الجمهورية العربية السورية
هيئة الطاقـة الذريـة

هـ ط ذ س- ش / ت ن ب ع 336
حزيران 2005

تقرير دائي عن بحث علمي
قسـم تكنولوجيا الأشعاع

تأثير الأشعة المؤينة و غير المؤينة على بيوض الديدان الطفيلية و الأوالي التي تسبب الأمراض المعوية في مخلفات الصرف الصحي

إعـداد

السيد معتصم شما
السيد محمد عمار العدوي
الدكتور نجم الدين الشرابي

المساعدون

السيد : حميد البارودي - قسم تكنولوجيا الأشعاع
الآنسة : أمل حموده - قسم تكنولوجيا الإشعاع
السيدة : تهاني يعقوب - قسم تكنولوجيا الأشعاع

الفهرس

فهرس المحتويات

المستخلص:

أظهرت نتائج مراقبة محطة عدرا لمعالجة مياه الصرف الصحي تباين كفاءتها في إزالـة بيـوض الديدان الطفيلية وبقية الممرضات التي تعد ضمن هدف البحث. طبقت العديد من الطرق المرجعية المستخدمة في الكشف وعد البيوض في المخلفات السائلة والحمأة بنوعيها الجاف والرطب.

كما حددت عيوشية بيوض الديدان بعدد من التقنيات والطرق التي تعتمد على المعـايير الـشكلية وبدراسة الحركية وبالحضن وباستخدام الملونات الحيوية. كما أمكن دراسة حيوية الأوالي باستخدام ملونات حيوية عديد إلا أن استخدام طريقة الزراعة على أوساط نوعية تركيبية لم يبد أية نتـائج.

وقد بينت نتائج تجارب القضاء على بيوض الأسكاريس والأوالي والأكيـاس الزحاريـة بالأشـعة المؤينة الصادرة من Co^{60} أن جرعة إشعاعية قدرها 6 كيلو غري قادرة على القضاء عليها بشكل كلي.

وعلى النقيض لم تبد تجارب القضاء على بيوض الأسكاريس والجيارديا والأكياس الزحاريـة أي نتائج إيجابية باستخدام تقنية الأشعة فوق البنفسجية فقد تبين أن هذه الأشعة كان لها دور تحفيـزي في عملية انقسام بيوض الأسكاريس. في حين لم يلاحظ أي تأثير على حيوية الجيارديا والأكيـاس الزحارية. ولذلك يمكن الاستنتاج على ضوء هذه التجارب الحالية عدم اعتبار تقانة الأشعة فـوق البنفسجية بديلاً عن استعمال الأشعة المؤينة للقضاء على بيوض الديدان والحيوانات الأولية.

Effect of ionizing and non ionizing radiation on Protozoan and Parasites Ova causing gastroenteritis presents in sewage sludge wastes

Shamma, M. ; Al-Adawi, M.A. ; Sharabi, N.

Abstract

The efficacy of Adra wastewater treatment plant for removing of parasitic eggs and other pathogens was various as the results of this work showed many eggs detected on and numeration referenced methods were applied for liquid and dried sledges. Helminths eggs viability was determined by aid of methods and techniques which depend on the morphological parameters, studying the motility incubation and applying the vital staining. The protozoa viability was studied by using vital staining, but applying culture techniques on specific composed media did not give any results. The disinfection results for ascaris eggs, protozoa and amoeba oocysts irradiated by 6 KGy of gamma (Co"60) which was sufficient to kill all types of such parasites. In conflict the UV radiation was able to motivate the division of the ascaris eggs embryo nations. Also, the viability of the Giardia and Entamoeba oocysts not affected. Therefor the UV technique couldn't be the alternative technology of ionizing radiation. (author)

1- مقـــدمة

يعرف العامل الممرض Pathogen للإنسان بأنه أي فيروس أو متعضٍ دقيق أو أي مادة قادرة على إحداث المرض له (Stedman's Medical Dirctionry 1977) ومن خلال هذا التعريـف يمكـن القول بأن الجـراثيم و الطفيليـات والفيروسـات والمـواد الميكروبيـة Endotoxins والفطريـات والمتعضيات الأخرى بأنها ممرضات Pathogens . وتعتبر الجراثيم والطفيليات والفيروسات بأنهـا ممرضات من النوع الأول على اعتبار أنه بإمكانها غزو الإنسان وإحـداث الإصـابة المرضـية لـه (Burge and Millner, 1980) بينما تعتبر الممرضات الأخرى على أنها ممرضـات مـن النـوع الثانوي ومثال عنها الفطريات التي غالباً ما تحدث الإصابة المرضية بشكل انتهازي.

يعطى تواجد جراثيم الكوليفورم البرازية بأعداد كبيرة في وسط ما مؤشراً قوياً على تواجد الممرضات، تبدي الجراثيم المعوية المرضية ردود فعل طبيعية لشروط البيئة بسلوك مـشابه لمـا تبديـه جـراثيم الكوليفورم لذلك يؤخذ تواجد هذه الجراثيم كمؤشر جيد للتلوث، كما يؤخذ تواجد الممرضات في الميـاه العادمة أو المخلفات الصلبة التي تستخدم في التطبيق على الأرض (الري، الزراعة) بعين الاعتبـار لعدة أسباب منها أن مثل هذه الممرضات سوف تدخل في سلسلة لغذاء بعد تلويثهـا للنبـات أو أنهـا ستنتقل خلال التربة وتلوث المياه الجوفية وبالتالي تلوث مياه الشرب أو أنها قد تلوث المياه الـسطحية من خلال جريانها وهذا ينتج عنه تعرض غير مباشر للأشخاص الذين يلامسون تلك المياه الملوثـة (الاستحمام) أو من خلال تلوث شبكات التزويد بمياه الشرب.

ان تواجد العامل الممرض ليس مجرد إشارة على حدوث العدوى أو الأمراض بل انه من المهم معرفة كيف تحدث العديد من المتعضيات الإصابة وهذا ما يدعى جرعة الاستجابة أو ما يسمى علاقة الجرعة والاستجابة.

تحتوي المياه العادمة على الممرضات الناتجة من فضلات الإنسان والحيوان التي ترمى فـي أنظمـة الصرف الصحي . بالإضافة إلى أن الجريان السطحي قد يحمل معه ممرضات من الحيوانات الثديية والطيور. يمكن أن تؤثر الشروط العالمية والإقليمية أيضاً على نوع وعدد من الممرضات محددة.

يمكن توزيع الممرضات الأولية التي تتواجد في المياه العادمة والمخلفات الصلبة في أرسبة مجموعات رئيسية:

الجراثيم Bacteria

الفيروسات Enteric Viruses

الأوالي Protozoa

الديدان : - الديدان الحبلية Nematode (round worms)

- Cestodes

إن الغرض من معالجة المياه العادمة هو إزالة الممرضات وتطهير المياه من أجل استخدامها أو رميها بشل آمن في الأمكنة المخصصة لذلك.

تتباين كفاءة الإزالة باختلاف وحدات المعالجة، ويعتمد ذلك على المتغيرات والخواص الفيزيائية والبيولوجية أيضاً . فعلى سبيل المثال فإن العديد من الطفيليات يبقى حياً حتى بعد معالجة المياه العادمة وبالتالي فإنها تتجمع في المخلفات الصلبة والتي تسمى الحمأة Sludge ، كنتيجة لكثافتها.

وتسعى بيوض الديدان دوماً لأن تترسب في الحمأة بسرعة كبيرة مقارنة مع أكياس الأوالي. (Farrell et al, 1996)

إن تعرض الأفراد لمتعض ممرض ليس من الضروري أن يحدث عدوى كما ذكر أعلاه وإن العلاقة بين الجرعة والاستجابة Dose Response تعتبر كمؤشر لجرعة العدوى . وأنه من الصعب قياس جرعة الاستجابة وذلك نظراً للإختلاف الواسع بين قدرة تحمل الأفراد (Jones et al., 1983).

والأبعد من ذلك ، فإنه ليس من الضروري أن ينتج المرض عن جرعة الإصابة Infection Dose المرض. ولقد أشار (Bryan, 1977) إلى جرعة الاستجابة للعديد من الممرضات.

كما راجع (Akin, 1983) الأدبيات للحصول على معلومات عن جرعة الإصابة للفيروسات Entroviruses وبقية الممرضات حيث تمتلك الجراثيم أوسع مجال لجرعة الإصابة بينما تتطلب السالمونيلا Salmonella spp مثلاً 105 إلى 108 خلية لكي تنتج معدل مرضي قدره 50% في البالغين الأصحاء.

وقد أحدثت إصابة مرضية بثلاثة أنواع من الشيغللا Shigella بمعدل 10-100 متعض . بينما كانت جرعات قليلة من 1 إلى 10 أكياس زحارية Entamoeba coli وجياردیا لامبليا Giardia lambila كافية لإحداث الإصابة الأميبية Amoebic Infection . وقد وجد أن جرعات قليلة جداً من الفيروسات ينتج عنها إصابة أيضاً.

وقد أوضح (Pharen, 1987) أنه بالإضافة إلى عامل جرعة الإصابة فإن هنالك عوامل عديدة تتدخل لإحداث المرض منها العمر والصحة العامة للأفراد.

