نُقدر عالياً العمل الرائع في إعداد هذا الكتاب الذي يتناول التجارب المهمة في مواصفات المياه الفيزيائية والكيميائية والبايولوجية. ويُعتبر عمل واسع ومفيد جداً وإضافة مهمة ترفد طلبة الدراسات الأولية والدراسات العليا على حدّ سواء. وكمرجع تستفيد منه الجهات ذات العلاقة في المؤسسات العلمية على أختلاف تخصصاتها. وهنا إوكد إنه تم بذل جهود كبيرة في إنجاز وإعداد هذا الكتاب وخروجه بهذه الصورة الرائعة ليُغني مكتباتنا العلمية ويُلبي إحتياجات الطلبة.

الأستاذ الدكتور

محمد نافع علي العزاوي

2018/4/13

رقم الايداع في دار الكتب والوثائق ببغداد (1588) لسنة 2018

مدخل التحاليل البيئية المختبرية للمياه 2018

مدخل الى

التحاليل البيئية المختبرية للمياه

(الفيزيائية، الكيميائية، البكتريولوجية)

تأليف

أحمد خضير كاظم — ماجستير علوم كيمياء

نور ياسين صالح — ماجستير علوم حياة/ بيئة

مدخل

الى

الفحوصات البيئية المختبرية للمياه

(الفيزيائية، الكيميائية، البكتريولوجية)

تاليف

أحمد خضير كاظم — **ماجستير علوم كيمياء**

نور ياسين صالح — **ماجستير علوم أحياء**

الطبعة الأولى 2018

بسم الله الرحمن الرحيم

المقدمة

اثناء عملي داخل المختبرات البيئية للاعوام الماضية تم تكليفي بعدة مهام منها اعداد ملازم للعمل المختبري سواء في الطرق المتبعة في فحوصات الماء او فحوصات التربة وكذلك قمت باعداد عدد من المحاضرات التي القيت سواء على الاخوة الكيميائيين في المختبر البيئي المركزي او العاملين في دوائر المحافظات والقيتها في الدورات التي اقامتها الدائرة الفنية او اقامها المختبر وكذلك شاركت في تدريب عدد من منتسبي وزارات الدولة المختلفة وفي داخلي هاجس بوجود نقص في المكتبة العربية داخل مختبرات البيئة من وجود كتاب جامع في تحاليل المياه... فرايت ان نزرع بذرة في مختبرات البيئة من كتاب يحوي طرق التحاليل البيئية و اهم الملاحظات العملية ولكي يكون كتابا مفيدا وسعيا لان يكون كتاب اكثر شمولية لفحوصات المياه تم انجاز العمل بإضافة الفحوصات البكتريولوجية و إضافة العديد من الملاحظات من قبل زميلتي السيدة نور ياسين و تمخضت الفكرة لاصدار كتاب جامع في التحاليل الكيميائية و البكتريولوجيية ، فاعددنا هذه البذرة عسى ان يتقبلها الله ويجعلها في ميزان حسناتنا وان تنال قبول الاخوة العاملين في المختبرات وان تكون طبعة اولى لطبعات لاحقة ومنقحة حتى يكتمل كتابا جامعا لجميع التحاليل يغني المكتبة العربية مشفوعا بملاحظات جميع الاخوة على ما في الكتاب من نقص او اخطاء لتلافيها وتطوير الكتاب للطبعات اللاحقة .

أحمد خضير كاظم

م.ر .كيمياويين

وزارة الصحة والبيئة

مع كل يوم يمضي وزمن ينقضي... ومع كل شعاع يُضيئ... ينمو الوطن ويزدهر بالعلم... سلاح يحتضنه ويحميه ليكون قوياً شامخاً أصيلاً... قادراً على مواجهة التحديات ومتواصلاً مع تطورات العصر وإزدهار الحضارة.

نُقدر عالياً العمل الرائع في إعداد هذا الكتاب الذي يتناول التجارب المهمة في مواصفات المياه الفيزيائية والكيميائية والبايولوجية. ويُعتبر عمل واسع ومفيد جداً وإضافة مهمة ترفد طلبة الدراسات الأولية والدراسات العليا على حدّ سواء. وكمرجع تستفيد منه الجهات ذات العلاقة في المؤسسات العلمية على أختلاف تخصصاتها. وهنا إوكد إنه تم بذل جهود كبيرة في إنجاز وإعداد هذا الكتاب وخروجه بهذه الصورة الرائعة ليُغني مكتباتنا العلمية ويُلبي إحتياجات الطلبة.

نحن نفتخر دائماً بمثل هذه النشاطات المتميزة ونُعبر عن خالص تمنياتنا القلبية والتهنئة لمحرري الكتاب وتمنياتنا لهم بالنجاح الدائم والتوفيق لخدمة العلم والوطن.

الأستاذ الدكتور
محمد نافع علي العزاوي
2018/4/13

الفهرس

الموضوع	الصفحة
المقدمة	١
صور تقديم الكتاب	٢
تقديم الكتاب	٣
الفصل الأول مدخل الى مختبرات التحاليل البيئية	٥
الماء	٧
نبذة عن المختبرات البيئية	٩
تقسيم المختبر البيئي	١٠
مختبرات التحليل الكيميائي	١٠
شروط الصحة والسلامة للعاملين في المختبر	١١
السلامة الميكروبية في المختبرات البيئية	١٣
التخلص من المخلفات	١٤
عمليات التطهير و التعقيم	١٤
أنواع المطهرات المستخدمة في المختبر	١٥
نظافة اليدين	١٥
توصيات وارشادات عامة للامان المايكروبي بالمختبر	١٥
طرق التعبير عن التركيز	١٨
المواد و المحاليل القياسية و صفاتها	١٩
تحضير المواد الكيميائية	٢٠
تحضير المواد السائلة	٢٠
تحضير المواد الصلبة	٢١
الأخطاء الشائعة داخل المختبرات	٢١
الدقة في الفحوصات المختبرية	٢٢
الفصل الثاني الخواص العامة والصفات الفيزيائية للماء	٢٣
النمذجة	٢٥
دقة الفحوصات	٢٨
العكارة	٣٠
مقدمة	٣٠
التداخل	٣٠
طريقة الفحص النفلومترية	٣٠
قراءة العينة	٣١
المحاليل القياسية	٣١

الموضوع	الصفحة
درجة الحرارة	٣٣
التوصيلية	٣٣
علاقة التوصيلية بدرجة الحرارة	٣٣
المواد الصلبة في الماء	٣٥
المواد الصلبة الكلية	٣٥
طريقة العمل	٣٥
الحسابات	٣٥
الاملاح الذائبة	٣٥
طؤيقة العمل	٣٦
التجفيف بدرجة ١٠٣-١٠٥°م	٣٦
التجفيف بدرجة ١٨٠°م	٣٦
العلاقة بين الاملاح الذائبة والتوصيلية	٣٧
الاملاح الذائبة النظرية	٣٧
ميزان الايونات	٣٨
نسبة الاملاح المقاسة الى النظرية	٣٨
المواد العالقة الكلية	٣٩
الأساسيات	٣٩
الكواشف و المستلزمات	٣٩
طريقة العمل	٤٠
العسرة	٤١
طريقة تعيين العسرة	٤١
طريقة العمل	٤١
ملاحظات حول الفحص	٤٣
القاعدية	٤٣
طريقة العمل	٤٤
ملاحظات حول الفحص	٤٤
الحامضية	٤٥
طريقة العمل	٤٥
ملاحظات حول الفحص	٤٦
الفصل الثالث التحاليل الكيميائية للماء	٤٧
الدالة الحامضية	٤٩
الكالسيوم	٥١
أساس الطريقة	٥١

الموضوع	الصفحة
طريقة العمل	٥١
ملاحظات حول الفحص	٥٢
المغنيسيوم	٥٢
طريقة تقدير المغنيسيوم	٥٣
الكلوريد	٥٣
طريقة تقدير الكلوريد بالتسحيح مع نترات الفضة	٥٤
ملاحظات حول الفحص	٥٤
الكبريتيد	٥٥
طريقة التسحيح مع الثايوسلفات	٥٥
ملاحظات حول الفحص	٥٦
الكبريتات	٥٧
الطريقة الوزنية	٥٧
طريقة قياس الكبريتات بقياس العكارة	٥٧
اتداخلات في هذه الطريقة	٥٨
الطريقة الأولى	٥٨
الطريقة الثانية	٥٩
الفوسفات	٦٠
طريقة مولبيدات الفوسفورك اسد	٦٠
ملاحظات حول الفحص	٦١
الصوديوم و البوتاسيوم	٦١
النتروجين	٦٢
اساسيات	٦٢
نتروجين- الامونيا	٦٣
طريقة نسلر	٦٤
نتروجين- النترات	٦٦
نتروجين- النتريت	٦٨
الفلورايد	٧٠
الطريقة اللونية	٧٠
الالمنيوم	٧٣
طريقة قياس الالمنيوم	٧٣
الحاجة البايولوجية للاوكسجين	٧٥
طريقة قياس BOD	٧٦
طريقة التسحيح	٧٩

الموضوع	الصفحة
طريقة الأقطاب	٨٢
الحاجة الكيميائية للاوكسجين	٨٤
طريقة الفحص اللونية	٨٤
الزيوت والشحوم	٨٧
الطريقة الوزنية لاستخلاص سائل- سائل	٨٨
ملاحظات حول الفحص	٨٩
الفصل الرابع التحاليل البكتريولوجية	٩١
المعدات المختبرية	٩٣
مواصفات المعدات المختبرية:	٩٣
الحاضنات	٩٣
الحمام المائي	٩٤
فرن التعقيم بالهواء الحار	٩٤
جهاز التعقيم بالبخار الموصدة	٩٤
جهاز قياس الحامضية	٩٥
الموازين	٩٥
أدوات تحضير الاوساط الزرعية	٩٦
الماصات والماصات الألكترونية والأسطوانات المدرجة	٩٦
حاويات الماصات	٩٦
الثلاجات والمجمدات	٩٦
أجهزة مراقبة درجة الحرارة	٩٧
قناني وأنابيب التخفيف	٩٧
أطباق الصب بتري	٩٨
عدة الترشيح	٩٨
أنابيب التخمر وأنبوبة درهم والقناني	٩٨
معدات التلقيح	٩٨
قناني العينات	٩٩
المجاهر	٩٩
مصباح الأشعة فوق البنفسجية	٩٩
الغسل والتعقيم	١٠١
العينات	١٠٢
جمع العينات	١٠٢
القناني	١٠٢

الموضوع	الصفحة
إزالة الكلورين	١٠٢
طريقة النمذجة	١٠٣
عينات مياه الشرب	١٠٤
عينات المياه السطحية	١٠٥
تحديد البيانات	١٠٦
عينات مياه الشرب	١٠٦
المياه الخام غير المكلورة	١٠٧
تحضير الأوساط الزرعية	١٠٧
خزن وحفظ الأوساط الزرعية	١٠٧
محلول التخفيف	١٠٩
العدد الكلي للبكتريا مختلفة التغذية	١١١
تحضير العينة	١١٢
الأوساط المستخدمة	١١٢
الوسط الزرعي Plate count agar	١١٢
الوسط الزرعي m-HPC agar	١١٣
الوسط الزرعي R2A	١١٣
الحضن	١١٤
عد الأطباق وتسجيل النتائج	١١٤
عد الأطباق لطريقتي الصب والنشر	١١٤
طريقة الترشيح الغشائي	١١٦
طريقة الحساب وتقرير العدّ	١١٦
أختيار طريقة الفحص	١١٧
طريقة صب الأطباق	١١٧
طريقة النشر على الطبق	١١٩
تحضير الأطباق	١١٩
طريقة العمل	١١٩
عدّ وتسجيل النتائج	١٢٠
طريقة الترشيح الغشائي	١٢٠
بكتريا القولون الكلية	١٢١
طريقة الأنابيب التخمرية المتعددة لعدّ البكتريا القولونية	١٢٢
فحص الجودة لمياه الشرب	١٢٢
فحص الجودة للمياه الخام	١٢٢

الموضوع	الصفحة
عينات أخرى	١٢٣
طريقة الأنابيب التخمرية المتعددة لتحليل Total coliform	١٢٣
العينات	١٢٣
الفحص الأفتراضي	١٢٤
طريقة العمل	١٢٥
قراءة النتائج	١٢٥
الفحص التأكيدي	١٢٦
الوسط الزرعي	١٢٦
طريقة العم	١٢٦
المرحلة التكميلية	١٢٧
تقنية صبغة غرام	١٣٠
تقدير الكثافة البكتيرية	١٣١
الدقة precision لإختبار الأنابيب التخمرية المتعددة:	١٣١
إستخدام الجداول لتحديد العدد الأكثر إحتمالية	١٣١
اختبار وجود – عدم وجود بكتريا القولون	١٣٥
الفحص الأفتراضي	١٣٦
الطريقة	١٣٦
المرحلة التأكيدية والمرحلة التكميلية	١٣٧
طريقة فحص البكتريا القولونية المتحملة للحرارة	١٣٩
إختبار بكتريا القولون البرازية	١٣٩
تقنية إختبار بكتريا *Escherichia coli* القولونية بإستخدام الركيزة المتألقة	١٤٢
تحديد وجود بكتريا القولون البرازية وبكتريا *E. coli* في آن واحد	١٤٥
إختبار بكتريا القولون في سبع ساعات	١٤٧
الفصل الخامس تحليل البيانات و برامج إدارة المعلومات المختبرية	١٤٩
برامج مراقبة نوعية المياه	١٥١
أهمية البيانات المختبرية	١٥٢
تطبيقات إدارة المعلومات المختبرية	١٥٣
أهمية أنظمة المعلومات المختبرية	١٥٤
البيانات	١٥٥
تصدير البيانات	١٥٥

الموضوع	الصفحة
الفرق بين المعلومات و البيانات؟	١٥٥
أهمية البيانات	١٥٥
ماهي قاعدة البيانات	١٥٦
امثلة	١٥٦
لماذا نستخدم قواعد بيانات الكترونية	١٥٦
امثلة	١٥٦
امثلة على تطبيقات لقواعد بيانات	١٥٧
برامج الأنظمة الإدارية	١٥٧
نظام إدارة المعلومات المختبرية	١٥٧

الفصل الأول

مدخل الى مختبرات التحاليل البيئية

الفصل الاول

١-١ الماء

قال الله تعالى: "وجعلنا من الماء كل شيء حي"

من هذه الاية انطلق العلماء بدون استثناء في اعتبار ان الماء هو اساس الحياة على الارض وعلى أي كوكب اخر وهو مصدر لكل شكل من اشكال الحياة المختلفة ويغطي الماء أكثر من ثلثي الكرة الارضية، ويتواجد في حياتنا بثلاث حالات هي الصلبة (الثلج) (في درجة حرارة الصفر المئوي) والسائلة الاعتيادية (الماء) (في درجة الحرارة ما بين الصفر والمئة مئوية) والغازية (البخار) (درجة الحرارة اعلى من صفر) وفي حالته السائلة الاعتيادية وهي الاكثر انتشارا فهو سائل عديم اللون والطعم والرائحة.

يعتبر الماء مركب كيميائي سائل عديم اللون والطعم والرائحة و يتكون جزيء الماء الواحد من ذرتي هيدروجين بالاضافة الى ذرة اوكسجين واحدة، يتكون جزئ الماء من ارتباط ذرة أكسجين بذرتي هيدروجين لتكوين رابطتين تساهميتين أحاديتين الزاوية بينهما ١٠٤,٥° ونتيجة لكبر قيمة السالبية الكهربائية للأوكسجين مقارناً بالهيدروجين تنشأ بين جزيئات الماء القطبية نوعاً من التجاذب الكهربي (الإلكتروستاتيكي) الضعيف يسمي بالرابطة الهيدروجينية ،وهو سائل مذيب جيد لكثير من المواد والاملاح والفيتامينات والاحماض الامينية الخ
وللماء خصائص مهمة منها :

- تميل جزيئات الماء إلى التصرف كمجموعات مترابطة وليس كجزيئات منفصلة ومجموعات جزيئات الماء تكون محتوية على فراغات.
- يتمدد الماء بارتفاع درجات الحرارة إذا كانت فوق ٤ درجات مئوية وينكمش بالبرودة شأنه في ذلك شأن كل السوائل والغازات والأجسام الصلبة، إلا أن الماء يسلك سلوكا شاذا تحت درجة ٤°م حيث يتمدد بدلا من أن ينكمش وهذا ما يجعل ثقله النسبي أي كثافته تقل بدل من أن تزيد وبذلك يخف فيرتفع إلى الأعلى وعندما يتجمد في درجة الصفر المئوي يكون تجمده فقط على السطح بينما في الأسفل يكون الماء سائلا في درجة ٤ م وفي ذلك حماية كبيرة للأحياء التي تعيش في الماء.
- يعتبر الماء سائل متعادل كيميائيا، إذ أن درجة الحموضة أو القاعدية فيه هي ٧، وهذا يعني أنه لا يمكن اعتبار الماء مادة حامضية أو قاعدية، لأنه مادة متعادلة كيميائيا.

- يعتبر الماء مذيب جيد للمواد، وهذا يعني أنه من الممكن إذابة الكثير من الأملاح والمواد في الماء، لكي تذوب مادة في الماء يجب أن تحتوي على أيونات حرة، أو أن تكون مادة قطبية (لأن "المثل يذوب بالمثل" والماء مادة قطبية، لهذا السبب الماء الموجود في الطبيعة لا يوجد بشكل نقي ١٠٠% وذلك بسبب وجود الأملاح والغازات المذابة.
- يعتبر الماء مادة موصلة سيئة للكهرباء، ولكن بما أن الماء مادة مذيبة، فعند إذابة الأملاح في الماء، أو إذابة مواد أخرى، يصبح الماء موصلا جيدا للكهرباء.
- ينقل الماء المواد داخل الخلايا وخارجها في جسم الكائن الحي وبذلك تتمكن الخلايا من التخلص من فضلاتها، والحصول على حاجتها من مواد مختلفة من محيطها الخارجي.

١-٢ نبذة عن المختبرات البيئية

ان في اي مرحلة من مراحل تأسيس مختبر يتطلب ذلك وجود مواصفة قياسية من توفير المكان والبناية المناسبتين والتأثيث المختبري اللازم لذلك والأجهزة الحديثة والمواد القياسية المستعملة اضافة الى تدريب الكادر المختبري الجيد. واتخاذ تدابير السلامة الكيمياوية والمختبرية. ليتسنى الحصول على نتائج دقيقة وواضحة وعندما يتعلق الامر بإنشاء مختبر بيئي فان عمل المختبر البيئي لا يقتصر على تحليل الماء والهواء والتربة ومعرفة المركبات المكونة لها. بل هو ايجاد الارقام الحقيقية للمواد الدخيلة الملوثة سواء كانت فيزيائية أو كيميائية أو بايولوجية أوبكتريولوجية ومن ثم دراستها وتقييمها وتحديد المحددات الخاصة اللازمة للماء والهواء والتراب للبلد واعداد التقارير والبحوث اللازمة لهذه النتائج لمعرفة وضع البيئة وموقف هذه البيئة من التلوث. ولهذا فانه يجب ان يكون المختبر البيئي ذو مستوى اعلى من الدقة في نتائج التحليل.

ولان ايجاد مختبرات بيئية مركزية عالية الدقة في التحليل فانه بالمقابل سيواجه مشاكل اخرى متمثلة بمشكلتين رئيسيتين هي كثرة عدد النماذج التي سيقوم بتحليلها مما قد يؤدي في بعض الاحيان الى سرعة في العمل تؤدي الى حدوث اخطاء في التحليل... ومع انه مختبر مركزي واحد ستكون المسافة بعيدة فعندئذ يستغرق وصول النماذج للمختبر عدة ساعات طويلة وهنا ستظهر مشكلة اخرى في مواجهة دقة المختبرات المركزية يمكن اجمالها بمشكلتين معا وهي صعوبة حفظ النموذج لحين ايصاله بصورة سليمة. ومشكلة ثانية متمثلة بان بعض الفحوصات انية ويجب قياسها فورا ومن النموذج مثل الدالة الحامضية ودرجة الحرارة والتوصيلية. وتتطلب هذه الفحوصات مثلا فحص آني وسريع لإيجاد الارقام الحقيقية لهذه الدالات. وللتغلب على هذه المشكلة حيث أصبح لبعض البلدان مختبرات متنقلة اضافة الى المختبرات الثابتة المركزية.

فما الفرق بين المختبرات المتنقلة عن المختبرات الثابتة؟

تكون اولا هذه المختبرات المتنقلة هذه ذات فحوصات واجهزة محدودة وقليلة وتكون معظم هذه الاجهزة من نوع الاجهزة الحقلية (والتي غالبا لا تملك دقة عالية) اذ لا يمكن لهذه المختبرات المتكونة من سيارة واحدة على الاغلب من حمل عدد من الاجهزة الضخمة الموجودة داخل المختبرات المركزية والثابتة (مثل اجهزة HPLC أو ICأو Atomic Absorption)، كما وتكون المختبرات المتنقلة ذات مستوى اوطأ من الدقة في نفس الوقت الذي تكون فيه المختبرات الثابتة ذات دقة اعلى. كما ويمكن للمختبرات الثابتة من تحليل أكثر للمواد المعقدة وغير المتوفرة للمختبرات المتنقلة.

١-٢-١ تقسيم المختبر البيئي

تقسم المختبرات البيئية بصورة عامة الى قسمين هما

١-قسم التحليل الكيميائي و ٢- قسم التحليل الاحيائي (البايولوجي و البكتريولوجي)

ويقسم كل من القسمين الى عدة اقسام تخصصية تعتمد على إمكانية المختبرو الفحوصات المطلوبة.

١-٢-٢ مختبرات التحليل الكيميائي

ان عمل مختبرات التحليل الكيميائي المتخصصة بالبيئة يتمثل بصورة رئيسية الى تحليل الماء والهواء والتربة ومعرفة ودراسة المواد الدخيلة على مكونات البيئة الرئيسية والمعروفة بيئيا بالتلوث ومراقبة المحددات الرئيسية لهذه المكونات. وعلى هذا الاساس قد يتم تقسيم المختبر الكيميائي الى قسم الماء وقسم التربة وقسم الهواء.

ولان الماء ينقسم بصورة رئيسية الى مياه الشرب وبدورها تشمل ايضا مياه الانهار والابار

والى مياه عادمة وتشمل مياه التصريف الصناعي والصحي فقد يقسم قسم الماء الى

١- قسم فحص ومراقبة مياه الشرب

٢- قسم فحص ومراقبة المياه العادمة

الا انه يتم في المختبرات الحديثة تقسيم القسم الكيميائي الى

١- قسم التحاليل اللاعضوية

ويتم في هذا القسم فحص فحص الدالة الحامضية والتوصيلية والمواد الصلبة والاملاح والفوسفات والكبريتات والنترات ..الخ

٢- قسم الفحوصات العضوية

ويتم في هذا القسم فحص المواد العضوية في الماء مثل مركبات THMs وPAHs وVOCs

٣- الفحوصات اللاعضوية

ويتم في هذا القسم فحص العناصر الثقيلة والخ من الفحوصات المتطورة والاجهزة الحديثة وغالبا ما يختص هذا القسم بفحوصات البحوث والدراسات (فحوصات خاصة)

او يتم تقسيم المختبرات البيئية الى

١- قسم الفحوصات الروتينية

٢- قسم الفحوصات المتقدمة او البحثية.

١-٣ شروط الصحة والسلامة للعاملين داخل المختبر :

على العاملين داخل المختبرات الاهتمام بشروط السلامة الكيمياوية في التعامل مع المواد الكيمياوية والمختبرية وذلك لتجنب التعرض الى الجروح والمخاطر الصحية التي تؤدي احيانا الى الوفاة ،و أيضا لتجنب تعريض المواد المختبرية والاجهزة الى التلف او الكسر .

تصنف المخاطر التي يتعرض لها العاملون في المختبرات الى:

١- مخاطر كيميائية : وهي المخاطر الناشئة من المواد الكيميائية وتفاعلاتها مثل المواد الخطرة ،الغازات، ابخرة الحوامض،.....الخ

٢- مخاطر فيزياوية : وهي المخاطر الناشئة عن بعض العوامل الفيزيائية مثل النار ، الكهرباء ،الاشعاع ، الحرارة ،الضوضاء.....الخ

٣- مخاطر بايولوجية : وهي المخاطر التي تنشأ بسبب وجود بعض الاحياء الخطرة والمسببة لمرض الانسان مثل البكتريا، الفايروسات.....الخ

٤- مخاطر هندسية او معمارية: وتعود هذه الاخطار الى الخطأ الناشئ من تصميم المختبر مثل مساحة عمل ضيقة ، عدم توفير تهوية مناسبة، .....الخ

ان هذه المستويات الاربعة للمخاطر ممكن ان تؤثر مجتمعة على الانسان من خلال

١- الاستنشاق والدخول عن طريق الجهاز التنفسي

٢- التذوق والدخول الى جسم الانسان عن طريق الجهاز الهضمي

٣- التماس مع الجلد .

٤- الحقن داخل الجلد او دخول هذه المواد الخطرة داخل الجسم عن طريق الجروح او الحروق التي تحدثها .

ان وجود نظام للسلامة المهنية داخل المختبرات يؤمن العاملين ويوفر لهم حماية من الاخطار المهددة و يكونوا علاا مستوى اعلى من الحيطة والحذر ومن هذه التعليمات :-

١- وجود أكثر من باب مفتوح للمختبر ومن الخطأ ان يحتوي المختبر الواحد على باب ومدخل واحد.

٢- عدم العمل مفردا داخل المختبر(حيث يجب ان يتواجد اكثر من شخص خلال العمل داخل المختبر)

٣- عند التعامل مع المواد الخطرة وذات التراكيز العالية او المواد المتبخرة او عند التسخين مثلا يتم التسخين داخل الهود المخصص لذلك.

٤- التاكد من عمل الهود وساحبات الهواء بصورة جيدة والتاكد دائما من وجود تهوية كاملة داخل المختبر.

٥- يجب ان تكون الانظمة التي تسيطر على التهوية تعمل بصورة جيدة وخالية من التلكؤ والعطل.

٦- وجود مطافئ للحريق، و في مكان قريب و يسهل الوصول اليها.

٧- عدم الاكل والشرب والتدخين داخل المختبرات.

٨- ان تحوي جميع حافظات المواد الكيميائية والقناني على ملصقات (ليبلات) موضح عليه الاسم الكامل ودرجة الخطورة.

٩- عدم حفظ المواد والاجهزة غير المستعملة داخل المختبر وعدم جعل المختبر بمثابة مخزن.

١٠- الحفاظ على نظافة المختبر.

١١- ان يحتوي كل مختبر على صيدلية ، منظومة لغسل العين....الخ

كما ان هناك شروط للسلامة الفردية للعاملين داخل المختبرات فمثلا المصطلح PPE يشير الى مختصر للكلماتpersonal protective equipment

ويشمل على توفير حماية وسلامة من المواد الكيمياوية وضمان عدم تماسها مع لعين ،الجلد ...الخ ويشمل ايضا توفير بدلة خاصة ،مناظر عملية خاصة توفر حماية للعين و قفازات...الخ مما يكون بمجموعه حماية للجسم بصورة كاملة من جميع المؤثرات الخارجية.

١-٣-١ السلامة الميكروبية في المختبرات البيئية:

١- **المواد الحيوية الخطرة:** هي المواد البيولوجية الخطرة و الميكروبات وتشمل ما يلي:
أ- الميكروبات المسببة للعدوى (البكتريا، والفطريات، والطفيليات، والفيروسات، ... الخ) ، والتي بإمكانها أن تسبب أمراضاً للأفراد الأصحاء ، أو تؤثر على البيئة والزراعة تأثيراً واضحاً .
ب- مزارع (مُستنبتات) الخلايا، والسوائل، والتي تؤدي الى العدوى للعاملين او التلوث للبيئة.
٢- **المواد الخطرة:** ويمكن تقسيم المواد الخطرة بشكل عام إلى:
أ- عوامل فيزيائية (كالإبر، والزجاج).
ب- عوامل كيميائية (كالأحماض، والقلويات).
ت- عوامل بيولوجية (كالعينات ، والمزارع (المستنبتات) الميكروبية)، التي قد تكون ضارة إذا استخدمت أو تم تداولها بطريقة غير ملائمة.

المعدات الوقائية للعاملين في المختبر:

١- **ملابس ومعاطف المختبر**: يجب ارتداء ملابس ومعاطف مختبرية (صدرية) وذلك عند دخول المختبر ويجب خلعها عند مغادرته.
٢- **وقاية الوجه:** تستخدم النظارات الواقية وواقيات الوجه والأقنعة للوقاية من خطر تعرض الوجه المحتمل للذرات والرذاذ المتطاير من مواد خطيرة أو معدية عندما يتعين التعامل مع الميكروبات خارج كابينة الأمان البيولوجي.

٣- **القفازات ذات الاستخدام الأحادي**: يجب إرتدائها لتجنب تعرض الجلد للمسببات الممرضة أو الاوساط الزرعية الملوثة أو الأسطح أو المواد أو الأدوات التي تعرضت لمثل هذه الممرضات ويجب نزع القفازات بعد إنهاء المهام المختبرية أوعند القيام بأي عمل مكتبي.

- يجب إرتداء القفازات عند الحاجة لملامسة المواد الناقلة للعدوى والأسطح أو المعدات الملوثة.
- يتم التخلص من القفازات عندما تتلوث بشكل واضح، ويجب نزعها عند الإنتهاء من العمل بالتعامل مع المواد المعدية أو عندما يحدث ثقب بالقفاز.
- لا يجوز غسل القفازات التي يتم التخلص منها بعد الإستخدام ولا إعادة إستخدامها ولا إستعمالها في ملامسة الأسطح النظيفة (لوحات مفاتيح الكمبيوتر - التليفونات ...إلخ) ولا يسمح بإرتدائها خارج المختبر.
- يجب غسيل اليدين فور نزع القفازات.

١-٣-٢ التخلص من المخلفات

- يتم تعقيم المزارع (المُستنبتات) والعينات الملوثة والمخلفات المعدية في جهاز الموصدة Autoclave بعدها يُمكن التعامل معها كإجراءات الغسل للزجاجيات أو التخلص منها بالنسبة للمواد ذات الإستعمال لمرة واحدة.

- عند الضرورة يمكن تطهير المزارع (المُستنبتات) البكتيرية والعوامل المعدية بإضافة الكلور بنسبة تركيز ٠,٥% وذلك لمدة عشر دقائق قبل التخلص منها نهائياً .

- يمكن التخلص من المخلفات التي تم تعقيمها بالبخار (بجهاز الموصدة Autoclave) مع غيرها من المخلفات العادية.

١-٣-٣ عمليات التطهير والتعقيم

- يجب تطهير أسطح العمل قبل وبعد إجراء الفحوصات وذلك بمادة الكحول الاثيلي بتركيز ٧٠% أو بإستخدام محلول الكلور بتركيز ١كلور:٩ماء مقطر. ويتم ذلك بشكل روتيني فور إنتهاء العمل.

- يجب إستخدام محلول الكلور المخفف عند إنسكاب أي مادة يُحتمل تسببها في العدوى (في حالة إزالة سوائل يُحتمل تسببها في العدوى) وتُترك لمدة ١٠دقائق ثم يتم تنظيفها.

١-٣-٤ أنواع المطهرات المستخدمة في المختبر:

تستخدم المطهرات متوسطة المستوى لتطهير الأسطح في المناطق الخاصة بالمختبر. ومن أمثلة هذه المطهرات: المحلول المبيض المخفف (١كلور:٩ماء مقطر) أو الإيثيل أو كحول الأيسوبروبيل أو الفينول أو اليودوفور والتي تُستخدم لأغراض تطهيرالجوامد (الأسطح الصلبة) والغير مخصصة لتطهير الجلد.

١-٣-٥ نظافة اليدين

١- يجب تعقيم اليدين بمطهر أو كحول قبل نزع القفارات وذلك بعد إتمام إجراء الأنشطة المختبرية. ثم غسل اليدين بالماء والصابون ولفترة لاتقل عن ١٥ثانية.
٢- يجب غسل الأيدي جيداً بالماء والصابون بعد خلع الملابس الوقائية (الصدرية) وقبل مغادرة المختبر.
٣- يجب غسل الأيدي بصورة فورية بعد التلوث بالعينات أو أي أوساط زرعية ملوثة أو غير ملوثة.

١-٣-٦ توصيات وإرشادات عامة للأمان الميكروبي بالمختبر:-

- إرتداء المعطف النظيف Laboratory coat قبل الدخول للمختبر ويجب غلق المعطف.
- يجب التعامل مع جميع العينات كمصادر مُحتملة لنقل العدوى.
- ينبغي إستخدام الماصات الميكانيكية، وليست الماصات عن طريق الفم، لمعالجة جميع السوائل في المختبر.
- يجب تجنب الإجراءات التي ينتج عنها تطاير للرذاذ مثل عمليات إيقاف نشاط البكتيريا عن طريق الموجات الصوتية، وعمليات الخلط، أو الغسيل،.... الخ في المختبرات المفتوحة.
- يجب أن يتم إبلاغ طبيب الأمان فور وقوع أي حوادث أثناء التعامل مع مواد حيوية، وخصوصاً حالات الوخز بالأدوات الحادة أو السوائل المتطايرة على الوجه وكقاعدة، فإن المواضع المصابة لابد أن يتم غسلها جيداً بالماء الجاري.
- يُحظر تناول الطعام أو الشراب أو الإحتفاظ بأي طعام أو شراب في المختبر أوفي أي من المناطق المحددة.

- يجب وضع علامة " خطر بيولوجي " على مدخل المختبر وقت إستخدام العوامل المسببة للأمراض بالإضافة إلى لصق هذه العلامة - إن أمكن - على صواني النقل والثلاجات والمعدات الأخرى المستخدمة في حفظ المواد الحيوية الخطرة.
- عدم جلب الأغراض الشخصية والحقائب النسائية إلى المختبر حرصاً على عدم تلوثها.
- يجب إجراء الفحوصات وتنفيذها بدقة وحرص.
- تنظيف طاولة العمل Bench بالمطهر المناسب قبل وبعد العمل.
- يجب إبلاغ المشرف على المعمل في حال تلوث أو إنسكاب أي مادة أو كسر أي آدوات زجاجية.
- عدم حمل العينات أو المزارع الميكروبية خارج المعمل.
- كتابة جميع البيانات التوضيحية على كل عينة.
- الحرص على نظافة وسلامة الأجهزة والمعدات.
- غسل اليدين جيداً بالماء والصابون قبل مغادرة المعمل.
- يجب التعامل مع جميع المواد الكيميائية بحذر والتعامل معها حسب توصيات الشركة المصنعة.
- عدم لمس العينين أو إستخدام الفم أثناء العمل داخل المختبر.
- كافة أدوات المختبر المُستخدمة من أنابيب وماصات وشرائح توضع في الأواني الخاصة بها لحين تنظيفها.
- تُلقح مزارع الأحياء الدقيقة الخطرة داخل الكابينة الواقية Safety cabinet مع إرتداء القفازات الواقية.
- في حالة إستخدام القفازات الواقية يجب عدم لمس كافة محتويات المختبر لمنع تلوثها.
- العينات والمزارع المُلقحة والقفازات الملوثة المراد التخلص منها توضع في المكان المخصص لذلك حتى يتم تعقيمها والتخلص منها بالطرق الصحيحة.
- الشعر الطويل يجب أن يربط للخلف لتلافي خطر الإحتراق والتلوث.

- تُحرق إبرة التلقيح Loop أو الأبرة الناقلة قبل وبعد الإستعمال.

- المجهر Microscope يجب صيانته والتعامل معه بدقة، ويجب تنظيف العدسات وإزالة آثار زيت العدسات وعدم ترك الشريحة على المجهر وغلق المجهر بعد الإنتهاء من الفحص وتغطيته.

- عدم رمي المواد التالفة والأوساخ في حوض الغسيل.

- الحرص على إطفاء اللهب بعد الإنتهاء من العمل.

- يجب عدم إستخدام الفم أو لمس العينين أثناء العمل داخل المختبر.

- تكتب المعلومات على الأطباق والأنابيب بطريقه مثالية (على الطبق وليس على الغطاء).

- إتباع الأسلوب السليم في التخلص من أي مواد(حيوية أو كيميائية).

- في حال وقوع مزارع ميكروبية حية، إبقى هادئاً وإتبع الآتي:
١- تبليغ مشرف المختبر بأسرع وقت.
٢- ضع منشفة ورقية أو قطعة قطن فوق المادة المسكوبة.
٣- إسكب مادة مطهرة بكمية وافرة فوقها (مادة الكلور).
٤- إرفع المنشفة أو القطن بعد ١٥ دقيقة وضعها في الوعاء المخصص.

.

١-٤ طرق التعبير عن التركيز :

١- المولارية : وهي عدد الاوزان الجزيئية الغرامية من المادة المذابة في لتر من المحلول و يعبر عنها بالصيغة الرياضية :$M= (W1/MW)\times(1000/V)$

W1 = وزن المذاب

MW= الوزن الجزئيئ

V= حجم المحلول

٢- العيارية : وهي عدد المكافئات الغرامية من المذاب في لتر من المحلول و يعبر عنها بالصيغة الرياضية : $N= (W1/Weq.)\times(1000/V)$

W1 = وزن المذاب

Weq. = الوزن المكافئ

V = حجم المحلول

٣- نسبة الوزن الى الحجم : هو وزن المذاب في حجم معين من المحلول مثل غرام \التر او ملغرام \التر (جزء من المليون (ppm)) او جزء من البليون (ppb)

٤- الدالة الاسية : يمكن التعبير عن تركيز مادة بدلالة اللوغارتيم السالب للاساس عشرة لقيمة مولاريتها

$P^X= -\log(x)$

٥- هذه الطرق الشائعة داخل المختبرات كما ان هناك طرق اخرى منها :

أ- التركيز بالنسبة الوزنية او بالنسبة الحجمية.

ب- المولالية

ت- الكسر المولي

ث- الوزن الملي مكافئ meq

وغيرها .

١-٥ المواد والمحاليل القياسية وصفاتها:

المواد القياسية الاولية :

١- سهولة الحصول على المادة القياسية الاولية وسهولة تنقيتها وحفظها وامكانية فحص الشوائب بحساسية معلومة وان لا تتجاوز الكمية الكلية للشوائب الموجودة في المادة القياسية الاولية ٠,٠١%- ٠,٠٢%
٢- ان لا تتغير المادة في الهواء الجوي خلال عملية الوزن كان لا تكون المادة ماصة للرطوبة ولا تتاكسد بالهواء ولا تتاثر بثاني اوكسيد الكاربون كما يجب ان لا يتغير تركيبها اثناء الوزن.
٣- ان تمتلك المادة القياسية الاولية الوزن المكافئ العالي بحيث يمكن اهمال الاخطاء الناجمة عن الوزن .
٤- ان تذوب المادة بسهولة.
٥- ان لا يستخدم حجم صغير جدا (مثلا ٥-١٠مللتر) من محلول قياسي في المعايرة للحصول على الدقة (خطأ نسبي ٠,١%) يجب استعمال محلول قياسي مقداره ٤٠ مللتر.

من الناحية العملية يصبح من الصعب الحصول على مادة قياسية نموذجية تنطبق عليها جميع الظروف والصفات المذكورة اعلاه لكنه من الضروري ان تحيط بمثل هذه الصفات عند اختيار المواد القياسية الاولية .

جدول ١-١ بعض الأمثلة على محاليل قياسية

الحوامض	$KHIO_3$, HCl , C_6H_5COOH , $C_6H_4(COOK)COOH$
القواعد	$Na_2B_4O_7$, MgO , Na_2CO_3
العوامل المؤكسدة	$KBrO_3$, $(NH_4)_2Ce(NO_3)_6$, $K_2Cr_2O_7$
العوامل المختزلة	$K_4Fe(CN)_6$, As_2O_3 , $Na_2C_2O_4$
مواد اخرى	KCl , $NaCl$

١-٦ تحضير المواد الكيميائية

بالنسبة الى تحضير المواد الكيميائية يمكن تقسيم المواد الكيميائية الى مواد سائلة وصلبة ولتحضير كل نوع من هذين النوعين تخضع هذه المواد الى قوانين خاصة بالنسبة الى تراكيزها ويتطلب ذلك وجود ادوات مختبرية معينة.

١-٦-١ تحضير المواد السائلة

تحضر المواد السائلة بطريقة التخفيف ويتضمن ذلك خطوتين اولا معرفة تركيز المادة السائلة داخل القنينة ثم ثانيا معرفة الحجم المطلوب تخفيفه.

