L, at 7 to 10 ml/min.

(2) Filter the sample through a 0.45 µm pore size membrane filter.

(3) Adjust pH to between 7 and 9, using NaOH or HCl as necessary. This ensures a pH of 8.5 after adding NH_4Cl-EDTA solution.

(4) To 25 ml sample or a portion diluted to 25 ml, add 75 ml NH_4Cl-EDTA solution and mix. Pour mixed sample into column and collect at a rate of 7 to 10 ml/min. Discard first 25 ml . Collect the rest in the original sample flask. There is no need to wash columns between samples , but if the columns are not to be used for several hours or longer , pour 50 ml dilute NH_4Cl-EDTA solution on , and let it pass through the system . Store Cu-Cd column in this solution and never let it dry.

(5) Carry out the reduction of NO_3-N standards exactly as prescribed for the samples. At least one nitrite standard should be compared to a reduced nitrate standard at the same concentration to verify the efficiency of the reduction column.

(6) As soon as possible , and not more than 15 min after reduction, add 2.0 ml color reagent to 50 ml of sample or standard and mix. Between 10 min and 2 hours afterward, measure absorbance at 543 nm against a distilled water reagent blank. Note: if the (NO_3+NO_2) -N concentration exceeds the standard curve range (about 1 mg N/L), use the remainder of reduced sample to make an appropriate dilution and analyse again.

(7) Make a calibration curve relating the absorbance of the nitrate standards against the amount of NO_3+NO_2 present . Read the amount of NO_3 +NO_2 in a sample from the graph.

Calculations:

$$(NO_3 + NO_2) - N\ ,\ (mg/L) = \frac{\text{reading from graph (µg)}}{\text{volume. of sample (ml)}}$$

Precautions:

(1) To prevent any change in the nitrate it should be determined immediately after sampling. If storage is necessary, the sample should be kept at 4^oC with or without preservatives such as H_2SO_4 (0.8 ml of coH_2SO_4/L of sample).

(2) Build up of suspended matter in the reduction column will restrict sample flow. Since nitrate nitrogen occurs in a soluble state, the sample can be prefiltered.

(3) Highly turbid sashould be treated with zinc sulfate before filtration to remove turbidity.

(4) Low results might be obtained for samples that contain high concentrations of iron, copper, cadmium or other metals. EDTA is added to eliminate this interference.

References:

(1) USEPA "Methods For Chemical Analysis of Water and Wastes", Ohio, 1983 (Method 353.3).

(2) " Standard Methods for Examination of Water and Wastewater", 19th Edition, American Public Health Association, Washington 1995 (Method [4500-NO_3(E)]).

Phosphorus (Orthophosphate)
(Method B-16, Spectrophotometry)

Principle:

Orthophosphate reacts under acid conditions to form a heteropoly acid, molybdophosphoric acid. In the presence of vanadium, yellow vanadomolybdophosphoric acid is formed. The intensity of the yellow color is proportional to phosphate concentration. The minimum detectable concentratin is 0.2 mg phosphorus/L in 1 cm spectrophotometric cell.

Equipment:

(1) Spectrophotometer for use at 400-490 nm.
(2) Acid-washed glassware.
(3) Filtration apparatus and filter paper.

Reagents:

(1) Phenolphthalein indicator.
(2) Hydrochloric acid (1:1).
(3) Activated carbon.
(4) Vanadate-molybdate reagent :

Solution (I) : Dissolve 25 g ammonium molybdate $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ in 300 ml distilled water.

Solution (II):Dissolve 1.25 g ammonium metavanadate NH_4VO_3 by heating to boiling in 300 ml distilled water .
Cool and add 330 ml of concentrated HCl .

Cool solution (II) to room temperature , pour solution (I) into solution (II) , mix and dilute to 1 liter.

(5) Standard phosphate solution : Dissolve in distilled water 219.5 mg anhydrous KH_2PO_4 and dilute to 1000 ml (1.00 ml = 50 µg PO_4-P).

Procedure:

(1) If sample pH is greater than 10 , add 0.05 ml (1 drop) phenolphthalein indicator to 50 ml sample and discharge the red color with 1:1 HCl before diluting to 100 ml .

(2) Remove excessive color in sample by shaking about 50 ml with 200 mg activated carbon in an erlenmeyer flask for 5 min. and filter to remove carbon.

(3) Place 35 ml or less of sample containing 0.05-1.0 mg P , in a 50 ml volumetric flask. Add 10 ml vanadate-molybdate reagent and dilute to the mark with distilled water.

(4) Prepare a blank in which 35 ml distilled water is substituted for the sample.

(5) After 10 min., measure absorbance of sample versus ablank at a wavelength of 400-490 nm. and compare with the calibration curve.

(6) Prepare a calibration curve by using 1-20 µg/ml standard phosphate solution and proceed as above.

Calculations:

$$\text{Phosphate-P, (mg/L)} = \frac{\text{mg P (in 50 ml final volume)} \times 1000}{\text{ml sample}}$$

Precautions:

(1) Positive interference is caused by silica and arsenate only if the sample is heated.