أما فيما يخص جرعة العدوى للديدان Helminths فقد أشار (Pharen, 1987) أنها بيضة وهذا ما يعطي أهمية التأكد من القضاء على مثل هذه الطفيليات خلال معالجة المياه العادمة قبل رميها أو استخدامها .

إن العديد من العوامل الفيزيائية والكيميائية والبيولوجية لها القدرة على تعطيل الممرضات (Rrimers et al., 1996). وقد أشار Pedersen et al., (1981) الى أن التخفيض الأولي للمتعضيات الممرضة

ينتج عن إزالة مصادر تغذيتها، وقد استنتج العديد من الباحثين أن معالجات المياه العادمة تكون قـادرة على تخفيض أنواع معينة من المتعضيات الدقيقة الممرضة، ولكن المعالجة المفردة لم ينتج عنها ميـاه خالية من المتعضيات الدقيقة الممرضة .

يتم القضاء على العديد من الممرضات خلال المعالجة الأولية والثانوية عادة" وقد لخـص كـلاً مـن Foster and Engelbrecht (1973) المعلومات حول كفاءة إزالة أنواع متعـددة مـن الممرضـات سوف تتركز في المخلفات الصلبة.

ويتم معالجة الحمأة عادة بعدة طرق يعتمد معظمها على عاملي الحرارة والزمن ويذكر من هذه الطرق الهضم الهوائي والهضم اللاهوائي ودمج الحمأة والتجفيف الحراري واستخدام القلـوي أو مـا يـسمى بالجير والغرض من مثل هذه المعالجات هو القضاء على الممرضات إلى الحد الذي يسمح باسـتخدام هذه المخلفات بشكل آمن في الزراعة حسب ما وصف في تشريعات وكالة حماية البيئة الأمريكية.

صنف معدل خطر الإصابة ببيوض الديدان المعوية من النوع المرتفع مقارنة مع الجـراثيم والأوالـي والفيروسات وذلك نظراً لصمود هذه الكائنات أو أحد أطوارها لفترات طويلة في البيئة هذا بالإضـافة إلى انخفاض الجرعة المسببة للعدوى والتي ترتبط أيضاً بضعف أو انعدام مناعة العائل لهـا وأخيـراً احتياجها إلى مرحلة تطور في التربة قبل انتقالها للعائل إما عن طريق الطعام أو الماء وذلك كنتيجـة لقصور تدابير الحفاظ على الصحة الشخصية والمنزلية.

يعتمد بقاء الطفيليات خارج الجسم العائل على الظروف البيئية، فعلى سبيل المثال تعتمد وبائيـة دودة الصفر Ascaris إلى حد كبير على درجة تطور بيوضها خارج جسم العائل هذا وبالإضافة إلـى أن هنالك العديد من المتغيرات الحيوية وغير الحيوية التي تؤثر على تطور الطفيليات إلى عوامل فيزيائية وكيميائية وبيولوجية .

تعتبر تغيرات درجة الحرارة وتبدلات فصول السنة بالإضافة لتأثير الأشعة بأنواعهـا ومنهـا أشـعة الشمس والآشعة فوق البنفسجية والأشعة المؤينة من العوامل الفيزيائية التي تؤثر على تطور أو حيـاة الطفيليات بشكل عام.

ولقد أجريت دراسات عديدة على الظروف والعوامل المثثرة على تطور بيوض أنواع من الديدان ومنها الأسكاريس باستخدام العالجة الحرارية وبعض المواد الكيميائية (Horak, 1994) ولكن عدد قليل من الأعمال التي نفذت حول تأثير الأشعة على تطور وعيوشية هذه البيوض.

جرت دراسة ومعرفة الأثر الضار للإشعاع الكهرطيسى على بيوض ويرقات الديدان الطفيليـة منـذ سنوات عديدة. إن تعريض بيوض دودة الصفر الخيلى

(Ascaris megalocephala) للإشعاع فوق البنفسجي لمدة 10 - 60 ثانية عند درجة حـرارة 16 و40 مئويه , كان كافيا لقتل من 10 إلى 80 ٪ من تلك البيوض , ويختلف هذا التأثير بطـول فتـرة التعريض

كما وجد أن بيوض دودة الصفر (Ascaris) (Dagon& Tsang, 1828; citedin Nolf,1932) قد قتلت عند تعريضها للأشعة فوق البنفسجية ذات أطوال موجة بين 280 و 315 نانومتر أو بين 180 و 315 نانومتر (Nolf,1932) . وعند مقارنة تأثيرات الإشعاع فوق البنفسجي على المراحل المعدية لبعض الديدان المسودة الطفيلية وجد أن حساسية التعرض للإشعاع مرتبطة بدورة الحياة والمتوجة المسننة (Ascaris suum) فدودة الصفر الخنازيرى . Tromba, (1978, a,b) (Stephanurus..dentatus) و الاسطوانيات الحليمية (Strongyloides,,,papillosus) والسرمية الدودية (Enterobius..vermicularis) والنيبونية البرازيلية (Nippostrongulus brasilliensis) التى تحتاج جميعها للمراحل المعدية كى تعيش , تتاثر بوضوح عند تعريضها لجرعة من الإشعاع فوق البنفسجي على مقدرة 600 مكروواط لكل دقيقة على السنتمتر المربع الواحد أو اقل من ذلك . في حين أن تعرض المراحل الطفيلية للديدان التشابرتية الغنمية (Chabberitia,,ovina) والمحجنية الملتوية (Haemonchus ontortus), والاستيرتاغية الختانية لكمية اكبر من اشعة الشمس لا يكون لة تاثير الا على مجمل جرعة مقدارها 8000 الى 13000 مكروواط لكل دقيقة على مساحة سنتمتر مربع واحد .تكون أكثر حساسية لبيوض الدودة السرمية الدودية (Enterobius..vermicularis) للإشعاع فوق البنفسجي عند أطوال أمواج اقل من 2400 أمبير (Hollaender et . al ; 940) كما يقل نشاط ذوانب دودة المنشقة (البلهارسية) المنسونية (S.mansoni) بعد تعرضها لإشعاع الضوء فوق البنفسجي ويزيد هذا ا لتأثير عند زيادة الجرعة وزيادة أعمار الذوانب . حيث أن قدرة اختراق الأنسجة ونضوج هذة الذوانب يعتمد على مستويات التعرض للإشعاع (Ariyo & Oyerinde , 1990) .

تعتبر بيوض الدودة المسلكة (Trichuris) الأكثر مقاومة لتأثير الضوء . و بالرغم من أن اختلاف حساسيتها للضوء لم يتم فهمه بشكل تام , لكن يعتقد بان التصبغ الداكن في الجدار لبيوض الدودة(المسلكةTrichuris) يوفر حماية لها من الإشعاعات الضوئية القصيرة . كما ظهر بوضوح أن تعريضا قصيرا جدا كاف لمنع نسبة عالية من بيوض دودة الصفر من الوصول إلى مرحلة التكوين الجنينى بالإضافة إلى كون زيادة بسيطة في زمن التعريض كان كافيا لموت تلك البيوض (Nolf,1932). القليل من المعلومات المثبتة متوفر فيما يتعلق بتأثير ضوء الشمس المركز على بيوض الصفر . لا تفسر المعلومات الدقيقة المتوفرة عن تأثير ضوء الشمس على بيوض دودة الصفر قلة انتشار هذا المرض في بعض المناطق الحارة ولكنها توفر أيضا معلومات عن العوامل المؤثرة على انتشار هذا المرض وغيرة من الطفيليات تحت الظروف المدارية . كما يمكن لهذه المعلومات أن تفسر ارتفاع مدى انتشار دودة الصفر في المناطق المعتدلة مقارنة مع غيرها , وربما اعتبرت هذه المعلومات أساسا لتطوير وسائل التحكم في تواجد الديدان المدورة . تحتاج بيوض دودة الصفر التي

تطورت جنينيا بشكل كامل إلى فترات أطول من التعريض إلى أشعة الشمس حتى تموت أكثـر ممـا تطلبه في حال كونها في المراحل غير المتطورة . إن تواجد بيوض دودة الصفر في الكتـل البرازيـة يوفر حماية أكبر أو اقل لها خلال الفترة المبكرة لتطورها تحت ظروف طبيعية , هذا بالإضافة إلـى كونها أكثر مقاومة لأشعة الشمس في المراحل المتأخرة من تطورها . مما يزيد مـن احتماليـة بقـاء بيوض دودة الصفر حتى تحت ظروف مناخية مدارية .

يعتبر السيزيوم 137 والكوبالت 60 من المصادر الشائعة للأشعة المؤينة وعلى الأخص أشعة غامـا ، كما تعتبر الحزمة الالكترونية مساوية لأشعة غاما من أجل جرعة امتصاصية محـددة (Koubik et al., 1987)

تعتبر المعالجة بالأشعة من الطرق البادرة والنظيفة لمعالجة المياه مـن دراسـة (Horak) العادمـة والمخلفات الصلبة الناتجة عنها ويعتبر استخدام المسرعات الالكترونية مـن التقنيـات الأكثـر أمانـاً (Hashimoto et al., 1986). هذا بالإضافة إلى أن المعالجة بالأشعة للمياه العادمة تقدم ميزات عدة بالإضافة لقدرتها على القضاء على الطفيليات كمساهمتها في زيادة نسبة الترسـيب والقـضاء علـى الرائحة (Horak, 1994) وكما أشار (Enigk et al.,1975) أن يمكن الحفاظ على البوتينـات بعـد معالجة بالأشعة على اعتبار أن المعالجة تتم في حرارة الغرفة.