غالبا ما تدرج على قناني المواد السائلة الكيميائية (والتي تكون غالبا من الحوامض) النسبة المئوية والوزن النوعي للمادة والوزن الجزيئي فيتم عنئذ من حساب التركيز الرئيسي للمادة الكيميائية السائلة من القانون :

العيارية = (الكثافة النوعية ×النسبة المئوية × ١٠) / الوزن المكافئ

ويتم الحصول على الوزن المكافئ من قسمة الوزن الجزيئي على عدد التأكسد أوعدد ذرات الهيدروجين الحامضية أوعدد الالكترونات المفقودة او المكتسبة.

ومن ثم يتم التخفيف للحصول على التركيز المطلوب بالاستفادة من قانون التخفيف

$N1\ V1 = N2V2$

حيث N1=التركيز الاول (المعلوم)

V1 =الحجم الاول (المعلوم)

N2= التركيز الثاني (المطلوب)

V2 =الحجم الثاني (المطلوب)

١-٦-٢ تحضير المواد الصلبة

لتحضير المواد الصلبة يتم حساب التركيز المطلوب من القانون :

المولارية = عدد المولات \ الحجم (لتر)

عدد المولات = الوزن \الوزن الجزيئي

وسنحصل على وزن المادة المطلوب من ادخال الحجم والتركيز المطلوبان.

ويمكن تحويل المولارية الى العيارية بالقسمة على عدد التكافؤ.

وكذلك يمكن التحضير من قوانين الكسر المولي او نسبة الوزن الى الحجم والخ.

١-٧ الاخطاء الشائعة داخل المختبرات

هناك عدة اسباب يعزى اليها اسباب الخطأ داخل المختبرات منها :

١-الاخطاء الناتجة عن سحب العينة : فهناك اخطاء تظهر عندما لا تكون العينة ممثلة .
٢-اخطاء التخفيف : فكلما كان التخفيف اكثر زادت نسبة الخطأ.
٣-اخطاء ترجع الى المحلل: مثل الاعتماد على النظر في تحديد نقطة نهاية التسحيح (نقطةالتعادل)
٤-اخطاء راجعة الى المواد المستخدمة : مثل استخدام مواد منتهية الصلاحية او هناك خطأ في طريقة احتساب تركيز المادة .
٥-التداخل اللوني: بالنسبة الى الطرق اللونية التي تعتمد على جهاز السبكتروفوتوميتر فان التداخل اللوني لبعض الايونات والفلزات يسبب نسبة من الخطأ .
هذا اضافة الى اسباب اخرى.

١-٨ الدقة في الفحوصات المختبرية

لكل طريقة تحليلية كيميائية او فحص مختبري يمكن حساب ما يسمى بالدقة والانحراف القياسي او كما تسمى باللغة الانكليزية Precision and Accuracy

وتسمى احيانا Precision الانحراف المعياري RSD% او الدقة التحليلية وهي مدى تقارب بين عدد من القراءات المأخوذة لنفس العينة باستعمال نفس الطريقة التحليلية وتحسب كما يلي

$$RPD\ OR\ RSD = [(d1-d2) \times 100]/ [(d1+d2)/2]$$

حيث

d1 = القراءة الاولى

d2 = القرءة الثانية

وتسمى كذلك Accuracy احيانا Recovery% نسبة الاسترجاع وهي مدى التقارب بين القيمة المقاسة لمحلول معروف التركيز والقيمة الحقيقية لنفس المحلول وتحسب كالاتي:

$$R\% = [measured\ value / actual\ value] \times 100$$

ويعود سبب وجود الاخطاء في النتائج لعدة اسباب منها المحلل القائم بالفحص والجهاز المستعمل ونقاوة المادة الكيميائية المستعملة الخ من الامور الشائعة.

الفصل الثاني

الخواص العامة والصفات الفيزيائية

٢-١النمذجة

لكي يكون التحليل المختبري دقيقا يجب ان تكون عملية النمذجة وطريقة نقل النماذج للمختبر صحيحة، لكي يقلل من نسبة الخطا التي من الممكن ان تحدث خلال عملية النقل.

من اهم النقاط التي يجب مراعاتها ان تكون القنينة مغسولة جيدا بالماء ثم بالصابون ثم تنشف جيدا و تجفف، وان يكون حجمها مناسب و مناسبة للفحص المراد تحليله من حيث الحجم او من حيث نوعها فبعض الفحوصات تحتاج الى مواصفات معينة كأن تكون القنينة زجاجية او معتمة، وان يتم جمع النموذج من المياه السطحية من على عمق لا يقل عن ٢٠ سم، وان توجه فوهة القنينة عكس تيار الماء، وان تسجل المعلومات المطلوبة لحظة سحب النموذج مثل درجة الحرارة، الحامضية، التوصيلية... الخ. وفي حالة سحب نموذج من مياه الاسالة او لفحص مياه الخزان فيلزم ان تفتح الحنفية وتترك لفترة كافية للتخلص من كل الماء الموجود في الانابيب لضمان وصول ماء الخزان ونزوله (او مياه الاسالة من المصدر الخارجي)، وفي حالة عدم التمكن من تقدير حجم الماء في الانابيب فتترك الحنفية مفتوحة من ٢-٣ دقيقة. وتقاس العكارة ونسبة الكلورين المتبقي بصورة مباشرة. تنقل القناني الى المختبر بسرعة وبفترة زمنية لا تتجاوز ٦ ساعات، في حاوية خاصة مبردة بدرجة حرارة اقل من ٦°م. يوضح الجدول ٢-١ المتطلبات الأساسية نوع القنينة و الحجم المطلوب لكل نموذج.

جدول ٢-١ يوضح متطلبات قنينة جمع النماذج و الاحجام الدنيا المطلوبة لكل فحص

الفحص	نوع قنينة جمع النموذج	الحجم المطلوب للقياس(مل) كحد ادنى
الاوكسجين المذاب (طريقة الأقطاب وينكلر)	زجاجية، قنينة الخاصة BOD	٣٠٠
الاس الهيدروجيني	زجاجية+ بولي اثيلين	٥٠
فوسفات	زجاجية مغسولة بحامض HNO31:1	١٠٠
كبريتات	زجاجية +بولي اثيلين + فلورو بوليمر	١٠٠
كبريتيد		١٠٠
العكارة		
الحاجة الكيميائية للاوكسجين	زجاجية +بولي اثيلين + فلورو بوليمر	١٠٠
الكلورايد	زجاجية +بولي اثيلين + فلورو بوليمر	٥٠
الفلورايد	بولي اثيلين	١٠٠
العسرة	زجاجية +بولي اثيلين + فلورو بوليمر	١٠٠
نتروجين- الامونيا	زجاجية +بولي اثيلين + فلورو بوليمر	٥٠٠
نترات+ نتريت	زجاجية +بولي اثيلين + فلورو بوليمر	٢٠٠
الدهون و الشحوم	زجاجية	١٠٠٠

و في حالة عدم إمكانية اجراء الفحوصات في اسرع وقت، و مع الاضطرار لحفظ النماذج فايضا هناك متطلبات أخرى لغرض الحفظ قد يتضمن التبريد او التحميض او إضافة قاعدة او أي مادة أخرى ، كما في الجدول٢-٢.

جدول (٢-٢) يوضح المتطلبات الأساسية لحفظ النموذج و المدة المسموحة لحفظ النموذج

الفحص	متطلب حفظ النموذج	الحد الأقصى المسموح به للحفظ	النظامي
الاوكسجين المذاب (طريقة الأقطاب وينكلر)	-	-	-
الاس الهيدروجيني	آني	٠,٢٥ ساعة	٠,٢٥ ساعة
فوسفات	تبريد	٤٨ ساعة	٤٨ ساعة
كبريتات	تبريد	٢٨ يوم	٢٨ يوم
كبريتيد	تبريد، إضافة ٤ قطرات من ٢ نورمال خلات الزنك لكل ١٠٠ مل من النموذج، جعل النموذج قاعدي pH9>9 بواسطة هيدروكسيد الصوديوم	٢٨ يوم	٧ يوم
العكارة	يقرأ في نفس اليوم: يحفظ في مكان مظلم لاكثرمن ٢٤ ساعة، تبريد	٢٤ ساعة	٤٨ ساعة
الحاجة الكيميائية للاوكسجين	الفحص بالسرعة الممكنة، او تحميض بواسطة H2SO4<2 تبريد	٧ يوم	٢٨ يوم

الكلورايد	لايوجد	-	٢٨ يوم
الفلورايد	لايوجد	٢٨ يوم	٢٨ يوم
العسرة	يحمض النموذج pH<2 بواسطة H_2SO_4أوHNO_3 ,	٦ اشهر	٦ اشهر
نتروجين- الامونيا	يحلل فورا اويحمض pH<2 بواسطة , H_2SO_4، تبريد	٧ يوم	٢٨ يوم
نترات+ نتريت	يحلل فورا او يحمض pH<2 بواسطة , H_2SO_4، تبريد	١-٢ يوم	٢٨ يوم
الدهون و الشحوم	يحمض النموذج pH<2 بواسطة H_2SO_4أوHCl ,	٢٨ يوم	٢٨ يوم

يكون التبريد بدرجة ≤ ٦°م او ٤°م.

دقة الفحوصات

تعتمد دقة الفحوصات الواردة في هذا الفصل على نوع الطريقة المتبعة ومبدئيا نختصر لبيان ثلاث معايير مهمة لتطبيقها على دقة الفحوصات:

١- المعايرة: تعتمد بعض الطرق على المعايرة سواء للأجهزة المستخدمة مثل الميزان والفرن او جهاز التوصيلية او معايرة المواد الكيميائية المستخدمة في الفحص.

٢- التكرارية: ويقصد بها إعادة تكرار فحص العينة مرتين على الأقل، ثم يتم حساب نسب الحيود والفرق ما بين القراءتين، وعادة ما يتم خلال العمل الروتيني اختيار عينة وتكرر في العمل كل ٢٠ عينة. يتم حساب الانحراف المعياري و الدقة في التحليل من قراءات التكرارية.

٣- نموذج السيطرة النوعية: عادة ما يكون نموذج السيطرة النوعية هو نموذج معلوم التركيز يرسل للمختبر معظم الأحيان من جهة خارج، ويقاس كنموذج ويرى مدى الحيود في القياس عن القيمة الحقيقية.

ان تطبيق هذه النقاط الثلاث على الفحوصات يكون مطمئنا اكثر للحصول على دقة اعلى للفحوصات.

جدول (٢-٣) يوضح اهم الطرق المعتمدة للفحوصات للوصول الى الدقة

الفحص	التكرارية	نموذج السيطرة النوعية	المعايرة
العكارة	-	×	×
التوصيلية	×	×	×
المواد الصلبة الكلية	×	-	-
المواد الصلبة الذائبة	×	-	-
المواد العالقة	×	-	-
العسرة	×	×	×
الحامضية	×	×	×
القاعدية	×	×	×

اما بالنسبة لفحوصات الايونات الموجبة و السالبة ولمختلف الطرق اللونية و التسحيحية فانه يمكن تطبيق حساب الدقة و التكرارية و الانحراف المعياري و نموذج السيطرة النوعية.

٢-٣ العكارة TURBIDITY

٢-٣-١ مقدمة

الاساس النظري لقياس العكارة يعتمد على تشتت الضوء وانكساره بواسطة المواد الغروية والطينية والعوالق والعضوية وغير العضوية بالإضافة الى الكائنات الحية الموجودة في الماء، ومن الصعب القول ان العكارة تتناسب مع تركيز ووزن هذه الجسيمات لان تشتت الضوء يعتمد ايضا على حجم وشكل هذه الجسيمات.

ويعتبر فحص العكارة أحد المؤشرات المهمة لجودة المياه وخاصة للمياه المستخدمة في صناعة الاغذية والمشروبات اذ يعتبر مقدار نقاوة الماء وصفاءه وخلوه من المواد العالقة سبب مهم للحصول على منتج مقبول.

٢-٣-٢ التداخل

من الممكن ان يحدث التداخل في هذه الطريقة بسبب وجود بعض الجسيمات التي تتكون من المواد التي تمتص الضوء مثل الكربون المنشط. و قد يؤدي تواجد بعض المواد الملونة المذابة في الماء او التي تمتص الضوء ايضا الى تداخل سلبي، كذلك وجود فقاعات الهواء في خلية الفحص او عدم نظافة الخلية او وجود بعض الخدوش يؤدي ايضا الى بعض التداخلات التي تعطي نسبة خطأ وحيود لقيم العكارة.

٢-٣-٣ طريقة الفحص (النفلوميتر)

من اجل الحصول على أفضل نتائج يجب ان تفحص العينة بصورة انية وبسرعة قبل تغير درجة الحرارة او الحامضية pH للعينة الاصلية.

وفي حال اقتضاء الضرورة التأخر في اجراء الفحص يجب ان تبرد الى درجة اقل من ٦°م لتقليل او ضمان عدم التحلل المايكروبايولوجي للمواد الصلبة.

وتعتمد الطريقة على المقارنة لشدة الضوء المنكسر والمشتت مع محلول قياسي من الفورمازين والذي يعتبر كمحلول مرجعي ويصل تركيزه الى ٤٠٠٠ NTU

و تعتمد طريقة النفلومترية على قياس تشتت الضوء بدرجة ٩٠°و يجب ان يكون مدى الحساسية للجهاز لا يزيد ٠,٠٢ NTU و خاصة للعينات التي تكون فيها العكارة اقل من NTU١ , و للتقليل من نسب الخطا و للحد من هذه الاختلافات يراعى في التصميم النقاط التالية:

١) مصدر الضوء-- التنغستن-تعمل بدرجة الحرارة بين ٢٢٠٠ و ٣٠٠٠ K.

٢) المسافة بين مصدر الضوء وخلية قياس الضوء المشتت مرورا بداخل أنبوب العينة لا تتجاوز ١٠ سم.

٣) زاوية قبول الضوء من قبل كاشف ٩٠ درجة. و في حال أن يكون للكاشف نظام التصفية، إذا ما استخدم، ان يكون طيف ذروة الاستجابة بين ٤٠٠ و ٦٠٠ نانومتر.

خلايا القياس للعينة يجب استخدام خلايا عينة أو أنابيب من الزجاج او البلاستك نظيفة وغير مخدشة وغير ملونة و يجب البقاء على نظافة هذه الخلايا نظيفة وبصورة دقيقة، كما يجب الانتباه عند حمل و وضع الخلية بالجهاز الى حملها من الجزء العلوي لتجنب طبع بصمة الاصابع التي ممكن ان تطبع على خلية القياس و تعطي حيود سلبي و يجب ان تغسل الخلية بصورة دائمة وتنظف بالصابون و باستخدام الماء المقطر اللاأيوني و تمسح بقطعة قماش ناعمة خاصة لمنع تخدش الخلية او تجنب مسحها بواسطة كلينكس الذي قد يؤدي الى لصق بعض الخيوط الناعمة على سطح الخلية.

في بعض الاحيان تغلف الخلية بطبقة خفيفة من زيت السيلكيون (ذو معامل انكسار مساوي لمعامل انكسار الزجاج للخلية)للتخلص من التشققات او الخدوش على سطح الخلية لكن استخدام كمية كبيرة من هذا الزيت ممكن ان يسبب ايضا تجمع بعض الاوساخ على سطح الخلية .

٢-٣-٤ قراءة العينة

ترج العينة جيدا ثم تترك حتى تختفي فقاعات الهواء ثم يوضع في حمام الموجات فوق الصوتية ultrasonic bath للتخلص من فقاعات الهواء .

ثم توضع خلية القياس بعد مسحها بقطعة القماش الخاصة بها في الجهاز و تقرا العكارة بصورة مباشرة.

٢-٣-٥ المحاليل القياسية :

غالبا ما تجهز المحاليل القياسية مع كل جهاز مع شهادة المنشا لهذه المحاليل و في حالة عدم وجود المحاليل القياسية فيمكن ان تحضر :

١- محلول أ : يذاب ١ غم من كبريتات الهيرازين $(NH_2)_2_H_2SO_4$ في ماء مقطر

و يكمل الحجم الى ١٠٠ مل في قنينة حجمية.

٢- محلول ب: تذوب ١٠ غم من هكسا مثيلين تترا امين في ١٠٠ مل من ماء التخفيف او الماء المقطر في قنينة حجمية.

٣- يمزج ٥ مل من محلول أ و ٥ مل من محلول ب ويترك لمدة ٢٤ ساعة بدرجة حرارة ٢٥ ± ٣ °م و يكون تركيز المحلول الناتج ٤٠٠٠ NTUويكون مستقر لمدة عام واحد ويحفظ في قنينة معتمة عن الاشعة فوق البنفسجية.

٤- تخفيف هذا المحلول بواسطة ماء التخفيف (المحضر من ماء لا ايوني او مقطر و مرشح جيدا من خلال فلتر ٠,١ µm و ذو عكارة لا تزيد عن ٠,٠٢NTU) الى التراكيز المطلوبة.

جدول (٢-٤) نسب التقريب المقبولة

مدى قياسات العكارة NTU	نسب التقريب المقبولة NTU
١-٠	٠,٠٥
١٠-١	٠,١
٤٠-١٠	١
١٠٠-٤٠	٥
٤٠٠-١٠٠	١٠
١٠٠٠-٤٠٠	٥٠
>١٠٠٠	١٠٠

ان تحديد نسبة الخطأ ومقدار التقريب لا يمكن تحديده في قياس العكارة ومن الممكن للوصول الى اعلى درجة دقة عبر التكرارية.

٢,٢. درجة الحرارة TEMPERTURE

قياس درجة الحرارة للنموذج من القياسات الانية والموقعية وذلك لان درجة حرارة الوسط المائي تتغير مع تغير درجة حرارة الوسط المنقول اليه او ان الماء يأخذ درجة حرارة الهواء للوسط الموجود فيه، لذا فان قراءة درجة حرارة نموذج الماء في المختبر نتيجة غير حقيقية ولا سيما إذا عرفنا ان هناك عدة نتائج كيميائية تعتمد على درجة الحرارة مثل التوصيلية والملوحة salinityوكذلك في ثبات كربونات الكالسيوم المشبعة.

وتقاس درجة الحرارة بعدة طرق منها:

١. المحرار الزئبقي او الكحولي.
٢. كثير من الاجهزة الالكترونية والحقلية يوجد فيها قطب لقياس درجة الحرارة مثل اجهزة pH واجهزة BOD واجهزة قياس التوصيلية.

٢-٥ التوصيلية الكهربائية ELECTRICAL CONDUCTIVITY

تعرف قابلية توصيل الماء للتيار الكهربائي بالتوصيلية، بمعنى ثاني ان التوصيلية تعتمد على تراكيز الايونات الموجودة في المحلول.

والتوصيلية من الفحوصات الانية والموقعية للنموذج لعدة اسباب منها كون التوصيلية تعتمد على درجة الحرارة كما ان التوصيلية تتغير مع تاريخ الخزن للنموذج، وتقاس التوصيلية في المختبر بالطرق الالكترونية والكهربائية وغالبا ما تكون الاجهزة لقياس التوصيلية اما حقلية اومختبرية ثابتة ،كما وتقسم هذه الاجهزة الى نوعين نسبة على اعتمادها على نوعين من القياسات:

١ فبعض الاجهزة تعتمد قياس التيار كوحدة لقياس التوصيلية

٢. وتعتمد النوع الاخر المقاومة كوحدة لقياس التوصيلية

٢-٥-١ علاقة التوصيلية بدرجة الحرارة

ان مقارنة نتائج التوصيلية للماء لنماذج عديدة يعتمد على معادلة جميع هذه النتائج تحت درجة حرارة واحدة، فكما أشرنا الى ان التوصيلية تعتمد على درجة الحرارة.

ان المعامل الموجود من خلال الدراسات لتصحيح درجة الحرارة للتوصيلية هو

[0.019(T-20)+1]

حيث ان التوصيلية تزداد حوالي ١,٩ % مع كل درجة حرارية. ولذا تصحح القراءات المأخوذة الى درجة حرارة موحدة ليتم مقارنتها وتصحح قيم التوصيلية حسب المعادلة

$$\mathbf{E.C= [C_m \times K_c\ ] / [0.019(T-20)+1]}$$

حيث E.C التوصيلية بدرجة حرارة ٢٠°م

C_m التوصيلية المقروءة بالجهاز بوحدات $\mu mhos\ cm^{-1}$

K_c ثابت الخلية ويحسب من قياس التوصيلية لمحلول قياسي ٠,٠١ مولاري من كلوريد البوتاسيوم (ان التوصيلية لهذا المحلول هي ١٢٧,٨ ($\mu mhos\ cm^{-1}$) في درجة حرارة ٢٠°م ويحسب من قسمة التوصيلية الحقيقية على المقاسة

$$\mathbf{K_c = Ct\ /Cm}$$

واذا كانت درجة الحرارة لا تساوي ٢٠°م فيجب ادخال معامل التصحيح لدرجة الحرارة فتكون المعادلة

$$\mathbf{K_c =(\ 127.8\ /Cm)\times[0.019(T-20)+1]}$$

ملاحظة :-

قد تصحح التوصيلية نسبة الى درجة الحرارة ٢٥ درجة مئوي فيصبح معامل التصحيح

$$\mathbf{[0.019(T-25)+1\ ]}$$

٢-٦ المواد الصلبة في الماء

٢-٦-١- المواد الصلبة الكلية (Total Solids) , (Total Residue)

وتشمل بمجموعها جميع المواد الصلبة الذائبة والعالقة .

٢-٦-١-١ طريقة العمل

يؤخذ ٥٠ مل من النموذج ويوضع في بودقة (جفنة)مجففة بدرجة حرارة ما بين (١٠٣-١٠٥) درجة مئوي و موزونة ومثبت وزنها (W1)و يبخر الماء في جفنة التبخير على حمام مائي وحتى تجف ثم تنقل الجفنة إلى الفرن الكهربائي عند درجة حرارة (١٠٣-١٠٨) درجة مئوية لمدة تتراوح ما بين (٤٥-٦٠) دقيقة ثم تنقل الجفنة الى المجفف (DESICCATOR) حتى تبردبعد ذلك توزن الجفنة بعد ان تبرد ويثبت وزنها بـ (W2).

٢-٦-١-٢ الحسابات

$$T.S=[\ (W2-W1)/ml\ of\ sample\ ]\times 1000$$

٢-٦-٢ الاملاح الذائبة الكلية

وتشمل مجموع الاملاح اللاعضوية والايونات السالبة والموجبة وبصورة رئيسية تتكون من (الكالسيوم والمغنيسيوم والصوديوم والبوتاسيوم والكربونات والبيكربونات والكلوريدات والكبريتات والنترات والفوسفات ....) يشير تعبير المواد الصلبة الذائبة في الماء الى الاملاح الذائبة وعلى الاغلب تتكون هذه الاملاح من (الكربونات والبيكربونات والكلوريدات والكبريتات والكالسيوم والمغنيسيوم ومجموع باقي الايونات الموجبة والسالبة مثل النترات والفوسفات .....)والموجودة في الماء. وتعزى اهمية هذه الفحوصات الى انها المؤشر العام والمحدد الرئيسي لصلاحية الماء العامة للشرب اوالغسل او لبقية الاغراض، وبصورة عامة تقل جودة نوعية المياه (من حيث الصلاحية للشرب وباقي الاستعمالات)كلما زادت كمية هذه المواد في الماء والمياه التي تحتوي على كمية عالية من المواد الصلبة الذائبة تكون غير سائغة للشرب.

وعمليا تقاس هذه المواد والاملاح مختبريا بالاستفادة من تقنيات التبخير والتجفيف للنموذج المائي.

٢-٦-٢-١طريقة العمل

وهناك طريقتان لحساب الاملاح الكلية الذائبة

أ-التجفيف بدرجة ١٠٣-١٠٥ درجة مئوية

يرشح حجم معين من نموذج الماء (٥٠-١٠٠) سم٣ من خلال ورقة ترشيح what man 42 أو what man GF/C و ينقل الراشح إلى جفنة تبخير(مغسولة جيدا و مجففة بدرجة حرارة ما بين (١٠٣-١٠٥) درجة مئوي موزونة ومثبت وزنها (W1)) و يبخر الماء في جفنة التبخير على حمام مائي وحتى يجف ثم تنقل الجفنة إلى الفرن الكهربائي عند درجة حرارة (١٠٣-١٠٨) درجة مئوية لمدة تتراوح ما بين (٤٥-٦٠) دقيقة و توضع الجفنة في المجفف (DESICCATOR) و توزن الجفنة بعد ان تبرد ويثبت وزنها بـ (W2)

الحسابات

T.D.S (mg/ L) = [(W2-W1)/ml of sample] ×1000

ب- التجفيف بدرجة ١٨٠ درجة مئوية

يرشح حجم معين من نموذج الماء (٥٠-١٠٠) سم٣ من خلال ورقة ترشيح what man 42 أو what man GF/C و ينقل الراشح إلى جفنة تبخير (مغسولة جيدا و مجففة بدرجة حرارة ١٨٠ درجة مئوي وموزونة ومثبت وزنها (W1) ، توضع على حمام مائي لغاية الجفاف ثم تنقل الجفنة إلى الفرن الكهربائي عند درجة حرارة (١٨٠) درجة مئوية لمدة تتراوح ما بين (٤٥-٦٠) دقيقة ، توضع في المجفف (DESICCATOR) الى ان تبرد ويثبت وزنها بـ (W2)

الحسابات

T.D.S= [(W2-W1)/ml of sample]×1000

٢-٦-٣ العلاقة بين الاملاح الذائبة والتوصيلية

تعتمد التوصيلية للماء على

١-درجة حرارة المحلول .

٢- تركيز الايونات في المحلول .

٣- تكافؤ هذه الايونات .

اي بمعنى اخر هناك علاقة بين التوصيلية و درجة الحرارة وعلاقة اخرى مع تركيز وتكافؤ ايونات المحلول وتشكل هذه الايونات ما نعرفه بـ (الاملاح الذائبة).

ويعبر عن هذه العلاقة بالصيغة الرياضية (بالنسبة الى المياه السطحية ومياه الشرب)

$$E.C=a \times TDS$$

حيث a قيمتها تساوي ١,٢ الى ١,٨(تقل نسبة الثابت للمياه التي تحتوي على كمية عالية من الكبريتات او الكالسيوم عن ١,٢)

ويعبر عن هذه العلاقة بصيغة اخرى هي

$$TDS/\ EC = 0.55\text{-}0.85$$

٢-٦-٤ الاملاح الذائبة الكلية النظرية

يمكن حساب قيمة الاملاح الذائبة بصورة نظرية من المعادلة:

$$TDS_{cal} = (0.6 \times ALKas\ CaCO_3) + Na^+ + K^+ + Ca^{2+} + Mg^{2+} + Cl^- + SO_4^{2-} + SiO_3^{2-} + NO_3^- + F^-$$

جميع الايونات محسوبة بالملغم/لتر.

مع ملاحظة pH المحلول فاذا كانت اعلى من ٥ فتهمل ايون الهيدروجين وأذا كان أقل من ٩ يهمل ايون الهيدروكسيل.

٢-٦-٤ ميزان الايونات

لان الماء متعادل كهربائيا فان مجموع الايونات الموجبة يكون مساويا لمجموع الايونات السالبة لذلك يمكن حساب النسبة المئوية من المعادلة:

$$\% \text{ difference} = 100 \times [(\sum \text{cation} - \sum \text{anion}) / (\sum \text{cation} + \sum \text{anion})]$$

ان نسب الاختلاف المسموحة موضحة بالجدول ٢-٤

جدول (٢-٥) يوضح النسب المئوية المسموحة في ميزان الايونات

∑anion meq/L	acceptabe difference
0-3.0	±0.2 meq/L
3.0-10.0	± 2%
10.0-800	5%

٢-٦-٥ نسبة الاملاح المذابة المقاسة الى النظرية

يجب ان تكون نسبة الاملاح المقاسة مساوية او اعلى بنسبة ٢٠% الى النظرية:

$$1.0 < [TDSmes./ TDScal.]< 1.2$$

٢-٧ المواد العالقة الكلية Total suspend solids

٢-٧-١ الاساسيات

من الفحوصات المهمة التي تدل على درجة تلوث النموذج المائي ، قد تكون المواد العالقة مزيجا من الاطيان والغرين وبعض الاحياء المجهرية مثل البلانكتون و المواد العضوية وغير العضوية .

اساس الطريقة هي اخذ حجم ممزوج جيدا من النموذج ويعتمد هذا الحجم على كمية المواد العالقة الموجودة في النموذج وترشح خلال ورقة الترشيح من نوع – glass fiber filter المثبتة على قمع بخنر ويتم ترشيحها باستخدام مضخة سحب vacuum pump

الفرق بين وزن الورقة وهي نظيفة و وزنها بعد استعمالها للنموذج وتجفيفها بدرجة حرارة ١٠٣-١٠٥ درجة مئوية هي كمية المواد العالقة .وتضرب في 10^6 للحصول على القيمة بتركيز ppm مع الاخذ بنظر الاعتبار حجم النموذج نحصل على كمية المواد العالقة الكلية الموجودة في النموذج.

٢-٧-٢ الكواشف والمستلزمات

١- ورقة ترشيح نوع glass micro fiber filters(watman)
٢- قمع بخنر
٣- مضخة سحب
٤- زجاجة ساعة
٥- دسيكيتر

٢-٧-٣ طريقة العمل

أ- الاولى

يرج النموذج جيدا ثم يؤخذ حجم مناسب (يعتمد على كمية المواد العالقة) ويرشح من خلال ورقة الترشيح (watman) glass micro fiber filters معلومة الوزن (W1)و المثبتة على القمع وباستخدام مضخة السحب وتؤخذ ورقة الترشيح وتوضع على زجاجة ساعة ثم تجفف في الفرن بدرجة حرارة ١٠٣-١٠٥ درجة مئوية لمدة ساعة واحدة وتخرج من الفرن و توضع في المجفف (dececator) ،ثم تبرد جيدا ويؤخذ وزنها (W2).

الحسابات

$$T.S.S=[\ (W2-W1)/ml\ of\ sample\ ]\times 10^6$$

ب- الطريقة الثانية :

وتشمل المواد العالقة غير الذائبة في الماء .

ويمكن تعيينها حسابيا من العلاقة بين T.S &T.D.S

$$TSS=T.S-TDS$$

٢-٨ العسرة HARDNESS

تعرف العسرة انها قياس قدرة الماء على ترسيب الصابون والذي يترسب بصورة رئيسية بواسطة ايونات الكالسيوم والمغنيسيوم الموجودة في الماء وقد تتسبب احيانا ايونات اخرى مثل ايونات الالمنيوم والحديد والمنغنيز والزنك وايونات الهيدروجين في ترسيب الصابون .

وتنقسم العسرة الى عسرة دائمة وعسرة مؤقتة ان املاح كربونات وبيكربونات للكالسيوم والمغنيسيوم تشكل العسرة الكربونية المؤقتة و التي يمكن التخلص منها بتسخين الماء لدرجة الغليان فتترسب (و هي الاملاح المترسبة على جدران القدور و اباريق الشاي) في حين تسبب كبريتات وكلوريدات الكالسيوم والمغنيسيوم العسرة غير الكربونية (العسرة الدائمة) و سميت بالدائمة لانه لا يمكن التخلص منها عند تسخين الماء.

ويعبر عن العسرة المقاسة بالمختبر على شكل كربونات الكالسيوم ، لان العسرة تعتمد على كمية ايونات الكالسيوم والمغنيسيوم الموجودة في الماء وتعتمد هذه الاخيرة على الظروف التي مر بها المصدر المائي.

٢-٨-١ طريقة تعيين العسرة (بالتسحيح)

تعتمد طريقة تعيين العسرة في المختبر على التسحيح مع EDTA (ethylene di amine tetra acetic acid)، حيث يمكن للاخير تكوين معقدات مخلبية Chelated Compound مع الكالسيوم والمغنيسيوم في وسط قاعدي $pH \approx 10$ ، وبوجود دليل مثل الايروكروم بلاك – ت Erichrome Blak T او calmagite او مزيج منهما للكشف عن نقطة نهاية التفاعل.

٢-٨-٢ طريقة العمل

يؤخذ ٥٠ مل من النموذج (او اي حجم اقل ويكمل الحجم الى ٥٠ مل في حالة احتواء الماء على كمية عالية للعسرة مثل مياه الابار) و يضاف ٢ مل من المحلول المنظم Buffer Solution المتكون من هيدروكسيد الامونيوم و ملحها مثل كلوريد الامونيوم واحد املاح EDTA لرفع الاس الهيدروجيني الى [PH=10] ويضاف قليلا من دليل الايروكروم بلاك –ت Erichrome Blak T حتى يكون اللون احمر نبيذي ويسحح هذا المحلول ضد EDTA (ethylene di amine tetra acetic acid) الى ان يتغير اللون الى اللون الازرق (نقطة النهاية).

طريقة تحضير المحلول المنظم

يذاب ١٦,٩ غم من كلوريد الامونيوم في ١٤٣ مل من هيدروكسيد الامونيوم ثم يضاف ١,٢٥ غم من EDTA-Mg وتخفف الى ٢٥٠ مل بالماء المقطر

تحضير محلول الكالسيوم القياسي

يوزن ١ غم من $CaCO_3$ اللامائي ، ويوضع في دورق ايرلماير ٥٠٠ مل و يتم إضافة HCl ١:١ حتى يذوب $CaCO_3$ ، يضاف ٢٠٠ مل ماء مقطر ثم يسخن حتى الغليان لعدة دقائق للتخلص من CO_2، يبرد وتضاق عدة قطرات من دليل METHYL RED و يضبط اللون البرتقالي بإضافة ١:١ HCl او٤ NH_4OH بتركيز $N٤$، ينقل الى قنينة حجمية و يكمل الحجم الى ١ لتربالماء المقطر.

كل ١ مل = ١ ملغم $CaCO_3$

ملاحظة

اذا لم يتوفر EDTA-Mg فيذاب ١,١٧٩ غم من DI Sodium –EDTA و (٠,٧٨٠ غم من $MgCl_2$ او ٠,٦٤٤ غم من $MgCl_2.6H_2O$) في ٥٠ مل من الماء المقطر و تضاف الى ٩ غم من كلوريد الامونيوم في ١٤٣ مل من هيدروكسيد الامونيوم ثم يضاف ١,٢٥ غم من EDTA-Mg وتخفف الى ٢٥٠ مل بالماء المقطر.

تحضير EDTA

يحضر باذابة ٣,٧٢٣ غم من Disodium –EDTA يذاب في الماء ويخفف الى ١ لتر وتتم معايرة المحلول مع CaCO3 من فترة الى اخرى

الحسابات

HARDNESS (EDTA) AS mg $CaCO_3$ /L= [A×B×1000]/mL of sample

A = الحجم EDTA من التسحيح (مل)

B = ملغم $CaCO_3$ المكافئ لمعايرة ا مل EDTA

٢-٨-٣ ملاحظات حول الفحص

١- في حالة التخفيف يضرب الناتج في عدد مرات التخفيف.
٢-التداخل مع هذه الطريقة
نسبة الخطأ قد تتداخل بعض الايونات الفلزية في هذا الفحص وتؤثر على هذه الطريقة وتجعل نقطة النهاية غير واضحة ويمكن التخلص من هذا التداخل باضافة بعض المثبطات INHIBITOR الى النموذج المائي، وتؤثر بعض المركبات العضوية او المواد العالقة التي تؤثر على نقطة النهاية للتفاعل ويمكن السيطرة عليها بواسطة تبخير النموذج المائي الى الجفاف في حمام مائي وتجفيفه في فرن بدرجة ٥٥٠ درجة مئوية الى ان تتاكسد جميع المواد العضوية ثم يذاب الناتج ب (٢٠) مل من حامض الهيدروليك بتركيز ١ نورمالي ويعادل الاس الهيدروجيني الى ٧ التعادل بواسطة هيدروكسيد الصوديوم (١ نورمالي) ثم يكمل الحجم الى ٥٠ مل بالماء المقطر ويبرد المحلول الى درجة حرارة الغرفة وتكمل طريقة العمل كأنه نموذج مائي .
٣-[0.01 M]EDTA=[0.02N]EDTA

٥- يراعى ان لا يستهلك حجم EDTA في التسحيح اكثر من ١٥ مل و عليه يتم اختيار عدد مرات التخفيف.

٦- مراعاة ان لا تتجاوز فترة التسحيح ٥ دقائق من وقت إضافة المحلول المنظم.

٢-٩ القاعدية ALKINITY

القاعدية وهي قابلية الماء على معادلة الحوامض القوية الى رقم هيدروجيني معين و القاعدية مهمة في فحص متغيرات المياه ومياه الصرف الصحي. لأن القاعدية تتحصل من وجود ايونات كل من الكربونات، البيكربونات، و الهيدروكسيد، و تعتبر كمؤشر على تركيزهذه الايونات . قد تشمل القيم المقاسة أيضا وجود كل من البورات، الفوسفات، السيليكات، أو قواعد أخرى إذا كانت موجودة. كذلك القاعدية مهمة في تحديد مدى ملائمة المياه للري. وتستخدم قياسات القاعدية في التفسير و معرفة مدى جودة وكفاءة عمليات معالجة مياه الصرف الصحي.

طرق قياس القاعدية

١-طريقة القطب.(فرق الجهد)

٢- التسحيح مع حامض بوجود دليل .

٢-٩-١ طريقة العمل (التسحيح مع حامض بوجود دليل)

يؤخذ ٥٠مل من النموذج المائي و تضاف اليه بضع قطرات من دليل الفينوفثالين(فاذا ظهر اللون الوردي يسحح النموذج مع حامض الكبريتيك معلوم التركيز الى ان يختفي اللون الوردي ويسجل الحجم اما اذا لم يظهر اللون الوردي يتم اضافة قطرات من المثيل البرتقالي و يكمل التسحيح للنموذج مع حامض الكبريتيك معلوم التركيز الى ان يتحول اللون من البرتقالي الى اللون البرتقالي المحمر ويسجل الحجم

الحسابات

الحجم المأخوذ باستعمال دليل الفينوفثالين يسمى قاعدية الفينوفثالين

الحجم المأخوذ باستعمال دليل المثيل البرتقالي يسمى قاعدية المثيل البرتقالي

$$\mathbf{ALK\ (mg/L)\ as\ CaCO_3 = [\ A \times B \times 50000]\ /\ C}$$

A= حجم الحامض

B= تركيز الحامض

C = حجم النموذج

٢-٩-٢ ملاحظات حول الفحص

١- قاعدية الفينوفثالين تحسب من حجم الحامض اللازم للتعادل بعد اضافة الفينوفثالين (P)

٢- القاعدية الكلية تحسب من الحجم الكلي للحامض المضاف لدليل الفينوفثالين و المثيل البرتقالي .

٣- تتداخل مع هذا الفحص المواد العالقة حيث تؤثر على درجة وضوح نقطة النهاية للتفاعل .

٤- كذلك تتداخل الرغوة والمواد الدهنية مع هذا الفحص.

٢-١٠ الحامضية ACIDITY

حامضية الماء هي قابليته على معادلة القواعد القوية الى رقم هيدروجيني معين .

وقد تاتي حامضية الماء من وجود الاحماض المعدنية او الاحماض الضعيفة مثل حامض الخليك او الكربونيك او من تحلل بعض المركبات مثل الحديد اوكبريتات الالمنيوم.

زيادة حامضية الماء تساهم في التاكل وتؤثر على العمليات البايولوجية .

طرق قياس الحامضية

١-طريقة القطب.(فرق الجهد)

٢- التسحيح مع قاعدة بوجود دليل .

طريقة العمل (التسحيح مع قاعدة بوجود دليل)

يؤخذ ٥٠ مل من النموذج الراكد غير المرشح وتضاف قطرات من دليل الفينوفثالين فاذا ظهر لون وردي فالمحلول قاعدي اما اذا لم يظهر اللون الوردي فالنموذج حامضي فيسحح مع هيدروكسيد الصوديوم (٠,٠٢) N و يكمل التسحيح حتى يظهر اللون الوردي ويسجل حجم القاعدة المستعمل .

الحسابات

$$\textbf{ACIDTY (mg/L) AS } CaCO_3 = [A \times B \times C \times 1000] / D$$

A= حجم القاعدة

B= عيارية القاعدة

C = الوزن المكافئ لكربونات الكالسيوم

D= حجم النموذج المائي مل

٢-١٠-١ ملاحظات حول الفحص

١- في حالة تواجد الكلورين يتم إضافة ثايوسلفات الصوديوم لتخلص من متبقي الكلورين.