(2) Negative interferences are caused by arsenate, fluoride, thorium, bismuth, sulfide, thiosulfate, thiocyanate, or excess molybdate.

(3) Blue color is caused by ferrous iron concentration but this does not affect results if ferrous concentration is less than 100 mg/L.

(4) Sulfide interference may be removed by oxidation with bromine water.

References:

"Standard Methods for Examination of Water and Wastewater", 19th Edition, American Public Health Association, Washington 1995 (Method [4500-P (C)]).

Total Coliform
(Method E-1 Microbiology)

Principle:

This bacteria develops red colonies with a golden metallic sheen within 24 hours at 35°C on an Endo-type medium containing lactose. All red, pink, blue, white or colorless colonies lacking sheen are considered non-coliforms.

Equipment:

(1) Sterilized glass or polypropylene wide-mouthed bottles (300 ml to 500 ml).

(2) Sterilized pipettes and graduated cylinders

(3) Sterilized glass Erlenmeyer flasks with metal caps, metal foil covers or screw caps.

(4) Sterilized borosilicate glass or disposable plastic petri dishes (60x15 mm, 50 x 12 mm).

(5) Filtration unit consisting of a membrane filter funnel and membrane holder. (The unit should be made of seamless steel, glass, or autoclavable plastic that does not leak and is not subject to corrosion.

(6) Membrane filter (pre-sterilized and certified membrances).

(7) Sterile absorbent pads ? 48 mm in diameter and of sufficient thickness to absorb 1.8 to 2.2 ml of medium.

(8) Sterilized smooth-tipped forceps without corrugations on the inner side of the tips (Ethyl or absolute methyl alcohol [95%] and flaming may be used for sterilization).

(9) Incubator adjusted to 35±0.5°C and a 90% relative humidity.

(10) Microscope with a 10 to 15 magnification and a white fluorescent light source

Reagents and Materials

(1) LES Endo agar : Dehydrated Difco M-Endo Agar LES (No. 0736), dehydrated BBL M-Endo Agar LES (No. 11203), or equivalent.

(2) Dehydrate in IL water containing 20 ml 95% ethanol. Bring to a near boil to dissolve to agar, then remove from heat to cool to 45-50°C. Final pH should be 7.2±0.2. Use 5 to 7 ml for each 60 mm petri dish. Do not expose plates to sunlight; store in the dark at 4 to 8°C. Discard the medium after 2 weeks.

(3) M-Endo medium : Dehydrated Difco M-Endo Broth Mf (No. 0749), dehydrated BBL M-coliform broth (No. 11119), or equivalent.

(4) Dehydrate in IL water containing 20 ml 95% ethanol. Bring to a near boil to dissolve agar, then remove from heat to cool to 45-50°C. Final pH should be 7.0 to 7.3. Use ml for each 60 mm petri dish. Do not expose plates to sunlight, store in the dark at 4 to 8°C. Discard broth medium after 96 hours and discharge agar after 3 weeks.

(5) Liquid medium (without agar) can be used with absorbent pads if the pads are certified to be free of sulfite or any other agent that could inhibit bacterial growth. Use 2 ml of the liquid medium per plate.

Procedure:

(1) Step 1 : Sample Size

(2) For drinking water, filter 100 to 1000ml volume which yields about 50 coliform colonies through a membrane filter (MF).

(3) For other waters, filter three different volumes (diluted or undiluted), depending on the expected bacterial density.

(4) Step 2: Sample Filtration

(5) Place a sterile MF (grid side up) over porous plate of receptacle using sterile forceps.

(6) Place matched funnel unit over receptacle carefully, lock it in place, and filter the sample under a partial vacuum.

(7) Rinse funnel by filtering a 20-to-30 ml portion of sterile diluted water. Disengage vacuum, unlock and remove funnel, and remove MF using sterile forceps. Place MF on selected medium with a rolling motion to avoid entrapment of air.

(8) Prepare a sterile rinse water sample (100 ml) as above for every 10 sample series.

(9) At the beginning of each filtration series, use a sterile filtration unit. If a time interval of more than 30 minutes elapses between sample filtrations, begin a new series using a sterile filtration unit. Sterilize unit with flowing stream of boiling water or ultraviolet disaffection (UV).

(10) Step 3: Culture Dish and Incubation

(11) If agar-based Endo-type medium is used: Place prepared filter directly on agar by rolling it onto agar surface without entrapping air.

(12) If liquid medium is used : Place a pad in the culture dish and saturate it with 1.8 to 2.0 ml M-Endo medium. Place prepared filter directly on pad. Invert dish.

(13) Incubate the prepared dishes for 22 to 24 h at 35 ± 0.5°C.

(14) Step 4: Counting

(15) Use a low-power (10 to 15 magnification) binocular dissecting microscope or other optical device with a white fluorescent light. Count the number of colonies that are pink-to-dark-red colored with a metallic surface sheen.

(16) Atypical coliform colonies can be dark-red or nucleated without sheen. Pink, red, white and colorless colonies lacking sheen are considered to be non-colilforms.