تؤخذ بيوض ديدان الأسكاريس كمعيار قوي لإجراء دراسات التعطيل عليها وذلك نظـراً لمقاومتهـا الشديدة للعديد من العوامل الفيزيائية والكيميائية ولقد كانت محور العديد من الدراسـات ولكـن يبقـى العائق الأكبر فيها تحديد عيوشيتها بعد معالجتها.

كما تؤخذ الجياردیا والزحار كمتعضيين مقاومين ومنتشرين ولما لها من أهمية طبية كمعيارين لإجراء دراسات القضاء على الأوالي.

2- المواد و الطرائق

2-1- الإعتيان Sampling

تم أخذ عينات من مخلفات الصرف الصحي على اختلاف أنواعها من محطة عدرا بما في ذلك ميـاه الخام التي ترد للمحطة وذلك بغرض التحري النوعي والكمي لبيوض الديـدان والحيوانـات الأوالـي المفترض توفرها في مثل هذه المخلفات وقد تمت عملية الإعتيان شهرياً ولمدة عام على النحو التالي .

وضعت كافة العينات السائلة في عبوات بلاستيكية ذات فتحة علوية وجوانب مستوية .

تم أعتيان مياه الصرف الصحي الخام والمعالجة أو الخارجة من المحطة والحمأة الطازجة بمعدل ثلاث مكررات عند كل مرحلة وبمعدل 1 ليتر و10 ليتر و 0.5 ليتر على الترتيب . بينما أخـذت عينـات الحمأة الجافة والمخزنة بمقدار 5 كيلوغرام في أكياس نايلون وعملت منها عينـات جزئيـة متجانـسة بمعدل 100 غ

2-2- طرق كشف وتعداد بيوض الديدان الطفيلية في المخلفات السائلة و الحمأة

2-2-1- تقنية تعداد بيوض الديدان الطفيلية المعوية في المخلفات السائلة حسب WHO(1989)

تعتمد هذه الطريقة الترسيب والتعويم وقد تم اختيارها طبقاً بتوجيهات منظمة الصحة العالميـة التـي اختارتها من بين عشرين طريقة مختلفة وتم تجربتها في ظروف ميدانية وفي بلدان مختلفة

<u>الأجهزة والأدوات</u>

- منبذة ذات قدرة تصل إلى جاذبية 1000
- أنابيب تثفيل
- جهاز فورتكس الخاص بالخلط
- أسطوانة قياس مدرجة
- مجهر ضوئي
- مقياس كثافة السوائل ضمن المجال من 1.00إلى 1.620
- خلية سيدفيك رافتر
- عبوات بلاستيكية لجمع العينات ذات فتحة علوية
- مثعب (مخلية هوائية)

- **المحاليل و المواد المستخدمة**

- محلول دارئ أسيتو أسيتيك (Aceto –Acetic) (pH 4.5) : إضافة 15 غـرام مـن ثلاثـي هيدرات صوديوم أسيتات الى 3.6 مل من حمض الاسيتيك الثلجي ، و يضاف إليه ماء مقطر حتى 1 ليتر

- الايتر أو الاسيتات الايتيلي .

- محلول سلفات الزنك المشبع : ذو كثافة نسبية 1.18 .

- محلول منظف : يحضر من الترايتون (Triton X_100) أو التـوين 80 (Tween 80) امـل إلى ليتر من الماء العادي .

- **تفاصيل طريقة العمل**

- جمعت عينة مفردة من المياه بحجم معلوم وليكن (ك) .

- تركت العينة كي تترسب لمدة 8 ساعات على الأقل ويمكن تركها لتترسب طوال الليل ثـم يكمـل الفحص في اليوم التالي .

- تم التخلص من السائل الطافي بدقة وتم التخلص منه بدون أن يحدث أي تشويش للرواسب بأستخدام جهاز نضح خاص أو مثعب (مخلية هوائية)

- جمع الراسب في أنابيب ثم غسلت العبوة جيداً بواسطة محلول غـسيل (Tween 80 1%) ثـم أضيف إلى أنابيب التثفيل .

- ثفلت الأنابيب على قوة 1000 دورة لمدة 15 دقيقة .

- أزيل المحلول الطافي وجمع الراسب في أنبوب تثفيل واحد و غـسلت الأنابيـب بمحلـول غـسيل وأضيفت إلى نفس الانبوب .

- اعيد تثفيل الأنبوب مرة أخرى على قوة 1000 ج لمدة 15 دقيقة .

- تم التخلص من السائل الطافي ثم غمرت الرسابة بحجم مساوٍ من المحلول الـدارىء أسيتواسـيتك ذو (pH= 4.5) و حرك المزيج جيداً.

- أضيف الأيتر بحجم مماثل لضعفي حجم المحلول الدارىء ثم حرك المزيج جيدا" لمدة عشرة دقائق

- نبذ المزيج على قوة 1000 ج لمدة 15 دقيقة لفصل العينة إلى ثلاث طبقات وتكون جميـع الكتـل غير الدهنية و التي تشمل بيوض الديدان المعوية الطفيلية واليرقات والحيوانـات الأوالـي موجـودة في أسفل أنبوب التثفيل بينما تكون الطبقتين الباقيتين خالية تماماً من البيوض و الحيوانات الأوالي .

- تم التخلص من السائل الطافي و غمرت الرسابة في خمسة أضعاف حجمها من محلول سلفات الزنك المشبعة ثم سجل الحجم النهائي الكامل (س(مل))

- مزجت العينة بقوة باستخدام جهاز فورتكس للخلط .
- باستخدام ممص باستور نقل قسمأمن المزيج إلى حجيرة العد سيدفيك رافتر .
- تركت الشريحة المحضرة على سطح مستوً لمدة 5 دقائق قبل عملية الفحص , هذه العملية ستـساعد البيوض في أن تعوم على السطح .
- فحصت البيوض في حجيرة التعداد (سيدفيك رافتر) وحدد العدد الكلي للبيوض لكـل لتـر (ن) الموجودة في العينة الأصلية حسب طريقة الحساب التي سوف يتم شرحها لاحقاً.

<u>حساب النتائج و إظهارها</u>

معادلة تحديد عدد البيوض و الحيوانات الأوالي

د = ع ن/ح ك حيث:

د: عدد البيوض المعوية أو الحيوانات الأوالي لكل لتر واحد من العينة

ع: عدد البيوض المعوية أو الحيوانات الأوالي التي تم عدها بواسطة الخلية المجهرية أو الوسيط الحسابي لشريحتين أو لثلاثة شرائح

ن: الحجم النهائي(مل) ويشمل حجم الرسابة ومحلول سلفات الزنك المشبع .

ح: حجم خلية (حجيرة سيدفيك رافتر) المجهرية وتساوي 1 مل .

ك: الحجم الأصلي لعينة المخلفات السائلة .

<u>التداخلات</u>

- يجب أن تكون العبوات المستخدمة في جمع العينات نظيفة وناعمة من الداخل ويجب أن يتم غـسلها مسبقاً بمنظف عام قبل جلب العينة وذلك لإزالة أي آثار للزيوت أو الشحوم لمنع التـصاق البيـوض و الحيوانات الأوالي بها .
- يجب أن يتم التخلص من السائل الطافي بحذر وذلك باستخدام مضخة خاصة أو المثعب ولا يجـوز بأي حال من الأحوال التخلص منها عن طريق الصب المباشر لمنع ضياع البيوض.

2-2-2- تقنية تعداد بيوض الديدان الطفيلية المعوية في الحمأة الطازجة حسب WHO(1989)

<u>- الأجهزة المستخدمة</u>

- مجهر ضوئي

- حجيرة سيدفيك- رافتر الخاصة بالعد
- دورق بايريكس حجم 2 لتر عدد2
- منبذة
- محور دوران بقدرة حمل أربعة أنابيب نبذ حجم 100 مل ويفضل أن تكون من الزجاج أو التفلون
- محور دوران بقدرة حمل 8 أنابيب نبذ مخروطية حجم 15 مل ويفضل أن تكون مـن الزجـاج أو التفلون
- منخل 48 نوع (Tyler sieve)
- قمع بلاستيكي كبير لدعم المنخل
- ملوقة من التفلون
- رف أنابيب اختبار كبير يتسع لأنابيب نبذ حجم 100 مل
- رف أنابيب اختبار صغير يتسع لأنابيب نبذ مخروطية حجم 15 مل
- سدادات مطاطية رقم 0
- عيدان خشبية
- جهاز تفريغ هواء
- دورق خواء بحجم 2 لتر أو اكبر
- سدادة توضع في طرف دورق الخواء من الزجاج او المعدن تستخدم كوصلة الى انبوب 0.25 انش أنبوب (Tygon tubing) لجهاز تفريغ الهواء
- ممصات باستور
- حاضنة على درجة حرارة 26 °م