٢- تعتمد طرق التسحيح للحامضية على إيصال الاس الهيدروجيني الى ٨,٣

٣- لدقة اكبر يستخدم Electrometric titrator الكهربائي، حيث يجب ان يكون المحلول ذو pH≥4، او يضاف له حامض الكبريتيك (٠,٠٢ نورمال) لجعل الاس الهيدروجيني حامضي ثم يضاف له ٥ قطرات من بيروكسيد الهيدروجين 30%ويغلى لمدة ٢-٥ دقيقة ثم توضع الأقطاب و يسحح ضد القاعدة القياسية حتى pH=8.3، ويتم حساب الحامضية من المعادلة:

Acidity as mg CaCO3/L=[[(A×B)-(C×D)]×50000]/ mL of Sample

A= حجم القاعدة NaOH المستخدمة في التسحيح مل

B= تركيز القاعدة

C= حجم حامض الكبريتيك المستخدم مل

D= تركيز حامض الكبريتيك

الفصل الثالث

التحاليل الكيميائية

التحاليل الكيميائية للماء

يحتوي هذا الفصل على اهم الفحوصات الكيميائية التي تجري على الماء لاختبار صلاحيته وتعيين جودة الماء.

٣-١ الدالة الحامضية pH (دالة الاس الهيدروجيني)

الدالة الحامضية عبارة عن قياس تركيز الهيدروجين الحامضي او هو دالة اسية لقياس تركيز الهيدروجين

ورياضيا فان pH = – لو $[H^+]$ او – لو $[H_3O^+]$

ولذا تكون قيم ال pH ما بين الصفر والاربع عشر كمقياس عام ويكون الرقم سبعة هو الحد الفاصل ما بين الحوامض والقواعد فالمحلول ذي الاس الهيدروجيني اقل من سبعة يعتبر حامضيا والمحلول ذي الاس الهيدروجيني اكثر من سبعة هو قاعدي وتعتبر اول الفحوصات المطلوبة للماء للتشخيص و بيان الصلاحية وتفحص لجميع انواع المياه في البيئة (المياه السطحية ومياه الجوفية ومياه المخلفات للمصانع ومياه الصرف الصحي ...الخ)و على الرغم من ان القيم المسموحة للتعبير عن صلاحية المياه هو ٧ المتعادل وبزيادة او نقصان قليل الا انه يعتبر من المتغيرات المهمة فقد يؤدي تغير الاس الهيدروجيني في وسط مائي الى قتل الكائنات الحية التي تعيش في ذلك الوسط المائي.

وفي التحاليل البيئية للماء تقدرpH حالا وموقعيا للنموذج المائي من المصدر المأخوذ منه ما لم يتعذر هذا الفحص لأسباب منها كون مسار النهر او البحر او البحيرة هائجاً أو ندما تكون الرياح عالية او عند عدم توفر جهاز حقلي لفحص pH الى غيره من الأسباب.

وفي المختبرات غالبا هناك ثلاث طرق لمعرفة pH هي

١. pH indicator paper
٢. liquid colorimetric indicators
٣. electronic meters

ان الطريقة الاولى غير دقيقة في الفحص وتعطي نتائج تقريبية تعتمد على تقدير عين المحلل فقط ولا تعطي الرقم الحقيقي لمقدار pH وفي اغلب الاحيان تكون نتائجها(حامضي او قاعدي) .

وللطريقة الثانية لها مساوئها ايضا فهناك عوامل فيزياوية وكيمياوية متداخلة مع هذه الطريقة وكذلك فان الكواشف (الدلائل) تكون فعالة ضمن حدود معينة للدالة الحامضية وكما مبين في الجدول رقم ١

ان الطريقة الكهربائية لمعرفة PH هي الطريقة المتبعة داخل المختبرات البيئية لقياس الاس الهيدروجيني وهناك نوعين من الاجهزة الالكترونية

١. حقلي
٢. مختبري ويكون ثابتا ويتكون من قطبين قطب من الكالوميل لقياس الاس الهيدروجيني والقطب الاخر لقياس درجة الحرارة . وفي اكثر الحالات المعقدة لهذا النوع من الاجهزة يستعمل لقياس اكثر من دالة في نفس الوقت مثل قياس التوصيلية مع PH مع درجة الحرارة .

ومن الجدير بالذكر من الاشارة الى ان الماء ليس كما يقال ذو pH متعادل كما يعتقد الكثير فعلى الرغم من الاساس النظري القائل ان الماء يحتوي على نسب متكافئة ومتساوية من الايونات السالبة والموجبة فالماء المقطر المحضر مختبريا يكون ذو pH =٦,٥ او ٦,٨ او ٦,٩ في احسن احواله او اقل وذلك بسبب وجود CO_2 في الجو ولكونه غاز سهل الذوبان وكثير الذوبان في الماء فيكون H_2CO_3حامض الكربونيك مع الماء فيكون الماء حامضيا بمجرد تلامسه مع الهواء.فيكون الماء المقاس بالطرق الالكترونية ذو pH حامضي وليس متعادلا كما يعتقده الناس .

٣-١-١ ملاحظات حول الفحص:

١- يتم الحفاظ على القطب باتباع تعليمات الجهاز ولكن غالبا يتم غمره بمحلول مشبع من كلوريد البوتاسيوم، في حالة عدم الاستعمال.

٢- تستخدم ثلاث محاليل قياسية أحدهم حامضي pH=4 ومتعادل pH=7 وقاعدي pH=9 و لاينصح بمعايرة الجهاز باقل من محلولين قياسيين.

٣-٢ الكالسيوم CALCIUM

الرمز الكيميائي للكالسيوم (Ca) ذو عدد ذري ٢٠ و وزن ذري ٤٠,٠٨، عدد التكافؤ٢. يعتبر الكالسيوم من العناصر الضرورية في تغذية النبات و الحيوان وهو عنصر اساسي في تكوين عظام الكائن الحي اذ يؤدي نقصانه في جسم الكائن الحي الى مشاكل في العظام و الاسنان، و يعتبر خامس عنصر من الأكثر وفرة في التربة اذ يتواجد بمعدل ٤,٦% و يتواجد الكالسيوم بصورة رئيسية في الترب الكلسية او خلال طبقات .gypsum, gypsi ferous .Lime stone , dolomite و يتواجد في المصادر المائية من خلال مروره بالطبقات أعلاه او من خلال طرحه من قبل مياه التصريف الصناعي لبعض الصناعات .

يتواجد الكالسيوم بحدود من ١الى ٥٠٠ < في المياه الجوفية او السطحية.

طرق تقدير الكالسيوم

هناك طرق اخرى لتقدير الكالسيوم هي
أ- بواسطة ATOMIC ABSORPTION Method
ب – Permenganat Titration Method

ج- EDTA Titrimetric Method

٣-٢-١ أساس عمل الطريقة التسحيح مع اثيلين داي امين EDTA Titrimetric Method

تعتمد طريقة العمل على قدرة EDTA اثيلين داي امين تتراستك اسسيد على تكوين معقدات مخلبية مع كل من ايون الكالسيوم و المغنيسيوم و في الوسط القاعدي تكون ايونات المغنيسيوم غير حرة اذ تتحول الى هيدروكسيد المغنيسيوم ، فيكون الكالسيوم معقد مع EDTA.

٣-٢-٢ طريقة العمل

يؤخذ ٥٠ مل من النموذج المرشح (او اي حجم ويخفف الى ٥٠ مل) و يضاف ٢ مل من هيدروكسيد الصوديوم (الى ان يصل الى pH≤12) و يضاف دليل الميروكسايد من (٠,٢-٠,١) غم ، حتى يصبح اللون وردي يسحح ضد EDTA حتى يتحول اللون الى اللون البنفسجي (نقطة النهاية)و لكون التفاعل يتم في وسط قاعدي يجب المباشرة في التسحيح فور اضافة هيدروكسيد الصوديوم.

الحسابات

Ca mg/l =(A×B×400.8)/ mL of sample

Calcium hardness as mg as $CaCO_3$/L = (A×B ×1000)/ mL of sample

A=حجم النازل من السحاحة (مل)

B = ملغم $CaCO_3$ المعادل ل١ مل من EDTA عند نقطة نهاية التسحيح مع الكالسيوم

٣-٢-٣ ملاحظات حول الفحص

١- في حالة التخفيف يراعى ضرب الناتج النهائي بعدد مرات التخفيف
٢- توجد بعض التداخلات عند وجود ايونات اخرى في المحلول مثل النحاس والحديد الثنائي والحديد الثلاثي والمنغنيز والرصاص والالمنيوم
٣- من الممكن اذا كانت قاعدية النموذج اعلى من ٣٠٠ ملغم /لتر ان لاتعطي نقطة نهاية واضحة .
٤- ممكن استخدام دلائل أخرى بدلا من الميروكساید مثل Solochrome Dark Blue و الذي يعطي نقطة تعادل واضحة للتغير اللوني من الأحمر الى الأزرق كذلك ممكن استخدام دليل Eriochrome Blue Blak R

٣-٣ المغنيسيوم MAGNESIUM

الرمز الكيميائي للمغنيسيوم Mg عدده الذري ١٢ و وزنه الذري ٢٤,٣، وهوثامن العناصر وفرة في القشرة الأرضية اذ يشكل بحدود ٣% ويتواجد المغنيسيوم في الماء نتيجة مرور الماء خلال بعض الانواع من الصخور مثل dolomite و gypsum والصخور الجيرية وكذلك من مياه التصريف لبعض الصناعات وخاصة تلك التي تستعمل dolomitic lime stone في معادلة المخلفات الحامضية ازائها .
وكما تكون كلوريدات المغنيسيوم (احد اسباب العسرة الدائمية) سبب تاكل انابيب المراجل المستعملة في توليد البخار.
يدخل المغنيسيوم في تركيب كل من الكلوروفيل وخلايا الدم الحمر وقد تكون بعض املاح المغنيسيوم سامة وقد يسبب زيادة المغنيسيوم على من ١٢٥ ملغم / لتر تدرر للبول.
يستخدم المغنيسيوم في السبائك، والألعاب النارية، والتصوير الفوتوغرافي، ، والأسمدة، والمستحضرات الصيدلانية،والأطعمة.

٣-٣-١ طريقة تقدير المغنيسيوم حسابيا

يقدر المغنيسيوم حسابيا من نتائج تقدير العسرة والكالسيوم حيث ان

Mg mg/L = [total hardness (as mg $CaCO_3$/L) – Ca HARNESS

(as mg $CaCO_3$/L) ×0.243

٣-٤ الكلوريد CHLORIDE

الرمز الكيميائي للكلور (Cl) عدده الذري ١٧ ووزنه الذري ٣٥,٤٥، و يتكون ايون الكلوريد من اكتساب Cl_2 لالكترون فيتحول الى Cl^- او عند ذوبان احد مركباته في الماء مثل كلوريد الهيدروجين. لا يمكن ان يتواجد ايون الكلوريد بصورة حرة لذلك فهو مرتبط دائما و مكونا مركبات مع المغنيسيوم او الصوديوم او الكالسيوم أهمها و اشهرها كلوريد الصوديوم و المستخدم في جميع المنازل.

و يعتبر الكلوريد احد اهم الانيونات الموجودة في المياه ، و تتواجد الكلوريدات في معظم المصادر المائية نتيجة ذوبان الصخور الرسوبية والنارية اضافة الى الفضلات الصناعية وخاصة مثل الصناعات الجلدية والنفطية وصناعة المطاط وغيرها .

طرق تقدير الكلوريدات

هناك عدة طرق لقياس الكلوريدات مثل

١- SILVER NITRATE METHOD
٢- MURCURIC NITRATE METHOD
٣- POTENTIOMETRIC METHOD
٤- Automated Ferricyanide Method
٥- Mercuric Thiocyanate Flow Injection Analysis

والطريقة المتبعة غالبا هي الاولى

٣-٤-١ طريقة تقدير الكلوريدات بطريقة التسحيح مع نترات الفضة

تتفاعل نترات الفضة مع الكلوريد في المحلول مكونة راسب ابيض من كلوريد الفضة وفي حالة وجود الدايكرومات فان نترات الفضة تتفاعل مع الداي كرومات بعد انتهاء الكلوريد في المحلول مكونة راسب احمر من Ag_2CrO_4 مشيرا لنهاية الكلوريد في المحلول .

تحضير المحاليل

١-محلول نترات الفضة القياسي

لتحضير لتر واحد من نترات الفضة بتركيز ٠,٠١٤ N يتم باذابة ٢,٣٩٥غرام في الماء ويكمل الحجم الى لتر ويعاير هذا المحلول مع كلوريد الصوديوم بتركيز ٠,٠١٤ نورمالي (عياري)

٢-دليل كرومات البوتاسيوم

يوزن ٥٠ غرام من K_2CrO_4 وتذاب في كمية معينة من الماء المقطر وتضاف اليها بعض قطرات من نترات الفضة حتى يتكون راسب احمر من كرومات الفضة يترك هذا المحلول لمدة ١٢ ساعة ثم يرشح ويكمل الحجم الى لتر واحد .

طريقة عمل (التسحيح ضد نترات الفضة)

يؤخذ ٥٠مل من النموذج المرشح (او اي حجم ويخفف الى ٥٠ مل) و يضاف اليه ١ مل من دليل كرومات البوتاسيوم ثم يسحح مع نترات الفضة فيتحول اللون من اصفر الى وردي مصفر

الحسابات

Cl mg/l =(A×B× C×1000)/ mL of sample

٣-٤-٢ ملاحظات حول الفحص

١-في حالة التخفيف يراعى ضرب الناتج بعدد مرات التخفيف .
٢-يجب ان يكون pH =[7-10] واذا لم يكن كذلك يعادل المحلول بواسطة هيدروكسيد الصوديوم او حامض الكبريتيك.
٣-اذا كان النموذج ملونا فانه يحدث تداخل و تزداد نسبة الخطا فعندها يضاف ٣ مل من عالق $Al(OH)_3$ ويرج جيدا ثم يترك ليركد ثم يرشح
٤-في هذه الطريقة تتداخل ايونات الكبريتيد SO_3^{-2}, $S_2O_3^{3-}$, S^{2-} مع تركيز الكلور ويزال تاثيرها باضافة ١ مل من ٣٠% من H_2O_2

٣-٥ الكبريتيد SULFIDE

يرمز كيميائيا لايون الكبريتيد S^{-2} و يتواجد في المياه الجوفية و المياه المتخلفة عن بعض الصناعات و خاصة النفطية . و يتواجد بصورة طبيعية نتيجة تحلل المواد العضوية و التحلل البكتيري للكبريتات. تركيز H_2S في المياه النظيفة بحدود ٠,٠٢٥-٠,٢٥ مايكروغرام لكل لتر و بزيادة نسبة غاز H_2S تظهر رائحة مميزة وهو غاز سام.

٣-٥-١ طريقة التسحيح مع الثايوسلفات باستخدام الايودين ودليل النشا

تعاني هذه الطريقة بالتداخل مع المواد التي تتفاعل مع اليود مثل الثايوسلفات و الكبريت وبعض المركبات العضوية.

معاملة النموذج

للتخلص من التداخلات يوضع ٤ قطرات (٠,٢مل) من خلات الزنك و قطرتان (٠,١مل) من هيدروكسيد الصوديوم ($N٦$) لكل ١٠٠ مل من النموذج في قنينة زجاجية ، تغلق باحكام دون ترك أي فراغ هوائي او فقاعة ، عادة تستخدم على الأقل قنينة بحجم ٥٠٠ مل لطريقة الايودين.

المواد الكيميائية المستعملة

١- **حامض الهيدروكلوريك HCl** بتركيز N ٦

٢- **محلول ايودين قياسي**

يذاب ٢٠-٢٥ غرام من يوديد البوتاسيوم في قليل من الماء ثم نضيف ٣,٢ غم من اليود بعد ان يذوب اليود يخفف الى ١ لتر و يعاير المحلول ضد ٠,٠٢٥ N من محلول ثايوكبريتات الصوديوم مستعملين محلول النشا كدليل.

٣- **محلول ثايوكبريتات الصوديوم القياسي** ٠,٠٢٥ نورمال ويحضر باذابة ٦,٢٠٥ غم من $NaS_2O_3.5H_2O$ في ماء مقطر مغلي ومبرد ويكمل الى ١ لتر ويضاف له ٥ غم من الكلوروفورم كمادة حافظة.

٤- دليل النشأ

يمزج ٥ غم من النشأ مع الماء البارد المقطر ويضاف هذا المحلول الى ٨٠٠ مل ماء مقطر مغلي ويكمل الحجم الى ١ لتر . ويضاف الى المحلول بضع قطرات من التلوين كمادة حافظة او ١,٢٥ غم من حامض السلسليك.

طريقة العمل

نأخذ ١٠ مل من محلول الايودين و يكمل بالماء المقطر الى ٢٠ مل ثم يضاف له ٢ مل من ٦ نورمالي حامض الهيدروليك HCl و يؤخذ ٢٠٠ مل من النموذج ويضاف له المحلول السابق (اذا بقي اللون اصفر لليود يضاف له دليل النشأ فيصبح ازرق) و يسحح ضد ثايوكبريتات الصوديوم ويتم تغير اللون من الازرق الى عديم اللون عند نقطة النهاية.

الحسابات

كل مل من ٠,٠٢٥ N من محلول الايودين يتفاعل مع ٠,٤ ملغم S^{-2}:

$$S^{-2}\ mg/L = [\ [(A\times B) - (C\times D)]\times 16000]/mL\ of\ sample$$

A= حجم الايودين (مل)

B= عيارية محلول الايودين

C= حجم $Na_2S_2O_3$ (مل)

D= عيارية $Na_2S_2O_3$

٣-٥-٢ ملاحظات حول الفحص

١- في حالة اختفاء اللون الاصفر لليود عند اضافته للنموذج فيضاف له ١٠ مل منه الى النموذج ويكمل التسحيح.

٣-٦ الكبريتات SULFATE

يرمز لجذر الكبريتات SO_4^{-2} و يتواجد في أنواع المياه المختلفة و بتراكيز من قليلة الى عدة الاف من الملغم لكل لتر.

الطرق المتبعة في قياس الكبريتات

١- طريقة وزنية
٢- طريقة ضوئية باستخدام جهاز العكارة

٣-٦-١ الطريقة الوزنية

يتم أخذ ١٠٠ سم^{٣}(مل) من النموذج ويوضع في بيكر وتضاف له ١٠٠ مل من الماء المقطر ثم تضاف عدة قطرات لـه من كاشف المثيل الاحمر ويحمض بواسطة حامض الهيدروليك (١:١) ٢ مل ويسخن المحلولثم يضاف للمحلول ١٠ مل من محلول كلوريد الباريوم ببطئ شديد وقبل الغليان و مع التحريك المستمر وبذلك تترسب الكبريتات على شكل كبريتات الباريوم، يوضع المحلول على حمام مائي لمدة ساعتين لاستكمال عملية الترسيب ثم ترشح باستعمال ورق ترشيح (٤٢ او ٤٤) ويغسل بالماء الساخن الى ان يصبح المحلول خاليا من الكلوريد (يتم التاكد من النخلص من الكلوريد باستخدام محلول نترات الفضة كدليل) و ينقل الراسب مع ورقة الترشيح الى بودقة مغسولة جيدا ومجففة بدرجة حرارة ٨٠٠ درجة مئوية لمدة ساعة واحدة ومبردة جيدا ثم توزن W1 ثم يتم حرق ورقة الترشيح في البودقة على مصباح بنزن الى ان تتحول الى راسب ابيض وتوضع في الفرن بدرجة حرارة ٨٠٠ درجة مئوي لمدة ساعة بعد ذلك تبرد البودقة داخل ديسيكيتر ويثبت وزنها W2

الحسابات

$$SO_4\ mg/L=[(W2-W1)\times 411.5\times 1000]/\ mL\ of\ sample$$

٣-٦-٢ طريقة قياس الكبريتات بقياس العكارة Turbidity metric method

تعتمد الطريقة الضوئية بقياس العكورة على تكوين راسب من كبريتات الباريوم في محيط حامضي ببلورات منتظمة الشكل و يقاس الضوء المشتت من سطح هذه البلورات بواسطة جهاز العكارة turbidimetric و تقاس بوحدة NTU و يكون ترسيب كبريتات الباريوم بوجود محلول مكيف conditioner و هناك نوعين من طرق عمل هذا المكيف هي

الاولى منهما على محلول مكيف من حامض الهيدروكلوريك و الايثانول والكليسيرول بينما تعتمد

الثانية على محلول المكيف الحاوي على حامض الخليك الثلجي و ملحه

التداخلات في هذه الطريقة

يمكن ان تتداخل المواد العالقة او النموذج الملون مع قراءة الجهاز و تؤثر بصورة كبيرة على النتائج و يمكن التخلص من هذا التداخل من ترشيح النموذج و ازالة اللون بواسطة charcoal الفحم المنشط

وكذلك ممكن ان تتداخل المواد العضوية اذا تواجدت بكمية كبيرة في المياه بحيث تمنع ترسب كبريتات الباريوم بصورة جيدة.

٣-٦-٢-١ طريقة قياس الكبريتات باستخدام العكارة Turbidity metric method (طريقة١)

١- الكواشف و المواد الكيميائية المستعملة

الكاشف ويتكون من المواد الكيميائية التالية

١-كلوريد المغنيسيوم Magnesium chloride $MgCl_2.3\ H_2O$

٢-خلات الصوديوم Sodium acetate $CH_3COONa.3H_2O$

٣-نترات البوتاسيوم Potassium nitrate KNO_3

٤-حامض الخليك الثلجي Acetic acid CH_3COOH

٢-كلوريد الباريوم Barium Chloride $BaCl_2$

تحضير المكيف

يؤخذ ٣٠ غم من كلوريد المغنيسيوم و ٥ غم من خلات الصوديوم و ١ غم من نترات البوتاسيوم و ٢٠ مل من حامض الخليك الثلجي وتذاب جميعها مع ٥٠٠ مل ماء مقطر على محرك مغناطيسي وتكمل الى ١ لتر.

طريقة العمل

يؤخذ ١٠٠ مل من النموذج او حجم مخفف الى ١٠٠ مل (مثلا ١٠ مل يخفف الى ١٠٠ مل) و يضاف ٢٠ مل من المحلول المكيف و يمزج بوضعه على المحرك المغناطيسي وبسرعة ثابتة ويتم اضافة تقريبا ٠,١ غم من كلوريد الباريوم خلال التحريك و يحسب من بعد اضافة كلوريد الباريوم دقيقة واحدة مع استمرار التحريك بسرعة ثابتةو بعد انتهاء الدقيقة يوضع النموذج في خلية القراءة ويوضع في الجهاز و توضع الخلية في الجهاز و تترك حوالي ٥ دقائق قبل القراءة ثم تؤخذ القراءة من الجهاز وتسقط على المخطط البياني المرسوم مسبقا و تؤخذ التركيز مع ملاحظة الاخذ بعين الاعتبار عدد مرات التخفيف في حساب تركيز الكبريتات

تم تحضير المحاليل القياسية للكبريتات ذات تراكيز،5,10,15,20,15,30,35 جزء بالمليون ومن معاملة كل نموذج بطريقة العمل المذكورة اعلاه ومن قرائتها بجهاز قياس العكورة كانت النتائج.

٣-٦-٢-٢ طريقة قياس الكبريتات باستخدام جهاز العكارة Turbidity metric method (طريقة٢)

أولا. المحلول المكيف : يحضر بمزج 50 ml من الكليسيرول مع محلول يحتوي 30 ml من حامض الهيدروكلوريك المركز و 300 ml الماء المقطر و100 ml ايثانول% 95 أو كحول ايزوبروبيلي و75 gm من كلوريد الصوديوم.

ثانيا. بلورات كلوريد الباريوم $BaCl_2$ حوالي 20-30 mesh

(طريقة العمل)Turbidity metric method

يؤخذ 10 ml من النموذج المرشح أو أي حجم آخر ويكمل إلى 100 ml حسب تركيز ايون الكبريتات في المحلول و يضاف له 5 ml من المحلول المكيف ثم تضاف له بلورات كلوريد الباريوم و يرج لمدة دقيقة على جهاز الرج المغناطيسي وبسرعة ثابتة ويوضع عشرة مل من المحلول في خلية القياس لجهاز العكورة، تؤخذ القراءات وتسقط على منحني القياسي المرسوم مسبقا، يتم حساب التركيز بعد الأخذ بنظر الاعتبار عدد مرات التخفيف.

٣-٧ الفوسفات PHOSPHATE

يتواجد الفوسفات في الطبيعة باربع صيغ هي :- $H_3PO_4^-$، $H_2PO_4^{-2}$، HPO_4^{-2} ، PO_4^{3-}

وتعتمد الصيغة الايونية للفوسفات على تركيز ايون الهيدروجين ودرجة الحرارة .

الطرق المختبرية الشائعة

١- Vonado Molybdo Phosphoric Acid

٢- Stannous Chloride Method

٣- Ascorbic Acid Method

٣-٧-١ طريقة Vonado Molybdo Phosphoric Acid

وهي طريقة لونية وتقاس بجهاز السبكترو فوتوميتر

المواد الكيميائية المستعملة

١-محلول قياسي اساسي للفوسفات
يجفف KH_2PO_4 في درجة حرارة ١٠٥ درجة مئوية ثم يوزن ٠,٢١٩٥ غم من KH_2PO_4 ويذاب في لتر من الماء المقطر حيث يكون تركيز الفوسفور فيه ٥٠ جزء بالمليون

٢-حامض الكبريتيك M1.25
يخفف ٧٠ مل من حامض الكبريتيك الى ١ لتر بالماء المقطر

٣-الكاشف الخاص
يوزن ٦ غم من موليبدات الامونيوم و٥,٣ غرام من حامض الاسكوربيك و٠,١٤ غم من Antimony Pot. Tartarate ثم تخلط المواد الثلاث مع بعضها وتطحن جيدا في هاون و

يحضر المحلول الكاشف من الخليط المطحون في ١٠٠ مل من حامض الكبريتيك المحضر أعلاه.

طريقة العمل

يؤخذ ٢٥ مل من النموذج المرشح ويضاف له ٥ مل من الكاشف الخاص بالفحص ويترك لمدة ١٠ دقيقة ثم يقرأ التركيزعلى طول موجي 700nm

الحسابات

يقرأ التركيز من الجهاز مباشرة بوحدات الجزء بالمليون.

٣-٧-٢ ملاحظات حول الفحص

١-اذا تم تخفيف النموذج يتم الاخذ بنظر الاعتبار عدد مرات التخفيف فتضرب بالنتيجة النهائية.

٢- اذا اردنا الحصول على تركيز جذر PO_4^{3-} تحول النتيجة من الجهاز وتضرب النتيجة بـ٣,٠٦

٣-٨ الصوديوم والبوتاسيوم SODIUM & POTASSIUM

ويتم قياسهما بطريقة التحليل باللهب و بواسطة جهاز الانبعاث اللهبي FLAME PHOTOMETER

٣-٨-١ طريقة العمل

يتم تحضير محاليل قياسية (يتم تحضير المحلول القياسي للصوديوم من كلوريد الصوديوم بوزن ٢,٥٤٢ غم ويكمل الى ١ لتر فيكون تركيزه ١٠٠٠ جزء بالمليون ويتم تخفيفه للحصول على بقية التراكيز) و (يتم تحضير المحلول القياسي للبوتاسيوم من كلوريد البوتاسيوم من وزن ١,٩٠٧ غم و يكمل الى ١ لتر فيكون تركيزه ١٠٠٠ جزء بالمليون ويتم تخفيفه للحصول على بقية التراكيز) ومن خلال اتباع التعليمات الخاصة بالجهاز يتم رسم منحني المعايرة القياسيين لكل من الصوديوم و البوتاسيوم .
عند قراءة نموذج الصوديوم او البوتاسيوم يتم اسقاط القراءات على المنحنيين القياسيين لقراءة التركيز.

٣-٩ النتروجين Nitrogen

٣-٩-١ اساسيات

النتروجين او الازوت رمزه الكيميائي N وعدده الذري ٧ ،وهو احد اهم العناصر في الماء و ذلك لكون ان الصيغ التي يتواجد فيها النتروجين عادة هي النترات، النتريت، الامونيا والنتروجين العضوي،جميع صيغ النتروجين هذه وكذلك غاز النتروجين بالامكان تحويلها من صيغة الى اخرى بايوكيميائيا وعلى ذلك فهي تدخل ضمن دورة النتروجين في الطبيعة.

ادناه شرح موجز لصيغ النتروجين مرتبة حسب حالة الاكسدة فيها:

١-**النترات: nitrate :** توجد بكميات قليلة في المياه السطحية ولكنها قد توجد بكميات كبيرة في بعض المياه الجوفية تسبب بعض الاعراض بالنسبة للاطفال الرضع خاصة والمرض الذي تسببه هو methemoglobinemia .النترات تتواجد بكميات قليلة في مياه المجاري حديثة التصريف ولكنها تكون الى حد ٥٠ ملغم /لتر نتروجين –نترات في مياه التصاريف المعالجة بطريقة النترجة البايولوجية biological nitrification.

٢-**النتريت(Nitrite) :** وهو حالة وسطية للنترجين في حالتي اكسدة الامونيا الى نترات واختزال النترات الى امونيا .حالات الاكسدة والاختزال تحدث في محطات معالجة المياه الثقيلة ، شبكات توزيع المياه وفي المياه الطبيعية. النتريت قد تدخل الى مصادر المياه نتيجة لاستعمالها كمادة مانعة للتاكسد في المياه المستعملة في الصناعة.

٣-**الامونيا(Ammonia) :** تتواجد طبيعيا في المياه السطحية والجوفية والمياه الثقيلة (المجاري) و تتواجد بكميات كبيرة في عملية ازالة الامونيا من المركبات العضوية الحاوية على النتروجين وفي عملية التحلل المائي لليوريا. وقد تتواجد طبيعيا من اختزال النترات تحت ظروف اللاهوائية وفي بعض محطات المعالجة تضاف الامونيا في عملية الكلورة لمياه التصاريف الحاوية على الامونيا سوف لن يكون هناك كلور متبقي الى ان تتاكسد كل الامونيا. وجد ان تركيز الامونيا يتراوح بين مايكروغرام /لتر في المياه الاعتيادية الى اكثر من ٥٠ ملغم /لتر في مياه التصاريف.

٤-**النتروجين العضوي**: يشمل المواد الطبيعية كالبروتين والببتايد واليوريا وبعض المواد العضوية المصنعة. تركيز النتروجين العضوي يتراوح من اقل من مايكروغرام/لتر في المياه الاعتيادية الى اكثر من ٢٠ ملغم /لتر في مياه التصاريف،و يمكن تحديده تحليليا بواسطة جهاز كلدال مع الامونيا.
تستعمل في تقدير صيغ النتروجين في نماذج المياه بعض المصطلحات مثل:

كلدال نتروجين =النتروجين العضوي+ نتروجين الامونيا

النتروجين المؤكسد الكلي= نتروجين النترات +نتروجين النتريت

النتروجين الكلي= كل الصيغ المختلفة للنتروجين الموجود في النموذج.

٣-٩-٢ نتروجين الامونيا (NH_3)

اساسيات

يعتبر غاز الامونيا من الغازات المهيجة وذو رائحة حادة خانقة عندما يلامس الحنجرة واللوزتين و بفعل الرطوبة يتحول الى هيدروكسيد الامونيا القاعدي ، يدخل غاز الامونيا في صناعات متعددة مثل (الاسمدة والبلاستك والاصباغ وكغاز التبريد) و يوجد طبيعيا في المياه السطحية والجوفية والثقيلة ويتواجد بكميات كبيرة في عملية ازالة الامونيا من المركبات العضوية الحاوية على النتروجين وفي عملية التحلل المائي باليوريا وقد تتواجد طبيعيا من اختزال النترات تحت الظروف اللاهوائية وفي بعض محطات المعالجة.

طريقة الفحص

١- طريقة نسلر
٢- طريقة فينيت Phenate
٣- طريقة التسحيح.

٣-٩-٢-١ طريقة نسلر:

حساسة في حدود ٢٠مايكروغرام/لتر نتروجين – امونيا وتستعمل لغاية ٥ ملغم/لتر. تؤثر على دقة هذه الطريقة الرواسب، اللون، العكارة الناتجة عن ايون الهيدروكسيل وكذلك في حالة تداخل المغنيسيوم والكالسيوم تزال بواسطة التقطير قبل استخدام نسلر او يمكن ازالتها بكفاءة اقل بواسطة الترسيب بواسطة كبريتات الزنك في محيط قاعدي.

طريقة Phenate حساسة لغاية ١٠ مايكروغرام /لتر امونيا –نتروجين ولغاية ٥٠٠ مايكروغرام /لتر.

النماذج الملونة والمتعكرة والتي قاعديتها تزيد عن ٥٠٠ ملغم /لتر تستخدم طريقة التقطير في تحضير النموذج قبل اتباع هذه الطريقة.

التقطير ثم التسحيح بالامكان استخدامها في حالات النماذج الحاوية على اكثر من ٥ ملغم /لتر امونيا-نتروجين

بالامكان ايضا تقدير كمية الامونيا باستخدام الاقطاب الالكترودات

تحضير النماذج

يمكن تحضير النموذج للفحص باحدى الطريقتين:

اولا: طريقة مباشرة: لا يحتاج الى تحضير النموذج للفحص وتستخدم للتراكيز الواطئة وهي عادة مياه الشرب والمياه السطحية النظيفة ومياه التصاريف التي تم معالجتها بكفاءة عالية.

ثانيا : طريقة التقطير : للتراكيز العالية والنماذج الحاوية على متداخلات.

يحدد اختيار الطريقة المباشرة او طريقة التقطير عاملان مهمان هما:

١- تركيز الامونيا في النموذج
٢- وجود المتداخلات.

الاجهزة المطلوبة :

١- kejldhal apparatus
٢- spectrophotometer

المواد و المحاليل

أ- **محلول نسلر:** يذاب ٥٠ غم من HgI2 و ٧٠ غم من KI في كمية قليلة من الماء يضاف هذا المحلول ببطئ مع المزج الى محلول مبرد من ١٦٠ غم (NaOH) في ٥٠٠ مل ماء ثم يخفف المحلول الى ١ لتر . يحفظ المحلول في قنينة ذات سداد محكم مع عدم تعريضه لضوء الشمس .بالامكان بقاء هذا المحلول صالح للاستخدام لمدة سنة فيما لو حفظ في ظروف ملائمة.

ب- **محلول قياس الامونيا :**يحضر باذابة ٣,٨١٩ غم من Anhydrous) (NH_4CL) (مجفف في ١٠٠ درجة مئوية) ويكمل الحجم الى ١ لتر.

ت- **Borate buffer sol.:** يحضر باضافة ٨٨ مل من (NaOH 0.1N) الى ٥٠٠ مل من Sodium Tetra Borate $Na_2B_4O_7$ بتركيز 0.025M والذي يحضر باذابة ٥ غم من $Na_2B_4O_7$ او 9.5غم من ($Na_2B_4O_7.10H_2O$) ويخفف الى ١ لتر بالماء المقطر.

ث- **Boric acid:** يحضر باذابة ٢٠غم من H_3BO_3 في ١ لتر ماء مقطر.

ج- **NaOH (6 N):** يحضر باذابة ٢٤٠ غم من NaOH في ١ لتر ماء مقطر.

ح- **H_2SO_4 (1N):**

طريقة العمل:

يؤخذ ٢٥٠ مل من النموذج غير المرشح وتضاف له ٢٥ مل من محلول BORATE BUFFERو تثبت حامضية المحلول عند PH=9.2 باضافة حامض الكبريتيك اذا كان قاعدي او هيدروكسيد الصوديوم اذا كان حامضي ثم يوضع النموذج في دورق يحتوي على حجر الغليان لغرض التقطير (بواسطة جهاز كلدال)، يجمع النموذج المتقطر في بيكر يحوي على ٢٥ مل من حامض البوريك بحيث يكون الحجم النهائي للتقطير مع الحامض ١٥٠ مل ويكمل الحجم الى ٢٥٠ مل بالماء المقطر ويمزج جيدا. يؤخذ ٥٠ مل او اي حجم مخفف الى ٥٠ مل من المحلول الاخير وتضاف له ٢ مل من محلول نسلرثم تقرأ التراكيز بعد مرور ١٠

دقـــائق علـــى اضـــافة نســـلر وظهـــور اللـــون الاصـــفر علـــى جهـــاز SPECTROPHOTOMETERعلى الطول الموجي 425 nm
ملاحظة :يحضر بلانك (٥٠ مل ماء مقطر وتضاف له ٢ مل محلول نسلر)

الحسابات

NH_3 ppm= reading from spectro.× F × Dillution

F=1.22

٣-٩-٣ نيتروجين النترات

الطرق المعتمدة لقياس تركيز النترات

١-ULTRAVIOLET METHOD
٢-NITRATE ELECTRODE METHOD
٣- CADMIUM REDUCTION METHOD
٤-BRUCINE METHOD

(التقدير بالاشعة فوق البنفسجية) يجري قياس امتصاص النموذج على طول موجي 220 NM ولكون المواد العضوية الذائبة ربما تعطي امتصاص على نفس الطول الموجي ولكون النترات ليس لها امتصاص على الطول الموجي 275 NM فبالامكان اجراء قياس ثاني على الطول الموجي 275 nm لتصحيح قيمة النترات،التصحيح يعتمد على طبيعة النموذج والمواد العضوية الموجودة فيه لذلك هو متغير من نموذج لاخر، ويجري ترشيح النموذج لازالة التداخلات من المواد العالقة.

اضافة الى حامض الهيدروكلوريك لمنع تداخل ايون الهيدروكسيد والكاربونات الموجودة في النموذج الى حد تركيز ١٠٠٠ ملغم /لتر على شكل كاربونات الكالسيوم، الكلوريدات ليس لها تاثير على القياس.

الاجهزة

١-جهاز spectrophotometer ذو اطوال موجية فوق البنفسجية 220nm,275 nm
٢-خلية ضوئية من السيليكا

الكواشف

اولا:محلول قياسي للنترات: يحضر باذابة ٠,٧٢١٨ غم من anhydrous potassium nitrate ويخفف الحجم الى ١ لتر(تركيز النتروجين في هذا المحلول هو ١٠٠ جزء بالمليون.).

يخفف ١٠٠ مل من المحلول القياسي الى ١ لتر فيكون محتوى المحلول الجديد ١٠ جزء بالمليون نتروجين او ٤٤,٣ جزء بالمليون نترات تحضر محاليل قياسية للنترات من المحلول القياسي الاخير بتراكيز (0-350) جزء بالمليون لرسم منحني قياسي.

ثانيا : حامض هيدروكلوريك 1N

طريقة القياس

يتم تحضر محاليل قياسية بتراكيز من 0-350 مايكروغرام نتروجين وذلك بتخفيف الحجوم التالية الى ٥٠ مل بالماء المقطر وهي (0,1,2,4,7.....,35 ml) ويضاف لها ١ مل من 1N (HCl) ثم تقاس الامتصاصية على طول موجي 220nm و يرسم منحني قياسي لهذه التراكيز. يؤخذ ٢٥مل من النماذج المرشحة او أي حجم مخفف الى ٢٥ مل ويضاف لها 1ml من حامض الهيدروكلوريك و يقرأ التركيز له. يتم تحضير بلانك بأخذ ٢٥ مل من الماء المقطر ويضاف له 1 ml حامض الهيدروكلوريك يحضر محلول قياسي بتركيز 2 ppm لتثبيت الجهاز.
تقرأ النماذج بجهاز spectrophotometer على طول موجي 220 nm ثم على طول موجي 275 nm (وهذا الطول الموجي الاخير لازالة التاثير الناتج من امتصاص المواد العضوية الموجودة في النموذج)

الحسابات

ppm Nitrogen =(A -B)×F×dil

F=4.43

A= conc. Of N at 220

B= conc.of organic matter at 275 nm

٣-٩-٣ نتروجين –نيترايت $NITRITE(NO_2)$

اساسيات

يمكن قياس تركيز النترايت استنادا الى تكون مركب احمر اللون من صبغة AZO عند PH=2-2.5 نتيجة اتحاد Diazolized sulfanilic acid مع N-(1-NAPHTHYL)-ETHYLENE DIAMINE DIHYDROCHLORIDE

الاجهزة

جهاز SPECTROPHOTOMETER على طول موجي 540 nm

الكواشف

محلول منظم buffer colour reagent: يحضر باضافة ١٠٥ مل من حامض الهيدروكلوريك المركز الى ٢٥٠ مل ماء مقطر و٥ غم من , sulfanile amide و 0.5 gm من N-(1-NAPHTHYL)-ETHYLENE DIAMINE DIHYDROCHLORIDE يمزج حتى يذوب ويضاف اليه ١٣٦ غم من الصوديوم اسيتيت ويمزج حتى يذوب ويكمل الى ٥٠٠ مل بالماء المقطر ، وهذا المحلول ثابت لعدة اسابيع اذا خزن في مكان مظلم

محلول قياسي للنترايت :يحضر باذابة 0.4926 gmمن صوديوم نترايت اللامائي anhydrous sodium nitrite المجفف ويكمل الى ١ لتر بالماء المقطر ويحفظ باضافة ٢ مل من الكلوروفورم 1ml =0.1 mg
يخفف ١٠ مل من هذا المحلول الى ١ لتر ماء مقطر يحوي هذا المحلول على 0.001 mg nitrogen ويعادل جزء واحد بالمليون.