Calculations:

$$TC = \frac{CCC \times 100}{V_S}$$

Where:

TC = total coliform colonies/100 ml.
CCC = counted coliform colonies.
V_s = volume of sample filtered (ml).

Precautions:

(1) The presence of algae, particulate and turbidity in the sample solution can cause interference.

(2) This procedure is not applicable to wastewater samples that have received primary treatment followed by chlorination.

(3) Throughly clean and sterilize all equipment.

References:

(1) "Standard Methods for Examination of Water and Wastewater", 19th Edition, American Public Health Association, Washington 1995 (Method 9222 B).

Fecal Coliform
(Method E-2, Microbiology)

Principle:

Fecal coliform causes fermentation of lactose and grows on M-FC broth within 48h at 44-45°C. It forms blue-colored colonies. Non-fecal coliform colonies are gray to cream colored.

Equipment :

(1) Sterilized glass or polypropylene, wide-mouthed bottles (300 ml to 500 ml).

(2) Sterilized pipettes and graduated cylinders.

(3) Sterilized glass Erlenmeyer flasks with metal caps, metal foil covers or screw caps.

(4) Sterilized borosilicate glass or disposable plastic petri dishes (60x15 mm, 50x12 mm).

(5) Filtration unit consisting of a membrane filter funnel and membrane holder. (The unit should be made of seamless stainless steel, glass, or autoclavable plastic that does leak and is not subject to corrosion.)

(6) Membrane filter (pre-sterilized and certified membranes).

(7) Sterile absorbent pads ? 48 mm in diameter and of sufficient thickness to absorb 1.8 to 2.0 ml of medium.

(8) Sterilized smooth-tipped forceps without corrugations on the inner side of the tips (ethyl or absolute methyl alcohol (95%) and flaming may be used for sterilization).

(9) Incubator adjusted to 44.5±0.5°C or a suitable water bath.

(10) Microscope with magnification of 10 to 15 times and white fluorescent light source.

Reagents and Materials:

(1) Rehydrate M-FC medium in water containing 10 ml 1% rosolic acid in 0.2 N NaOH. Heat to near boiling, remove from heat and cool to below 50°C. Do not sterilize by autoclaving. The final pH should be 7.4. Store the finished medium at 4 to 8°C in sealed plastic bags or other suitable container to reduce moisture loss. Discard unused broth after 96 h and the unused agar medium after 2 weeks.

(2) Use 5 to 7 ml of the agar medium per 50x12 mm petri dish and let solidify.

Procedure:

Step 1: Sample Size

For drinking water, a 50 to 100 ml sample is suitable. When the bacterial density of the sample is unknown, filter a few milliliters to establish fecal coliform density. Estimate the volume expected to yield a countable membrane. Two other portions, representing both one tenth and ten times the estimated volume, can be used.

Step 2: Sample Filtration

1) Place a sterile MF (grid side up) over the porous plate of receptacle using sterile forceps.

2) Carefully place matched funnel unit over receptacle and lock it in place. Filter the sample under a partial vacuum.

3) Rinse funnel by filtering a 20 to 30 ml portion of sterile dilution water. Disengage vacuum, unlock and remove funnel.

4) Remove MF using sterile forceps and place it on selected medium with rolling motion to avoid entrapment of air.

5) Prepare a sterile rinse water sample (100 ml) as above after every 10 samples in a series.

At the beginning of each filtration series, use a sterile filtration unit. If a time interval of more than 30 minutes elapses between sample filtrations, begin a new series using a sterile filtration unit. Sterilize unit with a flowing stream of boiling water or UV sterilizer.

Step 3 : Preparation of Culture Dish

If using liquid M-FC broth with pads:

(1) Place a sterile absorbent pad in each culture dish

(2) Saturate pad with about 2.0 ml M-FC medium.

(3) Remove any excess liquid from culture dish.

(4) PlacpMF the pad and invert the dish

If using M-FC broth without pads:

(1) Add 1.5% agar to the M-FC broth.
(2) Place 5 to 7 ml of the medium in each culture dish and let solidify.
(3) Roll the prepared MF onto agar surface, being careful to avoid entrapment of air.

Step 4: Incubation:

(1) Place prepared dishes in waterproof plastic bags or sealed petri dishes with waterproof tape to prevent leakage during submersion.

(2) Submerge in water bath and incubate for 24±2 h at 44.5 ±0.2°C.

Step 5: Counting

(1) Use wide-field dissecting microscope (low power, 10-15 magnification) or other optical

device to count the blue colored colonies of E. coli on the M-FC.

(2) Do not count the gray to cream colored coliform colonies.

Calculations :

$$FC = \frac{CCC \times 100_s}{Vs}$$

Where:

FC = fecal coliforms /100 ml
CCC = fecal coliform colonies counted
V_s = volume of sample filtered.

Precautions

(1) The presence of algae, particulates and turbidity in the sample solution can cause interference.
(2) This procedure is not applicable to wastewater samples that have received primary treatment followed by chlorination
(3) Be sure to clean and sterilize of all equipment

References:

"Standard Methods for Examination of Water and Wastewater", 19th Edition, American Public Health Association, Washington 1995 (Method 9222 D).