الكواشف

- محلول الفوسفات الدارئ: حضر المحلول الأصلي للفوسفات الـدارئ عـن طريـق إذابـة 34 غ من البوتاسيوم ثنائي هيدروجين الفوسفات KH2PO4 في 500 مل من الماء المقطـر عـدل الـرقم الهيدروجيني إلى قيمة pH 7.2 ± 0.5 باستخدام محلول هيدروكسيد الـصوديوم NaOH تركيـز 1 مول ثم خفف الكمية إلى 1000 مل بإضافة الماء المقطر

أضف 1.25 مل من المحلول الأصلي لمحلول الفوسفات الـدارئ و 5 مـل مـن محلـول كلوريـد المغنيسيوم (81.1 غ من كلوريد المغنيسيوم MgCl2.5H2O لكل لتر من الماء المقطر) إلى 1 لتر من الماء المقطر . حضر محلول العمل الدارئ بإضافة 0.1% من توين 80 Tween عدل الـرقم الهيدروجيني إلى قيمة pH 7.2 ± 0.5 باستخدام محلول هيدروكسيد الصوديوم تركيز 1 مول

- توين 80 Tween

-محلول سلفات الزنك ذا ثقل نوعي 1.20 : وزن 454 غ من سلفات الزنـك ZnSO4 فـي 1 لتـر من الماء الغير متأين (خالي من الأيونات) للتأكد من عملية الذوبان ثم فحص الثقل النوعي باسـتخدام مقياس كثافة السوائل المسيل (Hydrometer) يعدل الثقل النوعي إذا دعت الحاجة إلى 1.20

-حمض السلفوريك H2SO4 تركيز 0.1 N في 35% من الكحول الاثيلي

-أثير اثيلي ذات درجة نقاوة عالية.

إجراءات العمل

- تم وزن 50 غ وزن رطب من الحمأة المختاطة، وخلطت بالخلاط على سرعة عالية لمـدة دقيقـة واحدة مع 450 مل من محلول الفوسفات الدارئ الذي يحتوي على 0.1% من مادة توين 80 للحصول على معلق بتركيز 10% .في حال كانت العينة عبارة عن حمأة سائلة سـكبت فـي وعـاء الخـلاط (400 إلى 500) ثم أضيف لها مادة توين 80 للحصول على تركيز نهائي منها يعـادل 0.1 % ثـم سجل الحجم الناتج

- تستخدم نسبة الرطوبة (%) للعينة لأغراض الحسابات النهائية لإعداد البيوض لكل غرام من الوزن الجاف . ويمكن التعبير عن تركيز البيوض في عينات الحمأة السائلة بعدد البيوض لكـل وحـدة مـن الحجم.

- صبت العينة المتجانسة عبر منخل 48 (Tyler sieve) محمـل علـى قمـع كبيـر فـوق دورق بحجم 2 لتر.

- غسلت العينة عبر المنخل باستخدام عدة دفقات من الماء الدافئ يتم بعدها جمع المياه الناتجة عن الغسول في دورق خاص.

- تركت العينة المغسولة والمنخولة (الغسول) لتترسب طوال الليل.

-نضح السائل الطافي باستخدام المثعب (السيفون) وتركت الرواسب الصلبة في أسفل الدورق.

- خلطت الرواسب الصلبة بالتحريك الدائري لها ، ثم صبت في أنبوب نبذ بحجم 100 مل.

- شطف الدورق بالماء ثلاث مرات ثم صب الغسول في أنبوبي نبذ أخريين بحجم 100 مل.

- تمت موازنة الأنابيب والنبذ على قوة 400 (ج) لمدة 3 دقائق.

- تم التخلص من السائل الطافي ثم نقعت الرسابة جيدا في محلول سلفات الزنك ذا ثقل نوعي 1.20

- نبذ منقوع سلفات الزنك على قوة 400 (ج)لمدة 3 دقائق.

- صب السائل الطافي لمحلول سلفات الزنك في دورق ايرلنماير بحجم 500 مل، وخفف إلى نصف التركيز على الأقل باستخدام ماء غير متأين ، ثم غطي الدورق, وتم تركه ليترسب طوال الليل.

-شفط السائل الطافي الذي يعلو الرواسب.

-أعيدت عملية تعليق الرواسب بالتحريك الدائري للدورق ، ثم نقل بواسطة الممص إلى أربعة أنابيب نبذ مخروطية.

- غسل الدورق ثلاثة مرات باستخدام الماء الغير متأين وباستخدام الممص نقل الغسول إلـى أنابيـب النبذ.

- نبذت الأنابيب على قوة 480 (ج) لمدة 3 دقائق .

- جمعت الرسابات الناتجة من عملية التنبيذ في أنبوب نبذ واحد ثم نبذه مرة أخرى على قوة 480 (ج) لمدة 3 دقائق.

- تم إعادة نقع الرسابة في 7 مل من محلول الكحول الحمـضي ((0.1 N) حمـض الـسلفوريك في 35% من الايثانول) ثم أضيف لها 3 مل من الايثر.

- تم تغطية الأنبوب بسدادة مطاطية ثم قلب الأنبوب عدة مرات.

- نبذ الأنبوب على قوة 600 (ج) لمدة 3 دقائق .

- أعيد نقع الرسابة في 4 مل من حمض السلفوريك تركيز (0.1N) ثم صب في أنابيب(Nalgene) وغطيت الأنابيب برخاوة.

- حضنت الأنابيب على درجة حرارة 26° م لمدة 3-4 أسابيع.

- في نفس الوقت، تم حضن بيـوض شـاهد (Control) مـأخوذة مـن دودة الـصفر الخراطينـي (Ascaris suum) البالغة.

- عندما تتطور معظم بيوض الشاهد جنينيا، عندها تكون العينات جاهزة للفحص.

- فحص التركيز الناتج مجهريا باستخدام خلايا سـيدفيك – رافتـر (Sedgwick-Rafter) لتعـداد البيوض.

- ملاحظة العيوشية اعتمادا على ظهور البيوض المتطورة جنينيا والتي يمكن تمييز أشكالها اليرقية.

-التعرف على البيوض وتم تدوين عدد البيوض لكل غرام من الوزن الجاف.

الحسابات

1-حسبت نسبة المواد الصلبة (%) باستخدام نسبة الرطوبة:

المواد الصلبة الكلية (%) = 100%- نسبة الرطوبة%

2- تم حساب عدد البيوض في الوزن الجاف بالطريقة التالية:

(عدد البيوض) × الحجم النهائي (مل)

عدد البيوض /غ وزن جاف = ——————————————————

(التركيز%) × (العينة المنخلة مل) × (المواد الصلبة الكلية%)

2-2-3- تقنية فصل واسترجاع بيوض الديدان المعوية الطفيلية باستخدام المصافي

تم استخدام خمسة أنواع من المصافي بقياسات مختلفة ومتدرجة (Retsch , model , As 200) صنعت محلياً تبدأ بأكبر قياس 30 ميش ثم 50 ميش ثم 80 ميش ثم 160 ميش وتنتهي بأصغر قيـاس والذي يقيس 400 ميش .

والجدول التالي يوضح قياس الميش بالنسبة للميكرون.

30 ميش	480 ميكرون
50 ميش	300 ميكرون
80 ميش	180 ميكرون
160 ميش	105 ميكرون
280 ميش	48 ميكرون
400ميش	38 ميكرون

يتم تمرير العينات المراد الإستحصال منها على البيوض بعد خلطها ومجانستها بالمصل الفيزيولـوجي المضاف له توين 80 فتقوم المصافي بحجز البيوض التي يكون قطرهـا الأقـصر أصـغر مـن 38 ميكرون ضمن هذه المصافي كلاً حسب حجمها ثم يتم غسل المصافي وجمع الغسول في ببشر وتركـه حتى يرسب مدة ثمانية ساعات ووزع الغسول في أنابيب وثفل ثم التخلص مـن الجـزء الطـافي و فحص الراسب الناتج ومنه تم تحديد الأنواع و أعدادها .

2-2-4- طريقة ريتشي

تعتمد هذه الطريقة على مبدأ الكثافة في الفصل بين الفضلات والطفيليات فعند إضافة العينة المراد تكثيفها إلى سائلين غير قابلين للمزج مع بعضهما البعض أحداهما محب للماء والأخر محب للشحوم يتم توزع الفضلات والطفيليات كل حسب ألفته وحبه للماء بالإضافة إلى عملية الترسيب بواسطة التثقيل.

الأجهزة والأدوات

أنابيب مخروطية الشكل - مثفلة أنابيب - مصفاة - شرائح زجاجية - سـواتر زجاجيـة - مجهـر ضوئي.

- المحاليل و المواد المستخدمة:

1- محلول الفورمول10% (100 مل فورمالين كثيف 38% + 300 مل ماء).

2- محلول الإيتر أو البنزين.

3- محلول اللوغول (2غ يود بوتاسيوم+ 100 مل ماء مقطر + 1 غ من اليود).

4- مصل فيزيولوجي (محلول كلوريد الـصوديوم 0.9 % ، 9 غ كلـوري الـصوديوم + 1000 مل ماء مقطر .

- طريقة العمل

1- أخذ 2 ملغ من العينة المراد فحصها ومزجت مع حوالي 10 مل من محلول كلوريـد الـصوديوم (مصل فيزيولوجي)

2- تم الترشيح عبر مصفاة في أنبوب تنبيذ مدرج ومعلم عند حجمي 10 ، 13 مل.