طريقة العمل

اذا كان pH النموذج اكثر من ١٠ او القاعدية اكثر من ٦٠٠ ملغم /لتر يخفض الاس الهيدروجيني للنموذج الى ٦ بواسطة حامض الهيدروكلوريك المخفف 3:1 ثم يرشح النموذج .

يؤخذ ٢٥ مل ماء مقطر ويضاف له ٢ مل من المحلول المنظم الملون ويعتبر بلانك . يحضر محلول قياسي لتثبيت الجهاز بتركيز 0.5 ppm نتروجين ويضاف له ٢ مل من المحلول المنظم الملون. يؤخذ ٥٠ مل من النموذج المرشح او أي جزء مخفف الى ٥٠ مل ويضاف له ٢ مل من المحلول المنظم الملون وتترك النماذج لمدة ١٥ دقيقة لاظهار اللون ويقاس تركيز النماذج على طول موجي 540 nm بجهاز SPECTROPHOTOMETER

الحسابات

PPM(NO2) =ppm N of sample ×F×dillution

F=3.34

٣-١٠ الفلورايد FLUORIDE

يوجد الفلوريد في التربة والماء والغذاء وفي جسم الانسان وفي ترسبات المعادن (الفلوروسبار)، تواجده في الماء ياتي من تفاعل الماء مع المركبات الحاوية على الفلور. من مصادره الاخرى المياه الجوفية والمياه المصرفة من المصانع الكيمياوية ومصانع الاسمدة والزجاج. أن الفلورين فعال فيزيولوجيا لذا فان تحديد تركيز ايون الفلورين في مياه الشرب من الامور المهمة، كما أن أي نقص عن ٠,٥ ملغم /لتر في مياه الشرب يؤدي الى تسوس الاسنان.

اما اذا كان تركيزه اكثر من ١-١٥ في مياه الشرب ففي هذه الحالة يؤدي الى تسمم بالفلور ولكن درجة التسمم تتناسب طرديا مع تركيزه في الماء ، اي زيادة اخرى له تسبب نخر العظام ثم يؤدي ذلك الى تكسرها .

المياه السطحية تحوي على الفلوريد بتركيز لا يزيد على جزء واحد بالمليون اما المياه الجوفية فقد يصل تركيزه الى ١٥ جزء بالمليون في بعض المناطق ويمكن تقليل نسبته في المياه باستخدام املاح الكالسيوم حيث يترسب على شكل فلوريد الكالسيوم.

طرق قياس الفلوريد

١-طريقة الأقطاب

٢-الطريقة اللونية

٣-١٠-١ الطريقة اللونية

تعتمد الطريقة اللونية على التفاعل بين ايون الفلور وصبغة – zirconyl acid spadn ليكون معقد غير ملون هو 2- ZrF6 والصبغة كلما زاد تركيز الفلور يخف قياس اللون بواسطة جهاز قياس الطيف الضوئي او قياس شدة اللون

الكواشف:-

اولا:محلول قياسي من الفلور يحضر باذابة 0.221 gmمن anhydrous sodium fluoride (NaF) في لتر واحد من الماء المقطر .كل ١ مل من المحلول يحتوي على ١٠٠مايكروغرام من الفلور.

ثانيا:.SPANDNS SOL: يحضر باذابة 0.958gm من الصبغة في ٥٠٠ مل ماء مقطر.

ثالثا: Zirconyl-acid reagent: يحضر باذابة 0.133 gm من – zirconyl chloride Octahydrate($ZrOCl_2.8H_2O$) في حوالي ٢٥ مل ماء مقطر ثم يضاف اليه ٣٥٠ مل من HCL مركز ويخفف الى ٥٠٠ مل ماء مقطر.

رابعا: Acid-zirconyl spanus reagent: يحضر بخلط حجوم متساوية من spandus sol.و zirconyl acid reagent

خامسا: Reference solution

أ – يضاف ١٠ مل .spandus sol الى ١٠٠ مل ماء مقطر

ب- يخفف ٧ مل من HCL مركز الى ١٢ مل ماء مقطر .

يضاف المحلول المحضر في ب الى أ ويستعمل المزيج لتصفير الجهاز .

سادسا: SODIUM ARSENITE SOLUTION : يحضر باذابة ٥ غم من $NaAsO_2$ في لتر واحد ماء مقطر.(يستعمل هذا المحلول لازالة تاثير الكلورين في الماء.).

طريقة العمل:

تحضر تراكيز معلومة من ايون الفلور تتراوح بين (0-1.4) جزء بالمليون بحجم ٢٥ مل وتضاف لكل منها ٥ مل من كاشف acid zirconyl spadus وتقرأ الامتصاصية على طول موجي 570 nm و يتم رسم منحني قياسي Standard curve لتراكيز الفلورالمحضرة. يؤخذ ٥ مل من النموذج المرشح ويضاف له٥ مل من Acid Zirconyl spadus وتقرأ الامتصاصية على طول موجي 570 nm بعد تصفير الجهاز على محلول مقارنة reference

يستخرج تركيز الفلور من اسقاط القراءة على منحني القياس المرسوم أولا.

٣-١١ الالمنيوم ALUMINUM

عنصر واسع الانتشار يستخدم مركبات الالمنيوم على نطاق واسع كمخثرات في معالجة المياه المخصصة للشرب وكثير ما يرجح وجود الالمنيوم بنسبة اكثر من الحدود المسموح بها في مياه الشرب الى كون الالمنيوم هو احد مكونات الشب المستخدم في عملية التصفية في المشاريع.

٣-١١-١ طريقة قياس الالمنيوم

المواد والمحاليل المستخدمة :-

١- **حامض الكبريتيك** ذو عيارية (٠,٠٢)
٢- **حامض الاسكوربيك ascorbic acid** يذوب ٠,١ gm في ١٠٠ مل من الماء المقطر .ويحضر آنيا.
٣- **محلول بفر** ويحضر كما يلي: يذوب ١٣٦ غم من خلات الصوديوم ثلاثية الماء في ٤٠ مل من حامض الخليك (N١) والذي يحضرباضافة ٥٧ مل من حامض الخليك المركز في لتر من الماء المقطر.
٤- **الصبغة القياسية -SOLO CHROM CYANINE-R** تذوب ٠,١ غم من الصبغة في ٥٠ مل من الماء المقطر وتضبط PH ٢,٩ (قد لا نحتاج هذه الخطوة دائما لانه عند التحضير يتبين انه PH=2.9)
٥- **الصبغة العاملة** WORK أخذ ١٠ سم٣ من الصبغة القياسية ويكمل الحجم الى ١٠٠ سم^{٣} بالماء المقطر.
٦- **صبغة المثيل البرتقالي** (كما في القاعدية)
٧- **محلول EDTA** (كما في طريقة ايجاد العسرة)

طريقة العمل

يحضر محلول قياسي للالمنيوم لرسم منحني قياسي ويتم ذلك كالاتي بوزن ٠,٥ غم من معدن الالمنيوم ويذوب في ١٠ مل من حامض الهيدروكلوريك المركز مع التسخين ثم يخفف الى ١ لتر فهذا المحلول تركيزه ١٠٠ ملغم/لتريمكن الاستعانة بمحاليل محضرة جاهزة بتركيز ١٠٠٠جزء بالمليون ليحضر منه ١٠٠جزء بالمليون ثم ١٠ جزء بالمليون ويجري تخفيفها لتحضير التراكيز(٠,٥ الى ٢,٥)ملغم/لتر باستعمال المعادلة N1V1=N2V2
و تضاف الى المحاليل القياسية المحضرة المحاليل من (١-٤) ويحضر BLANK ايضا و تقرأ على طول موجي ٥٣٥ نانو متر
نأخذ ٣ اجزاء من النموذج حال جمعه كل منها بحجم ٢٥ مل :

أولا :يؤخذ الجزء الاول ويسحح مع الحامض لايجاد القاعدية له ويسجل كمية الحامض المستهلك.
١- ثانيا: الجزء الثاني يعتبر BLANK يضاف له ١ مل من (N٠,٠٢) EDTA بالإضافة الى حامض الكبريتيك و حامض الاسكوربيك والصبغة و محلول البفر
ثالثا: الجزء الثالث فيعامل باضافة المواد التالية له :
٢- كمية الحامض التي نحتاجها في القاعدية مع اضافة ١ مل من الحامض كزيادة .
٣- يضاف ١ مل من حامض الاسكوربيك المحضر انيا .
٤- يضاف ١٠مل من محلول البفر المحضر .
٥- يضاف ٥ مل من الصبغة العاملة من -SOLO CHROM CYANINE R-
٦- بعد رسم المنحني البياني تتم قراءة النماذج كما مبين في الخطوات السابقة وتسجيل القراءات لتمثل كمية الالمنيوم في النموذج

٣-١١ الحاجة البايولوجية للاوكسجين

BIOCHEMICAL OXYGEN DEMAND (BOD)

أن BOD هو كمية الاوكسجين اللازمة لاكسدة المواد العضوية اكسدة بايولوجية بواسطة الاحياء المجهرية الموجودة في النموذج.

و يعتبر من الفحوصات المهمة لتقييم نوعية المياه الملوثة و بالاخص مياه الصرف الصحي. النماذج المسحوبة لقياس BOD تجري عليها عدة تغيرات خلال فترة جمع النموذج و خزنه فاذا تاخرت فترة جمعه فان ذلك يؤثر على قيمة DO حيث تكون اقل من الحقيقية وذلك لحدوث تغيرات على المواد العضوية الموجودة بفعل الاحياء المجهرية في النموذج للتقليل من هذا التغيير في قيمة الاوكسجين تحفظ النماذج بدرجة اقل من ٦درجة مئوية على أن يتم الفحص خلال ٦ ساعات من جمع النموذج، و غالبا ما يتم حضن النموذج لمدة ٥ أيام او اكثر او قل حسب طرق العمل المذكورة في الادبيات و طرق العمل القياسية.

وقد تؤثر وتتداخل بعض العوامل مثل وجود مركبات الكبريت العضوية او عدم الخلط بصورة صحيحة على دقة الفحص ولكن ليس هناك قيمة او معامل للتصحيح للحصول على دقة النتائج مقابل هذه التداخلات.

طرق قياس BOD

١- طريقة التسحيح

٢- طريقة الالكترود

٣-١٢-١ طريقة قياس BOD

ان طريقة قياس BOD هي طريقة غير مباشرة لقياس المادة العضوية حيث تعتمد على قياس التغير في قيمة DO بعد فترة حضن لمدة ٥ أيام بدرجة ٢٠± ١ °م في الظلام و هذا التغير ناجم عن الكائنات الحية الدقيقة لانها ناتجة عن تدهور المادة العضوية.وهناك طريقتان لتقدير ال DO هي بطريقة التسحيح او باستخدام الأقطاب.

أ- الاجهزة المستعملة:-

اولا: حاضنة هوائية بمنظم حراري تلقائي لضبط درجة الحرارة بحدود ١±٢٠ درجة مئوية . يجب تجنب الضوء منعا لتكون الاوكسجين الذائب .

ثانيا:قناني حضانة سعة ٢٥٠-٣٠٠ مل (خاصة لفحص BOD) ذات سداد زجاجي مصنفر ويجب تنظيفها بمحلول حامض الكروميك وغسلها بالماء ثم تجفيفها بالارتشاح قبل استعمالها يفضل أن تكون لقناني الحضانة غالق مائي لتجنب تسرب الهواء الى داخل القنينة خلال فترة حضانتها .

ثالثا: سحاحة

رابعا: دوارق خاصة للفحص تحتوي على غطاء محكم.

ب-**الكواشف**:- يحتاج فحص الحاجة البايولوجية للاوكسجين الى المستلزمات التالية:-

ماء مقطر عالي النقاوة.

محلول فوسفات منظم:-

يذاب ٨,٥ غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4 ٢١,٧٥ غم و من فوسفات ثنائية البوتاسيوم احادية الهيدروجين K_2HPO_4 و ٣٣,٤ غم من فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين سباعية الماء $Na_2HPO_4.7H_2O$ و١,٧ غم من كلوريد الامونيوم NH_4Cl في ٥٠٠مل ماء مقطر وتخفف الى ١لتر، يجب أن يكون الرقم الهيدروجيني لهذا المحلول ٧,٢ دون حاجة للضبط، بدلا من ذلك

يمكن ان تذاب ٤٢,٥ غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4 و ١,٧ غم من كلوريد الامونيوم NH_4Cl في ٧٠٠ م من الماء المقطر ثم تعادل ال pH الى ٧,٢ بواسطة ٣٠% من هيدروكسيد الصوديوم، و يكمل الحجم الى ١ لتر.

محلول كبريتات المغنيسيوم : يذاب ٢٢,٥ غم من كبريتات المغنيسيوم سباعية الماء في ماء مقطر $MgSO_4.7H_2O$ ويخفف الى ١ لتر.

محلول كلوريد الكالسيوم :يذاب ٢٧,٥ غم من كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ في ماء مقطر ويخفف الى ١ لتر.

محلول كلوريد الحديديك : يذاب ٠,٢٥ غم من كلوريد الحديديك سداسي الماء $FeCl_3.6H_2O$ في ماء مقطر ويخفف الى ١ لتر.

معادلة النماذج الحامضية او القاعدية : من اجل معاملة مياه الصرف الصحي الحامضية او القاعدية يتم إضافة :

١- **القاعدة** : يذاب ٤٠ غم من هيدروكسيد الصوديوم في الماء المقطر ويكمل الحجم الى ١ لتر.

٢- **الحامض**: يضاف ٢٨ مل من حامض الكبريتيك المركز ببطء و مع التحريك الى مياه الكشف و يكمل الحجم الى ١ لتر.

معادلة حامضية النموذج: يجب ان يكون الاس الهيدروجيني للنموذج مابين ٦و٨و في حال كان النموذج خارج هذه الحدود يتم تثبيت درجة حرارة النموذج الى ٢٠±٣°م ثم يتم اذافة المحلول القاعدي او الحامضي في أعلاه و تضبيط الاس الهيدروجيني على ان لا تزيد كمية الحامض او القاعدة المضافة على ٠,٥% من حجم النموذج الأصلي تجنبا لتخفيف النموذج، مع ملاحظة ان بعض الحالات التي تتطلب فحص المصدر المائي كما هو.

محلـول كبريتيـت الصـوديوم: يـذاب ١,٥٧٥ غـم مـن كبريتيـت الصـوديوم Na_2SO_3في مياه الكاشف عالية النقاوة ويكمل الحجم الى ١ لتر، هذا المحلول غير مستقر لذلك يحضر بصورة يومية.

مثبطـات النترتـة: محلـول Allylthiourea(ATU): يـذوب ٢ غـم مـن Allylthiourea ($C_4H_8N_2S$) في ٥٠٠ مل من ماء الكشف و تكمل الى ١ لتر وهو محلول مستقر لمدة أسبوعين اذا حفظ بدرجة حرارة ≥٦°م بدون تجميد.

محلول كلوريد الامونيوم : يذاب ١,١٥ غم من كلوريد الامونيوم في ٥٠٠ مل ماء الكشف او ماء مقطر تعادل الحامضية الى ٧,٢ بواسطة محلول هيدروكسيد الصوديوم و يكمل الحجم الى ١ لتر، المحلول الناتج يحتوي على ٠,٣ ملغم نتروجين/لتر.

مصدر ماء التخفيف: يمكن استخدام الماء المقطر او ماء عالي النقاوة او ماء الكشف او حتى مياه الحنفية مع التأكد من خلوها من العناصر الثقيلة (وخاصة النحاس)او المواد السمية.

عملية التحضير لماء التخفيف كما يلي: توضع الكمية المطلوبة من الماء المستخدم للتخفيف كما سبق مع التأكد من DO للماء المستخدم لا تقل عن ٧,٥ ملغم/لتر عند ٢٠±٣ °م في قنينة مناسبة ويضاف اليها ١مل من كل من المحاليل :الفوسفات المنظم، كبريتات المغنيسيوم، كلوريد الكالسيوم ، وكلوريد الحديديك الى كل لتر من الماء.

يبذر ماء التخفيف اذا لزم الامر باضافة ١-١٠ مل من رائق ماء المجاري المرسبة الذي مضى عليه ٢٤-٣٦ ساعة الى كل لتر وفي حالة عدم وجود مثل هذا الماء في المختبر يمكن أن تبذر المياه بنقطة من مرق اللاكتوز الذي يعتبر وسط ملائم لنمو مجموعة البكتريا القولونية.

اذا استخدمت مياه النهر لاغراض بذر المياه فيجب اضافة ١٠-٥٠ مل منه الى كل لتر من الماء ويجب استخدام مياه التخفيف المبذورة في نفس يوم تحضيرها ثم تجري

بعد ذلك عملية تهوية مياه التخفيف بواسطة تيار من الهواء المضغوط لكي تشبع بالاوكسجين ويمكن اجراء عملية التشبع بخزن المياه لمدة ٢-٣ ايام في قناني مملوءة جزئيا بالماء ومغلقة بسداد قطني.

٣-١٢-١-١ طريقة التسحيح

تعتمد طريقة التسحيح على اضافة كبريتات المنغنيز الى النموذج ثم اضافة قاعدة قوية فيتكون راسب جوزي هو بعد ذلك يتحرر اليود باضافة حامض الكبريتيك المركز ،أن اليود المتحرر يسحح مع محلول الثايوسلفات باستعمال النشأ كدليل،كمية اليود المتحرر يعادل كمية الاوكسجين الموجود في النموذج.

محلول كبريتات المنغنوز : يذاب ٤٨٠ غم من كبريتات المنغنوز رباعية الماء او ٤٠٠ غم من كبريتات المنغنوز ثنائية الماء او ٣٦٤ غم من كبريتات المنغنوز احادية الماء في ماء مقطر ويرشح ويكمل الى لتر واحد ،يلاحظ ان عند إضافة كبريتات المنغنوز الى محلول محمض من يوديد البوتاسيوم ان لا يعطي لون بوجود دليل النشا.

محلول يوديد-قلوي /ازيد الصوديوم:-

١- للحصول على العينات المشبعة او اقل من المشبعة

تذاب ٥٠٠ غم من هيدروكسيد الصوديوم أو(٧٠٠ غم من هيدروكسيد البوتاسيوم) و١٣٥ غم من يوديد الصوديوم في الماء المقطر ويكمل الحجم الى ١ لتر.

يذاب ١٠ غم من ازيد الصوديوم NaN_3 في ٤٠ مل ثم يضاف الى المحلول السابق مع التحريك المستمر، يلاحظ أيضا انه يجب ان لا يعطي لون عند تحميضه، يمكن استخدام املاح الصوديوم او البوتاسيوم.

٢- للحصول على عينات مفرطة التشبع

تذوب ١٠ غم من ازيد الصوديوم NaN_3 في ٥٠٠ مل من الماء المقطر، يضاف ٤٨٠ غم من هيدروكسيد الصوديوم و ٧٥٠ غم من يوديد الصوديوم NaI و يحرك

الى ان يذوب ، يلاحظ تعكر المحلول بسبب تكون راسب ابيض من كربونات الصوديوم Na_2CO_3 (لا يضر وجود الراسب بالفحص) ويجب التنبيه الى انه لا يمكن تحميض هذا المحلول لانه يحرر حامض الهيدروزويك السام.

حامض الكبريتيك المركز: تركيز هذا الحامض حوالي ٣٦نورمالي وكل ١ مل منه يكافئ حوالي ٣مل من محلول يوديد –القلوي /ازيد الصوديوم.

دليل النشا : يذوب ٢ غرام من النشا القابل للذوبان في المختبر وحامض سالسيليك ٠,٢ غرام في ١٠٠ مل من الماء المقطر الساخن.

محلول ثاني كرومات البوتاسيوم القياسي ٠,٢٥ عياري : يذاب ١,٢٢٦ غم من ثاني كرومات البوتاسيوم السابق تجفيفها لمدة ساعتين عند ١٠٣ درجة مئوية في لتر ماء مقطر.

محلول ثايوكبريتات الصوديوم القياسي ٠,٠٢عياري: يذاب ٦,٢٠٥ غم من ثايوكبريتات الصوديوم خماسية الماء في ماء مقطر سبق غليه وتبريده في نفس اليوم ،اضف ١,٥ مل من ٦ مولاري من هيدروكسيد الصوديوم او ٠,٤ غم و يكمل الحجم الى ١ لتر، و يعاير مع باي ايوداید البوتاسيوم potassium bi-iodate $[KH(IO_3)_2]$

محلول باي ايودات البوتاسيوم القياسي ٠,٠٠٢١مولاري: يذاب ٨١٢,٤ ملغم من $[KH(IO_3)_2]$ و يكمل الحجم الى ١ لتر.

طريقة العمل:

اذا احتوى النموذج على كمية وافية من الكلور المتخلف ٠,١ ملغم /لتر يجب تركها لمدة ١-٢ ساعة او الى ان يتبدد الكلور واذا كان الكلور بكميات كبيرة جدا فيجب معادلتها باضافة الكمية اللازمة من كبريتيت الصوديوم بالضبط في حالة نقص الاوكسجين الذائب في النموذج فيجب تهويته لرفع نسبة الاوكسجين الى حد التشبع وليس اكثر عند ٢٠ درجة مئوية.

تملأ القناني الخاصة ذات سعة ٢٥٠-٣٠٠ مل بالنماذج المراد فحصها قبل الترشيح او اي جزء مخفف الى ٣٠٠ مل ولكل نموذج سواء مخفف او غير مخفف تملأ منه قنينتان، احدهما يجرى عليها فحص DOو الأخرى توضع في الحاضنة لفحص BOD_5 طريقة قياس DO عن طريق التسحيح:

يضاف لها ٢ مل من محلول كبريتات المنغنيز و٢ مل من محلول الازيد القلوي مع الرج لمدة دقيقة لكي تترسب المواد العالقة، يفتح غطاء القنينة ثم يضاف ٢ مل من حامض الكبريتيك المركز خلال عنق القنينة ، يرج عدة مرات حتى يلاحظ ذوبان المواد العالقة تماما، يسحب ٢٠٠ مل من المحلول في دورق مخروطي بسداد محكم ونبدأ بالتسحيح ضد ثايوكبريتات الصوديوم ٠,٠٢٥ نورمالي الى ان يصبح اللون اصفرباهت ،يضاف محلول النشا كدليل ويكمل التسحيح حتى يختفي اللون الازرق .

ان حجم ثايوكبريتات الصوديوم يكافئ كمية الاوكسجين المذاب في ٢٠٠ مل من النموذج ويعبر عنه DO حيث ان كل ١ مل من ثايوكبريتات الصوديوم بتركيز ٠,٠٢٥ مولاري = ١ ملغم اوكسجين مذاب /لتر.

القنينة الاولى للنموذج في الحاضنة تحفظ لمدة خمسة ايام ثم تجرى الاضافات السابقة للقنينة الثانية فمنها يكون حجم ثايوكبريتات الصوديوم مكافئ الى كمية الاوكسجين الذائب بعد مرور خمسة ايام ويعبر عنه DO5

٣-٢-١٢-١-٢ طريقة الاقطاب

أساسيات: تعتمد هذه الطريقة على خاصية التنافذ للأوكسجين من خلال الغشاء المستعمل بالالكترود .

الاجهزة

١-جهاز Dissolved Oxygen Meter
٢- حاضنة هوائية.
٣- قناني BOD سعة ٣٠٠ مل.

الكواشف

يستعمل ماء التخفيف كما في طريقة التسحيح.

طريقة العمل

قبل البدأ بالعمل يجب ضبط pH للنموذج ، فاذا كانت حامضية يتم معادلتها باضافة هيدروكسيد الصوديوم واذا كانت قاعدية فيتم معادلتها باضافة H_2SO_4

تملا قنينتان من قناني الحاضنة سعة ٣٠٠مل بسداد زجاجي تماما وتوضع احداهما في الحاضنة عند ٢٠ درجة مئوية ولمدة خمسة ايام . عند توقع زيادة الاوكسجين زيادة الاوكسجين الحيوي المطلوب على ٥ ملغم /لتر ، فيجب تخفيف النموذج بوضع الحجم المناسب منه(اقل من ٣٠٠ مل) في قنينة الحاضنة ثم تملأ كاملة بماء التخفيف.

تعين كمية الاوكسجين الذائب في احدى القنينتين قبل الحضانة وتعين في الثانية بعد حضانتها لمدة ٥ ايام عند ٢٠ درجة مئوية بالطريقة الواردة فيما بعد.

تجمع النماذج بقناني خاصة بBOD ذات حجم ٣٠٠ مل تملا حتى الفوهة لتفادي ظهور فقاعات هوائية، وتقرا قيمة DO للنماذج بواسطة جهاز DO METER فاذا كانت القراءة اكثر من ٧ ملغم /لتر فعندئذ تاخذ النماذج وتحفظها في الحاضنة Incubator لمدة خمسة ايام دون الحاجة الى تخفيفها ، اما اذا كانت قراءة DO للنماذج اقل من ٦ فتخفف بماء التخفيف المحضر سابقا ، و لمعرفة التخفيف المحتمل يحضر على الأقل ثلاث من التخفيفات و اذا كانت بيانات العينة غير متوفرة او لم يتم فحصها سابقا ممكن ان يكون COD دليل على معرفة التخفيف

المحتمل ومن الممكن استخدام النسب المئوية التالية فيتم تحضير التخفيفات: ٠,٠١ إلى ١,٠٪ للنفايات الصناعية القوية ، ١إلى ٥ ٪ لمياه الصرف الصحي الخام والمستقرة ، من ٥ إلى ٢٥ ٪ النفايات السائلة المعالجة للصناعات العضوية، و ٢٥ إلى ١٠٠٪ لمياه الأنهار الملوثة، كما يلاحظ اجراء عدد من التكرارات، تقرأ قيمة DO للنماذج مرة ثانية بعد تخفيفها .
تحفظ النماذج في الحاضنة لمدة ٥ أيام،تقرأ قيمة الاوكسجين المستهلك بعد ٥ ايام وهذه هي قيمة DO5

الحسابات

أولا: اذا كانت الاوكسجين المستنفذ لا يقل عن ٢ ملغم/ لتر و ان DO بعد فترة الحضن لا تقل عن ١ ملغم / لتر

$$\mathbf{BOD= [(D1-D2)- (S)V_S]\times P}$$

D1= قراءة ال DO الانية

D2= قراءة ال DO بعد فترة حضن ٥ أيام بدرجة حرارة ٢٠±١°م

S= كمية الاوكسجين المستنفذ للماء التبذير/مل

V_S= حجم ماء التبذير المضاف بالمل

P= نسبة التخفيف

ثانيا : اذا كان النموذج غير مخفف باستثناء إضافة التبذير (البذور) و كان الاوكسجين المستنفذ اقل من ٢ ملغم/ لتر يؤذخ الاوكسجين المستنفذ مباشرة كقراءة BOD.

ثالثا : اذا كانت كل قناني التخفيف تقرأ DOالمتبقي اقل من ١ ملغم/ لتر، تؤخذ قراءة القنينة الأعلى DO وعادة هي الأكثر تخفيفاَ وتحسب من المعادلة:

$$\mathbf{BOD\ mg/L > [(D1-D2)- (S)V_S]\times P}$$

رابعا : اذا كانت كل قراءات الاوكسجين المستنفذ للنماذج المخففة اقل من ٢ ملغم/ لتر تؤخذ قراءة النموذج الأقل تخفيفا و يحسب الBOD من المعادلة:

$$BOD\ mg/L < [(D1-D2)- (S)V_S]\times P$$

٣-١٣ الحاجة الكيمياوية للأوكسجين

CHEMICAL OXYGEN DEMAND (COD)

اساسيات:

يعرف COD بكمية الاوكسجين اللازمة لأكسدة المواد العضوية اكسدة كيميائية باستعمال عامل مؤكسد مثل دايكرومات البوتاسيوم بمحيط حامضي وهي طريقة صالحة لكافة انواع المياه مثل مياه الانهار والمياه الصناعية والبشرية والطريقة المتبعة في المختبر وهي طريقة الاكسدة بالدايكرومات حيث يعتبر عامل مؤكسد قوي وله القابلية على اكسدة معظم المواد العضوية.

٣-١٣-١ طريقة الفحص (الطريقة اللونية)

Closed reflux colorimetric method

اساسيات :

تعتمد هذه الطريقة على اكسدة المواد العضوية الموجودة في مياه الشرب الصناعية بواسطة عامل مؤكسد قوي هو ايون الدايكرومات وتعتمد هذه الطريقة على الهضم ومن ثم قراءة على جهاز المطياف الضوئي

الاجهزة

أ- خلايا امتصاص ذات نوعية مثالية .
ب- جهاز المطياف الضوئي. وتكون القراءة على 420nm او 600nm .

الكواشف

أ- **محلول الهضم (المدى العالي) :**يضاف ٥٠٠ مل من الماء المقطر الى ١٠,٢١٦ غم من دايكرومات البوتاسيوم $K_2Cr_2O_7$ مجففة الى ١٥٠ درجة مئوية لمدة ساعتين ثم يضاف١٦٧ مل من حامض الكبريتيك المركز H_2SO_4 و يوزن 33.3 غم من $HgSO_4$ حيث يذوب المحلول ويبرد الى درجة حرارة الغرفة ويخفف الى ١٠٠٠ مل.

ب- **محلول الهضم (المدى الواطئ):** يكون التحضير نفسه في الفقرة السابقة ولكن يستعمل فقط ١,٠٢٢ غم من مادة دايكرومات البوتاسيوم.

ت- **كاشف حامض الكبريتيك:** يضاف كبريتات الفضة كرستالات او باودر الى حامض الكبريتيك المركز بنسبة Ag_2SO_4 / Kg H_2SO_4 (5.5gm) وتترك من يوم الى يومين عند التحضير تخلط وتمزج جيدا.

ث- **محلول قياسي من مادة بوتاسيوم هيدروجين فثاليت:** تطحن وتجفف الى وزن ثابت في ١١٠ درجة مئوية حيث يذوب وزن ٤٢٥ ملغم في ماء مقطر ويخفف الى لتر وهذه تعادل 500 µg O_2 /L

ت- **حامض السلفامك sulfamic acid**: و يستخدم للتخلص من تداخل ايون النتريت NO2 حيث يضاف ١٠ ملغم من حامض السلفامك لكل غم من نتروجين النتريت الموجود في النموذج، مع ملاحظة عند إضافة الحامض للنموذج يضاف أيضا الى البلانك.

التعامل مع النماذج

يتم قياس حجم ثابت من النموذج والكواشف في انابيب او خلايا خاصة حيث يتم التحضير والهضم وتبريد النماذج والبلانك وواحد او أكثر من المحاليل القياسية المرجعية فاذا كانت السيطرة الحجمية صعبة يتم نقل النموذج المهضوم ويخفف الى حجم معلوم ثم يقرأ

تحضير منحني المعايرة

تحضر على الاقل ٥ محاليل قياسية من مادة البوتاسيوم هيدروجين فثاليت مع استعمال نفس حجوم الكواشف والانابيب او الخلايا ونفس طريقة الهضم للنماذج.

طريقة الهضم

تغسل انابيب الهضم مع السدادات في ٢٠% حامض كبريتيك قبل الاستعمال لتجنب حدوث أي تلوث ثم تؤخذ الحجوم المعلومة من الكواشف والنماذج يوضع النموذج في انبوب الهضم او الانبوبة الخاصة ويضاف اليه محلول الهضم وكاشف محلول حامض الكبريتيك مع الحذر عند اضافة الاخير داخل الانبوبة ثم تقفل السدادات وتخلط المحتويات.

ثم توضع الانابيب في جزء الهاضم المغلق الذي حرارته تصل الى ١٥٠±٢°م درجة مئوية ويتم التكثيف المرجعي خلال ساعتين، وتبرد الى درجة حرارة الغرفة و توضع الخلايا او انابيب الزرع في حاملة الانابيب بعض كبريتات الزئبقيك سوف تترسب لكن هذا لايؤثر على التحليل وهكذا تتم القراءة بجهاز مقياس الطيف الضوئي، بالاعتماد على الجدول التالي :

الحجم النهائي	كاشف حامض الكبريتيك /مل	محلول الهضم/ مل	النموذج /مل	قناني الهضم
٧,٥	٣,٥	١,٥	٢,٥	mm١٠٠×١٦
١٥	٧	٣	٥	mm١٥٠×٢٠
٣٠	١٤	٦	١٠	mm١٥٠×٢٥
٧,٥	٣,٥	١,٥	٢,٥	Standard 10 ml ampoules

٣-١٤ الزيوت والشحوم OIL & GREASE

اساسيات

تستخلص الدهون والشحوم بواسطة طريقة الاستخلاص سائل- سائل بواسطة المذيبات العضوية ولذا فان هذا الفحص يمثل بصورة عامة جميع المواد القابلة للذوبان في المذيب العضوي التي تتشابه بخصائصها الفيزيائية و الذوبانية مع الزيوت و الشحوم مثل بعض الاصباغ العضوية او مركبات الكبريت و الكلوروفيل مع ملاحظة ان بعض المواد المستخلصة مثل الدهون والاحماض الدهنية غير المشبعة تتاكسد لذا يجب اخذ الاحتياطات اللازمة عند تبخير المذيبات لتقليل هذه الظاهرة .

ومن اهم ما يجب الانتباه اليه في طريقة استخلاص السائل / سائل هو استرداد المذيب و تبخيره في منظومة مغلقة و اعادة تدويره.

تناولت المصادر و الطبعات المختلفة للطرق القياسية للمياه ومياه الصرف الصحي على استخدام مذيبات عضوية مختلفة في الطريق الوزنية لاستخلاص سائل – سائل مثل اثير البترولیوم للمياه الطبيعية و المعالجة و الهكسان للمياه الملوثة و قد يستخدم trichlorotrifluoroethane تراي كلوروتراي فلورو ايثان و لكنه غير محبذ للاضرار البيئية الناجمة عن استخدام مركبات الكلوروفلوروكربونات .

وقد يستعاض عن استخدام مذيب التراي كلورو فلورو ايثان بمزيج ٨٠% من الهكسان و ٢٠% مثيل رباعي بيوتيل ايثرmethyl-tert-butyl ether

طرق قياس الزيوت و الشحوم

١- PartitionInfra-red method

٢- Soxhlet method

٣- Gravimetric method

و يعتبر فحص الزيوت و الشحوم مؤشر رئيسي لتقييم محطات المعالجة.

جمع العينة: القناني يجب ان تغسل بالماء و الصابون ثم تغسل وتجانس بالماء ثم تجانس بالمذيب للتخلص من اي متبقيات من الزيوت في القنينة و التي من الممكن ان تتداخل في الفحص وتؤدي الى حيود سالب ، غطاء القنينة من الالمنيوم فويل ،ثم توضع في الفرن بدرجة حرارة ٢٠٠ الى ٢٥٠ °م لمدة لاتقل عن ساعة و يراعى ترك فراغ في القنينة عند سحب العينة .

في حالة عدم فحص النموذج بصورة مباشرة و لتخزين النموذج لغاية الفحص يتم تحميض النموذج بواسطة 1:1 HCl او $1:1 H_2SO_4$ الى $pH \leq 2$

٣-١٤-١ الطريقة الوزنية لاستخلاص سائل-سائل

المواد المستعملة والادوات : ١-جفنات ٢-حمام مائي٣-قمع فصل

الكواشف والمواد المستعملة

محلول ١:١ HCL،فريون او هكسان ، SODIUM SULFATE AN HYDROUS

طريقة العمل

يوزن النموذج و يطرح منه وزن القنينة وهي جافة وفارغة W1يحول النموذج من قنينة جمع النماذج الى قمع فصل ثم تغسل القنية بواسطة المذيب و ترج بقوة لاذابة ما يمكن ان يعلق على جدران القنينة الداخلية من مواد عضوية ، يرج قمع الفصل لمدة دقيقتان ثم تترك لتفصل طبقتان (طبقة عضوية للمذيب و الطبقة المائية للنموذج) ثم تعاد الطبقة المائية مع قليل من الطبقة العضوية لقنينة جمع العينة الاصلية ثم تنزل الطبقة العضوية على ورقة ترشيح تحتوي على ١٠ غم من كبريتات الصوديوم اللامائية للتخلص من وجود الطبقة المائية ،وتنقل الطبقة العضوية الى دورق التقطير ، اما اذا لم يمكن الحصول على نقطة واضحة للفصل بين الطبقة العضوية والمائية و كانت بحدود ٥ مل تنقل الى انبوب زجاجي وتوضع في السنترفيوج ويدور بسرعة دوران ٢٤٠٠ دورة / دقيقة ثم تفصل و ترشح على ورقة ترشيح تحتوي على ١٠ غم من كبريتات الصوديوم اللامائية ، تعاد هذه الخطوة مرتين او ثلاثة مع النموذج الاصلي ثم يجمع الطبقة العضوية في دورق التقطير ،يقطر المذيب بدرجة حرارة ٨٥ °م الذي يستعاد في دورق موضوع في حمام ثلجي و وعند الوصول الى انتهاء المذيب بصورة واضحة للعيان ، يتم تمرير فاكيوم هواء من خلال محولة الفاكيوم لتجفيف المتبقي من المذيب يتم حساب وزن المتبقي في قارورة(دورق) التقطيرحيث توزن بعد تبريدها ثم يطرح منها وزن القارورة (الدورق) وهي فارغة.

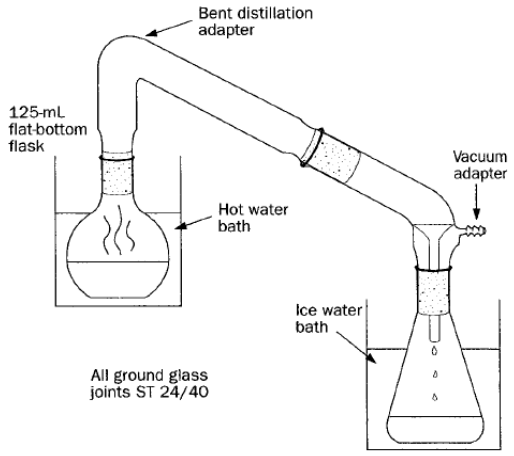


Figure 5520:1. Distillate recovery apparatus.

شكل ٣-١ يوضح المنظومة المغلقة لتقطير المذيب في فحص الزيوت والشحوم

الحسابات

على اعتبار ان الكثافة للنموذج =١

oil & grease mg/L = W/V

w = وزن صافي المتبقي

v=حجم النموذج الاصلي

٣-١٤-٢ ملاحظات حول الفحص

١-في بعض الحالات يكون وجود لبعض المواد الصابونية يسبب عرقلة لفصل الطبقتين العضوية والمائية .فنضيف قليل من كلوريد الصوديوم .

٢-تختلف المواد العضوية المستعملة كمذيبات لاسباب حسب توفرها واسباب اقتصادية الى اخره بعضها يكون ذو كثافة اقل من الماء واخرى اعلى من الماء فتكون تارة الطبقة العضوية الى الاعلى او الاسفل تباعا فيجب الانتباه.الى مكان الطبقة العضوية الى الاعلى او الاسفل .

٣-في بعض الاحيان تهبط قطرة ماء مع الطبقة العضوية يتم التخلص منها بامرار ورقة ترشيح على القطرة لسحبها .

الفصل الرابع

التحاليل البكتريولوجية

٤-١ المعدات المختبرية

مقدمة: المختبر يحتوي على معدات مختبرية ضرورية لإنجاز فحوصاته، وهذه المعدات يجب التأكد من معايرتها والتحقق من أدائها قبل الإستخدام الأول لها، وبعد الإستخدام يتم معايرتها بشكل دوري. ويوثق إجراء صيانة الأجهزة التي ينبغي صيانتها على الأقل سنوياً.

مواصفات المعدات المختبرية:

أ- **الحاضنات Incubators**: تُستخدم حاضنات ذات حجم كافي لمنع الإزدحام الداخلي والحفاظ على درجات حرارة موحدة في جميع الأوقات وفي كل المساحة الداخلية، ويفضل أن تكون مجهزة بموزع هواء داخلي. توضع الحاضنات بدرجة حرارة الغرفة بين ١٦-٢٧°م. أو في مكان منفصل ومعزولة عن الإضطرابات الهوائية. تنظف الحاضنات وتعقم بشكل دوري. ويتم التأكد من إحتفاظ الحاضنات بدرجات حرارية مناسبة. وتوزع القناني والأطباق في الحاضنة دون إزدحامها (ترك مسافة مناسبة ٢,٥سم تقريباً) مما يسمح بمرور الهواء دون عوائق وتجنب الإزدحام وعدم وضع أكثر من أربع أطباق petri فوق بعضها البعض.

وإن معايرة الحاضنات ضرورية قبل الإستخدام الأول وسنوياً عند الإستخدام، وتتم المعايرة بمحرار مرجعي. وعند الإستخدام يتم التحقق وتسجيل درجات الحرارة مرتين يومياً (صباحاً ومساءاً) وبفاصل ٤ساعات على الأقل. ويتم التحقق على الرفوف المستخدمة أو على الأقل الرفوف العلوية والسفلية للحاضنة لضمان التوزيع الحراري المناسب. يمكن إستخدام محرار زجاجي يتم غمره في الماء أو الجلسرين الى علامة الغمر. كذلك قد تكون الرطوبة مصدر قلق إذا تسببت بجفاف الأوساط الزرعية الصلبة مما يقلل من المياه المتاحة للعمليات الأيضية الضرورية للنمو وقد تتسبب بتحلل الخلية.

يجب التقييم السنوي لتبخر الآكار بنسبة مئوية من الوزن وذلك لفترة الحضانة المطلوبة بحسب طريقة الفحص. ويجب إضافة مصدر رطوبة عند فقدان نسبة >١٥% من الوزن بسبب نقص الرطوبة ويمكن تلافي ذلك أما بإستخدام حاضنات مجهزة بمصدر رطوبة أو غلق الأطباق بشكل محكم في أكياس أو حاويات. وإذا دعت الحاجة الى رطوبة أكثر يمكن إضافة مناديل رطبة في أوعية مملوءة بالماء وتوضع في الحاضنة، ويتم إعادة ملؤها عند الحاجة. أما في حالة عدم فقدان الوزن وحدوث تلطخ للمستعمرات على الأوساط فيجب تقليل الرطوبة في الحاضنة.

ب- **الحمام المائي Water-bath**: يُستخدم حمام مائي مناسب لحجم العمل المختبري ويفضل أن يكون ذو غطاء لتقليل فقدان الماء والحرارة وموزع حرارة داخلي. وتُستخدم رفوف مصنوعة من الفولاذ المقاوم للصدأ أو البلاستيك أو أي مادة مقاومة للصدأ. يجب الحفاظ على مستوى مناسب لعمق الماء مما يسمح لغمر الأنابيب لمستوى السطح العلوي للعينة. وينبغي إفراغ وتنظيف الحمام المائي عند الحاجة لمنع تكوُن الأملاح والنمو المايكروبي وبعدها يتم تطهير الحمام المائي وإعادة تشغيله مرة أخرى.
وإن معايرة الحمام المائي عند جهات معتمدة ضرورية قبل الإستخدام الأول وسنوياً عند الإستخدام، وتتم المعايرة بمحرار مرجعي. وعند الإستخدام يتم التحقق وتسجيل درجات الحرارة مرتين يومياً (صباحاً ومساءاً) وبفاصل ٤ساعات على الأقل.

ت- **فرن التعقيم بالهواء الحار Hot-air sterilizing oven**: يستخدم فرن مناسب لحجم العمل المختبري مما يمنع الإزدحام. وتكون مصنعة لتوفير درجة حرارة تعقيم موحدة ومناسبة من ١٠-١٧٠°م. ومجهز بمحرار زجاجي. كذلك يمكن إستخدام الفرن في درجات الحرارة المنخفضة لتجفيف المعدات الزجاجية.
ينبغي فحص إداء الفرن شهرياً وذلك بأشرطة تجارية أو سبورات مايكروبية مثل Bacillus atrophaeus وإن التركيز المثالي المُستخدم هو ١×١٠^{٦}. وتُفحص الأشرطة بزجاجيات مماثلة للزجاجيات المُعقمة في الفرن.
كذلك يتوجب معايرة درجة حرارة الفرن وذلك إما بمحرار زجاجي (يُوضع مستودع المحرار في قنينة مملؤة بالرمل) أو بمحرار رقمي على أن تكون دقة المحارير عند ١٦٠-١٨٠°م.

ث- **جهاز التعقيم بالبخار الموصدة Autoclave**: يُستخدم جهاز تعقيم autoclave مناسب لحجم العمل مما يمنع الإزدحام الداخلي. مُصنع بشكل يوفر درجة حرارة تعقيم داخلية موحدة (تصل الى درجة حرارة التعقيم ١٢١°م)، وقادر على الوصول لدرجة التعقيم بغضون ١٥ دقيقة. ويجب أن يكون مُجهز بمقياس حراري دقيق ومقياس ضغط وصمامات آمان.
عند وضع المواد المراد تعقيمها في جهاز الموصدة يُراعى عدم وضع السلات والرفوف والقناني فوق بعضها البعض وتُترك مسافة مناسبة بين الدوراق والقاناي والسلات مما يسمح لبخار الماء العبور من بينها. وبعد كل دورة تشغيل تُسجل المواد المعقمة ودرجة الحرارة والوقت الكلي للتعقيم (وقت التعرض للحرارة) وإسم الفاحص.

كذلك ينبغي التأكد من درجة الحرارة تصل الى ١٢١°م خلال فترة التعقيم (١٥دقيقة) وإن دورة التعقيم للأوساط لاتتجاوز ٤٥دقيقة أو أقل.
كعمل روتيني تحقق من درجة حرارة الموصدة إسبوعياً بمحرار مرجعي (محرار زئبقي) وفي حالة عدم إمكانية التحقق بالمحرار فتُستخدم الأشرطة. وإن الحفاظ على وظيفة الموصدة أمر بالغ الأهمية لذلك يتم إجراء إختبار شهري لفعالية التعقيم للأوساط بإستخدام دلائل بايولوجية مثل أشرطة سبورات Geobacillus stearothermophilus أو عوالق أو كبسولات ويفضل أن تكون بتركيز ١×١٠^{٦}.
توضع الدلائل في قنينة زجاجية تحتوي على سائل وذلك للمحاكاة الحقيقية لإداء تعقيم الموصدة للأوساط.

ج- **جهاز قياس الحامضية pH equipment**: يُستخدم جهاز كهربائي لقياس قيمة الحامضية للأوساط الزرعية ويكون دقيق الى حد ٠,١ وحدة pH. ويُفضل أن يكون مجهز بمقياس حرارة. وتستخدم أقطاب مناسبة لتحديد الpH للأوساط السائلة والصلبة. وللحصول على معلومات عن المنحدر والإجراءات التصحيحية يتم مراجعة دليل الpH. يُسجل المنحدر شهرياً أو حسب مامطلوب. يجب معايرة pH meter مع محلولين بفر ضمن حدود القياس ويجب الحصول على البفرات من مصدر معتمد.

ح- **الموازين Balances**: تُستخدم موازين لاتقل حساسيتها عن ٠,١ غم مع وزن ١٥٠غرام. وتتم معايرتها مع أوزان مرجعية. ويُستخدم ميزان حساسيته ١ملغم مع وزن ١٠غم لوزن المواد ذات الكميات القليلة (<٢غم). يوضع الميزان في مكان لاتوجد فيه تيارات هواية قوية وعلى سطح ثابت لتجنب الأهتزازات والسحب وفي مكان قليل الرطوبة. يجب معايرة الموازين يومياً قبل الإستخدام بإستخدام كتلتين ضمن الأوزان المستخدمة. وقبل كل إستخدام يُنظف الميزان ويتم تصفيره (Tare) قبل إضافة المادة المراد وزنها ويتم تنظيفه بعد الإستخدام ومسح المواد المسكوبة مباشرةً. وينبغي التأكد من دقة عمل الأوزان شهرياً وذلك بإجراء كل من accuracy و precision و leanearity مقابل أوزان مرجعية، وتُسجل النتائج والتاريخ وإسم المحلل. يتم تنظيف الأوزان في حالة تعرضها للسقوط أو التآكل ويتم أعادة شهادتها أو إستبدالها. وإعادة أخذ شهادة المعايرة للأوزان كما موضح في تعليمات شهادة المعايرة للشركة المُصنعة أو على الأقل مرة كل خمس سنوات.

خ- **أدوات تحضير الاوساط الزرعية**: تُستخدم معدات مصنوعة من زجاج البورسيلكات Borosilicate glass والمقاومة للصدأ stainless steel أو غيرها من المواد المقاومة للصدأ. وتُستخدم الزجاجيات النظيفة والخالية من المخلفات التي قد تلوث الوسط.

د- **الماصات والماصات الألكترونية والأسطوانات المدرجة Pipets, micropipets and graduated cylinder**: تُستخدم ماصات ذات حجم يتناسب مع الحجم المطلوب وبدقة عالية وبسرعة. ويجب أن لايتجاوز خطأ المعايرة للشركة المصنعة عن ٢,٥%. تُستخدم ماصات ذات تدرج واضح ونهاية طرفية غير مكسورة. ويتم معايرتها بأحجام مرجعية. وينبغي عدم سحب العينات بالفم. كذلك يتم إستخدام إسطوانات مدرجة معايرة ودقيقة.

ذ- **حاويات الماصات Pipet containers**: تُستخدم حافظات إسطوانية أو مستطيلة مصنوعة من الألمنيوم أو الفولاذ المقاوم للصدأ ولاتُستخدم الحاويات المصنوعة من النحاس.

ر- **الثلاجات والمجمدات Refrigerator and freezers**: تُستخدم ثلاجات ذات درجات حرارة من ٢الى ١٠°م لحفظ العينات والأوساط والكواشف وغيرها. ولاتُستخدم الثلاجة لحفظ المواد العضوية المتطايرة والطعام والمشروبات مع الأوساط الزرعية أو العزلات البكتيرية. الثلاجات ذات الصقيع الحاد قد تسبب جفاف الأوساط الزرعية المخزونة لأكثر من إسبوع، ولاتُستخدم الأوساط إذا كانت تسبب قلق في الفحص. إن درجة حرارة المجمدات تعتمد على حاجة الفحص (مثال: خزن العزلات البكتيرية) تتراوح درجات الحرارة القياسية للمجمدات من -١٠ الى -٢٠°م وصولاً الى -٧٠ الى -٩٠°م. ويجب مراقبة درجة حرارة الثلاجات والمُجمدات يومياً بإستخدام محرار مرجعي إما يكون محرار زجاجي موضوع داخل قنينة مملؤة بماء مقطر أو جلسيرين، أو بإستخدام محرار رقمي وذلك بوضعه على الرفوف العلوية والسفلية للثلاجات. تُعرّف كل مادة بالإسم وتاريخ حفظها في الثلاجات وتُفحص شهرياً ويتم التخلص من المواد التي تجاوزت مدة الحفظ. وتُنظف الثلاجات سنوياً أو عند الحاجة.

ز- **أجهزة مراقبة درجة الحرارة Temperature monitoring devices**: لمراقبة درجات حرارة الحاضنات والثلاجات يُستخدم محرار زجاجي أو معدني متدرج أو رقمي يتوافق مع جهاز مقياس الحرارة أو أجهزة العرض الرقمية للأجهزة، وحسب الدرجات المطلوبة للفحوصات. يُمكن وضع مقياس حرارة غير زئبقي في قنينة ماء أو جلسرين ووضعها على كل رفّ. مقياس الحرارة يجب أن تكون تدريجاته مناسبة للقياس المطلوب، مثلاً يستخدم مقياس حرارة مدرج ٠,١°م للحاضنات التي تعمل بدرجة ٣٥°م. وبدلاً من ذلك يُمكن إستخدام مقياس حرارة رقمي. ويجب معايرة وتسجيل دقة جميع أجهزة قياس درجة الحرارة على الأقل سنوياً، بالمقارنة مع مقياس حرارة مرجعي معتمد. تاريخياً كانت مختبرات الأحياء الدقيقة تستخدم مقياس الحرارة الزئبقي، ولكن توقف إستخدام المقاييس الزئبقية بسبب المخاوف من المضار البيئية للزئبق (مركب سام عصبياً). وبدلاً عن ذلك يُمكن إستخدام مقاييس حرارة مملؤة بسائل عضوي أو تُستخدم مقاييس رقمية. ويجب التأكد من أن علامات مقياس الحرارة واضحة للقراءة وأن عمود السائل أو الزجاج لايحوي على كسر. ويجب التخلص من مقاييس الحرارة غير واضحة التدريجات.

تتم معايرة الأجهزة بمقاييس حرارة ذات تدريجات ٠,٥°م أو أقل حسب الحاجة (مثلاً عند معايرة حمام مائي بدرجة ٤٤,٥+٠,٢°م لحضانة البكتريا المقاومة للحرارة يُستخدم مقياس حرارة ذو تدريجات ٠,١ °م). أما مقاييس الحرارة التي تستخدم لمعايرة الثلاجات أو لقياس درجات حرارة العينات عند الأستلام يُمكن أن يكون تدريجاته ٠,١ أو ٠,٥ °م.

عند إستخدام مقاييس الحرارة السائلة في معايرة الحاضنات أو الثلاجات ينبغي وضع مستودع السائل للمقياس في الماء أو الجلسرين. وعند إختبار درجات الحرارة التي تتجاوز ٥٠ °م يجب وضع مستودع المقياس الحراري في حاوية زجاجية مملؤة بالرمل.

س- **قناني وأنابيب التخفيف Dilution bottles and tubes**: تُستخدم قناني وأنابيب زجاجية مقاومة للحرارة (ويُفضل زجاج البورسيليكات borosilicate) وتُغلق بسداد زجاجي أو غطاء مُبطن مما لاينتج مركبات سامة أو جراثيم عند تعقيمها. ولاتُستخدم سدادات القطن لغلقها. توضع علامة على مستوى التدرّج بشكل ثابت لايُمحى على جانب زجاجة أو أنبوب التخفيف، والتأكد إن العلامة ضمن مستوى الدقّة المطلوب. يُمكن إستخدام قناني بلاستيكية أو مصنوعة من مواد غير سامة إذا كان بالإمكان تعقيمها بالشكل الصحيح. تهمل جميع القناني أو الأنابيب التي تتضمن خدوش أو شقوق أو رواسب.

ش- **أطباق الصب بتري Petri dishes**: لفحص عدّ الأطباق للمراقبة البيئية، تُستخدم أطباق بتري زجاجية أو بلاستيكية ١٠٠×١٥ أو ١٥٠×٢٠ ملم. قعر الطبق يجب أن يكون خالياً من الفقاعات والخدوش ومستوي، بالتالي تكون سماكة الوسط متساوية في جميع أنحاء الطبق. عند تطبيق تقنية الترشيح بالأغشية تستخدم أطباق زجاجية أو بلاستيكية ٦٠×١٥ أو ٥٠×١٢ملم. تُعقم الأطباق الزجاجية وتحفظ في حافظات معدنية مصنوعة من الألمنيوم أو الفولاذ المقاوم للصدأ (aluminum or stainless steel) ولاتُستخدم الحافظات المصنوعة من النحاس copper. كذلك قبل التعقيم يُمكن لفّ الأطباق بورق وأفضل نوعية ورق هي (sulfate pulp kraft).

ص- **عدة الترشيح Membrane Filtration Equipment:** تُستخدم أقماع ترشيح filter funnel وماسك أغشية membrane holders مصنوعة من الفولاذ المقاوم للصدأ أو الزجاج أو البلاستيك المتحمل للتعقيم بجهاز الموصدة autoclave. ويجب أن لايوجد فيها تسريب أو خدوش أو صدأ. ويجب تبديلها في حالة وجود تكسرات.

ض- **أنابيب التخمر وأنبوبة درهم والقناني Fermentation tubes, vials and bottles**: تُستخدم أي أنابيب تخمر ذات حجم يتوافق مع متطلبات حجم وتركيز الوسط الزرعي. في حالة فحص إنتاج الغاز توضع إنبوبة درهم Durham tube بشكل مقلوب في داخل إنبوية التخمر، بحيث يتم إمتلاءها بالوسط الزرعي، وتكون إنبوبة درهم مغمورة بالوسط الزرعي (لحد ٢/١ الى ٣/٢) مما يتيح رؤية تكون الغاز بسهولة.

ط- **معدات التلقيح Inoculating equipment**: يُستخدم ناقل وهو عبارة عن سلك مصنوع من النيكل أو البلاتينيوم-ايريديوم ذو قطر ٣ملم والتي يمكن تعقيمها باللهب. وهنالك خيار آخر وهو الإستخدام لمرة واحدة وذلك إما عود خشبي أو بلاستيكي يتراوح قطره بين ٠,٢-٠,٣سم ويكون أطول من إنبوب التخمر ب ٢,٥سم على الأقل. تُعقم الأعواد الخشبية بالحرارة الجافة أما البلاستيكية فيتم تعقيمها بالموصدة (autoclave) وتُحفظ في حافظات زجاجية أو أي حافظة لاتحوي مواد سامة. والخيار الثالث هو إستخدام النواقل والأبر المعقمة الجاهزة ذات الإستعمال لمرة واحدة.

ظ- **قناني العينات Sample bottles**: تُستخدم قناني ذات حجم وشكل مناسب لجمع عينة فيها تكفي لجميع الفحوصات المطلوبة مع وجود مساحة هواء كافية (على الأقل ٢,٥سم) مما يسمح بخلط العينة المناسب قبل إجراء الفحص. ويُمكن تغطيتها حتى يتم إنتهاء الفحوصات المطلوبة. يُنصح بإستخدام القناني ذات الفوهة الواسعة. عند تحضير القناني في المختبر يجب إستخدام القناني المصنوعة من الزجاج أو البلاستك غير السامة (على سبيل المثال polypropylene). كذلك تتوفر قناني تجارية معقمة ذات إستخدام لمرة واحدة أما تحتوي على عامل إزالة الكلور أو بدونه. معظم القناني البلاستيكية تقلل الوزن أثناء نقل العينات وتقلل من حوادث الكسر أثناء النقل.

قناني جمع العينات يُمكن أن تحتوي على غطاء معدني أو بلاستيكي مع بطانة داخلية على أن لاتنتج مواد سامة أثناء تعقيمها. قبل تعقيم القناني يتم غلقها بالغطاء الخاص بها ويتم تغطية قمم وعنق القناني بورق اللألمنيوم أو ورق الكرافت (heavy kraft).

يتم تقييم تعقيم قناني جمع العينات وذلك أما بأختبار فحص قنينة واحدة من كل وجبة تعقيم أو بنسبة مئوية (١-٤%) من كل وجبة تعقيم للقناني. وتُثبت النتائج في سجل وفي حالة ظهور نمو يتم تجاهل الدفعة كاملةً. أيضاً يتم التحقق من فاعلية عامل إزالة الكلور ودقة علامة ١٠٠مل إن وجدت على القناني. وتُثبت جميع النتائج.

ع- **المجاهر Microscopes**: المختبر يحتاج الى خصائص المجهر مثل التكبير (العدسات العينية والشيئية) ومتطلبات الإضاءة. معظم مختبرات الأحياء المجهرية تستخدم المجاهر المركبة. ينبغي معايرة جودة العدسات وقوة التكبير وأبعاد القياس. يتبع توصيات الشركة المصنعة لضبط وتعديل الأضاءة لكل هدف مُستخدم. وبعد كل إستخدام يُنظف المجهر والعدسات. ويتم إستخدام الزيت immersion oil الموصى به من الشركة المصنعة مع عدسات الزيت فقط. والتأكد من إزالة الزيت من العدسات بعد كل إستخدام. كذلك يستخدم الهواء المضغوط لإزالة الغبار عن المجهر بدون دفعه على العدسات.

وعند عدم إستخدام المجهر يتم تغطيته وحفظه في مكان منخفض الحرارة والرطوبة بإستمرار.

غ- **مصباح الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet light**: يُمكن إستخدام مصابيح الأشعة فوق البنفسجية قصيرة الموجة ٢٥٤نانوميتر لإغراض التطهير وتقليل التلوث بالحمض النووي (مثلاً لتطهير عدة الترشيح). وعند الإستخدام المستمر يُفضل فصل المصابيح شهرياً ومسحها بقطعة قماش مبللة بالإثانول (٧٠% إثانول:٣٠% ماء مقطر).

يتم التحقق من المصابيح فصلياً وذلك بمقياس اشعة فوق البنفسجية (short wave UV light meter) وإستبدال المصابيح التي يقل إنتاجها الى ٧٠% من الإنتاج الأولي. وبدلاً عن ذلك، يُمكن تعريض أطباق بتري تحتوي على ٢٠٠-٣٠٠ وحدة مكونة لمستعمرة /١مل من عالق بكتيري مُختار لمدة دقيقتين. ثم تُحضن بدرجة حرارة ٣٥°م لمدة ٤٨ ساعة وبعدها يتم عدّ المستعمرات. وينبغي إستبدال المصابيح إذا لم يتم تقليل المستعمرات بنسبة ٩٩%. كما إنه يُستحسن أن يُطلب من الشركة المصنعة العمر المتوقع للمصباح ومن ثم يُتبع الإستخدام بالساعة.

كذلك تُستخدم مصابيح الأشعة فوق البنفسجية طويلة الموجة ٣٦٥-٣٦٦نانوميتر لأكتشاف التألق في الطرق الأنزيمية. ولتحقيق الفاعلية يجب إطفاء جميع مصابيح الإنارة المختبرية وإغلاق الستائر لمنع دخول الضوء من النوافد. يجب أن يستخدم المحللون مصابيح 6W لأن التألق الضعيف قد لايكون مرئياً عند إستخدام مصابيح 4W. يجب المحافظة على نظافة الوحدات وإستخدام مقياس ضوئي light meter للتحقق من بقاء المصابيح بالقوة الكهربائية المناسبة، وإستبدال مصباح الأشعة فوق البنفسجية سنوياً.

تنبيه: على الرغم من أن الأشعة فوق البنفسجية قصيرة الموجة (٢٥٤نانومتر) معروفة بأنها أكثر خطورة من الأشعة فوق البنفسجية طويلة الموجة (٣٦٥نانومتر) إلا إنه كليهما يُمكن أن يضّر بالعينين والجلد ويحتمل أن يكون مسرطناً. فيجب حماية العينين والجلد من التعرّض للأشعة فوق البنفسجية.

٤-٢ الغسل والتعقيم Washing and sterilization

تُعتبر الأواني الزجاجية النظيفة ضرورية في مختبرات الأحياء الدقيقة لضمان موثوقية الفحوصات. تُغسل الزجاجيات قبل الإستخدام الأول. ويجب تعقيم كل الأدوات الملوثة قبل غسلها. وتُغسل جميع الأدوات بعد الإستخدام، وفي حالة جفاف المواد على الأدوات يستوجب نقعها قبل الغسل. ويُمكن غسل المعدات يدوياً أو بغسالات أوتوماتيكية ولكن يجب التأكد من سلامة توزيع المياه في جميع أجزاء المعدات.

تُنظف جميع المعدات الزجاجية بماء دافئ أو حار ومسحوق تنظيف مناسب للمختبرات لايحتوي على الفوسفات. ولإزالة جميع آثار المنظفات يتم غسل الزجاجيات ٥-١٠ مرات بالماء البارد بعد إختفاء الرغوة. ثم تغسل ٢-٣ مرات بماء مقطر. ويتم إجراء فحص الرقم الهيدوجيني بإستخدام bromothymol blue pH check على كل وجبة غسل (معدات مغسولة بنفس الوقت) وذلك للتأكد من عدم وجود بقايا قلوية أو حامضية. ففي حالة وجود بقايا يكرر غسل المعدات. وتحفظ المعدات بعد الغسل بعيداً عن الغبار.

لتعقيم الزجاجيات بطريقة التعقيم الجاف، يستخدم فرن hot-air oven بدرجة حرارة ≤١٧٠°م لمدة ساعتين. وبدلاً من ذلك يمكن تعقيمها بالموصدة autoclave بدرجة حرارة ١٢١°م ولمدة لاتقل عن ٣٠دقيقة. عند تعقيم القناني ينبغي غلق الغطاء بشكل غير محكم قبل التعقيم. ويمكنك التخلص من الرطوبة الموجودة في القناني بعد التعقيم وذلك بوضعها في فرن التجفيف. أما الماصات الزجاجية يتم تعقيمها بوضعها في حافظة معدنية وبإستخدام فرن حراري جاف بدرجة ≤١٧٠°م ولمدة لاتقل عن ساعتين.

٤-٣ العينات Samples

٤-٣-١ جمع العينات Samples Collection:

أ- القناني Containers: تجمع العينات للفحوصات البكتريولوجية في قناني نظيفة ومعقمة ذات فوهة عريضة ومصنوعة من الزجاج (borosilicate) أو البلاستيك غير المتفاعل. ويجب أن تحتوي القناني على سدادات أو أغطية لاتسمح بالتسريب ولاتكوّن مواد سامة مع تكرار الإستخدام والتعقيم. إن إستخدام قناني الإستعمال لمرة واحدة ذات الفوهة العريضة يكون ملائم لجمع عينات الحمأة .

ب- **إزالة الكلورين dechlorination**: عند جمع العينات التي تحتوي على كلورين متبقي residual chlorine أو هالوجينات أخرى يتم إضافة مادة تعادل الكلورين المتبقي في القناني. وإن مادة ثايوسلفات الصوديوم ($Na_2S_2O_3$) مناسبة لمعادلة الكلورين المتبقي لمنع قتل البكتريا أثناء نقل العينات.

عند جمع عينات من مياه الصرف الصحي المكلورة يتم إضافة كمية كافية من $Na_2S_2O_3$ الى قناني جمع العينات بحيث يكون التركيز النهائي في العينة ١٠٠ملغم/لتر. مثال، لقنينة حجم ١٢٠مل، يُضاف ٠,١مل من محلول $Na_2S_2O_3$ بتركيز ١٠% وذلك لإزالة (تعادل) أكثر من ١٥ملغم/لتر من الكلور المتبقي في العينة. أما مياه الشرب فتحتوي كمية كلورين متبقي أقل لذلك فإن ٠,١مل من محلول $Na_2S_2O_3$ بتركيز ٣% يكون كافي لإزالة (تعادل) الكلورين المتبقي يصل الى ٥ملغم/لتر في عينة بحجم ١٢٠مل. ولتحضير محلول $Na_2S_2O_3$ أنظر الجدول رقم (٤-١) وعند أخذ عينات لأول مرة يُفضل قياس كمية الكلورين المتبقي وذلك لتحضير قناني جمع العينات تحوي عامل إزالة مناسب لحجم العينة. ويتم التخلص من محلول $Na_2S_2O_3$ في حالة وجود عكارة فيه، وذلك لنمو البكتريا والتلوث.

تُغلق القناني بشكل غير مُحكم بعد إضافة محلول $Na_2S_2O_3$، ويتم تعقيمها أما بالحرارة الجافة أو الرطبة كما موضح في الفقرة ٤-٢ ويتم إجراء تقييم التعقيم كما موضح في الفقرة ٤-١ظ. وقد تتوفر قناني تحتوي على عامل إزالة الكلورين المتبقي تجارياً ويمكن أن تعادل أو تزيل فعل الكلورين المتبقي بتركيز ١٥%ملغم/لتر. يتم التحقق من فاعلية عامل إزالة الكلورين المتبقي لكل وجبة عن طريق إستخدام هايبوكلورات الصوديوم (NaOCl) كعنصر سيطرة نوعية وذلك عند ٥-١٥ ملغم/لتر (أو مايعادلها).

جدول رقم (٤-١)

تحضير محلول ثايوسلفات الصوديوم ($Na_2S_2O_3$)

Solution strength and $Na_2S_2O_3$ form	Weight of compound required
3% anhydrous	3 g/100ml
3% pentahydrate	4.6 g/100ml
10% anhydrous	10 g/100ml
10% pentahydrate	15.21 g/100ml

٤-٣-٢ **طريقة النمذجة Sampling procedure**: يجب إتباع إسلوب سليم لجمع العينات من أجل الحفاظ على سلامة العينة. وإن النمذجة غير الصحيحة للعينة يمكن أن تُبطل أي نتيجة تحليل مختبري.

إن التخطيط المنهجي لجمع العينات يعطي صورة ممثلة عن المياه المفحوصة. وعند التخطيط لجمع العينات يجب مراعات الضروف الزمانية والمكانية (الأفقية والعامودية) وحالة الطقس من رطوبة وحرارة جافة وحركات المدّ والجزر للمياه السطحية. كذلك فإن تكرار أخذ العينات وعددها يعتمد على الإستخدام النهائي للبيانات.

القناني المُستخدمة لجمع العينات يجب أن تكون كبيرة بما فيه الكفاية لجمع حجم العينة المطلوب وبقاء مساحة كافية في القنينة بعد جمع العينة تقريباً ٢,٥سم لضمان الخلط الجيد للعينات (بطريقة الرّج) قبل إجراء الفحص. في حالة وصول عينة بدون فراغ كافي للخلط، أما يتم رفض العينة وطلب سحب عينة بديلة. أو يمكن (للحفاظ على سلامة العينة) أن تُفرغ محتويات العينة بالكامل في قنينة معقمة ذات حجم كافي للخلط الجيد، في ضروف معقمة، ثم يتم سحب ١٠٠ مل من العينة في قنينة معقمة وترك فراغ كافي لخلط العينة عند إجراء الفحص.

يجب المحافظة على قنينة جمع العينات مغلقة حتى وقت جمع العينة. عند جمع العينة يفتح الغطاء ولايتم وضعه على أي سطح. وينبغي تجنب التلوث الخارجي للعينة وتلوث السطح الداخلي لغطاء القنينة. ويتم ملئ القنينة بدون غسلها بالعينة. ثم يتم غلق القنينة. ويجب إتخاذ الأحتياطات اللازمة لتجنب تلوث العينة مثل إرتداء القفازات النظيفة عند جمع العينة وتجنب لمس فوهة القنينة باليدين أو بالحنفية.

أ- **عينات مياه الشرب Potable water**: نختار بعناية موقع جمع العينات الذي يكون من السهل الوصول إليه من قبل جامعي العينات لأنه يمكن أن يكون جمع العينات روتيني. إذا كان جمع العينات من نظام شبكة التوزيع للمياه فيجب تجنب الحنفيات المتصلة بمعدات معالجة للمياه (مثل أجهزة تنقية المياه أو وحدات الأشعة فوق البنفسجية UV أو الفلاتر). كذلك تجنب أخذ العينات من الحنفيات المعرضة للتلوث الخارجي مثلاً القريبة من الأرض أو القريبة من أسفل الحوض. في حالة أخذ العينات من حنفيات أنظمة توزيع شبكات المياه نختار حنفية بدون أي رابط إضافي وتكون حنفية متصلة بشكل مباشر بالخط الرئيسي (لاتجمع عينة من حنفية متصلة بخزان). ويتم أزالة أي مرفقات من الحنفية (مثل الفلاتر أو رشاشات أو معدات التوجيه) لأنها قد تحتوي على بكتريا ولاتعكس جودة مياه المصدر. تُفتح حنفية الماء البارد بشكل كامل ويُترك الماء يجري للصرف الصحي لفترة كافية للتخلص من المياه الراكدة في الأنابيب (٢-٣ دقيقة). ثم يقلل جريان الماء من الحنفية للتمكّن من ملئ القنينة بدون رشّ.

إذا كانت الحنفية مشكوك في نظافتها فيتم إختيار حنفية أخرى. أما إذا كانت هنالك حاجة في جمع عينة من حنفية مشكوك في نظافتها، فيتم تعقيم الحنفية (من الداخل والخارج) وذلك بمادة هايبوكلورات الصوديوم (١٠٠ملغم NaOCl/لتر) أو الكحول أو اللهب ثم يترك الماء يجري بمعدل تدفق ثابت لمدة ٢-٣ دقيقة بعد التعقيم. ولاتُوخذ عينات من الحنفيات التي تسرّب مياه على الجزء الخارجي للحنفية. وفي حالة وجوب أخذ عينة من حنفية خلط، يُفتح الماء الساخن لمدة دقيقتين، ثم الماء البارد لمدة ٢-٣ دقيقة، ثم تُجمع العينة كما موضح أعلاه. ويتم جمع حجم مناسب وكافي لإجراء الفحوصات المطلوبة. والمختبر يكون مسؤول عن حجم العينات المطلوب لإجراء الفحوصات.

في حالة جمع عينة من بئر مُزود بمضخة، تُفتح المضخة ويُترك الماء يجري حتى تستقر درجة حرارة الماء (٥-١٠ دقيقة) قبل جمع العينة. قد تحتاج الى جمع عينة في الهواء الطلق فيجب تجنب الحنفيات المقاومة للصقيع كذلك الحنفيات في الهواء الطلق تحتاج الى تطهير بالقاصر أو مايعادله بسبب إحتمالية تلوثها. أما إذا لم يُجهز البئر بمضخة فيتم جمع العينة مباشرةً بواسطة قنينة معقمة ومزودة بثقل في قاعدتها، ويجب الحرص وتجنب تلوث العينة من أي سطح.

في دراسات تقييم مياه الشرب يتم جمع العينات من نهاية أنظمة شبكة توزيع المياه (أبعد نقطة يصل اليها الماء) لضمان التغطية الشاملة لنوعية المياه خلال كل شهر. يتم إختيار مواقع أخذ العينات بعناية لتشمل مقاطع النهايات المسدودة وتوضيح الجودة البكتريولوجية في جميع أنحاء الشبكة ولضمان عدم حدوث تلوث موضعي عن طريق مواقع الربط والتكسّرات في خطوط التوزيع وإنخفاض مستوى الضغط الداخلي للأنابيب.

مواقع أخذ العينات قد تكون:

- مواقع عامة مثل محطات الشرطة والإطفاء والمباني الحكومية والمدارس ومحطات الحافلات والقطارات والمطارات والمتنزهات.
- المؤسسات التجارية مثل المطاعم ومحطات الوقود ومباني ومنشآت صناعية أو تجارية.
- مساكن خاصة مثل المنازل والمباني السكنية والمجمعات السكنية.

يُفضل تجنب الحنفيات الخارجية في الهواء الطلق وحنفيات إطفاء الحرائق ووحدات معالجة المياه.

ب- **عينات المياه السطحية Surface water**: قد تحتاج دراسة مسطح مائي لمدى قصير وجهود مكثفة. إن إختيار مواقع أخذ العينات البكتريولوجية لتشمل خط رئيسي من المنبع الى المنطقة المدروسة. ومناطق طرح الصرف الصحي والنفايات الصناعية الرئيسية والروافد بإستثناء الروافد التي تقل نسبة التيار فيها عن ١٠% من التيار الرئيسي ونقاط الأخذ للمياه التي تُجهز محطات تنقية مياه الشرب وعينات المصب النهائي والمناطق الترفيهية أسفل النهر. قد تتطلب نقاط إلتقاء مياه الصرف مع مياه المسطح المائي دراسة أولية لتحديد مدى إكتمال الخلط. بالنسبة للروافد يتم إختيار نقطة جمع العينة بالقرب من الإلتقاء بالتيار الرئيسي. وقد يتم جمع العينات بالقوارب أو من الجسور القريبة من النقاط الحرجة للدراسة. وإن تكرار العينات يجب أن يعكس التغيرات في ضروف المسطح المائي.

لمراقبة جودة نوعية المياه للجداول والبحيرات نختار مواقع حساسة لأخذ العينات وقد يكون أخذ العينات موسمياً لمياه الإستجمام أو يومياً لمآخذ المياه لمحطات معالجة مياه الشرب أو كل ساعة عندما يكون التحكم في محطات معالجة النفايات غير منتظم وتصريف الفضلات السائلة يكون في مناطق حصاد المحار أو تصريف مستمر.

تؤخذ العينات من الأنهار والبحيرات بمسك القنينة (بإرتداء القفازات) من قاعدتها ويكون عنقها بإتجاه الأسفل وتُغمر في الماء، ثم تُقلب فوهة القنينة الى الأعلى قليلاً وتوّجه الفوهة بإتجاه التيار. إذا لم يكن هنالك تيار (على سبيل المثال مياه الخزانات) فيتم تكوين تيار مصطنع عن طريق دفع القنينة الى الأمام بشكل أفقي بعيداً عن اليد. عند أخذ العينات بإستخدام القارب يتم سحب العينات من الجهة الأمامية للقارب، وإذا كان مستحيل جمع العينة باليد، يتم تثبيت وزن في قاعدة القنينة وخفضها بالماء. ويجب تجنب التماس مع حافة القارب وذلك لإنها تسبب تلويث العينة.

تحديد البيانات Identifying data: العينات يجب أن تكون مصحوبة بمعلومات كاملة ودقيقة تتضمن إسم الموقع و نوع العينة وموقع الجمع وعمق العينة والتاريخ والوقت وإسم جامع العينة والفحوصات المطلوبة والكلورين المتبقي ونوع عامل إزالة الكلورين المتبقي أو أي إجراء غير طبيعي عند جمع العينة. وعند إستلام العينات يتم تسجيل درجات الحرارة (بارد وغير مجمد <١٠°م) ويتم التأكد إن القناني تحوي معلومات كافية للتعريف.

٤-٣-٣حفظ وتخزين العينات Preservation and Storage:

بصورة عامة ينبغي البدء بإجراء الفحوصات البكتريولوجية في أقرب وقت ممكن بعد جمع العينة وذلك لتجنّب التغييرات في عدد الخلايا البكتيرية. ولايتم تحليل العينات التي فيها تسريب أو كلورين متبقي. وبدلاً من ذلك يتم طلب سحب عينة أخرى. وفي حالة تعذر فحصها خلال ساعة من الجمع، يتم تبريد العينات أثناء النقل الى المختبر وذلك للحصول على نتائج أكثر دقّة. تُحفظ العينات في الظلام ومبردة ولكن غير مجمدة (<١٠°م) مع أكياس الثلج ولاينبغي وضع العينات في تماس مباشر مع أكياس الثلج، تعزل العينات بورق الفقاعات أو الورق المجعد أو مايعادلهما. العينات التي تصل بسرعة الى المختبر (خلال ساعة واحدة) قد لاتصل الى درجة <١٠°م. يمكن حفظ العينات مبردة لمدة لاتزيد عن ٢٤ ساعة.

أ- عينات مياه الشرب Potable water: في حالة طلب إجراء فحوصات بكتريا القولون الكلية total coliform و*E. coli* يمكن حفظ عينات مياه الشرب من وقت الجمع الى الفحص ٣٠ساعة. وعلى الرغم عدم وجود ضوابط لدرجة حرارة الحفظ ولكن حاول إبقاء العينات مبردة ولكن غير مجمدة (<١٠°م) أثناء النقل الى المختبر. وبالمثل إحتفظ بالعينات المطلوب إجراء فحص العدد الكلي للبكتريا الهوائية heterotrophic plate count مبردة

وغير مجمدة (<١٠°م) ولفترة لاتتجاوز ٨ساعات (جمع وإجراء الفحص). ولاتُقبل أي عينات مياه تظهر عليها علامات التجميد. يُسجل وقت إستلام العينة ودرجة الحرارة إذا كانت مبردة في سجل إستلام العينات. ويتم إجراء الفحوصات في نفس يوم الإستلام. في حالة تأخر العينات يتم تبريدها الى اليوم التالي طالما لاتزال ضمن حدود الوقت المطلوب للحفظ.

ب- المياه الخام غير المكلورة nonpotable water: تحفظ عينات مياه الأنهار والمياه الترفيهية وعينات الصرف الصحي مبردة وغير مجمدة (<١٠°م) خلال فترة نقل ٨ساعات من جمع العينة الى إجراء الفحوصات المطلوبة. عند وصول العينات الى المختبر يتم تبريدها وتسجيل وقت الإستلام ودرجة الحرارة في سجل إستلام العينات. ويتم فحص العينات خلال ساعتين. لفحص عينات الحمأة (fecal coliform و *salmonella*) يمكن حفظ العينة لمدة ٢٤ساعة.

٤-٤ تحضير الأوساط الزرعية:

أ- **خزن وحفظ الأوساط الزرعية:** يتم خزن الأوساط الزرعية الجافة (powder) في قناني مُحكمة الغلق في الظلام بدرجة حرارة <٣٠°م وبمكان قليل الرطوبة. ولاتُستخدم الأوساط في حالة تغير لونها أو تكتلها. ويجب إستخدام الأوساط الزرعية الجافة قبل تاريخ إنتهاء صلاحيتها أو خلال سنة واحدة من تاريخ شرائها إذا كانت تحتوي على عوامل إنتقائية (sodium azide، bile salts، antibiotics، sulfur-containing aminoacides، الخ) وذلك للحفاظ على انتقائية مثلى للأوساط.
يتم إستخدام الأوساط التجارية عند توفرها. وينبغي تجنب تحضير الأوساط الزرعية من مركباتها الأساسية إلا عند الضرورة. ويتم تحضير كميات أو دفعات من الأوساط الزرعية مما يتيح إستخدامها خلال إسبوعين مالم تُحدد الطريقة خلاف ذلك. أما إذا كانت الأوساط في أنابيب ذات غطاء مُحكم (screw-capped) فيمكن خزنها لمدة تصل الى ٣ اشهر بدرجة حرارة <٣٠°م. ويتم خزن الأوساط بعيداً عن أشعة الشمس المباشرة وتجنب التبخر المفرط للأوساط. تُوضع أطباق بتري petri dishes في حاويات مُحكمة الغلق أو أكياس بلاستيكية مع غلق فوهة الكيس جيداً، وتُحفظ في الثلاجة. وتُحفظ الأطباق بشكل مقلوب لمنع تكثف الرطوبة على الآكار. ولاتُستخدم الأطباق التي تحتوي على قطرات رطوبة مكثفة لأنها تتسبب في إنتشار المستعمرات. وإذا دعت الحاجة يُمكن تجفيف الأطباق بوضعها في الهود laminar-flow hood مع فتح غطائها قليلاً.