3- نبذت لمدة دقيقة واحدة بسرعة متوسطة 2000 دورة / دقيقة، يراق السائل الطافي وإذا كان السائل الطافي عكر جداً يغسل الراسب ثانية أي يمـزج مـع 10 مـل مـن محلـول كلوريـد الـصوديوم (مصل فيزيولوجي) ثم ينبذ دقيقة واحدة وبسرعة متوسطة ثم يراق السائل الطافي.

4- أضيف محلول الفورمالين 10 % إلى الرسابة حتى علامة 10 مل.

تركيب فورمول 10 % (100 مل فورمالين كثيف 38% + 300 مل ماء).

5- حرك المزيج جيداً وترك ليرقد مدة خمسة دقائق.

6- تم إضافة 3 مل من الأيتر أو البنـزين حتى علامة 13 مل.

7- سد الأنبوب ثم قلب على جانبه وتم رجه بشدة لمدة ثلاثين ثانية.

8- تنـزع السدادة بعناية وننبذ مدة دقيقة واحدة بسرعة متوسطة.

فتتكون أربع طبقات في الأنبوب :

- الطبقة الأولى :إيتر .
- الطبقة الثانية : أنقاض.
- الطبقة الثالثة : محلول الفورمول.
- الطبقة الرابعة : الراسب الذي يحتوي على بيوض وأكياس الطفيليات.

9-تخلخل طبقة الأنقاض ثم يقلب الأنبوب ويصب كل السائل الطافي ويتم حل طبقة الأنقاض بمـسحها بواسطة ماسحة قطنية.

10- يمزج السائل المتبقي جيداً مع الراسب بنقر الأنبوب بلطف.

11- ويتم فحص الراسب كاملاً بالنسبة للتربة والحمأة أما بالنسبة للبراز يتم أخذ نقطتان من الراسـب وتوضع قطرة فوق محلول اللوغول وقطرة فوق المصل الفيزيولوجي ويتم فحـصها لتحـري وجـود البيوض وأكياس الأوالي.

- حساب النتائج و إظهارها

يتم فحص الراسب على التكبير X40 للبحث عن الأكياس الأوالي وبقية الطفيليات المعويـة وتحديـد أنواعها اما بالنسبة للتحري عن بيوض الديدان فيتم بفحص الراسب على التكبير X 10.

2-2-5- طريقة التعويم باستخدام محلول مشبع من كبريتات التوتياء ZnSO4 % 33

وهي أولى طرق التكثيف المكتشفة وتسمح بكشف الديدان واليرقـات وأكيـاس الأوالـي والبيـوض (باستثناء المثقوبات (المتورقات) والمنشقات) كما وإن وجود الدسم في العينة يعرقل طريقـة التكثيـف هذه ولذلك تنقع السواتر لمدة عشر دقائق في المزيج التالي: 10 مل محلول كحول 95%، و10 مـل ايتر ثم نجفف.

المبدأ: إن إضافة محلول كبريتات التوتياء 33% إلى العينة يدفع العناصر الطفيلية إلى الطفو (التعويم) على السطح حيث يمكن لمها وتجميعها وتبقى الفضلات في الأسفل ويعود ذلك لكون الثقـل النـوعي للمحلول اكبر من الثقل النوعي للطفيليات .

العمل

مزجت العينة مع المصل الفيزيولوجي بنسبة 1 إلى 10 ثم صفيت عبر مصفاة ذات ثقوب دقيقة.
نقلت العينة إلى أنبوبي تثفيل وثفلت لمدة 5 دقائق بمعدل (1000-1500) دورة / دقيقة.
أستبدل السائل العلوي بالمصل الفيزيولوجي ومزجت العينة و أعيد تثفيلها .
كررت هذه العملية ثلاث مرات حتى أصبح السائل العلوي رائقا .
أستبدل السائل العلوي بمحلول كبريتات التوتياء ومزج أولاً مع الراسب ثـم أضـيف المحلـول الـى الأنبوب حتى فوهته .
غطى الأنبوب بسترة زجاجية بحيث تلامس سطح المحلول مع تجنب تشكل فقاعات هوائية.
ترك الأنبوب ساعة كاملة على الأقل ثم نزعت الستررة ووضعت مع العالق فيهـا علـى الـصفيحة وبنفس الوضعية وفحصت تحت المجهر بالتكبير الضعيف ثم القوي.

2-3- طرائق دراسة الحيوية

2-3-1- تحديد عيوشية بيوض الديدان المعوية الطفيلية

إن التمييز بين بيوض الديدان المعوية الطفيلية الحية والميتة تعتبر من إحدى المشاكل الرئيسية بالنسبة للبحث في مجال الديدان الطفيلية وتشمل التقنيات المستخدمة في تقييم العيوشية مايلي :

2-3-1-1- المعايير الشكلية

إن التعرف على الصفات الشكلية باستخدام المجهر هي عملية سهلة , لكنها تفتقر إلى معـايير ثابتـة , فهي تحتاج إلى مهارة وخبرة , وهى غير سهلة للمبتدئين إن فشل اليرقات في الحركة لا يعنى بأنهـا ميتة , فلا يمكن التفريق بين البيوض الحية والميتة بمجرد الملاحظة المباشرة لها . يمكن تأكيد مـوت هذة البيوض عندما يكون الانحلال والتفسخ واضحا و وقد يستغرق ذلك عدة أسابيع أو حتى عدة اشهر . وجد ريمير وزملاؤة (Reimers *et. al*., 1989) ارتباطا بين تحديد عيوشية بيوض دودة الصفر , في حين وجدت ايريس
(Ayres, 1992) بان الطريقة المعتمدة على المعايير الشكلية غير دقيقة كطريقة التحضين .

هناك بعض التغييرات الشكلية التي تظهر في بيوض دودة الصفر الميتة منها :

- تشكل الفجوات في هيولى (Cytoplasm) خلايا البيضة , ويعود ذلك لتحال الدهون .
- انحلال خلوي .
- انكماش في خلايا البيضة .
- تكهف في جزء من سطح الخلية في قيض البيضة أو في الغلالة البروتينية.

تشكل حبيبات كاسرة للضوء داخل الخلية

2-3-1-2- طريقة الحضن

عمل الباحثون على حضانة بيوض دودة الصفر مستخدمين أوساطا زراعية مختلفة للكشف عن تطور وعيوشية هذة البيوض, فوجد (Oskanen *et . al*; 1990) أن معدل التطور الجنينـى لبيـوض دودة الصفر التي تمت حضانتها لمدة 21 إلى 30 يوما عند درجة حرارة 25 إلى 30 م لـم تتغيـر عنـد استخدام (0.1 N) حمض السلفوريك H2SO4 أو ماء الصنبور العادي كوسط زراعة لهذة البيـوض, وكانت عدوى البيوض متساوية بعد التحضين, بينما تطورت هذة البيوض بشكل بطيء نـسبيا عنـد استخدام محلول الفورمالين الدارىء1٪.

جدول رقم (2)

المستنبتات	المرجع
10٪ بايكربونات البوتاسيوم	Cram (1924)
0.1٪ فورمالين	Brown (1928)
1٪ كربونات الصوديوم	Passy&Fairbairn
محلول ملحى + 5٪فورمالين	Bhaskaran et.al (1961)
(0.1 N) حمض السلفوريك	Fairbairn (1961)
ماء مقطر	Arfaa (1978)
ماء الصنبور العادى	Kiff&Lewis – jones(1984)
2٪ثنائى كرومات الصوديوم	Fleming (1987)

لقـد تـم اسـتخدام التقنيـة التـي وصـفها (HassandTodd,1962) وعـدلها (Curington&Harman1981)

لتعداد وتحديد عيوشية البيوض الطفيلية في الحمأة ومياه الصرف الصحي باستخدام تقنية الحـضانة , حيث يتم استخلاص البيوض من المياه العادمة وتضاف فورا إلى محلول من حمض الـسلفوريك (N 0.1) حيث تترك لتتم حضانتها عند درجة حرارة 25 – 30 م لمدة 21 إلى 30 يوم , وهـذه الـسلبية الأساسية لهذه الطريقة حيث أنها تحتاج عدة أسابيع لتتم عملية التطور الجنيني للبيوض وهذا يجعلهـا غير عملية للاستخدامات الروتينية .

3-1-3-2 -طريقة الملونات الحيوية

استعرض العديد من المؤلفين هذه التقنية لتحديد عيوشية البيوض، علماً أنة لم يعط لها سابقاً أية أهمية (WHO1967) و تتلخص السلبيتان الأساسيتان لعملية التلوين الحيوي في أن بعض الملونات لها تأثير سام على البيوض وان عملية التلوين لا تتم مباشرة بعد موت البيوض (مثـال يرقـات دودة جـذور البطاطا استخدم اليود ومحلول يوديد البوتاسيوم كما وان استخدام الأيوسين وبرتقالية الأكريدين من قبل تينانت 1964الذي وجد أنهما سامتان نسبيا . وقد استخدم العديد من الملونات لتحديد عيوشية بيـوض الصفر ولكن لم ينجح معظمها إلا أن أرين (Arine,1986) أكد الحكم على موت يرقات دودة الصفر الخنازيرى باستخدام 0.05 ٪ زرقة الميثيلين لمدة 5 دقائق , فقد بقيت اليرقات الحية غير ملونة , بينما تلونت اليرقات الميتة بلون ازرق غامق وبقيت ملونة باللون الأزرق حتى بعد غسلها بالمـاء المقطـر وتنبيذها لمرتين متتاليتين .