إذا حُفظت الأوساط السائلة في أنابيب تخمرية في الثلاجة فيُمكن أن تذوب كمية كافية من الهواء مما ينتج فقاعة هواء في إنبوبة درهم عندما يتم حضنها لاحقاً بدرجة حرارة ٣٥°م. لذلك تُجلب جميع الأوساط الزرعية خاصة التخمرية وتُوضع في درجة حرارة الغرفة ليلة كاملة قبل الإستخدام ويتم التخلص من الأنابيب التي تحتوي على أي فقاعات هواء.
بعد مدة الخزن أو الحضن لفترات طويلة قد تتكسر العوامل الإنتقائية وكذلك يُمكن أن يؤدي التبخر الى تغيير تراكيز مكونات الوسط الزرعي. لذلك يتم تجاهل الأنابيب التي تُظهر نمو نتيجة الى تلوثها أو فقدان التبخر لأكثر من ١مل. لان فقدان ١٠% أو أكثر (١مل أو أكثر من ال١٠ مل الأساسية) يؤثر على حسابات العدد الأكثر إحتمالية (MPN).

ب- **ضبط قيمة ال pH:** بعد تعقيم الأوساط يتم تحديد وتسجيل قيمة ال pH. وتحدد توجيهات كل وسط زرعي قيمة ال pH النهائي بعد التعقيم، ويتم ضبط قيمة ال pH حسب التوجيهات للوسط. أما إذا لم يتم تحديد قيمة ال pH فإن ضبطه غير ضروري. عادةً أثناء التعقيم تنخفض قيمة الpH ٠,١ الى ٠,٢ ولكن أحياناً تصل الى ٠,٣ في الأوساط المركزة مرتين double strength. والأوساط الزرعية التي تحتوي على بفر يكون الإنخفاض في قيمة الph ضئيل.
لتحديد قيمة الpH النهائية، يُبرد الوسط الزرعي بدرجة ٤٤-٤٦°م، وبضروف معقمة نأخذ كمية قليلة من الوسط ويتم تحديد جهاز القياس للقراءة بدرجة حرارية أعلى، او بدلاً عن ذلك يمكن تبريد الوسط الزرعي تماماً الى درجة حرارة الغرفة ثم قياس قيمة الpH النهائية. إذا كان ضبط قيمة الpH للوسط الزرعي ضرورياً، فيتم إستخدام قضيب تحريك معقم وإضافة كمية كافية من هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) بتركيز (٠,١N) والمعقم بالفلترة. أو يُستخدم حامض الهيدروكلوريك (HCl) بتركيز (٠,١N).
إذا تم تحضير الأوساط الجافة حسب التعليمات فنادراً ما تحتاج الى ضبط قيمة الpH ومع ذلك قد تكون قيمة الpH النهائية غير مقبولة بسبب الوزن غير الصحيح للوسط الجاف عند التحضير، أو إن الوسط المُعاد تسخينه قد تعرّض للحرارة لفترة طويلة، أو وجود مشكلة في الوسط نفسه. وإذا كانت قيمة الpH للأوساط المُعدة مسبقاً غير مقبولة برقم ثابت فيجب تحديد السبب وقد يلزم ضبط قيمة الpH قبل التعقيم.

ت- تعقيم الأوساط الزرعية: بعد تحضير الوسط الزرعي يتم توزيعه في قناني نظيفة وخالية من الشقوق والخدوش، وتُعقم خلال ساعتين من تحضيرها. ولايجوز تخزين الأوساط الزرعية غير المعقمة.

يُستخدم جهاز الموصدة autoclave في تعقيم الاوساط الزرعية بدرجة حرارة ١٢١ºم وبحسب التعليمات الخاصة بالشركة المصنّعة. حيث يختلف الوقت المطلوب للتعقيم بإختلاف شكل ونوع المواد والوسط ووجود الكربوهيدرات والحجم. تُعقم معظم الأوساط السائلة الكربوهيدراتية بدرجة حرارة ١٢١ºم لمدة ١٢ دقيقة، مع وجود إستثناءات؛ على سبيل المثال يجب تعقيم وسط A-1 لمدة ١٠دقائق بدرجة حرارة ١٢١ºم. تُستخرج الأوساط من جهاز الموصدة autoclave عندما يصل الضغط الى الصفر، ويتم تبريد الوسط بسرعة لتجنب تحلل السكريات عند تعرضها للحرارة لفترات طويلة.

يتم تعبئة الأوساط في قناني أو حاويات صغيرة وذلك للسماح بالتسخين المتساوي والتبريد السريع للأوساط الزرعية، حيث إن أقصى فترة تعرض للحرارة لمعظم الأوساط السائلة الكربوهيدراتية هو ٤٥دقيقة (من إغلاق جهاز الموصدة autoclave الى عملية إخراج الأوساط الزرعية). وإن أقصى فترة تعرض لوسط A-1 هو ٣٠دقيقة. يمكن توفر الأوساط المعقمة تجارياً. وكذلك ينبغي عدم إعادة تعقيم الأوساط الزرعية.

بعد التعقيم يتم فحص الأوساط الزرعية لتحديد إذا كانت هنالك أي تغيرات ملحوظة في اللون أو حدوث إختلاف في الشفافية أو ترسيب مكونات الوسط. توضع علامة على حاويات حفظ الأوساط ويُكتب عليها تاريخ التحضير ووجميع المعلومات ذات الصلة في سجلات خاصة.

٤-٥ محلول التخفيف dilution water: يُمكن تحضير محلول التخفيف في المختبر أو يتم شراؤه تجارياً. وسنعرض هنا إثنان من أكثر المحاليل إستخداماً في مختبرات المياه الأساسية للأحياء الدقيقة.

أ- محلول بفر buffered water: ويتكون من محلولين.

محلول الفوسفات بفر(رقم ١) ويتكون من إذابة ٣٤غرام من فوسفات الهيدروجين KH_2PO_4 في ٥٠٠ مل من الماء المقطر ويتم ضبط قيمة الpH الى ٧,٢+٠,٥ بواسطة هيدروكسيد الصوديوم ١*N*، ويُخفف الى ١لتر بماء مقطر. يتم تعقيمه بواسطة الترشيح أو بجهاز الموصدة autoclave. ويُحفظ المحلول في الثلاجة ويتم التخلص منه عندما تظهر فيه عكارة.

محلول كلوريد المغنيسيوم (رقم ٢) ويتكون من إضافة كلويد المغنيسيوم (٣٨غرام من $MgCl_2$ أو ٨١,١غرام من $MgCl_2.6H_2O$) الى ١لتر من الماء المقطر. ويتم تعقيمه ثم يحفظ في الثلاجة، ويتم التخلص منه إذا أصبح المحلول عكر.

طريقة تحضير محلول بفر buffered dilution وذلك بإضافة ١,٢٥مل (من محلول رقم ١) و ٥مل (من محلول رقم ٢) الى ١لتر من الماء المقطر. وثم يُوزع بحجم ٩٩+٢مل أو ٩+٠,٢مل بعد التعقيم لمدة ١٥ دقيقة. قيمة pH النهائية يجب أن تكون ٧,٢+٠,١. ويجب الأنتباه الى ان قيمة الpH تتغير مع الوقت. ويُحفظ في الثلاجة ويتم التخلص منه في حالة تكوّن عكارة فيه. يمكن إستخدامه خلال ٦شهور.

ب- ماء الببتون ٠,١% Pepton water: يُحضر بإضافة ١غرام من الببتون peptone الى ١لتر من الماء المقطر. إن قيمة الpH النهائية يجب أن تكون ٧,٢+٠,١ بعد التعقيم. وثم يوزع بحجم ٩٩+٢مل أو ٩+٠,٢مل بعد التعقيم لمدة ١٥ دقيقة. وإن الحفظ كما موضح أعلاه.

ملاحظة: عند تخفيف العينات يجب أن لاتزيد المدة عن ٣٠ دقيقة في درجة حرارة الغرفة وذلك لإنها تسبب جرح الخلايا أو موتها أو قد يحدث نمو للبكتريا في محلول ماء الببتون.

٤-٦ العدد الكلي للبكتريا مختلفة التغذية Heterotrophic Plate Count (HPC)

وتسمى العدد الكلي للبكتريا الهوائية Aerobic Bacterial Total Count (ABTC) أو العدد الكلي الحي للبكتريا Total Plate Count (TPC)

فحص العدد الكلي للبكتريا (HPC) هو الطريقة لتقدير البكتريا الحية المكوّنة للمستعمرات colony forming unit (CFU) في الماء على وسط مغذي حيث إن المستعمرات ممكن أن تنشأ من زوج من الخلايا أو سلسلة أو تجمع أو خلية مفردة وكل ذلك يتضمنه مصطلح CFU ووحداتها وحدة مكونة لمستعمرة لكل ١مل (CFU/1ml). ويُعد مقياساً للتغيرات أثناء معالجة المياه وتوزيعها أو في حمامات السباحة ودليلاً على جودة عمليات معالجة المياه وسلامة أنظمة التوزيع وملائمة المياه للشرب والصناعات الغذائية ومؤشراً مُهمّاً للتغيرات التي ممكن أن تحدث في نوعية المياه خلال مراحل الخزن والتوزيع والكشف عن فقدان التأثير التطهيري للكلور ووجود المستويات العالية من المواد العضوية والترسبات إلا أنه لايوفر دليلاً على ضرورة وجود خطر صحي أو تلوث برازي ومع ذلك فإنه توجد أنواع مايكروبية خاصة تعد جزءاً من البكتريا الهوائية ممكن أن تسبب الإصابة لمجموعة من الأشخاص الذين يتميزون بضعف المناعة ضد الأمراض.

٤-٦-١ مكان العمل: يجب توفير مكان عمل مناسب منضدي خالي من المسامات وذو مساحة كافية وخالية من أي عمل ويكون ذو مساحة فضاء أعلى من المنضدة خالي ونظيف ومجهز بأضاءة جيدة وتهوية أفقية مناسبة. ويجب تطهير السطح المنضدي قبل وبعد إجراء أي تحليل.

يوصى بتجهيز سطح منضدي laboratory bench لايقل عن ٢متر لكل مُحلل. ومساحة إضافية لنشاطات التحضير والدعم. كذلك فإن إرتفاع ال bench يجب أن يكون معقول ومريح للعاملين. في حالة العمل بوضعية الوقوف فإن الأبعاد المثالية للمنضدة يكون بمعدل إرتفاع ٩٠-٩٧سم، وعمق ٧٠-٧٦سم. أما العمل بوضعية الجلوس كالعمل على المجهر وعدّ الأطباق فيكون إرتفاع المنضدة ٧٥-٨٠سم. وإن سطح المنضدة ينبغي أن يكون من الصلب المقاوم للصدأ stainless steel أو epoxy plastic أو مادة ملساء ذات سطح غير نافذ ويكون خامل ومقاوم للتآكل.

٤-٦-٢ العينات: جمع الماء كما هو موضح في الفقرة ٤-٣ يجب بدء التحليل في أقرب وقت ممكن بعد جمع العينة لتقليل التغيرات في الأعداد البكتيرية. ولفترة لاتتجاوز ٢٤ساعة. في حالة عدم إمكانية إجراء التحليل خلال ٣٠ دقيقة من وقت الجمع، يُمكن حفظ العينة في درجة حرارة أقل من ١٠°م ولكن بدون تجميد.

٤-٦-٣ تحضير العينة:

قبل الإختبار يوضع رقم العينة على الطبق والتخفيف والتاريخ وأي معلومات أخرى ضرورية. ويتم تحضير طبقين (مكررين) على الأقل لكل عينة، أو تخفيف.

تُرّج العينة أو التخفيف جيداً لمدة ٧ثواني (٢٥ مرة) بتحريكها بسرعة للأعلى والأسفل أو بإستخدام جهاز رجّاج mechanical shaker لمدة ١٥ثانية بسرعة واطئة. تعتمد النتائج التحليلة على خلط العينة المناسب، فإن الخلط غير المناسب يمكن أن يُقلل من الكثافة البكتيرية الفعلية في العينة.

٤-٦-٤ الأوساط المستخدمة :

تتوفر الاوساط الجاهزة ويتم تحضيرها حسب إرشادات الشركة المصنّعة ولكن يجب التأكد من المواد والمغذيات الموجودة فيها مماثلة لما يتم عرضه أدناه.

أ- **الوسط الزرعي Plate count agar (tryptone glucose yeast agar)**:
هذا الوسط يمكن إستخدامه لفحص عدّ البكتريا الهوائية بطريقة صب الأطباق وطريقة النشر على الطبق، ويُستخدم على نطاق واسع وربما يعطي عدداً أقل من وسط R2A و NWRI agar. ويجب أن يستخدم الوسط الجاف عندما يكون متوفر تجارياً وكذلك يمكن تحضيره من المواد الأتية:

Tryptone	5.0 g
Yeast extract	2.5 g
Glucose	1.0 g
Agar	15.0 g
Reagent-grade water	1L

ويجب ضبط ال pH الى ٧+٠,٢ بعد التعقيم بجهاز التعقيم لمدة ١٥دقيقة وبدرجة حرارة ١٢١°م.

ب- **الوسط الزرعي m-HPC agar**: يمكن إستخدامه في فحص عدّ البكتريا الكلية الهوائية في المياه ذات المستويات المنخفضة للمغذيات. مثل مياه الشرب. وهذا الوسط الزرعي يُستخدم لطريقة الترشيح الغشائي فقط. يتوفر الوسط الجاف تجارياً وكذلك يمكن تحضيره من المواد الأتية:

Peptone	20.0 g
Gelatin	25.0 g
Glycerol	10.0 ml
Agar	15.0 g
Reagent-grade water	1 L

عند تحضير الوسط من المواد الأساسية يتم ضبط ال pH الى ٧,٢ بواسطة ١N من NaOH. ويتم تسخينة ببطئ للأذابة الكلية. يضاف ال grycerol ثم يُعقم بدرجة ١٢١°م لمدة ٥ دقائق. الأوساط التجارية يجب ان لاتحتاج الى ضبط الpH . القيمة الحامضية النهائية pH يجب أن تكون ٧,١+٠,٢.

ت- **الوسط الزرعي R2A**: يستخدم هذا الوسط الزرعي في طريقة صب الأطباق و طريقة النشر على الطبق وطريقة الترشيح الغشائي. وإن المغذيات القليلة فيه طوّرت للإستخدام مع مياه الشرب المعالجة لمراقبة الإتجاهات في إنتاج مياه الشرب. ويُمكن لهذا الوسط ولفترة الحضانة الطويلة أن يُحسّن من إسترجاع البكتريا المُجهدة والمتحملة للكلورين. وقد ينتج على هذا الوسط أعداد أكثر من البكتريا التي تظهر على الأوساط الأخرى. ويمكن تحضيره من المواد الأتية:

Yeast extract	0.5 g
Proteose peptone No. 3 or polypeptone	0.5 g
Casamino acids	0.5 g
Glucose	0.5 g
Soluble starch	0.5 g
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	0.3 g
Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4$ _ $7H_2O$)	0.05 g
Sodium pyruvate	0.3 g
Agar	15.0 g
Reagent-grade water	1 L

وعند تحضير الوسط من المواد أعلاه يتم ضبط ال pH الى ٧,٢ بواسطة K_2HPO_4 أو KH_2HPO_4 الصلبة وذلك قبل إضافة الآكار. ويسخن لإذابة الآكار ثم يعقم بدرجة ١٢١°م لمدة ١٥ دقيقة. الأوساط التجارية يجب ان لاتحتاج الى ضبط ال pH بعد التعقيم. القيمة النهائية للحامضية يجب ان تكون ٧,٢+٠,٢.

٤-٦-٥ الحضن:

يتم حضن الأطباق المزروعة بالاوساط الزرعية السابقة كما يلي:

١- وسط plate count agar (PCA) يُحضن بدرجة ٣٥°م لمدة ٤٨+٣ساعات.
٢- وسط m-HPC يُحضن بدرجة ٣٥°م لمدة ٤٨+٣ساعات.
٣- وسط R2A يُحضن بدرجة ٢٠-٢٨°م لمدة ٥-٧أيام.

خلال الحضن يجب المحافظة على الرطوبة داخل الحاضنة وذلك لأن أطباق الآكار يجب أن لاتفقد أكثر من ١٥% من وزنها، وهذه الرطوبة مهمة خاصةً عند إستخدام فترات الحضن الطويلة.

يُمكن وضع إناء فيه ماء في الجزء السفلي للحاضنة، ولكن يجب أن تكون الجدران الداخلية ورفوف الحاضنة ذات جودة عالية مقاومة للصدأ أو من الألمنيوم أو مطلي بأكاسيد الألمنيوم والتي لاتصدأ ولاتتأكسد. أما في حالة عدم إمكانية ترطيب الحاضنة يُمكن وضع الأطباق في أكياس بلاستيكية وإزالة الهواء قدر المُستطاع قبل غلقها.

٤-٦-٦ عد الأطباق وتسجيل النتائج:

أ-عد الأطباق لطريقتي الصب والنشر: يتم عدّ جميع المستعمرات على الطبق المختار بأسرع وقت بعد مدة الحضن. إذا كان لابد من تأجيل العدّ مؤقتاً، يتم حفظ الأطباق في الثلاجة لمدة لا تزيد عن ٢٤ ساعة، على أن لاتكون روتين بالعمل. يتم تسجيل نتائج طبق السيطرة control على التقرير الخاص لكل العينات.

تُعد المستعمرات يدوياً بإستخدام جهاز Quebec colony counter أو مايكافئة بالتكبير، وكذلك يتوفر جهاز عدّ الأطباق الأوتوماتيكي automatic plate-counting والذي يستخدم برنامج الحاسوب لقراءة الطبق وإعطاء النتائج. يُمكن قبول العدّ الأوتوماتيكي عند إجراء تقييم مع طريقة العدّ اليدوي ومقارنة النتائج المحسوبة.

تُعدّ الأطباق التي تعطي من ٣٠ إلى ٣٠٠ مستعمرة لكل طبق. والهدف هو أن هناك على الأقل تخفيف واحد يعطي هذا العدد من المستعمرات، بإستثناء ما هو مبين أدناه.

عادة لايُستخدم حجم عينة أكثر من ٢,٠ مل. ومع ذلك، عندما يكون العدد الإجمالي للمستعمرات النامية من ٢,٠ مل أقل من ٣٠ مستعمرة، تُسجّل النتيجة المقرؤة. ومع هذا الإستثناء، إعتمد فقط على الأطباق التي لديها ٣٠ إلى ٣٠٠ مستعمرة في الطبق.

ويتم حساب العدد البكتيري لكل ملليلتر بواسطة المعادلة التالية:

العدد الكلي للبكتريا CFU/ ml = عدد المستعمرات المحسوبة
الحجم الفعلي للعينة المفحوصة مل

إذا لم يكن هناك طبق يحوي ٣٠ إلى ٣٠٠ مستعمرة، وهنالك طبق أو أكثر يحتوي على أكثر من ٣٠٠ مستعمرة، يتم عدّ الطبق ذو العدد الأقرب الى ٣٠٠ مستعمرة. ويتم الحساب والعدّ على النحو الوارد أعلاه وتُسجل CFU/ ml.

إذا كانت جميع أطباق التخافيف للعينة لا يوجد بها مستعمرات، يتم تسجيل العدد أقل من واحد (<١) مقسوماً على أكبر حجم مستخدم للعينة. على سبيل المثال، إذا لم تنمو مستعمرات من حجم العينة ٠,٠١ مل، يُسجل العدد أقل من ١٠٠ (<١٠٠)خلية مكوّنة لمستعمرة / مل.

إذا كان عدد المستعمرات لكل طبق يتجاوز ٣٠٠، لا تُسجل النتائج بأنها "غير قابلة للعد". فإذا كانت أقل من ١٠ مستعمرات /سم^{٢}، عدّ المستعمرات في ١٣ مربع (من عداد المستعمرة) بوجود توزيع ممثل للمستعمرات. كذلك يُمكن تحديد سبعة مربعات متتالية أفقياً عبر الطبق وستة مربعات متتالية عمودياً، وينبغي الحرص على عدم حساب مربع أكثر من مرة واحدة. يتم حساب المستعمرات المقدرة لكل طبق على النحو التالي:

عند إستخدام طبق ٦٥سم^{٢} (المساحة النموذجية للأطباق الزجاجية) تُضرب عدد المستعمرات المحسوبة في ١٣ سم^{٢} ممثل في خمسة. أما عند إستخدام طبق ٥٧سم^{٢} (المساحة النموذجية للأطباق البلاستيكية) تُضرب مجموع عدد المستعمرات ل١٩ سم^{٢} ممثل في ثلاثة.

عند وجود أكثر من ١٠ مستعمرات لكل سم^{٢} تُعد أربعة مربعات ممثلة ويؤخذ المعدل لكل سم^{٢} ويُضرب في عامل مناسب (٥٧ للأطباق البلاستيكية ذات الإستخدام لمرة واحدة و٦٥ للأطباق الزجاجية) وذلك لتقدير المستعمرات لكل طبق. لاحظ إن القطر الأسمي لكل من الأطباق البلاستيكية والزجاجية هو ١٠٠ملم، لذلك فإن القطر الداخلي للطبق الزجاجي أقرب مايكون لل٩٠ملم، لذلك فإنه عند عدّ البكتريا في الأطباق المزدحمة أكثر من ١٠٠ مستعمرة لكل سم^{٢}

تُسجل النتائج >٦٥٠٠ مقسومة على أصغر حجم عينة للأطباق الزجاجية و >٥٧٠٠ مقسومة على أصغر حجم عينة للأطباق البلاستيكية وتكتب النتيجة (estimated CFU/ml).

إذا كان النمو مفرط في الاطباق، تسجل بأنها "spreaders" (.Spr).

عندما تكون الاطباق غير قابلة للعدّ بسبب فقدان التخفيف، والحادث العرضي، والتلوث، أو أطباق السيطرة control تشير إلى أن الأوساط الزرعية أو غيرها ملوثة، يتم الإبلاغ عنها كحوادث مختبرية "laboratory accident"(LA).

ب. طريقة الترشيح الغشائي: عدّ المستعمرات على ورقة الترشيح بإستخدام المجهر المكبر من ١٠ إلى ١٥مرة. يفضّل وضع الطبق بشكل مائل بزاوية ٤٥ درجة على سطح المجهر وضبط مصدر الضوء عمودياً على المستعمرات. كثافة المستعمرات المثالية لكل طبق هو من ٢٠-٢٠٠ مستعمرة. في حالة أن تكون المستعمرات صغيرة وغير مزدحمة يُمكن قبول حدود أعلى من ٢٠٠ مستعمرة.

تُعد كل المستعمرات على ورقة الترشيح عندما تكون ≤٢ مستعمرة لكل مربع. أما في حالة ٣-١٠مستعمرة لكل مربع يتم عدّ ١٠ مربعات ويُحسب المعدل لكل مربع. وفي حالة ١٠-٢٠ مستعمرة لكل مربع تُحسب خمسة مربعات ويُحسب المعدل لكل مربع. ثم يُضرب المعدل لكل مربع في ١٠٠ ويُقسم على حجم العينة للحصول على مستعمرة / مل (colony/ml).

في حالة أكثر من ٢٠ مستعمرة في المربع تُسجل النتيجة >٢٠٠٠ مقسومة على حجم العينة وتُسجل النتيجة estimated CFU يُستخدم الحساب التقديري فقط عندما تكون المستعمرات موزعة ومنفصلة بدون نشر.

طريقة الحساب وتقرير العدّ: يستخدم مصطلح "وحدة مكونة للمستعمرة" (CFU) لوصف العدّ للطريقة المستخدمة. لذلك تقدم جميع التقارير بوصف colony forming unit كذلك يتم تسجيل الطريقة المستخدمة ، ودرجة حرارة الحضن، والوسط الزرعي المستخدم في التقرير. مثال :

CFU/mL, pour plate method, 35°C/48 h, plate count agar

لحساب العدد الكلي للبكتريا مختلفة التغذية CFU/ml بطريقة صبّ الأطباق وطريقة النشر وطريقة الترشيح الغشائي، يُقسم العدد الكلي للمستعمرات أو المعدل لكل طبق (في حالة زرع أطباق مكررة لنفس التخفيف) على حجم العينة.

تجنب خلق الدقة الوهمية عند حساب الوحدة المكونة للمستعمرة CFU وذلك بتقريب العدد حيث أذا كان الآحاد ٥،٦،٧،٨ و٩ يتم رفع رقم العشرات. وإستخدم الصفر في حالة الآحاد أقل من ٥.

مثال: عند حساب ١٤٢ يتم تسجيل النتيجة ١٤٠، وعند العد ١٥٥ يتم تسجيلها ١٦٠ . ولكن تُسجل رقم ٣٥ في حالة العد ٣٥.

٤-٦-٧ أختيار طريقة الفحص:

وهنالك عدة طرق لقياس العدد الكلي الحي للبكتريا الهوائية:-

أ- طريقة صب الأطباق Pour plate method

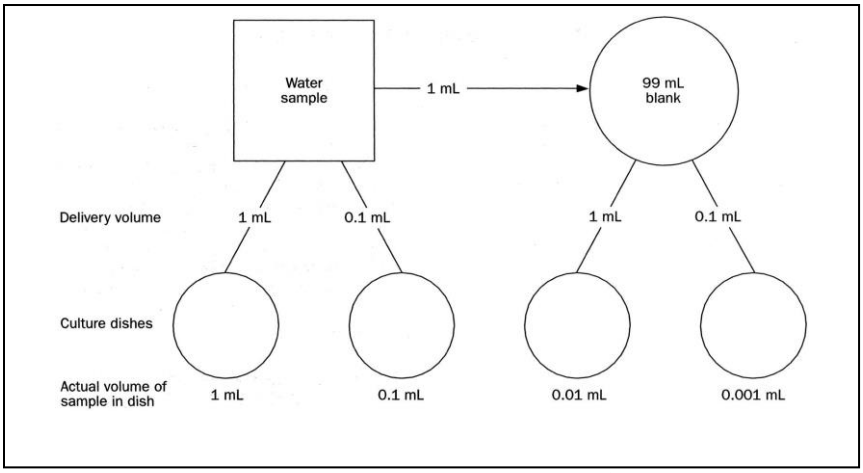
وهي طريقة بسيطة الأداء يمكن أن تستوعب كميات من العينة أو تخافيف العينة تتراوح من ٠,١ الى ٢,٠ مل. المستعمرات النامية صغيرة نسبياً مما يقلل من التنافس فيما بينها مقارنة مع المستعمرات النامية على سطح الوسط . ومن ناحية أخرى، فإن المستعمرات المغمورة غالباً ماتكون أبطأ بالنمو ويصعب نقلها. ولابد من إستخدام حمام مائي للحفاظ على درجة حرارة الآكار الملائمة قبل صبّه في الأطباق.

النمذجة وتحضير العينات: راجع الفقرة ٤-٣

أختيار التخفيف المناسب: أذا أمكن يتم إختيار التخفيف المناسب إعتماداً على المعلومات التاريخية للعينة من نفس الموقع. أو يتم إختيار تخافيف مما تعطي على الأقل طبق واحد يحتوي على ٣٠-٣٠٠وحدة مكونة لمستعمرة (CFU) (لاحظ الشكل ٤-١). لأغلب عينات مياه الشرب يتم صب ١مل و٠,١مل من العينة مباشرةً بدون تخفيف، و١مل من التخفيف$^{-2}$١٠ مما يعطي نتائج قابلة للعد والقراءة.

تجنب تحضير التخافيف وصبّ الأطباق تحت أشعة الشمس المباشرة. وتُستخدم ماصات معقمة لكل عمليات النقل من نفس الحاوية، ماصة لكل تخفيف. أذا تلوثت الماصة قبل إتمام عملية النقل، يتم إبدالها بماصة معقمة. ولمنع حدوث تلوث عند عملية نقل الماصة المعقمة من الحاوية الخاصة بحفظ الماصات، لاتدفع طارف الماصة بقوة الى قعر الحاوية ولا تلامس فوهة وعنق قناني الجمع أو أنابيب التخفيف. ولا تغمر الماصة أكثر من ٢-٣سم تحت سطح العينة أو التخفيف.

يُصّب ٠,١ الى ٢,٠ مل من العينة أو التخفيف في طبق بتري ويتم مسك الماصة بزاوية ٤٥°، مع ملامسة طارف الماصة الى قعر الطبق أو السطح الداخلي لعنق أنبوب التخفيف. ويتم فتح غطاء الطبق بمساحة تكفي لأدخال طرف الماصة فقط.



شكل (٤-١) تحضير التخافيف

يتم إستخدام سلسلة التخافيف عند تحضير تخافيف للعينة أقل من ٠,١مل. كذلك فإنه عن فحص نماذج مياه الصرف الصحي أو المياه ذات العكارة العالية يجب تحضير سلسلة تخافيف من العينة ولايجوز إستخدام ٠,١مل من العينة مباشرة وصبّها في الطبق. وينبغي أن لاتتجاوز المدة عن ٢٠ دقيقة بين تحضير أول تخفيف الى صبّ الوسط في آخر طبق.

وبعد صبّ التخافيف المناسبة في الأطباق يُفتح غطاء الطبق بحذر مما يسمح بصبّ الآكار فقط ويتم إضافة ١٠-١٢مل من الوسط المُغذي الذائب والمحفوظ بدرجة ٤٤-٤٦°م (لمدة لاتتجاوز ٣ساعات) ويتم مجانسة الوسط مع العينة وذلك بتحريك الطبق بشكل دائري الى اليمين والى اليسار. تجنب سكب الوسط خارج حافات الطبق. وعند صبّ الآكار المحفوظ في حمام مائي، يلف السطح الخارجي لقنينة الآكار بمنشفة نظيفة towel وتجنب تقطير الماء على منضدة العمل bench.

وتترك الأطباق الملقحة حتى يتصلب الآكار (لمدة ١٠دقائق) وبعدها يتم حضن الأطباق الملقحة بشكل مقلوب في الحاضنة بدرجة حرارة ٣٥°م على أن لاتزيد عن أربع أطباق عمودية فوق بعضها.

يتم التحقق من تعقيم الأوساط الزرعية ومحلول التخفيف blank بصبّ طبق سيطرة control لكل مجموعة عينات. ويتم تحضير أطباق سيطرة أخرى لتحديد التلوث من الأطباق أو الماصات أو هواء الغرفة.

الحضن: راجع فقرة ٤-٦-٥

عد الأطباق وتسجيل النتائج: راجع فقرة ٤-٦-٦

ب- طريقة النشر على الطبق Spread plate method

إن طريقة النشر على الطبق لاتسبب صدمة حرارية للبكتريا، وجميع المستعمرات تكون على سطح الآكار مما يسمح للمُحلل تمييزها بسهولة عن الفقاعات والجسيمات الأخرى في الآكار ورؤية الأختلاف المورفولوجي للمستعمرات. كذلك يُمكن نقل المستعمرات بسرعة وتمييزها مورفولوجياً ومقارنتها مع صفات المستعمرات المنشورة. لكن هذه الطريقة تقتصر على حجم صغير من العينة أوالتخفيف التي يمكن إمتصاصها من قبل الآكار وهي ٠.١ الى ٠.٥ مل، إعتماداً على درجة تجفيف الوسط.

النمذجة وتحضير العينات: راجع الفقرة ٤-٣

تخفيف العينة: راجع طريقة صبّ الأطباق ٤-٦-٧أ والشكل (٤-١).

الأوساط المستخدمة: يُمكن إستخدام وسط Plate count agar أو وسط R2A وعند إستخدام وسط R2A وللحصول على أفضل نتائج تُحضن الأطباق المُلقحة بدرجة حرارة ٢٨°م لمدة ٥-٧ أيام. راجع فقرة ٤-٤-٤.

تحضير الأطباق: يتم صبّ ١٥مل من الوسط المستخدم في طبق بتري معقم ١٠٠*١٥ملم أو ٩٠*١٥ملم ويترك الى أن يتصلب الآكار. تُستخدم الأطباق مباشرةً بعد التجفيف أو يتم حفظها في كيس بلاستيكي مُحكم داخل ثلاجة بدرجة حرارة ٢-٨°م لمدة إسبوعين. في حالة تجفيف الأطباق وإستخدامها في نفس اليوم، يتم صب ٢٥مل من وسط الآكار في طبق بتري وتجفف في Laminar flow hood بدرجة حرارة الغرفة (٢٤-٢٦°م) مع غلق الغطاء للحصول على فقدان الوزن المطلوب (٢-٣ غم).

طريقة العمل:

تحضير التخافيف راجع طريقة صبّ الأطباق شكل (٤-١).

يتم تلقيح الأطباق المجففة مُسبقاً بحجم ٠,١ أو ٠,٥مل من العينة بإستخدام ماصة معقمة، حيث يتم صبّ العينة على سطح طبق الآكار المجفف ثم تُستخدم عصا زجاجية على شكل حرف L (يمكن استخدام عصا بلاستيكية نوع الإستعمال الواحد) لنشر العينة على سطح الآكار بحركة دائرية. ويُترك الطبق حتى يتم إمتصاص العينة بالكامل من قبل الآكار، ثم يتم حضنها بشكل مقلوب في الحاضنة Incubator.

الحضن: راجع فقرة ٤-٦-٥

عدّ وتسجيل النتائج: راجع فقرة ٤-٦-٦

ت- طريقة الترشيح الغشائي membrane filter method

تسمح هذه الطريقة بإختبار كميات كبيرة من المياه المنخفضة العكارة، وهي الطريقة المفضلة للمياه منخفضة العدد البكتيري (من ١ الى ١٠ وحدة مكونة مستعمرة لكل ١مل) وهذه الطريقة لاتنتج صدمة حرارية للبكتريا ولكن تُضيف حساب كلفة المرشح الغشائي. وتشمل العيوب الأخرى مثل صغر المساحة لتطور ونمو المستعمرات، والحاجة للكشف عن المستعمرات بواسطة إنعكاس الضوء على خلفية بيضاء أذا لم يتم إستخدام المرشحات الملونة او صبغات التباين، وإحتمالية تحطيم الخلايا بسبب ضغط الترشيح المفرط والتغيرات المحتملة في نوعية الفلتر الغشائي.

النمذجة وتحضير العينات: راجع الفقرة ٤-٣

الأوساط الزرعية المستخدمة: يُمكن إستخدام الوسط الزرعي m-HPC أو الوسط R2A راجع فقرة ٤-٦-٤

تحضير الأطباق: تُوزع ٥مل من الوسط المُستخدم m-HPC أو R2A والمُعقم في أطباق بتري بحجم ٥٠*٩ملم. ويترك الآكار ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة. ويُمكن حفظ الأطباق المحضرة بشكل مقلوب في حاضنة أطباق container مُحكمة الغلق في الثلاجة بدرجة حرارة ٢-٨°م لمدة لاتزيد عن إسبوعين.

حجم العينة: يختلف حجم العينة المُرشح حسب خواصها، ويُختار أكبر حجم عينة يُعطي ٢٠-٢٠٠ وحدة مكونة لمستعمرة CFU الى حجم العينة المُرشح.

الطريقة: بإستخدام مضخة يُرشح الحجم المُختار من العينة بإستخدام ورق ترشيح معقم ٤٧ملم، وحجم ثقوبه ٤٥ مايكرومتر. ويُغسل قمع الترشيح ثلاث مرات ب ٢٠-٣٠مل من محلول التخفيف dilution water المُعقم. وفي بيئة معقمة تؤخذ ورقة الترشيح بواسطة ملقط معقم باللهب وتوضع على وسط الآكار بطبق بتري. تُوضع ورقة الترشيح بحذر ويتم تحريكها بصورة دائرية من جانب الى آخر لمنع تكوّن الفقاعات أسفلها.

الحضن: راجع فقرة ٤-٦-٥

عدّ وتسجيل النتائج: راجع فقرة ٤-٦-٦

٤-٧ بكتريا القولون الكلية Total coliform

استخدمت بكتريا القولون منذ فترة طويلة كمؤشرات على نوعية المياه على أساس فرضية إن هذه البكتريا تعيش بصورة طبيعية في أمعاء الحيوانات ذات الدم الحار، وإن وجودها في الماء يُشير الى وجود تلوث برازي حديث. عرفت هذه البكتريا تاريخياً من خلال قدرتها على تخمير اللاكتوز وليس من خلال علم البكتريولوجي وهي مجموعة تتكون من عدة أجناس تنتمي الى عائلة Enterobacteriaceae.

بكتريا القولون هي بكتريا لاهوائية إختيارية، سالبة لصبغة غرام، غير مكونة للسبورات، بكتريا عصوية الشكل مخمرة للاكتوز مع إنتاج غاز وحامض بوجود صبغة الصفراء وذلك خلال ٤٨ساعة وبدرجة ٣٥°م.تُستخدم طريقة الأنابيب التخمرية المتعددة للكشف عن بكتريا القولون في مياه الشرب ولعدّ بكتريا القولون في مياه الشرب والمياه الخام. وعند إستخدام الأنابيب التخمرية المتعددة فإن كثافة بكتريا القولون تُقدر بواسطة جدول العدد الأكثر إحتمالية Most Propable Number (MPN) table. وإن نتائج فحص TC مع المعلومات الإضافية المستحصلة من المهندسين والمسوحات الصحية تُعطي أفضل تقييم لفاعلية معالجة المياه والنوعية الصحية لمصدر الماء.

وهنالك عدة طرق لقياس بكتريا القولون الكلية، منها:-

٤-٧ أولاً: طريقة الأنابيب التخمرية المتعددة لعدّ البكتريا القولونية Total coliform (TC)

١- فحص الجودة لمياه الشرب

عند تحليل مياه الشرب لبيان جودتها يجب تحليل ١٠٠ مل من المياه بإستخدام تقنية الأنابيب التخمرية المتعددة وتكون أما ١٠ مكررات من الأنابيب كل منها يحوي ١٠ مل أو ٥مكررات من الأنابيب كل منها يحوي ٢٠ مل أو أنبوب أو قنينة واحدة تحوي ١٠٠ مل من العينة. كذلك فإنه عند فحص مياه الشرب بهذه الطريقة يُجرى الفحص التأكيدي لجميع الأنابيب التي تُظهر نمو مع أو بدون وجود حامض أو غاز. كل العينات التي تُظهر نتيجة موجبة لفحص TC يجب أن يتم إجراء فحص FC أو *E. coli* لها.

إن الهدف من الفحص الروتيني لشبكة إمدادات مياه الشرب هو تحديد كفاءة عمليات المعالجة لمحطات تنقية مياه الشرب وسلامة أنظمة التوزيع، كذلك يُستخدم هذا الفحص للكشف عن وجود التلوث البرازي لأنظمة التوزيع نتيجة التكسرات فيها. وفي بعض الحالات قد يُعزى وجود بكتريا القولون Total coliform في أنظمة توزيع مياه الشرب نتيجة الى نمو بكتريا القولون أو بقاءها داخل الأغشية الحيوية البكتيرية Biofilm في الأنابيب الرئيسية وليس بسبب فشل عمليات المعالجة في محطات تنقية مياه الشرب أو المصدر المائي أو التلوث من مصدر خارجي. ولانه من الصعب التمييز بين بكتريا القولون التي تدخل أنظمة التوزيع للمياه وبكتريا القولون الموجودة بالفعل داخل الأغشية الحيوية البكتيرية للأنابيب والرواسب لذلك نفترض إن كل البكتريا القولونية هي من خارج أنظمة توزيع المياه.

٢- فحص الجودة للمياه الخام

عند فحص أو تحليل المياه تُحقن سلسلة من الأنابيب بتخافيف عشرية مناسبة من عينة المياه (مضاعفات ال ١٠ مل) وذلك على أساس كثافة البكتريا المتوقعة. تُستخدم طريقة الأنابيب التخمرية المتعددة كفحص أفتراضي أما الفحص التأكيدي فيُستخدم كسيطرة نوعية quality control على ١٠% من عينات المياه كل ثلاثة أشهر.

بشكل عام فإن الهدف من تحليل المياه الخام هو تقدير الكثافة البكتيرية وتحديد مصدر التلوث وفرض معايير جودة المياه أو تتبع بقاء البكتريا. وتُستخدم طريقة الأنابيب التخمرية المتعددة للحصول على قيم إحصائية صحيحة لل MPN والتي تمثل تقدير كثافة البكتريا القولونية.

ويجب فحص عدد من عينات المياه للحصول على نتائج ممثلة لموقع أخذ العينات. وبشكل عام فإن قيمة المتوسط للنتائج لعدد من العينات سوف يُعطي قيمة أفضل لأنه يقلل تأثير التباين من عينة الى أخرى.

٣- عينات أخرى

أن طريقة الأنابيب التخمرية المتعددة قابلة للتطبيق على المياه المالحة والمويلحة وكذلك الطين والرواسب والحمأة. جمع النماذج وإستخدام قناني جمع العينات كما هو مذكور سابقاً. كذلك بالنسبة لأحجام العينات وأعداد أنابيب التخفيف.

عند تحضير العينات الصلبة وشبه الصلبة، تُوزن العينة يُضاف محلول التخفيف للحصول على تخفيف 10^{-1} ، على سبيل المثال نضع ٣٠ غم من العينة في خلاط معقم ونضيف ٢٧٠مل من محلول phosphate buffered المعقم أو ٠,١% من pepton dilution water ثم نمزج لمدة ١-٢ دقيقة بسرعة ٨٠٠٠ دورة/دقيقة. تُحضر التخافيف العشرية المناسبة من الطين بأسرع وقت ممكن للحدّ من ركود العينة.

٤-٧-١طريقة الأنابيب التخمرية المتعددة لتحليل Total coliform

أ- العينات samples: كما موضح في فقرة ٤-٣.

تُستخدم الأوساط الجافة أذا أمكن ذلك ويجب التأكد من المكونات الاولية للوسط أن تكون متوافقة مع مكونات الوسط المبينة لاحقاً. ويمكن تخزين الأوساط التخمرية المحضرة في أنابيب أو قناني ذات غطاء محكم لأكثر من ثلاثة أشهر وذلك بدرجة حرارة ١-٣٠ °م في الظلام وبنسبة تبخر أقل من ١٠% من الحجم الأصلي.

عند حفظ الأنابيب في الثلاجة بعد تعقيمها، فيجب ان تترك لمدة ٢٤ ساعة (overnight) بدرجة حرارة الغرفة ٢٠°م قبل الإستخدام. والأنابيب التي تظهر نمو أو فقاعات يجب التخلص منها لتجنب النتائج الموجبة الكاذبة. ولأثبات قبول كفاءة الأوساط يجب عمل فحص سيطرة موجبة وسالبة للأوساط قبل الأستخدام الأول.

ب- الفحص الأفتراضي:-

١- **الوسط الزرعي:** يُستخدم وسط Lauryal tryptose broth في أنابيب الأختبار المتعددة للفحص الأفتراضي، وأذا لم يتوفر يمكن تحضيره من المواد الآتية:

Tryptose	20.0 g
Lactose	5.0 g
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	2.75 g
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	2.75 g
Sodium chloride (NaCl)	5.0 g
Sodium lauryl sulfate	0.1 g
Reagent-grade water	1 L

تُضاف المواد الجافة الى الماء وتُخلط جيداً وتُسخن حتى الأذابة. قبل التعقيم تُوزع في أنابيب تخمرية تحتوي إنبوب صغير موضوع بشكل مقلوب (يسمى Durham tube). كذلك يُمكن الإستغناء عن إنبوبة درهم وذلك بأضافة ٠,٠١ غم/لتر من صبغة bromocresol purple (لتحديد أنتاج الحامض والدلالة على النتيجة الموجبة في هذا الفحص). تغلق الأنابيب بغطاء معدني أو بلاستيكي مقاوم للحرارة.

عند تحضير وسط Lauryal tryptose broth يجب الأنتباه الى تركيزه بشكل كافي وذلك لأنه عند أضافة ١٠٠ أو ٢٠ أو ١٠ مل من العينة الى الوسط يجب أن لايقل تركيز الوسط. مما يعني إنه يتم تحضير وسط مركز مرتين double concentrated في حالة أضافة ١٠ أو ١٠٠مل من العينة، وتحضير وسط مركز ثلاث مرات triple concentrated في حالة إضافة ٢٠ مل من العينة.

يتم تعقيم الأوساط بجهاز الموصدة Autoclave بدرجة حرارة ١٢١°م لمدة ١٢-١٥ دقيقة. يجب التأكد أن تكون إنبوبة درهم (في حالة إستخدامها) خالية من الفقاعات. و pH الوسط يجب أن يكون ٦,٨ +٠,٢ بعد التعقيم.

٢- طريقة العمل:-

ترتب كل خمسة أو عشرة أنابيب تخمرية كصفوف. عدد الأنابيب وأحجام العينات المُستخدمة يعتمد على نوعية وصفات المياه المراد تحليلها. لمياه الشرب يجب تحليل ١٠٠ مل وذلك بإستخدام خمسة أنابيب كل منها يحوي ٢٠ مل من الوسط ثلاثي التركيز ويُضاف ٢٠ مل من العينة لكل منها أو ١٠ أنابيب كل منها يحوي ١٠ مل من الوسط ثنائي التركيز ويضاف ١٠ مل من العينة لكل منها أو قنينة واحدة تحوي ١٠٠ مل من الوسط ثنائي التركيز ويُضاف ١٠٠ مل من العينة. أما عينات المياه الخام (غير مياه الشرب) يُستخدم خمسة أنابيب لكل تخفيف (١٠، ١، ٠,١ مل).

عند تحضير التخافيف وقياس حجم العينة المخفف (تتبع النصائح في طريقة صبَّ الأطباق). ويُستخدم الشكل (٤-١) كدليل لتحضير التخافيف. تُرّج العينة والتخافيف جيداً لمدة ٥ ثواني (٢٥ مرة). ويتم تلقيح كل خمسة أنابيب بنفس حجم العينة وتزداد بتخافيف عشرية لكل خمسة أنابيب.

يتم حضن الأنابيب الملقحة وأنابيب السيطرة وسيطرة التعقيم في ٣٥+ ٠,٥ °م. بعد ٢٤ + ٢ ساعة يتم رّج كل أنبوب بهدوء وفحص وجود نمو أو غاز و/أو حامض. في حالة عدم وجود غاز أو حامض يعاد حضن الأنابيب وأعادة فحصها بعد نهاية ٤٨ + ٣ ساعة. يتم تسجيل وجود أو عدم وجود نمو أو غاز و/ أو حامض. في حالة عدم إستخدام إنبوبة درهم فإن النمو بوجود الحامض (ظلال من اللون الأصفر) يدل على إيجابية الفحص الأفتراضي.

٣- قراءة النتائج:

ان وجود الفعل الحامضي (لون أصفر) و/أو الغاز في الأنابيب في غضون ٤٨ + ٣ ساعة يعني نتيجة إيجابية للفحص الإفتراضي. وكل الأنابيب التي أعطت نتيجة موجبة للفحص الإفتراضي يُجرى عليها الفحص التأكيدي.

أما عدم وجود فعل حامضي و/أو غاز في غضون ٤٨ + ٣ ساعة يعني نتيجة سالبة للفحص. بالنسبة لعينات مياه الشرب فيتم إجراء الفحص التأكيدي للأنابيب التي تُظهر نمو بدون ظهور غاز أو فعل حامضي.

٤-٧-١-ج الفحص التأكيدي:-

١- الوسط الزرعي:

يُستخدم الوسط Brilliant green lactose bile broth (BGLB broth) في أنابيب الإختبار التخمرية. وإذا لم يتوفر يُمكن تحضيره من المواد لآتية:

Peptone	10.0 g
Lactose	10.0 g
Oxgall	20.0 g
Brilliant green	0.0133 g
Reagent-grade water	1 L

تُضاف المواد الجافة الى الماء وتُخلط جيداً وتُسخن حتى الإذابة. قبل التعقيم يتم توزيع الوسط في أنابيب تخمرية تحتوي إنبوب صغير موضوع بشكل مقلوب (Durham tube) وينبغي التأكد أنه حجم الوسط مناسب لغمر نصف الى ثلثي الدرهم تيوب بعد التعقيم. تُغلق الأنابيب بغطاء معدني أو بلاستيكي مقاوم للحرارة.

يتم تعقيم الأوساط بجهاز الموصدة Autoclave بدرجة حرارة ١٢١°م لمدة ١٢-١٥ دقيقة. يجب التأكد من إنبوبة درهم خالية من الفقاعات. وpH الوسط يجب أن تكون ٧,٢ +٠,٢ بعد التعقيم.

٢- طريقة العمل:

يتم إجراء الفحص التأكيدي لكل الأنابيب التخمرية في الفحص الأفتراضي التي أظهرت نمو أو غاز أو حامض بعد ٢٤+ ٢ ساعة. وكذلك بالنسبة للأنابيب التي تم إعادة حضنها لنهاية ٤٨+ ٣ ساعة وأظهرت نمو أو غاز أو حامض.

يتم رّج أنابيب الفحص الأفتراضي التي أظهرت نتيجة موجبة بهدوء وذلك لإعادة تجانس البكتريا. وبواسطة حاقن Loop ذو قطر ٣-٣,٥ ملم يتم نقل مرة أو أكثر من الأنبوب الموجب للفحص الأفتراضي الى أنبوبة التخمرية تحوي وسط BGLB. وبدل ذلك يُمكن إستخدام عود خشبي معقم وغمره في الزرع على الاقل ٢,٥سم، ثم غمره في قعر الأنبوبة التخمرية التي تحوي وسط BGLB. وتكرر العملية لكل الأنابيب الموجبة على أن يتم تعقيم الloop كل مرة أوتبديل العود الخشبي في كل مرة.

يمكن للمحلل المختبري أن يحقن أنابيب BGLB لفحص بكتريا القولون الكلية total coliform و أنابيب تحوي وسط EC broth لفحص بكتريا thermotoleramt (fecal) coliform أو وسط EC-MUG broth لفحص بكتريا *Escherichia coli*. في حالة إستخدام نفس ال loop أو العود الخشبي لحقن أكثر من وسط فيجب حقن الوسط الأكثر تثبيطاً (BGLB) في الأخير.

أنابيب BGLB broth الملقحة يتم حضنها بأسرع وقت بدرجة حرارة ٣٥+٠,٥ °م. إن وجود أي كمية من الغاز في إنبوبة درهم في أي وقت خلال ٤٨+ ٣ ساعة يعني نتيجة موجبة للفحص التأكيدي. ولتقدير كثافة بكتريا القولون يتم حساب العدد الأكثر احتمالاً MPN من الأنابيب الموجبة حسب الجداول (٤-٢) أو (٤-٣) وذلك حسب حجم العينة المُستخدم. أو جدول (٤-٤) في حالة إستخدام التخافيف..

٤-٧-١-د المرحلة التكميلية:

ان المرحلة التكميلية غير مطلوبة في تحليل عينات مياه الشرب. أما عينات المياه الخام التي تم جمعها حسب تعليمات المياه النظيفة فأن ١٠% من العينات (الأنابيب) التي تعطي نتيجة موجبة لفحص بكتريا القولون الكلية total coliform يجب إجراء المرحلة التكميلية عليها موسمياً.

يتم إجراء المرحلة التكميلية كتوصية لمراقبة الجودة quality control ويُستخدم عندما تكون النتائج غير مؤكدة. كذلك يتطلب إجراء فحص thermotolerant (fecal) coliform و/أو *E. coli* لفحص ال total coliform الموجب، وإن إستخدام EC broth و أو EC-MUG broth تُعتبر إختبارات تكميلية. ولغرض مراقبة الجودة QC فإنه عند عدم ظهور نتيجة موجبة لمياه الشرب لمدة ثلاثة اشهر فيجب تحليل عينة واحدة على الأقل لعينات مياه المصدر وذلك للتأكد من إستجابة الأوساط الزرعية بشكل مناسب.

وللتحقق من وجود البكتريا القولونية coliform وتوفير البيانات لمراقبة الجودة بالنسبة للمياه الخام يتم إجراء الفحص التكميلي كل ثلاثة أشهر لعينة موجبة واحدة على الأقل، وإذا لم تظهر عينة موجبة خلال الثلاثة أشهر يمكن تطبيق مراقبة الجودة QC بإستخدام عينة موجبة معلومة.

يُمكن للمحلل المختبري أن يحقن الأوساط الإفتراضية الموجبة في BGLB للفحص التأكيدي لل total coilform و يحقن وسط EC broth لفحص thermotolerant (fecal) coliform و/ او EC-MUG broth لفحص ال *E.coli* على أن يتم تلقيح وسط BGLB في الأخير. إن النتيجة الموجبة لحضن الأوساط EC broth و/أوEC-MUG broth في درجات الحرارة المرتفعة ٤٤,٥+٠,٢°م يُعتبر فحص تكميلي.

وكطريقة بديلة تُستخدم فقط للمياه الملوثة أو مياه الصرف الصحي والمعروفة بأنها تعطي نتائج موجبة بإستمرار. إذا كانت كل أنابيب الفحص الأفتراضي موجبة في إثنين أو أكثر من التخفيفات المتتالية خلال ٢٤ساعة فعندئذ يُمكن إجراء الفحص التأكيدي للأنابيب ذات الخفيف الأعلى فقط (حجم العينة الأقل) والتي تكون جميع أنابيبها موجبة للفحص الأفتراضي الى جانب أي أنابيب موجبة في التخفيف الأعلى التالي. ويتم إجراء الفحص التأكيدي لكل الأنابيب التي أظهرت غاز أو حامض خلال ٢٤-٤٨ساعة.

في حالة إيجابية الفحص لوسط BGLB broth وسلبية الفحص للأوساط EC broth و/أوEC-MUG broth فذلك يدل على وجود بكتريا القولون غير المعدية nonfecal coliform. أما في حالة إيجابية الفحص للأوساط EC broth و/أوEC-MUG broth وسلبية الفحص للوسط BGLB broth فذلك يدل على وجود thermotolerant (fecal) coliform أو*E.coli* بالتوالي.

وهنالك طريقة بديلة للمرحلة التكميلية للفحص الموجب لبكتريا القولون positive total coliform وذلك باستخدام وسط LES Endo agar ووسط MacConkey agar حيث يتم تحضير الأوساط حسب تعليمات الشركة المصنعة وتعقيمها بجهاز الموصدة Autoclave بدرجة حرارة ١٢١°م لمدة ١٥ دقيقة، ويتم تبريدها لدرجة ٤٥° م وتصب في أطباق petri (١٠٠*١٥ملم) ويتم ضبط ال pH الى ٧,١+٠,٢ بعد التعقيم. وكذلك يتم تحضير Nutrient agar حسب تعليمات الشركة المصنعة ويُوزع في أنابيب إختبار ذات غطاء مُحكم وتُعقم بجهاز الموصدة Autoclave بدرجة حرارة ١٢١°م لمدة ١٥ دقيقة، ويتم ضبط ال pH الى ٦,٨+٠,٢ بعد التعقيم. ويتم وضع الأنابيب بصورة مائلة وذلك لتصلب الآكار ويكون سطح مائل، وبعد أن يتصلب الآكار يتم غلق الأنابيب وتحفظ في مكان بارد.

نأخذ كل إنبوب موجب للفحص الإفتراضي BGLB broth بأسرع وقت ممكن بعد تكون الغاز ونعمل منه تخطيط على وسط LES Endo agar أو وسط MacConkey agar. وللحصول على مستعمرات نقية مفصولة عن بعضها بمسافة ٠,٥سم على الأقل، يتم إتباع طريقة التخطيط المتتالي.

وللحصول على عزلات ناجحة في حالة وجود بكتريا القولون يتم إتباع مايلي:

- إستخدام ناقل loop معقم ذو حلقة قطرها ٣ملم أو إستخدم أبرة تطعيم ذات نهاية منحية قليلاً.
- وضع الأنبوبة التخمرية بشكل مائل وذلك لتجنب أخذ أي أغشية أو زبد متكون على سطح الوسط.
- يتم إدخال نهاية الناقل loop أو الأبرة needle في الوسط بعمق ٠,٥ سم تقريباً.
- يتم التخطيط على الأطباق مع وضع الناقل او الأبرة بشكل مائل على الآكار وذلك لمنع خدش سطح الآكار.
- يتم تعقيم الناقل أو الأبرة باللهب بين كل تخطيط وآخر لنفس الطبق وذلك لتحسين العزل للمستعمرات.

يتم حضن الأطباق بشكل مقلوب وبدرجة حرارة ٣٥°م لمدة ٢٤+٢ ساعة.

يكون شكل المستعمرات النموذجية على وسط LES Endo agar وردي الى أحمر داكن مع سطح معدني أخضر لماع. أما المستعمرات غير النموذجية فتكون مستعمرات وردية او أحمر أو ابيض أو عديمة اللون بدون لمعة. وذلك بعد ٢٤ ساعة من الحضن. أما المستعمرات المخمرة للاكتوز النامية على وسط MacConkey agar تكون حمراء ويمكن ان تكون محاطة بهالة (منطقة) معتمة لترسّب مادة الصفراء bile.

يتم إختيار مستعمرة نموذجة واحدة أو أكثر (معزولة جيداً) من كل طبق أو في حالة عدم وجود مستعمرات نموذجية يتم إختيار مستعمرتين أو أكثر من المستعمرات المرجح أن تكون قولونية، ويتم نقل جزء من نمو المستعمرة النموذجية الى وسط Lauryal tryptose broth أحادي التركيز في إنبوب إختبار تخمري ونقل جزء آخر من المستعمرة النوذجية الى وسط Nutrient agar المائل.

عند نقل المستعمرات يتم إختيار مستعمرة معزولة جيداً ويتم ملامسة سطح المستعمرة فقط بال loop أو الأبرة المعقمة باللهب والمبردة وذلك للتقليل من خطر نقل مستعمرات مختلطة.

يتم حضن الأنابيب Lauryal tryptose broth الحاوية على إنبوبة درهم بدرجة حرارة ٣٥+٥,٥°م لمدة ٢٤+٢ ساعة. وإذا لم يظهر غاز بعد ٢٤+٢ ساعة يتم إعادة الحضن الى ٤٨ +٣ ساعة. ثم يتم إجراء فحص صبغة غرام للأنابيب التي تظهر غاز في سط Lauryal tryptose broth ولكن يتم إجراء صبغة غرام من المستعمرات النامية على وسط nutrient agar المائل المقابلة لوسط Lauryal tryptose broth.

تقنية صبغة غرام:

يمكن حذف الأختبار التكميلي بصبغة غرام لفحص عينات مياه الشرب فقط وذلك لإن البكتريا الموجبة لصبغة غرام والكائنات الحية الدقيقة المكونة للسبورات نادراً ما تستطيع البقاء في مياه الشرب.

توجد تعديلات متنوعة لصبغة غرام يُستخدم تعديل Huker's كما موضح لتصبيغ مسحة من المستعمرات النقية، وتتضمن صبغة للبكتريا الموجبة وصبغة للبكتريا السالبة كسيطرة.

تُؤخذ شريحة slide واحدة ويتم تحضير مسحة خفيفة من النمو البكتيري المراد فحصه ومسحتين أحدهما موجبة وأخرى سالبة لصبغة غرام من مستعمرات سيطرة، وذلك بإستخدام قطرات من الماء المقطر على الشريحة. تُترك المسحة لتجف في الهواء ثم تثبت بتمريرها على اللهب ثم تصبغ لمدة دقيقة واحدة بصبغة ammonium oxalacrytal violet solution. بعد دقيقة تُغسل الشريحة بماء الحنفية وبعدها يتم تصبيغها ب lugol's solution لمدة دقيقة.

تُغسل الشريحة بماء الحنفية. ويتم إزالة اللون بواسطة تمرير ال acetone alcohol على الشريحة لمدة ١٥-٣٠ ثانية، حتى يكون المحلول المتدفق عديم اللون. ولا تزيد عن ذلك. ثم يتم إضافة صبغة ال safranin لمدة ١٥ ثانية وبعدها تغسل بماء الحنفية وتجفف بورق ماص أو بالهواء الجاف. وتكون الشريحة جاهزة للفحص بالمجهر.

البكتريا الموجبة لصبغة غرام تظهر باللون الأزرق أما البكتريا السالبة لصبغة غرام فتظهر باللون الأحمر. وهذه النتائج تكون مقبولة فقط عندما تعطي مستعمرات السيطرة الموجبة والسالبة نتائج مطابقة.

التفسير: تكوّن الغاز في الإنبوب الثانوي لوسط lauryal tryptose broth بعد ٤٨+ ٣ ساعة والفحص المجهري يُظهر بكتريا سالبة لصبغة غرام وغير مكونة للسبورات وذات شكل عصوي (من وسط ال nutrient agar المقابل للفحص الموجب للأنابيب في الفحص التكميلي) فذلك يدل على وجود عدد من مجموعة بكتريا القولون total coliform.

٤-٧-١ هـ تقدير الكثافة البكتيرية

١- الدقة precision لإختبار الأنابيب التخمرية المتعددة:

إن إختبار الأنابيب التخمرية المتعددة ليس دقيق جداً إلا إذا تم فحص العديد من أجزاء العينة، لذلك توخى الحذر عند تفسير الدلائل الصحية لأي نتيجة مفردة للبكتريا القولونية. تتحسن دقة الفحص بشكل كبير عندما يتم فحص عدة عينات من نفس النقطة وبشكل منفصل وبعدها يتم تقدير المتوسط الحسابي لها.

على الرغم من أن جداول العدد الأكثر إحتمالاً MPN وحساباتها تُستخدم لفحص بكتريا القولون إلا أنه يُمكن تحديد العدد الأكثر إحتمالاً لجميع الأحياء الدقيقة في حالة توفر الأوساط المناسبة للفحص.

٢- إستخدام الجداول لتحديد العدد الأكثر إحتمالية:

تُسجل تراكيز بكتريا القولون بصورة العدد الأكثر إحتمالية MPN/١٠٠مل (MPN/100 ml). وإن قيمة العدد الأكثر إحتمالية MPN لمجموعة الأنابيب الموجبة والسالبة موضح بالجداول رقم (٤-٢) و(٤-٣) و(٤-٤) . وإن أحجام العينات المُختارة الخاصة بفحص مياه الشرب مبينة بالجدول رقم (٤-٢) و(٤-٣). أما الجدول رقم (٤-٤) فيوضح قيمة العدد الأكثر إحتمالية MPN للنتائج المترافقة الموجبة والسالبة عند إستخدام تخافيف ١٠ مل و١ مل و٠,١ مل من حجم عينة المياه الخام. إذا كان إستخدام أحجام عينات مماثلة لأحجام العينات في الجدول (١٠، ١، ٠,١ مل) فتُسجل القيمة المقابلة للنتائج الموجبة والسالبة المترافقة بصورة MPN/١٠٠مل (MPN/100 ml) ومع ذلك إذا كانت سلسلة التخافيف مختلفة عن ذلك، فنختار قيمة MPN من الجدول والمقابلة للنتائج الموجبة والسالبة وتحسب الMPN الحقيقية بإستخدام المعادلة التالية:

$$\text{MPN/100 mL} = (\text{Table MPN/100 mL}) \times 10/V$$

حيث إن V= حجم جزء العينة لأقل تركيز من التخافيف.

جدول رقم (٤-٢) العدد الأكثر إحتمالية MPN للأنابيب الموجبة عند إستخدام حجم ١٠مل من العينة وخمسة أنابيب أختبار

Number of Tubes Giving Positive Reaction (10 ml each)	MPN Index/ 100 ml
0	<1.1
1	1.1
2	2.6
3	4.6
4	8.0
5	>8.0

جدول رقم (٤-٣) العدد الأكثر إحتمالية MPN للأنابيب الموجبة عند إستخدام حجم ١٠مل من العينة و ١٠ أنابيب أختبار

Number of Tubes Giving Positive Reaction (10 ml each)	MPN Index/ 100 ml
0	<1.1
1	1.1
2	2.2
3	3.6
4	5.1
5	6.9
6	9.2
7	12
8	16
9	23
10	>23

جدول رقم (٤-٤) العدد الأكثر إحتمالية MPN للأنابيب الموجبة عند إستخدام سلسلة تخافيف من العينة، خمسة أنابيب لكل تخفيف (١,٠مل ، ١مل، ١٠مل)

Combination of Positives	MPN Index/ 100ml	Combination of Positives	MPN Index/ 100ml	Combination of Positives	MPN Index/ 100ml	Combination of Positives	MPN Index/ 100ml
0-0-0	<1.8	2-2-0	9.3	4-0-3	25	5-1-3	84
0-0-1	1.8	2-2-1	12	4-1-0	17	5-2-0	49
0-1-0	1.8	2-2-2	14	4-1-1	21	5-2-1	70
0-1-1	3.6	2-3-0	12	4-1-2	26	5-2-2	94
0-2-0	3.7	2-3-1	14	4-1-3	31	5-2-3	120
0-2-1	5.5	2-4-0	15	4-2-0	22	5-2-4	150
0-3-0	5.6	3-0-0	7.8	4-2-1	26	5-3-0	79
1-0-0	2.0	3-0-1	11	4-2-2	32	5-3-1	110
1-0-1	4.0	3-0-2	13	4-2-3	38	5-3-2	140
1-0-2	6.0	3-1-0	11	4-3-0	27	5-3-3	170
1-1-0	4.0	3-1-1	14	4-3-1	33	5-3-4	210
1-1-1	6.1	3-1-2	17	4-3-2	39	5-4-0	130
1-1-2	8.1	3-2-0	14	4-4-0	34	5-4-1	170
1-2-0	6.1	3-2-1	17	4-4-1	40	5-4-2	220
1-2-1	8.2	3-2-2	20	4-4-2	47	5-4-3	280
1-3-0	8.3	3-3-0	17	4-5-0	41	5-4-4	350
1-3-1	10	3-3-1	21	4-5-1	48	5-4-5	430
1-4-0	10	3-3-2	24	5-0-0	23	5-5-0	240
2-0-0	4.5	3-4-0	21	5-0-1	31	5-5-1	350
2-0-1	6.8	3-4-1	24	5-0-2	43	5-5-2	540
2-0-2	9.1	3-5-0	25	5-0-3	58	5-5-3	920
2-1-0	6.8	4-0-0	13	5-1-0	33	5-5-4	1600
2-1-1	9.2	4-0-1	17	5-1-1	46	5-5-5	>1600
2-1-2	12	4-0-2	21	5-1-2	63		

إذا كانت سلسة التخافيف العشرية تتضمن أكثر من ثلاث تخافيف، إستخدم الإرشادات التالية لإختيار أنسب ثلاث تخافيف ثم إستخدم الجدول رقم (٤-٤) والمعادلة السابقة لحساب العدد الأكثر إحتمالاً MPN. بالنظر الى جدول رقم (٤-٥) والذي يقدم عدة أمثلة من A–G لمجموعات موجبة. أولاً تحذف أعلى تخفيف (حجم العينة الأصغر) إذا كانت كل الأنابيب سالبة وعلى الأقل يبقى تخفيف واحد فيه إنبوب سالب. ثم نحذف التخفيف الأقل (حجم العينة الأكبر) إذا كانت جميع الأنابيب موجبة و على الأقل يبقى تخفيف واحد فيه إنبوب موجب. وبهذه الارشادات يتم إختيار التخافيف الثلاثة في المثال A عن طريق حذف التخفيف الأعلى (٠,٠٠١مل) والتخفيف الأقل (١٠مل).

إذا كان التخفيف الأدنى لايوجد فيه أنابيب موجبة والعديد من التخافيف الأعلى منه لايوجد فيها أنابيب موجبة فيتم حذف أعلى التخافيف السالبة كما في مثال B .

قد تبقى أكثر من ثلاثة تخافيف بعد حذف التخافيف الأدنى ذات الأنابيب الموجبة والتخافيف الأعلى ذات الأنابيب السالبة في هذه الحالة إذا كان التخفيف الأعلى كل أنابيبه موجبة والتخفيف الذي يليه أيضاً كل أنابيبه موجبة يتم أخذ أعلى تخفيف يملك أي أنابيب موجبة ويُؤخذ التخفيفين اللذان يليه مباشرةً. في المثال C أعلى تخفيف يملك أنابيب موجبة هو ٠,١مل والذي هم ضمن تخفيفين من ٠,٠٠١مل الذي يملك أنبوب موجب. المثال D أعلى تخفيف كل أنابيبه موجبة هو ٠.٠١مل وهو ضمن إثنين من التخافيف العشرية لل ٠.٠٠١مل ليعطي 4-5-1

في حالة حذف التخافيف الأدنى (كل الأنابيب موجبة) ولم يبقى تخفيف يملك إنبوب موجب فنختار أدنى تخفيفين ونُعين مجموع أي تخافيف متبقية الى التخفيف الثالث. في المثال E أعلى تخفيف (كل الأنابيب موجبة) يحتوي ١٠مل، هذا التخفيف حذف في الخطوة الثانية، فيتبقى أربع تخافيف ولايوجد أي منهم كل الانابيب موجبة في هذه الحالة نختار أدنى تخفيفين متبقيين المقابلة ل١مل و٠,١مل. وللتخفيف الثالث نضيف عدد الأنابيب الموجبة في التخافيف الأعلى (٠،٠١مل و ٠,٠٠١مل) للحصول على 4-4-1 .

في حالة لم يوجد تخفيف كل أنابيبه موجبة (مثال F) يتم إختيار أدنى تخفيفين يقابلان ١٠ مل و ١مل وللتخفيف الثالث نجمع عدد الأنابيب الموجبة للتخافيف المتبقية (٠،١مل و ٠,٠١مل و ٠,٠٠١مل) للحصول على 4-3-2 وإذا تم حساب التخفيف الثالث أكثر من ٥ أنابيب موجبة فإن سلسلة التخافيف المختارة غير موجودة في الجدول (٤-٥).

إذا لم نجد التخافيف الثلاثة المختارة في الجدول فإنه يوجد شئ غير إعتيادي في التخافيف المتسلسلة وفي هذه الحالة قد لاتنطبق الأساليب المعتادة لحساب العدد الأكثر إحتمالاً MPN. أما في المثال G فهنالك طريقة أخرى لحساب MPN وذلك بمعادلة خاصة لم يتم شرحها في هذا الكتاب.

جدول رقم (٤-٥) أمثلة لإختيار ثلاث تخافيف مترافقة ومتتالية ذات أنابيب موجبة

Example	Volume *mL* 10	1	0.1	0.01	0.001	Combination of Positives	MPN Index *No./100 mL*
A	5	5	1	0	0	x-5-1-0-x	330
B	4	5	1	0	0	4-5-1-x-x	48
C	5	2	5	2	1	x-x-5-2-1	7000
D	4	5	4	5	1	x-x-4-5-1	4800
E	5	4	4	0	1	x-4-4-1-x	400
F	4	3	0	1	1	4-3-2-x-x	39
G	4	3	3	2	1	x-x-3-2-1	1700

ثانياً: اختبار وجود – عدم وجود بكتريا القولون Presence- Absence (P-A) coliform test

إن إختبار وجود أو عدم وجود (P-A) للمجموعة القولونية هو تعديل بسيط لتقنية الأنابيب التخمرية المتعددة المُستخدم كطريقة روتينية لعينات المياه التي يتم جمعها من أنظمة توزيع شبكات المياه ومحطات معالجة وتنقية مياه الشرب. هذا التعديل البسيط يتم بإستخدام جزء كبير من العينة (١٠٠مل) في قنينة واحدة للتحديد النوعي لوجود أو عدم وجود بكتريا القولون وذلك بحسب نظرية إن بكتريا القولون يجب أن لاتتواجد في ١٠٠مل من عينات مياه الشرب. كذلك يُمكن للمحلل فحص العديد من العينات في فترة زمنية محددة مقارنة مع الطرق الكمية. تُشير دراسات المقارنة مع تقنية الترشيح الغشائي الى إن إختبار P-A ربما يزيد من الكشف عن بكتريا القولون في العينات التي تحوي العديد من الأحياء المجهرية والتي يمكن أن تنمو على حساب بكتريا القولون وتسبب مشاكل في الكشف عنها.

إن وسط P-A broth يحتوي على اللاكتوز ودليل حامضي للكشف عن وجود إنتاج الحامض. المحلل يُلاحظ القناني المُلقحة فإن وجود الغاز و / أو إنتاج حامض (المواد الأيضية النهائية لتخمر اللاكتوز) يُعتبر نتيجة موجبة. وإن النتيجة الإفتراضية لبكتريا القولون لفحص P-A broth يجب تأكيدها بإستخدام وسط BGLB broth.

العينات: طريقة أخذ العينات كما موضح في فقرة ٤-٣

ويجب التأكد إن العينات تلبي معايير القبول المختبرية عند إستلامها.

الفحص الأفتراضي:

الوسط المستخدم: P-A broth ويمكن تحضيره من المكونات الآتية:

Beef extract	3.0 g
Peptone	5.0 g
Lactose	7.46 g
Tryptose	9.83 g
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	1.35 g
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	1.35 g
Sodium chloride (NaCl)	2.46 g
Sodium lauryl sulfate	0.05 g
Bromocresol purple	0.0085 g
Reagent-grade water	1 L

عندما يتم فحص ١٠٠ مل من العينة فيتم تحضير الوسط بتركيز ثلاثي Triple strength . يتم إذابة المكونات السابقة في الماء بالتحريك وبدون إستخدام الحرارة. ويوزع ٥٠ مل من الوسط المحضر في قناني ذات غطاء محكم وحجم ٢٥٠ مل. وليس بالضرورة وضع إنبوبة درهم. ثم تعقم في جهاز الموصدة Autoclave بدرجة حرارة ١٢١°م ولمدة ١٢ دقيقة، إن الحد الكلي للوقت في جهاز التعقيم هو ٣٠ دقيقة أو أقل. ويجب أن تكون قيمة ال pH ٦,٨+٠,٢ بعد التعقيم.

أما إذا تم التعقيم بواسطة الترشيح، فيُمكن إستخدام تركيز سداسي من وسط P-A broth. بضروف معقمة يتم توزيع ٢٠ مل من الوسط سداسي التركيز في قناني بحجم ٢٥٠مل.

الطريقة:

يتم رّج العينة بقوة لمدة ٥ثواني (حوالي ٢٥مرة) ويُضاف ١٠٠ مل من العينة الى القناني التي تحوي ٥٠مل من وسط P-A broth. ويمزج جيداً بقلب القنينة مرة أو مرتين لتوزيع العينة بشكل متساوي في الوسط. ثم يتم حضنها في درجة حرارة ٣٥+٠,٥°م ويتم قراءتها بعد ٢٤+٢ساعة و٤٨+٣ساعة ويُلاحظ إنتاج الحامض.

التفسير: إذا تخمر اللاكتوز وأنتج حامض فسوف يظهر لون أصفر في الوسط الزرعي. وإذا تم إنتاج الغاز أيضاً فسوف تظهر رغوة عند رّج القنينة بلطف. أي كمية من الغاز و/أو الحامض يعني نتيجة إيجابية للفحص الافتراضي ويتطلب إجراء الفحص التأكيدي.

المرحلة التأكيدية والمرحلة التكميلية: موضحة في الشكل رقم (٤-٣)

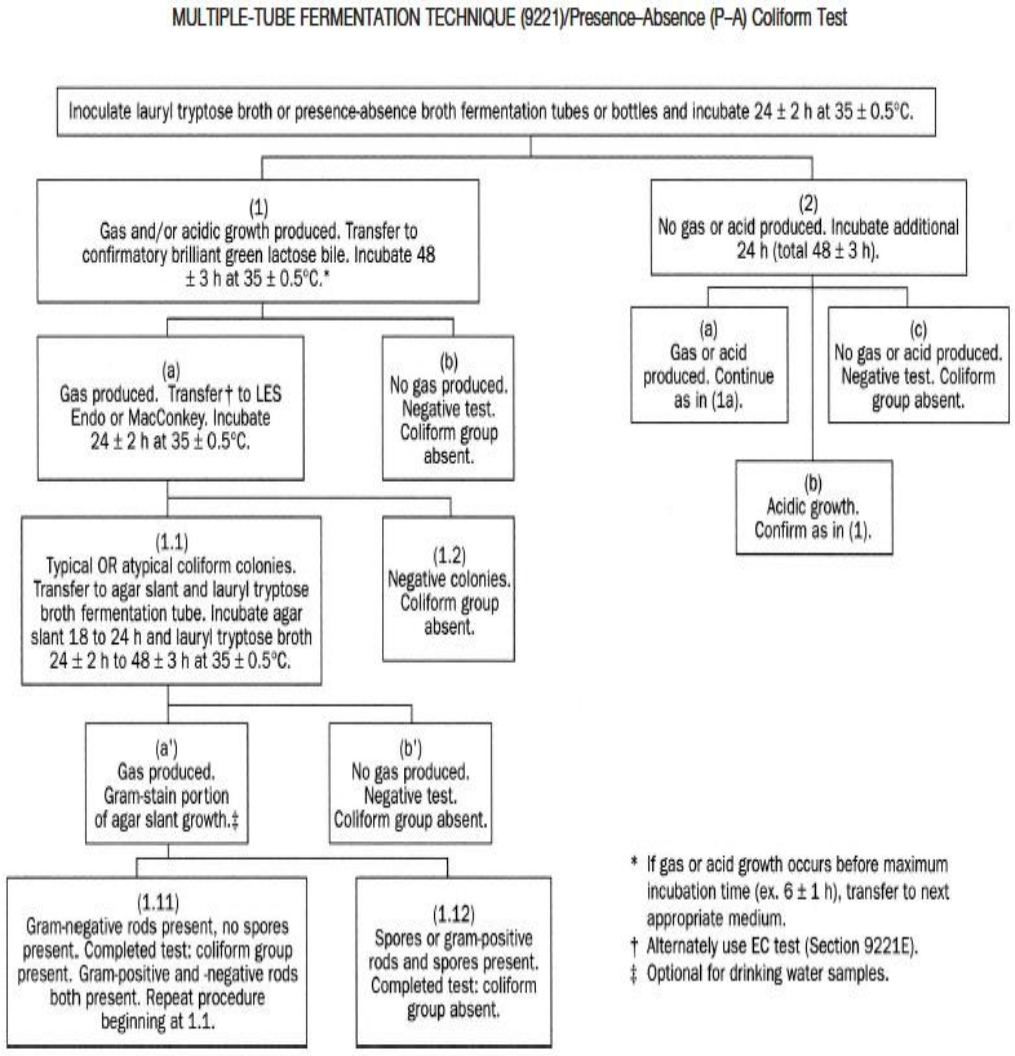


Figure 9221:1. Schematic outline of presumptive, confirmed, and completed phases for total coliform detection.

بكتريا القولون الكلية Total Colifotm

الوسط الزرعي: يستخدم الوسط BGLB broth في أنابيب تخمرية للإختبار. كما موضح سابقاً في الفحص التأكيدي لبكتريا القولون الكلية Total Coliform(٤-٧-١ج).

الطريقة:

بعد الحضن يتم إستخدام ناقل loop معقم ذو حلقة بحجم ٣- ٣,٥ ملم وذلك بنقل loopfuls مرة أو أكثر من مرة من القناني الموجبة للفحص الأفتراضي الى الأنابيب الحاوية على BGLB broth. وبدلاً من ذلك يمكن إستخدام عود خشبي معقم يتم غمره مسافة لاتقل عن ٢,٥سم في الوسط الزرعي للفحص الموجب الإفتراضي ثم يتم غمره الى قعر إنبوب التخمر الحاوي على BGLB broth وبعدها يتم التخلص من العود الخشبي.

تُكرر العملية على جميع الأنابيب الموجبة للفحص الإفتراضي، وتُحضن بدرجة حرارة ٣٥+٠,٥°م كما موضح سابقاً في الفحص التأكيدي لبكتريا القولون الكلية Total Coliform (٤-٧-١ج).

وفي نفس الوقت يمكن نقل loopfuls من القناني الموجبة للفحص الإفتراضي الى وسط EC broth (لتحديد وجود بكتريا thermotolerant (fecal) coilform) و/ أو وسط EC– MUG broth (لتحديد وجود *E.coil*) على أن يتم تلقيح الوسط الأكثر تثبيطاً للبكتريا (BGLB broth) في الأخير.

التفسير: إنتاج الغاز في وسط BGLB broth بغضون ٤٨ +٣ ساعة يؤكد وجود بكتريا القولون. وتُسجل النتيجة بصورة (P-A test positive or negative) لبكتريا القولون الكلية في ١٠٠مل من العينة. عينات مياه الشرب الموجبة لفحص بكتريا القولون الكلية يجب أن يتم إجراء فحص thermotolerant (fecal) coilform (راجع الفقرة ٤-٨) أو فحص *E.coli* (راجع الفقرة ٤-٩).