هناك عدة ايجابيات لاستخدام الملونات الحياتية للتحقق من عيوشية بيوض دودة الصفر أهمها :

1- خطوات التلوين سهلة وموثوقة وغير مكلفة وسريعة حيث أنها تعطى النتيجـة خـلال 5-10 دقائق
2- طريقة البنفسجية المتبلورة لا تحتاج لدقة متناهية لإعطاء نتائج دقيقة سوى الرقم الهيدروجيني.
3- لا حاجة للأهتمام بتراكيز محلول البنفسجية المتبلورة المستخدمة في التلوين أو في تخزينها .
4- تمكن من الحصول مباشرة على نتيجة العيوشية دون تعريض العينة للتلف.
5- الطريقة غير مكلفة ماديا.
6- ملون البنفسجية المتبلورة غير سام ويعمل كوسط جيد لتطور البيوض جنينيا ولفقسها.
7- ثباتية الملون.
8- يمكن استخدام هذة الطريقة في فحص تأثير المطهرات والعوامل البيئية على عيوشية البيوض .

يعتمد فحص عدم امتصاص الملون في عملية تحديد العيوشية للبيوض على حقيقة أن خلايا البيـوض العيوشية لا تمتص الملون أو غيرة من الملونات في حين أن الخلايا غير العيوشـة, والتـي تمـتص الملونات لا تتنفس ولا تقوم بعمليات تحليل السكر, ولا تستطيع تغيير لون الملونات الأساسية Philips, (1973) .

تحضير محاول عمل البنفسجية المتبلورة

تحضر في محلول أوكسالات الأمونيوم والزى يحتوى على 2 غ من البنفـسجية المتبلـورة 20 مـل من 95٪ كحول إيثيلى , ممزوج مع 80 مل من محلول مـائي 1 ٪ أوكـسالات الأمونيـوم(1977 Lillie,)

1. طريقة العمل

1- تم استخلاص البيوض من مياه الصرف الصحى ومزجت مع محلول هيبوكلوريت الصوديوم لمدة 30 دقيقة وذلك لإزالة قيوض البيوض .

2- تم غسل البيوض بالماء المقطر لخمسة مرات على الأقل حتى وصـل الـرقم الهيـدروجينى للتعادل

3- تم مزج قطرة أو قطرتين من محلول البنفسجية المتبلورة مع المحلول الذي نقعت به البيوض , ثم نقل قطرة واحدة من منقوع البيوض إلى شريحة زجاجية نظيفـة , وباسـتخدام الغلنـه السلكية تم نقل الملون الحيوي إلى الشريحة , ثم مزجه مع البيوض .

4- بعد مرور 10 دقائق تم استخدام المجهر الضوئى للتمييز بين البيوض العيوشة وغير عيوشة التى تم تراكم الملون الأزرق فيها بينما العيوشة ظهرت بدون لون لأنها لم تمتصة .

5- في حال امتصاص كل البيوض الموجودة في العينة الملـون فـيمكن افتـراض أن 100 ٪ من البيوض في العينة كانت ميتة , وفى هذه الحالة لا يوجد حاجة للقيـام بفحـص تاكيـدى بطريقة الحضانة . في حال وجود بيضة أو بيضتين في العينـة غيـر ملـونتين فأنـة مـن الضروري إجراء الفحص التأكيدى بواسطة الحضن بحيث توضع البيوض غير متلونة فـي حاضنة عند 26 مع N 0.1 حمض السلفوريك أو ماء الصنبور العـادي حتـى يـتم التطور الجنينى الكامل للبيوض وبعد ذلك يتم فحص المزيج باستخدام خلية سـيديفيك رافتـر .(Sedgwick –Rafter)

4-1-3-2 - طريقة دراسة الحركية (Chris Smith 1991)

تم جمع بيوض الإسكاريس لمبركويدز الحاوية على الجنين بالفلترة عبر فلتـر 12 um أو بطريقـة المصافي ثم تم معالجتها فيما بعد بمحلول هيبوكلوريد الصوديوم 1 % وذلك بإضـافة قطـرات مـن المحلول إلى أعلى الفلتر باستخدام ممص حيث ينسحب المحلول عبر الفلتـر تحـت تـأثير الخاصـة الشعرية ، و يراقب المحضر تحت المجهر وعند تتعرض البيوض لمحلول هيبوكلوريد الصوديوم تبدأ اليرقة بالحركة بشكل كبير ونشيط ضمن قشرة البيضة.

2. 2-3-2- طرائق دراسة حيوية الأوالي

2-3-2-1- طريقة تلوين الكائنات الأوالي

تم تجريب العديد من الملونات (بنفسجية المتبلورة – فوكسين كثيف - يود يودي – أخضر ملكايت – أسود سودان- أحمر الميتيل – أحمر فينيل – زرقة المتيلين – غميزا – رايـت – برتغاليـة ميتيـل- هيماتوكسلين الحديدي – تري ميتيل تترازوليوم- EA 50) وبتمديدات مختلفة على قدرتها في تحديد حيوية الأكياس الزحارية وأكياس الجيارديا اللامبليا

تم تجهيز شاهد حي من الأكياس الزحارية وأكياس الجيارديا مأخوذة من عينات براز مرضـية وتـم تجهيز عينات أخرى تم قتلها بحضنها بدرجة حرارة 70 م° مدة خمسة دقائق وطبقت عليهما الملونات السابقة لمعرفة أي الملونات أفضل لتحديد حيوية الاكياس الأوالي وكانت النتائج كالتالي

أسم الملون	شاهد حي	شاهد ميت
بنفسجية المتبلورة	دخول اللون	دخول اللون
فوكسين كثيف	دخول اللون	دخول اللون
يود يودي	دخول اللون	دخول اللون
أخضر ملكايت	دخول اللون	دخول اللون
أسود سودان	دخول اللون	دخول اللون
أحمر الميتيل	دخول اللون	دخول اللون
أحمر فينيل	دخول اللون	دخول اللون
زرقة المتيلين	دخول اللون	دخول اللون
غميزا	دخول اللون	دخول اللون
رايت	دخول اللون	دخول اللون
برتغالية ميتيل	دخول اللون	دخول اللون
هيماتوكسلين الحديدي	دخول اللون	دخول اللون
2-3-5 تري ميتيل تترازوليوم	عدم دخول اللون	عدم دخول اللون
EA 50	عدم دخول اللون	دخول اللون

وبذلك فشلت كافة الملونات بتحديد الحيوية إلا ملون EA50 .

2-3-2- طريقة الزراعة على أوساط نوعية

وتستخدم هذه الطريقة لمعرفة حيويةُ Entameba Histolotyca و Giardia lamblia

1- تحضير وسط Keister medium (Keister, 1983) :

يتم إذابة المواد الكيميائية التالية في 600 مل من الماء المقطر:

Tryptic Soya Broth	20 g
Glucose	10 g
Yeast extract	10g
Potassium dihydrogen phosphate (KH2PO4)	0.6g
Dipotassium hydrogen phosphate (K2HPO4)	1g
Sodium chloride	2 g
L-cysteine-HCL monohydrate	2 g
Ascorbic acid	0.2 g
Ferric ammonium citrate	0.023g
Dehydrate bovine bile	0.7g

وقد قمنا باستعاضة وسط EC medium عن مـادة (Dehydrate bovine bile) أخيـرا لعـدم وجودها في المخبر.

حلت هذه المكونات تماما في الماء المقطر بالتحريك المستمر ، وعدل الرقم الحمـضي الهيـدروجيني ليكون 7الى7.2 . تـم إضـافة 5 مـل مـن كـل مـن المـضادين الحيـويين Penicillin و streptomycin، و 100 µl من fungizone و 100 مـل مـن fetal bovine serum مع التحريك المستمر ثم أكمل الوسط إلى 1 ليتر بالماء المقطر.

ثم يفلتر الوسط باستخدام فلاتر معقمة ذات أقطار مسام 0.45 µ و 0.2 µ تحت تفريغ.

وضع الوسط داخل زجاجات بلاستيكية معقمة (500مل) وخزنت فـي بـراد 4 °م ليـتم اسـتخدامها في غضون 3 أسابيع.

2- استخلاص أكياس Giardia lamblia (Visvesvara et al., 1988) :

3- يتم توزيع العينة الحاوية على الأكياس إلى أنابيب زجاجية معقمة بقياس 16 × 125 مـم تحـوي وسط Keister medium (Keister, 1983) ، ذو الرقم الحمضي الهيدروجيني pH 7.2 . يـضاف 750 وحدة دولية من Penicillin و 750 µg من Streptomycin و 50 µg Fungizone لكل 1 مل .

تحضن المستنبتات بدرجة حرارة 37 °م في وضع مائل، ويتم فحص الأنابيب بواسطة مجهر مقلـوب كل 6 ساعات للكشف عن وجود أتروفات. في حال رؤية أتروفات ملتصقة على جدار الأنبوب، يوضع الأنبوب بوضع الوقوف لمدة 10 دقائق ثم يزال 13 مل من الوسط بحذر بواسطة ممص معقم وذلـك قبل إضافة الـ 13 مل من الوسط الدافئ للتقليل قدر الإمكان من أي تلوث بكتيري.
في البداية، يتم إعادة زرع المستنبتات كل 7-10 أيام. عند ملاحظة علامات تكيـف الأنـاريف مـع الوسط عندها يتم إعادة زرع المستنبتات كل 3 أيام.

4- النتائج

4-1- استخدام الأشعه المؤينه (غاما)

ا- بيوض الأسكاريس:

تم جمع بيوض الإسكارس من مياه الصرف الصحي الداخلة لمحطة عـدرا والتـي تشكل ما نسبته 85 % مياه و15 % أجساما صلبه وقد وجـد فيهـا (50 – 60) بيضه مخصبة ذات غشاء مزدوج في اللتر الواحد. وتم أسـتخدام طريقـة ريتـشي لتكثيف كافة الطفيليات ثم استخدام طريقة التعويم بأستخدام محلـول مـشبع مـن نترات الصوديوم Na No3 كثافته 1.38 غ /مل , وذلك لفصل.

البيوض من الرسابة بالتثقيل لمدة خمس دقائق عند 2000 دوره /ثانيه .
تم فحص البيوض مجهريا ثم أضيف لمعلقها مياه المخرج الخالية من بيوض الإسكارس ليصل التركيز النهائي إلى 500 بيضة في كل أنبوب اختبار ذو غطاء .
تم توزيع نفس العدد من البيوض في 27 أنبوب اختبار وقسمت هذه الأنابيب إلى ثـلاث مجموعـات تحوي كل مجموعة 9 أنابيب إحداها الشاهد أما الأ نابيب الثمانية الأخرى فقد تم تعريضها لجرعـات إشعاعية تصاعدية
(1.5 , ...0.3 ,0.2 ,0.1) كيلو غراي بواسطة خلية غاما ذات نشاط إشـعاعي 6.039kci معايرة بمشعر فريكي عند معدل الجرعة 2.6 كيلو غراي , وقد تم اختيار هذه الجرعات اعتمادا على الدراسة السابقة ل (Shamma & Al- adawi).

تم فحص العينات مجهريا وتم أخذ صور فوتوغرافية للبيوض التي تم فحصها مباشرة . تـم حـضن البيوض المشعة والشاهد عند الدرجة 37 مئوية . تم مراقبة البيوض مجهريا يوميـا ولمـدة ثمانيـة أسابيع في كافة العينات .

حددت عيوشية البيوض الملقحه بقدرتها على تشكيل اليرقات خلال فترة الأسابيع الثمانية بعد المعالجة الإشعاعية.

ا-1- النتيجة :

تم استخدام الفحص المجهري قبل وبعد تشعيع بيوض *Ascaris lumbricoides* وذلك لمراقبة التغيـرات المورفولوجية والتي أظهرت ما يلي:

1- عينات الشاهد وهى البيوض غير المشعة والبيوض التي تم تشعيعها بالجرع أقل من 0.5 كيلـو غراي.

كانت البيوض تحوى كتلة خلوية حبيبية متجانسة وذلك في 90 % من البيوض التي تم فحصها . وبعد أسبوع من الحضانة عند الدرجة37م° ظهر في خلايا البيوض المذكورة انقسامات نظامية.

2- اظهر الفحص المباشر لنفس البيوض وبعد فترة الحضانة مدة أسبوعين استمرار الانقسامات.

3- أما البيوض والتي تم تشعيعها بالجرع 0.5 كيلوغراي وما فوقها حتى1.5 كيلـوغراي أظهـرت تفتت وتوزع لمحتويات الخلية في كامل البيوض صورة وذلك بعد أسـبوعين مـن الحـضانة عنـد الدرجة37م° .

4- اظهر الفحص المباشر لبيوض الشاهد والبيوض التي شععت بالجرعة0.5 كيلوغراي والأدنى منها تشكل اليرقات صورة .

5- لم يظهر الفحص المجهري للبيوض المشعة عند الجرعة 0. 5 كيلوغراي والجـرع الأعلـى تشكل لليرقات.

ب - أكياس الجياردیا :

تم مزج عينة البراز بمحلول المصل الفيزيولوجي 9% لتجانسها ثم يفحص عدد الأكياس في 1 مـل من محلول الأم وكان 9 مليون كيس تقريباً.

قسمت التجربة إلى ثلاث مجموعات تضمنت كل منها ثلاثة مكررات إضافة ألى الشاهد.

تضمنت المجموعة الأولى خمسة أنابيب جرى تعريضها لأشعة غاما ابتداءً من 200 Gy ووصـولاً على 1 KGy بفاصل 200 Gy بين الجرعة والجرعة .

تتألف المجموعة الثانية من أربعة أنابيب شععت ابتداءً من 1 KGy ووصولاً إلى 2 KGy بفاصـل 250 Gy بين الجرعة والأخرى .

تتألف المجموعة الثالثة من أربعة أنابيب شععت ابتداءً من 3 KGy ووصولاً إلى 6 KGy بمعـدل 1 KGy بين كل جرعة وجرعة .

بعد التشعيع مباشرة تم تطبيق طريقة الملونات الحيوية للتميز بين الأكياس الحيـة و الأكيـاس الميتـة وزرعت هذه العينات مع الشاهدعلى وسط Keister و جرى مراقبة نموها لمدة سبعة أيام.

ب –1- النتيجة :

تم فحص أكياس الجياردیا بعد التشعيع مباشرة في المجموعات الثلاثة باستخدام ملون EA50 بابانيكولا وبوجود شاهد حي وشاهد ميت عند درجة حرارة قدرها 60 م° ولمدة خمسة دقائق لتمييز قدرة الملون على التمييز بين الأكياس الحية والميتة .

لم يلاحظ في المجموعة الأولى وجود أكياس ميتة إلا في الجرعة الأخيرة وهي 1 KGy وكانت بحدود 10% تقريباً .

وفي المجموعة الثانية كانت النسب متقاربة فعند الجرعة 1.5 KGy 20 % وعند الجرعة 2 KGy كانت النسبة 35%_ 40 %.

وفي المجموعة الثالثة بدأ الاختلاف واضح بالنسبة للنتائج وكانت كالتالي :

3 KGy كانت نسبة القتل 50%_ 60% .

4 KGy كانت نسبة القتل 70% _ 80%.

5 KGy كانت نسبة القتل 90%_ 95%.

6 KGy كانت نسبة القتل 90 % _ 95%.

وزرعت هذه العينات مع الشاهد على وسط Keister والذي تم تحضيره في المخبر وتمت المراقبة خلال مدة سبعة أيام ولكن لم يكن هناك نموات أو تحولات للنواشط في الشاهد أو في العينات الأخرى المشععة .

ج - أكياس الزحار:

تم مزج عينة البراز بمحلول المصل الفيزيولوجي 9% لتجانسها ثم يفحص عدد الأكياس في 1 مـل من محلول الأم وكان240 ألف كيس تقريباً.

قسمت التجربة إلى مجموعتين وكل مجموعة ثلاث مكررات بالإضافة للشاهد لكل مجموعة.

تتألف المجموعة الأولى من عشرة أنابيب شععت الأنابيب ابتداءً مـن100 Gy ووصـولاً علـى 1 KGy بفاصل 100 Gy بين الجرعة والجرعة .

تتألف المجموعة الثانية من أربعة أنابيب شععت ابتداءً من 1 KGy ووصولاً إلى 2 KGy بفاصـل 250 Gy بين الجرعة والجرعة .

تتألف المجموعة الثالثة من أربعة أنابيب شععت ابتداءً من 3 KGy ووصولاً إلى 6 KGy بمعـدل 1 KGy بين كل جرعة وجرعة .

بعد التشعيع مباشرة تم تطبيق طريقة الملونات الحيوية للتميز بين الأكياس الحيـة و الأكيـاس الميتـة وزرعت هذه العينات مع الشاهد على وسط Keister وفحصت لمدة سبعة أيام لمراقبة النمو.

ج - 1- النتيجة :

جرى فحص الأكياس الزحارية في المجموعات الثلاثة بعد التشعيع مباشرة باستخدام ملون EA50 بابانيكولا وبوجود شاهد حي وشاهد ميت بواسطة الحرارة عند الدرجة 60 م° ولمدة خمسة دقائق لتمييز قدرة الملون على التمييز بين الأكياس الحية والميتة .

في المجموعة الأولى لم يلاحظ وجود أكياس ميتة إلا في الجرعة الأخيرة وهي 1 KGy وكانت بحدود 5 % تقريباً .

وفي المجموعة الثانية كانت النسب متقاربة فعند الجرعة 1.5 KGy 10 % وعند الجرعة 2 KGy كانت النسبة 30% .

وفي المجموعة الثالثة بدأ الاختلاف واضح بالنسبة للنتائج وكانت كالتالي :

3 KGy كانت نسبة القتل 60% .

4 KGy كانت نسبة القتل 80% .

5 KGy كانت نسبة القتل 90% .

6 KGy كانت نسبة القتل 95 % _ 99%.

وزرعت هذه العينات مع الشاهد على وسط Keister والذي تم تحضيره في المخبر وتمت المراقبـة خلال مدة سبعة أيام ولكن لم يكن هناك نموات أو تحولات للنواشط في الشاهد أو في العينات الأخرى المشععة .