المرحلة التكميلية: يجب إجراء الفحص التكميلي لعينات المياه الخام كما موضح سابقاً في فحص بكتريا القولون الكلية Total Coliform (٤-٧-١د). أنظر الشكل (٤-٣).

٤-٨ طريقة فحص البكتريا القولونية المتحملة للحرارة Thermotolerant (Fecal) Coliform Procedure

وتعرف ببكتريا القولون البرازية fecal coliform، وهي قادرة على تخمير اللاكتوز وإنتاج الغاز بدرجة حرارة ٤٤,٥°م وقد تم تسجيلها في المياه الغنية بالمواد العضوية أو في المناخات الإستوائية في غياب التلوث البرازي الحديث. لذلك فإنه عند البحث عن التلوث البرازي يُوصى بإجراء إختبار ال *E.coli* (مؤشر أكثر تحديداً). ومع ذلك قد تتطلب الأنظمة تحديد (إختبار) بكتريا القولون البرازية وعدّها.

يمكن فحص بكتريا القولون البرازية بطريقة الأنابيب التخمرية المتعددة والتي سيتم شرحها، أو يمكن إستخدام طريقة الترشيح الغشائي membrane-filter method. يتم تشخيص بكتريا القولون البرازية بطريقة الأنابيب التخمرية المتعددة وذلك لقابليتها على تخمير اللاكتوز لإنتاج الغاز في ٤٤,٥+٠,٢°م خلال ٢٤+٢ساعة.

٤-٨-١ إختبار بكتريا القولون البرازية thermotolerant coliform بإستخدام وسط (EC medium)

إن إختبار بكتريا القولون البرازية thermotolerant coliform بإستخدام وسط (EC medium) قابل للتطبيق والتحقق عن بكتريا القولون البرازية في مياه الشرب وتلوث الجداول ومصادر المياه الخام التي لم يتم تصفيتها ومنظومات معالجة مياه الصرف الصحي ومياه السباحة والمياه البحرية والرصد العام لجودة المياه. لايُستخدم وسط EC medium لعزل بكتريا القولون البرازية بشكل مباشر من الماء، وإنما يتطلب إغناء البكتريا في وسط إفتراضي للإستعادة المثلى لبكتريا القولون البرازية.

الوسط الزرعي: الوسط الزرعي المستخدم هو EC medium broth وتُستخدم الأوساط الزرعية التجارية أو تُحضر من المواد الآتية:

Tryptose or trypticase	20.0 g
Lactose	5.0 g
Bile salts mixture or bile salts No. 3	1.5 g
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	4.0 g
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	1.5 g
Sodium chloride (NaCl)	5.0 g
Reagent-grade water	1 L

تُضاف المواد الجافة الى الماء، وتُخلط جيداً، ثم تُسخن حتى الإذابة. قبل التعقيم تُوزع بإحجام مناسبة في أنابيب تخمرية تحتوي على إنبوبة درهم موضوعة بشكل مقلوب، تُغلق الأنابيب بغطاء معدني أو بلاستيك مقاوم للحرارة. ثم تُعقم بجهاز الموصدة Autoclave بدرجة حرارة ١٢١°م ولمدة ١٢-١٥دقيقة. ينبغي التأكد إن إنبوبة درهم خالية من فقاعات الهواء، ويجب قياس قيمة ال pH ٦,٩+٠,٢ بعد التعقيم.

طريقة العمل:

أ- بعد الحضن لأنابيب الفحص الأفتراضي يتم رّج الأنبوب بلطف (الذي يُظهر غاز أو نمو أو حامض) وذلك لإعادة تجانس الأحياء المجهرية وتوزيعها. وبسرعة يتم إستخدام ناقل معقم loop ذو حلقة قطرها ٣-٣,٥ملم لنقل loopfuls واحد أو أكثر من الأنابيب التي تُظهر نمو مع حامض و/أو غاز الى إنبوبة تخمرية تحوي وسط EC broth. وبدلاً من ذلك يُمكن إستخدام عود خشبي معقم يتم غمره مسافة لاتقل عن ٢,٥سم في الوسط الزرعي الإفتراضي ثم يتم غمره الى قعر إنبوب التخمر الحاوي على EC broth ويتم التخلص من العود الخشبي. تكرر هذه العملية لجميع أنابيب التخمرية الموجبة للفحص الإفتراضي وتُحضن في حمام مائي بدرجة حرارة ٤٤,٥+٠,٢°م. يمكن التلقيح لوسط EC broth و/أو EC-Mug broth في آن واحد مع وسط BGLB broth على أن يتم تلقيح وسط BGLB broth (الأكثر تثبيطاً) في الأخير.

ب- يتم وضع الأنابيب الملقحة في حمام مائي ويُفضل أن يكون ذو غطاء، خلال ٣٠دقيقة بعد التلقيح. ويتم حضنها بدرجة حرارة ٤٤,٥+٠,٢°م لمدة ٢٤+٢ساعة. وينبغي ان يكون عمق المياه في الحمام المائي كافياً لغمر الأنابيب الى أعلى مستوى للوسط الزرعي.

التفسير: إن إنتاج الغاز مع وجود نمو في وسط EC broth خلال ٢٤+٢ساعة أو أقل من ذلك يُعتبر نتيجة موجبة لفحص thermotolerant (fecal) coliform. وإن عدم وجود الغاز (مع نمو قليل أو بدون نمو في الوسط) يُعتبر نتيجة سالبة للفحص. إذا تم إستخدام طريقة الأنابيب التخمرية المتعددة، يتم حساب العدد الأكثر إحتمالية MPN لبكتريا القولون البرازية من عدد الأنابيب الموجبة لوسط EC broth (كما موضح في فقرة ٤-٧-١-د). عند إستخدام إنبوبة واحدة فقط من قنينة الفحص الإفتراضي المفردة، تُسجل النتيجة وجود أو عدم وجود لبكتريا القولون البرازية (presence or absence thermotolerant coliform). إذا ظهر نمو كثيف مع عدم إنتاج غاز يتم إخضاع النمو الى إختبار thermotolerant coliform أو *E. coli* بإستخدام أوساط أخرى مختلفة.

٤-٨-٢ إختبار بكتريا القولون البرازية مباشرة بإستخدام وسط (A-1 medium)

Thermotolerant (Fecal) Coliform Direct Test (A-1 Medium)

أ- **الوسط الزرعي A-1 Medium**: يُمكن أن يُستخدم للعزل المباشر لبكتريا القولون البرازية من نماذج المياه غير المُرشحة ومياه الصرف الصحي المعالجة والمياه البحرية ولكن لايُستخدم لمياه الشرب. وعلى عكس طريقة EC medium فإن إستخدام وسط A-1 medium لايحتاج الى وسط إغنائي في أوساط إفتراضية للإستعادة المثالية لبكتريا القولون. وكذلك يمكن تحضير الوسط من المواد الأولية الآتية:

Lactose	5.0 g
Tryptone	20.0 g
Sodium chloride (NaCl)	5.0 g
Salicin	0.5 g
Polyethylene glycol *p*-isooctylphenyl ether	1.0 mL
Reagent-grade water	1 L

تُسخن جميع المواد حتى إذابة المواد الصلبة، ثم تُضاف polyethylene glycol p-isooctylphenyl ether. ويتم ضبط ال pH ٦,٩+٠.١. وعند إستخدام ١٠مل من العينة يتم تحضير تركيز ثنائي من الوسط (double-strength) ليكون التركيز النهائي بعد إضافة العينة صحيح.

قبل التعقيم يُوزع الوسط بأحجام مناسبة في أنابيب تخمرية تحوي إنبوبة درهم موضوعة بشكل مقلوب. وتُغلق الأنابيب بغطاء معدني أو بلاستيكي مقاوم للحرارة. ويتم تعقيم الأوساط بجهاز الموصدة Autoclave بدرجة حرارة ١٢١°م لمدة ١٠دقائق. وبعد التعقيم يتم التأكد من أنه إنبوبة درهم خالية من فقاعات الهواء. وتُحفظ في مكان مظلم بدرجة حرارة الغرفة لمدة لاتزيد عن ٧ أيام. ويتم تجاهل الراسب المتكون أثناء التخزين.

الطريقة: تُلقح أنابيب A-1 broth كما موضح في طريقة الأنابيب التخمرية المتعددة لتحليل TC (الفقرة ٤-٧-١ب). تحضن لمدة ٣ساعات بدرجة حرارة ٣٥+٠,٥°م. ثم تُنقل الأنابيب للحضن في حمام مائي Water bath بدرجة حرارة ٤٤,٥+٠,٢°م. ثم يعاد حضنها مرة ثانية لمدة ٢١+٢ساعة.

التفسير: إنتاج الغاز في أي من الأنابيب A-1 broth بغضون ٢٤ساعة أو أقل يُعتبر نتيجة موجبة للفحص. يتم حساب العدد الأكثر احتمالية MPN لبكتريا القولون البرازية FC من عدد الأنابيب الموجبة لوسط A-1 medium broth كما موضح في فقرة ٤-٧-١د.

٤-٩ تقنية إختبار بكتريا *Escherichia coli* القولونية بإستخدام الركيزة المتألقة

Escherichia coli Procedure Using Fluorogenic Substrate

إن بكتريا *Escherichia coli* القولونية هي إحدى المايكروبات المتواجدة بصورة طبيعية في براز الحيوانات ذوات الدم الحار normal flora. وإن وجودها في الماء يُعد مؤشراً للتلوث البرازي وإحتمالية وجود مسببات الأمراض المعوية. وإن إختبار بكتريا *Escherichia coli* يُمكن تطبيقها على مياه الشرب و المياه السطحية والمياه الجوفية ومياه الصرف الصحي. ويُمكن إستخدام تقنية الأنابيب المتعددة كما موضح أدناه وذلك أما بإستخدام طريقة الترشيح الغشائي أو بطريقة إختبار أنزيم الركيزة المتفلور وهنالك طرق أخرى للكشف عن وجود *Escherichia coli*.

يُستخدام وسط EC–MUG medium لإختبار بكتريا *Escherichia coli* وذلك لإن بكتريا *Escherichia coli* تُعرف كنوع من البكتريا القولونية التي تمتلك انزيم *β*-glucuronidase, والذي له القابلية على تفكيك الركيزة المتفلورة 4-methylumbelliferyl- *β* -D-glucuronide (MUG), مما يحرر المادة المتفلورة في غضون ٢٤+٢ساعة أو أقل من ذلك. في وسط EC–MUG medium بدرجة حرارة ٤٤,٥+٠,٢°م.

٤-٩-١ أختبار *Escherichia coli* بإستخدام وسط EC–MUG medium

إن إستخدام وسط EC–MUG medium للكشف عن بكتريا *Escherichia coli* يمكن تطبيقه على مياه الشرب وتلوث الجداول ومصادر المياه الخام غير المرشحة وأنظمة معالجة مياه الصرف الصحي ومياه السباحة ومياه البحر، والمراقبة العامة لنوعية المياه. ولايُستخدم وسط EC–MUG للعزل المباشر، فلابد من إستخدام وسط إفتراضي إغنائي للإستعادة المثلى لبكتريا *Escherichia coli* .

الوسط المُستخدم: يُستخدم وسط EC–MUG medium ويُمكن تحضيره من الأوساط التجارية حسب تعليمات الشركة المصنّعة أو يتم تحضيره من المواد أدناه:

Tryptose or trypticase	20.0 g
Lactos	5.0 g
Bile salts mixture or bile salts No.3	1.5 g
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	4.0 g
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	1.5 g
Sodium chloride (NaCl)	5.0 g
4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG)	0.05 g
Reagent-grade water	1 L

تُضاف المواد الجافة الى الماء وتمزج جيداً، ثم تُسخن للإذابة. وقبل التعقيم يتم توزيعها في انابيب لاتتألق تحت الأطوال الموجية الطويلة (٢٦٥-٢٦٦نانومتر) لمصباح الأشعة فوق البنفسجية(UV). يُمكن الإستغناء عن وضع إنبوبة درهم . تُغلق الأنابيب بغطاء معدني أو بلاستيكي مقاوم للحرارة. ويجب أن يكون pH الوسط ٦,٩+٠,٢ بعد التعقيم بجهاز التعقيم autoclave ولمدة ١٥دقيقة وبدرجة حرارة ١٢١°م.

الطريقة:

تُرّج الأنابيب التخمرية أو القناني للفحص الأفتراضي التي تُظهر نمو أو غاز أو حامض بلطف، وذلك لإعادة تجانس الاحياء المجهرية في الوسط. ويُستخدم ناقل معقم loop حلقته ذات قطر بحجم ٣-٣,٥ملم لنقل loopfuls واحد أو أكثر من الأنابيب التي تُظهر نمو الى إنبوبة تخمرية تحوي وسط EC-MUG broth. وبدلاً من ذلك يُمكن إستخدام عود خشبي معقم يتم غمره مسافة لاتقل عن ٢,٥سم في الوسط الزرعي ثم يتم غمره الى قعر إنبوب التخمر الحاوي على EC-MUG broth ويتم التخلص من العود الخشبي.

توضع جميع الأنابيب المزروعة EC-MUG broth في حمام مائي water bath بغضون ٣٠دقيقة من التلقيح. يتم حضن الأنابيب الملقحة و أنابيب السيطرة السالبة لمدة ٢٤+٢ساعة في حمام مائي ويُفضل أن يكون ذو غطاء للحفاظ على درجة حرارة ٤٤,٥+٠,٢°م. ويتم المحافظة على عمق الماء في الحمام المائي مما يسمح للماء ان يكون بمستوى سطح الوسط الزرعي.

التفسير: يتم إجراء فحص التألق على كل الأنابيب التي تُظهر نمو بإستخدام مصباح الأشعة فوق البنفسجية 6W و بطول موجي ٢٦٥-٢٦٦نانومتر. ويُعتبر وجود الوميض الأزرق الساطع نتيجة موجبة لفحص *E.coli*. وإن وجود النمو بغياب الوميض الأزرق يُعتبر نتيجة سالبة للفحص. ولتفسير النتائج وتجنب سوء تحديد الوميض الضعيف للوسط الزرعي أو لزجاج الأنابيب وتداخلها كنتيجة موجبة، فينبغي إجراء تقييم سيطرة موجبة وسالبة وذلك بفحص بكتريا *E.coli* معروفة كسيطرة موجبة (MUG-positive culture)، أما السيطرة السالبة فتكون بزراعة بكتريا *Klebsilla pneumonia* (MUG-negative culture) وكذلك فحص إنبوب إختبار لوسط EC-MUG غير ملقح. المسافة بين مصباح الأشعة فوق البنفسجية UV lamp والأنابيب يجب أن تكون مماثلة للبعد عن إنبوب السيطرة الموجبة *E. coli* الذي يُظهر وميض واضح على عكس إنبوب السيطرة السالبة وانبوبة السيطرة للوسط الغير ملقح. يتم حساب العدد الأكثر إحتمالية MPN لبكتريا *E. coli* من عدد أنابيب EC-MUG broth الموجبة للفحص وذلك حسب الفقرة ٤-٧-١-د.

في حالة إستخدام إنبوب إختبار واحد فقط أو الزرع من فحص إفتراضي لقنينة أو مستعمرة واحدة، تُسجل النتيجة كوجود أو عدم وجود (presence or absence of *E. coli*).

٤-٩-٢ تحديد وجود بكتريا القولون البرازية وبكتريا *E. coli* في آن واحد

Simultaneous Determination of Thermotolerant Coliforms and *E. coli*

يُمكن تحديد وجود بكتريا القولون البرازية و بكتريا *E. coli* في نفس الوقت وذلك بوضع إنبوبة درهم بشكل مقلوب عند توزيع وسط EC-MUG broth في الأنابيب، ويتم تحضير وسط EC-MUG كما موضح في فقرة ٤-٩-١.

التحضير: قبل التعقيم يتم توزيع كمية مناسبة من الوسط EC-MUG broth في أنابيب إختبار تحوي إنبوبة درهم موضوعة بشكل مقلوب ويجب أن تكون كمية الوسط بحيث تغمر على الأقل نصف الى ثلثي إنبوبة درهم بعد التعقيم. ويتم غلق الأنابيب بغطاء معدني أو بلاستيك مقاوم للحرارة. ويجب ان يُضبط pH الى ٦,٩+٠,٢ بعد التعقيم لمدة ١٥دقيقة بدرجة حرارة ١٢١°م.

الطريقة:

ترّج الأنابيب التخمرية أو القناني للفحص الأفتراضي التي تظهر نمو أو غاز أو حامض بلطف، وذلك لأعادة تجانس الأحياء المجهرية في الوسط. يُستخدام ناقل معقم loop حلقته ذات قطر بحجم ٣-٣,٥ملم لنقل loopfuls واحد او أكثر من الأنابيب التي تُظهر نمو الى إنبوبة تخمرية تحوي وسط EC-MUG broth. وبدلاً من ذلك يُمكن إستخدام عود خشبي معقم يتم غمره مسافة لاتقل عن ٢,٥سم في الوسط الزرعي وإخراجه فوراً ثم يتم غمره الى قعر إنبوب التخمر الحاوي على EC-MUG broth ويتم التخلص من العود الخشبي.

تُوضع جميع الأنابيب الملقحة EC-MUG broth في حمام مائي water bath بغضون ٣٠دقيقة من التلقيح. يتم حضن الأنابيب الملقحة وأنابيب السيطرة الموجبة والسالبة لمدة ٢٤+٢ساعة في حمام مائي ويُفضل أن يكون ذو غطاء للحفاظ على درجة حرارة ٤٤,٥+٠,٢°م. ويتم المحافظة على عمق الحمام المائي مما يسمح للماء أن يكون بمستوى سطح الوسط الزرعي.

التفسير: يتم فحص التألق على كل الأنابيب التي تُظهر نمو و/أو غاز بإستخدام مصباح الأشعة فوق البنفسجية 6W و بطول موجي ٣٦٥-٣٦٦نانومتر (365-366 nm). إن وجود النمو مع إنتاج الغاز يدل على نتيجة موجبة لوجود بكتريا القولون البرازية thermotolerant coliform، وإن وجود التألق الأزرق الساطع يُعتبر نتيجة موجبة لفحص *E. coli*. الأنابيب التي تُظهر نمو و/او غاز ووميض تألق تُعتبر نتيجة موجبة لكل من بكتريا القولون البرازية thermotolerant coliform و *E. coli*. أما الأنابيب التي تُظهر نمو و/أو غاز بدون وميض ازرق ساطع يُعتبر نتيجة موجبة لبكتريا القولون البرازية thermotolerant coliform وسالبة لبكتريا *E. coli*.

ونتيجة الى الوميض المتألق الضعيف للوسط الزرعي أو لزجاج الأنابيب يجب توخّي الحذر عند تفسير النتائج. وللمساعدة في تفسير النتائج، ينبغي إجراء تقييم سيطرة موجبة وسالبة وذلك بفحص بكتريا *E.coli* معروفة كسيطرة موجبة (MUG-positive culture)، أما السيطرة السالبة فتكون بزراعة بكتريا thermotolerant *Klebsilla pneumonia* (MUG-negative culture) وكذلك فحص إنبوب إختبار لوسط EC-MUG غير ملقح (without inoculated). المسافة بين مصباح الاشعة فوق البنفسجية UV lamp والأنابيب يجب أن تكون مماثلة للبعد عن إنبوب السيطرة الموجبة *E. coli* الذي يُظهر وميض واضح على عكس إنبوب السيطرة السالبة وإنبوبة السيطرة للوسط الغير ملقح. يتم حساب العدد الأكثر إحتمالية MPN لبكتريا *E. coli* من عدد أنابيب EC-MUG broth الموجبة للفحص وذلك كما موضح في فقرة ٤-٧-١-د وبإستخدام الجداول (٤-٢) أو (٤-٣) أو(٤-٤).

في حالة استخدام إنبوب إختبار واحد فقط أو الزرع من فحص إفتراضي لقنينة أو مستعمرة واحدة، نُسجل النتيجة كوجود أو عدم وجود (presence or absence of *E. coli* and thermotolerant coliform).

٤-١٠ إختبار بكتريا القولون في سبع ساعات:

هذه الطريقة مشابهة لطريقة الترشيح الغشائي لبكتريا القولون ولكن بإستخدام أوساط ودرجة حضن مختلفة للحصول على النتائج ب ٧ساعات والتي تكون مماثلة للطريقة الإعتيادية للفحص.

الوسط المستخدم:

يُستخدم وسط M-7h FC agar وربما لايتوفر في الأسواق التجارية على شكل مسحوق لذلك ينبغي تحضيره من مواده الأساسية وهي:

Proteose peptone No. 3 or polypeptone	5.0 g
Yeast extract	3.0 g
Lactose	10.0 g
d-Mannitol	5.0 g
Sodium chloride (NaCl)	7.5 g
Sodium lauryl sulfate	0.2 g
Sodium desoxycholate	0.1 g
Bromcresol purple	0.35 g
Phenol red	0.3 g
Agar	15.0 g
Reagent-grade water	1 L

تُخلط جميع المكونات وتُسخن في حمام مائي وبعد أن تذوب كل المكونات يترك في الحمام المائي لمدة ٥دقائق إضافية. ثم يبرد الى ٥٥-٦٠ °م ويُضبط ال pH الى ٧,٣+ ٠,١ بواسطة NaOH (0.1*N*) (غالباً يحتاج الى ٠,٣٥مل/لتر). يُبرد الى ٤٥ °م ويُوزع في أطباق ذات غطاء محكم بكمية ٤-٥مل وتحفظ الأطباق في درجة حرارة ٢-١٠ °م. وتُتلف بعد مرور ٣٠يوم في حالة عدم الإستخدام.

طريقة العمل:

تُرشح كمية مناسبة من حجم العينة خلال ورق ترشيح، توضع ورقة الترشيح على طبق يحوي وسط M-7h FC agar وتُحضن بدرجة حرارة ٤١,٥°م لمدة ٧ساعات. مستعمرات بكتريا القولون البرازية تكون صفراء اللون (تدل على تخمر اللاكتوز).

الفصل الخامس

تحليل البيانات وبرامج ادارة المعلومات المختبرية

البيانات المختبرية

برامج مراقبة نوعية المياه

تعتبر برامج المراقبة للمياه النقطة الأهم في تعيين نوعية المياه وجودتها، من حيث مطابقتها للمواصفة القياسية او لا، وتمثل برامج المراقبة قواعد البيانات الرئيسية لفهم طبيعة الماء ومعرفة مصادر التلوث ومطابقتها للمواصفة كما اشير. فمن المهم في برامج المراقبة معرفة بالضبط الغرض الرئيسي والأهمية لما سيوفره برنامج المراقبة.

ولكن قبل بدء أي برنامج للمراقبة لا بد من تعيين خطة البرنامج عبر الإجابة عن هذه الأسئلة:

هل برنامج المراقبة وطني ام دولي؟

هل برنامج المراقبة مرتبط بدراسة فصلية او شهرية ام هل هو برنامج مراقبة روتيني مستمر؟

ماهي نوعية المياه المطلوبة في برنامج المراقبة (سطحية (نهر، بحيرة، هور...الخ)، مياه شرب، مياه جوفية، مياه صناعية...) ؟

ماهي المنطقة المحددة بالبرنامج مع تحديد احداثياتها ان امكن؟

هل هناك بيانات سابقة تخص هذا البرنامج او نوعية المياه التي ساقوم بمراقبتها؟

ماهي الفحوصات المطلوبة للبرنامج؟

هل أدوات النمذجة و الشخص الذي يقوم بالنمذجة مدرب جيدا لخطة النمذجة ؟

اين ساقوم بفحص المتغيرات المطلوبة في البرنامج؟

هل المختبر الذي سيقوم بالفحص مؤهل للفحوصات المطلوبة ومدرب جيدا؟

هل كافة المستلزمات الخاصة بالنمذجة و الفحص متوفرة؟

لذا من المهم قبل البدأ ببرنامج المراقبة تحديد خطة البرنامج و كتابة تقرير عن كافة ما يخص البرنامج سواء من معلومات سابقة او مطلوبة مستقبلا، وعن إمكانية توفيرها او لا.

أهمية البيانات المختبرية

لا تعتبر الأرقام التي يصدرها المختبر للمتغيرات ذات أهمية ان لم تكن مرتبطة بهدف مراقبة وببرنامج قواعد للبيانات لحفظ تلك البيانات والرجوع اليها عند الحاجة، لذا كان الاهتمام برصانة المختبر ودقة الفحوصات من جهة، و بالأرقام و النتائج التي تصدر من المختبر و تحويلها الى بيانات و مخططات بيانية وجداول احصائية تراقب البرنامج مع الوقت.

وقد يخطئ البعض ويعتقد أن التحليل الإحصائي يقتصر على عملية جمع البيانات والمعلومات الرقمية وجمعها في جداول ورسومات بيانية، إلا أن أهمية التحليل الإحصائي تتجاوز ذلك، حيث تكمن أهمية التحليل الإحصائي في كونه الطريقة العلمية التي تستعين بها مختلف العلوم في تحليل البيانات وتعميم النتائج.

و لذا برزت أهمية برامج قواعد البيانات ومنها برامج إدارة المعلومات المختبرية التي سنسلط الضوء عليها في هذا الفصل

تطبيقات ادارة المعلومات المختبرية في المختبرات البيئية

LABORATORY INFORMATION MANAGEMENT SYSTEM APPLICATION IN ENVIRONMENTAL LAB.

الحاسبة ذلك النظام الذي ساهم كثيرا في تطوير من البحوث العلمية والدراسية من خلال برمجياتها و برامجها التي كانت تتطور باستمرار تطورا سريعا في شتى المجالات وكذلك كان لبرامج الحاسبة وجود داخل المختبرات البيئية ايضا من خلال برامج ادارة المعلومات المختبرية (lims) فما هي **نظم أدارة المعلومات؟**

انظمة ادارة المعلومات الادارية هي مجموعة من الاشخاص والالات و الاساليب التي تتصل ،تنتظم وتعمل معا لتجميع ، استرجاع ، معالجة و تخزين المعطيات والبيانات لانتاج المعلومات من اجل ان يستفيد منها المستويات التالية:-

١- العلماء والباحثين.
٢- صناع ومتخذي القرار.
٣- المهنيون.
٤- الجمهور العام.

ولهذا كان لانظمة ادارة المعلومات الادارية اهمية كبيرة في الدوائر والمؤسسات الحكومية وغير الحكومية فقد ساهمت هذه البرمجيات كثيرا في حفظ نسخ احتياطية للمعلومات و قواعد البيانات مع سهولة وسرعة الوصول اليها وبتخصصية بالبحث عالية مع توفير الجهد الكبير للعاملين وتنسيق للبيانات لتظهر بشكل يخدم المستويات الاربعة سالفة الذكر والتي تود الاستفادة من مخزون قاعدة البيانات .ولهذه الانظمة تطبيقات كثيرة احدها (LIMS)

انظمة ادارة المعلومات المختبرية

انظمة ادارة المعلومات المختبرية هي الانظمة الادارية التي تخدم المعلومات المختبرية وتتناول المعلومات كاملة حول العينة ابتداءا من استلامها داخل المختبر مرورا بفحوصاتها وحتى تنتهي بالتقرير النهائي لنتائج العينة.

اهمية انظمة ادارة المعلومات المختبرية

تتمثل اهمية ادارة المعلومات المختبرية من حيث انهاتوفر معلومات عن

١- جمع العينة وتاريخ جمعها ومكان الجمع واسم جامع العينة وتاريخ تسليمها الى المختبر ....الخ
٢- بيانات عن جميع نتائج الفحوصات لهذه العينة كيمياويا وبايولوجيا وبكتريولوجيا .
٣- المحددات لكل نوع من انواع المياه (شرب، معبأة ، نهر ، صرف صحي ....الخ)
٤- طريقة العمل المتبعة لكل فحص
يقوم البرنامج بمعالجة هذه البيانات واخراجها على شكل تقارير

١- تقرير نتائج كيمياوي
٢- تقرير نتائج بكتريولوجي
٣- تقرير نتائج بايولوجي
٤- تقرير احصائي

ان تطبيق نظام ادارة المعلومات المختبرية كان نقلة في التعامل مع الانظمة الكومبيوترية داخل المختبرات البيئية فبعد ان كان طبع النتائج بواسطة البرامج المكتبية (office (word)) اصبح يتعامل المبرمج والفني عند طبع النتائج برنامج خاص يخزن هذه النتائج في قاعدة معلومات مخزنة مسبقا داخل الحاسبة .

كذلك اصبح بالامكان ربط المختبرات الكيميائية والبايولوجية والبكتريولوجية مع بعضها البعض والاتصال بهذه المختبرات اصبح بواسطة شبكة تسيطر عليها حاسبة مركزية (server) .

كذلك ممكن مستقبلا من ربط الشبكة بجميع مختبرات المحافظات.كخطوة ثانية ومرحلة متقدمة لتطبيق هذا البرنامج.

البيانات :

تمثل البيانات عناصر قد تكون (نصوص ،ارقام، صور ...او حتى اصوات ...الخ) تتم معالجة هذه العناصر ويتم تخزينها داخل جهاز الحاسوب حيث يقوم جهاز الحاسوب بعملية معالجة (تفسير) لهذه العناصر ويقوم بتحويلها الى معلومات نستطيع فهمها و ادراكها.

تصدير البيانات

ان تصدير بيانات المختبر واصدار التقارير يكون لاجل

١- اجراء مسحا بيئيا لمنطقة معينة

٢- اجراء دراسة لمنطقة معينة

٣- اجراء دراسة حول طريقة عمل لاعتمادها

اواي سبب اخر ولكي يكون هناك تقرير للنتائج معتمد هناك عدد من البرامجيات التي يستفادمنها الكيميائي المحلل وسنسلط الضوء في هذا الفصل على برنامج ادارة المعلومات المختبرية

الفرق بين المعلومات والبيانات ؟

تشير العناصر PO_4,0.04,3500 الى بيانات تدخل الحاسبة ممكن بواسطة برمجيات معينة من تفسير واخراج هذه البيانات على شكل معلومات مفيدة ممكن تفسيرها .

ان نتيجة فحص PO4 هي 0.04ppm وان تكلفة الفحص الواحد هي 3500دينار وممكن تفسيرها باشكال وصور اخرى حسب المعالجة المطلوبة .

أهمية البيانات

تكمن اهمية البيانات كونها المكونات الاساسية التي يقوم عليها اي عمل .كما يمكن معالجة و دمج البيانات مع بعضها باستخدام تقنيات متعددة وتظهر نتائج وتقارير مختلفة ومتعددة.

ما هي قاعدة البيانات ؟

قاعدة البيانات هي مجموعة من البيانات المرتبطة مع بعضها والتي تختص بموضوع او اكثر .

امثلة على قاعدة البيانات :-

١- دليل الهاتف
٢- دغتر العناوين.
٣- سجلات الرواتب لشركة معينة .
٤- سجلات المبيعات لشركة ما.
٥- جدول مواعيد انطلاق الطائرات.

لماذا نستخدم قواعد البيانات الالكترونية ؟

تتميز قواعد البيانات الالكترونية عن قواعد البيانات الاعتيادية بعدة مميزات هي:-

١- سهولة الاستخدام.
٢- السرعة الفائقة .
٣- تخزين قدر هائل من البيانات .
٤- السماح بادخال و تحرير البيانات بسهولة شديدة.
٥- السماح بفرز البيانات في سرعة وسهولة .
٦- التحديث التلقائي واعادة حساب البيانات.
٧- السماح بالبحث السريع عن البيانات وتحديدها.
٨- تنسيق وتنظيم وتقديم البيانات بطريقة مفضلة لدى المستخدم.
٩- مشاركة المعلومات مع برامج وتطبيقات اخرى .
١٠- من خلال الاتصال عبر الشبكات ممكن لقواعد البيانات مشاركة مجموعة واحدة من المعلومات مع العديد من المستخدمين وهو مايقلل من تكرار البيانات.

أمثلة على قواعد البيانات:-

هناك عدة برامج وتطبيقات لقواعد البيانات هي:-

١- قاعدة بيانات Microsoft access
٢- قاعدة بيانات اوراكل oracle
٣- قاعدة بيانات SQL server

امثلة على تطبيقات لقواعد البيانات:-

برامج الانظمة الادارية

نظام ادارة المعلومات:- برنامج تخزين المعلومات واعادة تقديمها بشكل سريع ويتميز بمقدرة عالية على ادارة المعلومات المخزنة فيها بشكل منطقي متناسق وربطها ببعضها وفق منطقية وتخفيض حجم المعلومات عن طريق التقليل من تكرارها بالاضافة الى السرعة بسبب هيكلية تعامل واضحة ضمن البيانات المحفوظة مع امكانية حماية المعلومات المخزنة واحد الامثلة على هذه الانظمة هو نظام LIMS نظام ادارة المعلومات المختبرية ويتميز هذا النظام لانشاءه عدة متطلبات هي:-

١- جمع كافة البيانات الخاصة .
٢- قاعدة بيانات .
٣- نظام ادارة المعلومات
٤- كافة المستلزمات الفنية .
٥- امن البيانات
٦- النسخ الاحتياطية .
٧- التقارير .

نظام ادارة المعلومات المختبرية

ان نظام ادارة المعلومات المختبرية هو احد انظمة ادارة المعلومات التي تختص بالمعلومات المختبرية من توثيق النتائج وتحليلها بصورة سريعة ودقيقة ويمتلك القدرة على استعادة النتائج المخزنة بسرعة مع الخزن بنسخ احتياطية تحفظ المعلومات بصورة دائمية واعداد التقارير والاحصائيات الشهرية والفصلية والسنوية.

يمكن من خلال برنامج lims الاستفادة من نتائج تحليل عينة ما بصورة تخدم

١- العاملين في المختبر.
٢- المسؤولين واصحاب القرار.
٣- الخبراء والمختصون والباحثين والاكاديميين.
٤- *المواطنين العاديين.*

أحمد خضير كاظم

محل وتاريخ الولادة: بغداد – ١٩٧٩

المؤهل العلمي:

بكالوريوس علوم في الكيمياء/جامعة بغداد ٢٠٠١

ماجستير علوم كيمياء/ عضوية ٢٠١٥

الاعمال العلمية :-

أولا: البحوث العلمية: -

١- الادب المستفيد من الرسالتين المبعوثتين الى الشيخ المفيد

المؤتمر العلمي العالمي الأول للدراسات التخصصية في الإمام المهدي عجل الله فرجه الشريف في جامعة النجف الدينية ٧/رجب/١٤٢٨ الموافق ٢٠٠٧/٧/٢٢

2- Synthesis and Characterization of Some New Nucleoside Analogues from Substituted Benzimidazole via 1,3-Dipolar cycloaddition, Thanaa M. AL-Mouamin, Ahmed Kh. Kadhim, (جامعة بغداد) المؤتمر الوطني الثاني للكيمياء,Volume: Baghdad Science Journal Vol. 13(2s(Supplement))2016

3- ROS production and gene expression in alveolar macrophages exposed to PM2.5 from Baghdad, Iraq: Seasonal trends and impact of chemical composition, samera h. hamad, ahmed kh. Kadhim etal.; November 2015,Science of The Total Environment 543(Pt A):739-745

4- Source Apportionment of PM2.5 Carbonaceous Aerosol in Baghdad, Iraq, Samera Hussein Hamad, James Jay Schauer, Jongbae Heo, Ahmed K.H. Kadhim ETAL., April 2015,Atmospheric Research 156:80–90

5- Seasonal trends in the composition and ROS activity of fine particulate matter in Baghdad, Iraq, Samera Hussein Hamad,Martin Shafer , Ahmed K.H. Kadhim ETAL., January 2015,Atmospheric Environment 100

6- Synthesis and Characterization of Some New Nucleoside Analogues from Substituted Benzimidazole and Evaluation of Their Biological Activities,

Thanaa M Al-Mouamin,Ahmed K.H. Kadhim,Iraqi journal of science ,January 2015,vol.56,No.1C,PP633-644

7- Assessment of bottled drinking water quality in baghdad local market by some chemical and biological activity parameters , Ahmed KH. Kadhim , Noor Y. Salih, Sabah O. Hamad, المؤتمرالعلمي الدولي الأول لكلية العلوم جامعة النهرين ٢٠١٧

ثانيا: الدراسات و المقالات العلمية: - اكثر من عشرين مقالة و دراسة مشتركة ومنفردة منها:-

١- تنقية المياه وتحليتها بواسطة المبادلات الايونية

نشرت في ملحق علوم وتقنيات لجريدة الصباح الرسمية في عددها الصادر في ٢٠٠٦/٦/١٩

٢- المولدات وتلوثها.....الى اين ؟

قبلت للنشر في ملحق علوم وتقنيات لجريدة الصباح الرسمية في ٢٠٠٦/٧/٢٤

٣- الاشعاع و تأثيراته السرطانية

قبلت للنشر في مجلة البيئة والحياة المجلة الرسمية لوزارة البيئة في ٢٠٠٦/٨/٧

و نشرت في عدد كانون الثاني عام ٢٠٠٧

٤- تاثير درجة الحرارة على فحص الاملاح الذائبة

قدمت الى وزارة البيئة وحصلت على كتاب شكر من مكتب الوكيل الفني للوزارة ذي العدد م و ف/ ٢٨ في ٢٠٠٧/١/١٥

٥- التحاليل الفيزيائية والكيميائية للتربة (الطرق الاصولية المعتمدة في فحوصات التربة)

حصلت على كتاب شكر من الدائرة الادارية لوزارة البيئة بالعدد ١٤٣ في ٢٠٠٧/٢/١٣

٦- نظرة عامة على تاثير الاملاح الذائبة على المياه العراقية

نشرت في اذار ٢٠٠٧ في مجلة البيئة والحياة

٧- أهمية فحص التوصيلية الكهربائية للماءوعلاقتها بالفحوصات الاخرى

وضرورة أدخال معامل تصحيح درجة الحرارة في حساب ومقارنة نتائج التوصيلية

حصلت على مكافاة من دائرة بيئة بغداد / وزارة البيئة (ب غ ا م/٥٣٢ في ٢٠٠٧/١٢/٥)

٨- دليل تحديث طرق العمل الكيميائية القياسية للمياه

حصلت على كتاب شكر وتقدير من المختبر البيئي المركزي / وزارة البيئة (١٥٧٧ في ٢٠٠٩/١/١٥)

٩- الدليل الارشادي لمستخدمي برنامج إدارة المعلومات المختبرية LIMS

حصل على مكافاة مالية من الدائرة الإدارية والمالية / وزارة البيئة (٧٥٥٩ في ٢٠١٠/١١/٣٠)

١٠- دليل المختبر البيئي المركزي

حصل على شكر وتقدير الدائرة الإدارية و المالية / وزارة البيئة

(دم/٢/٥٧٢٨ في ٢٠١١/١٢/٢٨)

١١- اعداد محاضرة في دورة تصنيف التربة العراقية و أسباب تلوثها

حصلت على شكر وتقدير من الدائرة الفنية / وزارة البيئة (دف/١/٣١٤٥ في ٢٠١١/٥/٨)

١٢- تدريب كوادر امانة بغداد / دائرة المخلفات الصلبة والبيئة / قسم البيئة على فحوصات الروتينية

حصل على كتاب شكر وتقدير من دائرة المخلفات الصلبة والبيئة / امانة بغداد ١٩٤ في ٢٠٠٨/١/٢٢

١٣- نظرة نحو اقتصاد الكيمياء الخضراء

منشورة على الموقع الالكتروني لمؤسسة النور ٢٠١٢/٧/٤

<u>ثالثا: براءة اختراع</u> رقم ٤١٥٥ شباط لسنة ٢٠١٥

design and construction of shunt resistance for high current

- د. كمال حسين لطيف ، أ.د.احمد كمال احمد، د.بسمة حسين حمد، احمد خضير كاظم

<u>رابعا : الكتب المؤلفة :</u>

١- اللمع في اعمال نهار أيام الجمع، رقم الإيداع في دار الكتب و الوثائق ببغداد (١٥٢٩)٢٠١٠

٢- الرياض الجامعة لاعمال ليلة الجمعة، رقم الإيداع في دار الكتب و الوثائق ببغداد (١٥٢٨)٢٠١٠

نـــور ياسين صالح موسى

noor_eco@yahoo.com

محل وتاريخ الولادة: بغداد – ١٩٧٩

المؤهل العلمي:

- **ماجستير بيئة وتلوث- كلية العلوم/ جامعة بغداد (٢٠١٦)**
- **بكالوريوس علوم حياة – كلية العلوم/ جامعة بغداد (٢٠٠١)**

البحوث والدراسات:

- Human health risk assessment of trihalomethane through multi-pathway exposure from drinking water of Baghdad, Iraq
- The assessment of some physical and chemical parameters of drinking water quality in Al-Wahda and Al-Qadisiyah treatment plants at Baghdad, Iraq
- Assessment of bottled drinking water quality in baghdad local market by some chemical and biological activity parameters

View publication stats