4-2- استخدام الأشعة غير المؤينة (UV.)

أ- بيوض الأسكاريس :

- تم جمع بيوض الأسكارس لمبريكويدز من براز مريض يحوي على أعـداد كبيـرة مـن هـذه البيوض

قبل ثلاثة ايام من اجراء التجارب .

- تم غسل العينات بماء الصنبور وتركيز البيوض باستخدام مناخل ذات مسامية مناسبة من موديل (Retsch , model , As 200) أما في المرحلة الأخيرة تـم اسـتخدام مناخـل ذات مـسامية 38µm .

أضيفت البيوض والتي تم ترشيحها في مياه مخرج محطة عدرا والخالية تماما من بيوض الأسكارس لمبريكويدز .

- تم فحص وإحصاء البيوض مجهرياً .
- تم أعادة التجربة ثلاثة مرات متتالية.
- تم تعريض البيوض للأشعة الفوق بنفسجية حيث قسمت البيوض إلى قسمين والقـسم الأول تم تقسيمه إلى ثلاث مجموعات .

المجموعة الأولى : وتم التشعيع فيه للبيوض اعتمادا على تغيير الزمن وقد اعتمد الزمن فـي القـسم الأول على الثواني حيث تم التشعيع من 2 ثانيه وحتى 60 ثانيه وزمن التشعيع هو 2 ثانيه .

المجموعه الثانيه : وهنا تم التشعيع فيه للبيوض اعتمادا على تغيير الزمن وقد اعتمد الزمن في القـسم الثاني على الدقائق حيث تم التشعيع بدءا من 1 دقيقه انتهاء وحتى 5 دقائق وزمن التشعيع هو 1 دقيقه.

المجموعه الثالثه :

وهنا تم التشعيع فيه للبيوض اعتمادا على تغيير الزمن وقد اعتمد الزمن في القسم الثالث على الـدقائق وقد بدء التشعيع من 10 دقائق وحتى 25 دقيقه وزمن التشعيع هو 5 دقائق .

اما القسم الثاني وفيه استمر التشعيع فيها 60 دقيقه و بفاصل زمني قدره 2 دقيقه .وفي كـل تجربـه تم استخدام ثلاث عينات شاهد معروف عدد البيوض فيها وهو 100 بيضه / مل تم إضافتها إلى 5 مل من مياه مخرج محطة عدرا المفلترة في أطباق بتري البلاستيكية .

أما وحدة الأشعة الفوق بنفسجية والمصممة محلياً فقد تم معايرتها وتحديد شدتها الإشـعاعية بواسـطة (UVX Digital Radiometer from UVP, Inc.) وعند مسافة قدرها 5 سم من المصدر المشع (لمبة UV) (Philips UV-C Low pressure mercury lamp 30 W/G30 TB) حيث كانت الشدة الإشعاعية 4.275 $mW.s/cm^2$. وكانت نتائج لمعايرة اللمبة حسب المسافات كالتالي :

المسافة	الشدة الإشعاعية(المنبع)
2 Cm	95 W/m^2
3.5 Cm	60.8 W/m^2
5 Cm	42.75 W/m^2
8 Cm	27.8 W/m^2
19 Cm	12.5 W/m^2

52 Cm	3.85 W/m^2

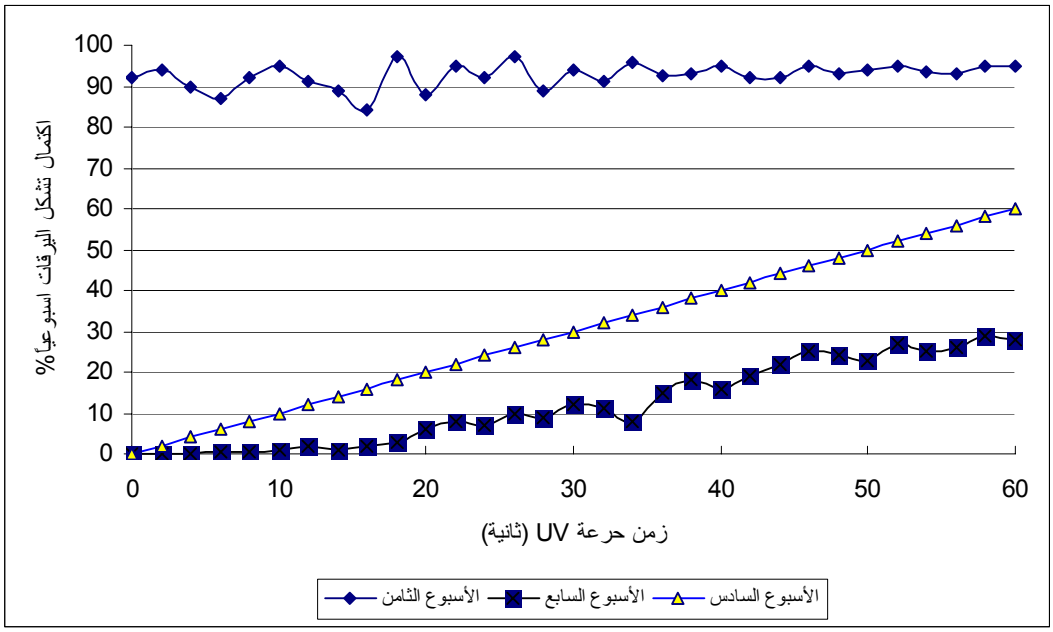
جميع البيوض والتي تم تشعيعها تم فحصها مجهريا وحضنها وذلك طبقا لظروف الحضن التي نـصح فيها (Arene1986) و (Seamster 1950) والتي تتضمن إضافة قطرات من H2SO4 0.1 N إلى وسط الحضن وذلك عند درجة حرارة 1± 28 مئوية لمدة ثمانية أسابيع .

تمت مراقبة البيوض أسبوعيا وذلك لمراقبة عملية التطور الجنيني للبيوض وذلـك لتحديـد الحيويـة ومراقبة تشكل اليرقات وبعد الفحص المجهري كانت تعاد البيوض إلى إطباق البتري وذلـك بغـسل الشريحه الزجاجيه بماء الصنبور وتحميض الوسط بحمض الكبريتيك الذي استعمل سابقا ومن ثم يـتم إعادة الأطباق إلى الحاضنه .

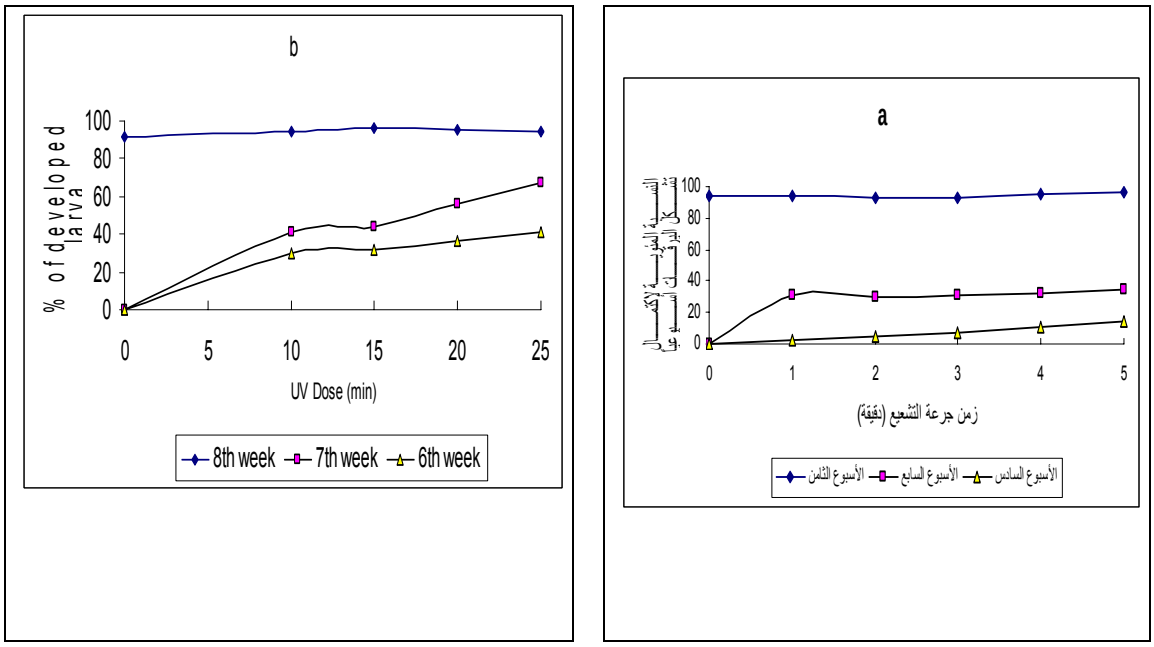
تمت مراقبة حيوية اليرقات وذلك باستخدام تراكيز مختلفة مـن محلـول هيبوكلـورات الـصوديوم وقد استخدمت أيضا الملونات الحياتية للتأكد من حيوية اليرقـات ومـن هـذه الملونـات crystal violet.وذلك طبقا لتطبيقات (Lilie 1977).

أ- 1 - النتيجة :

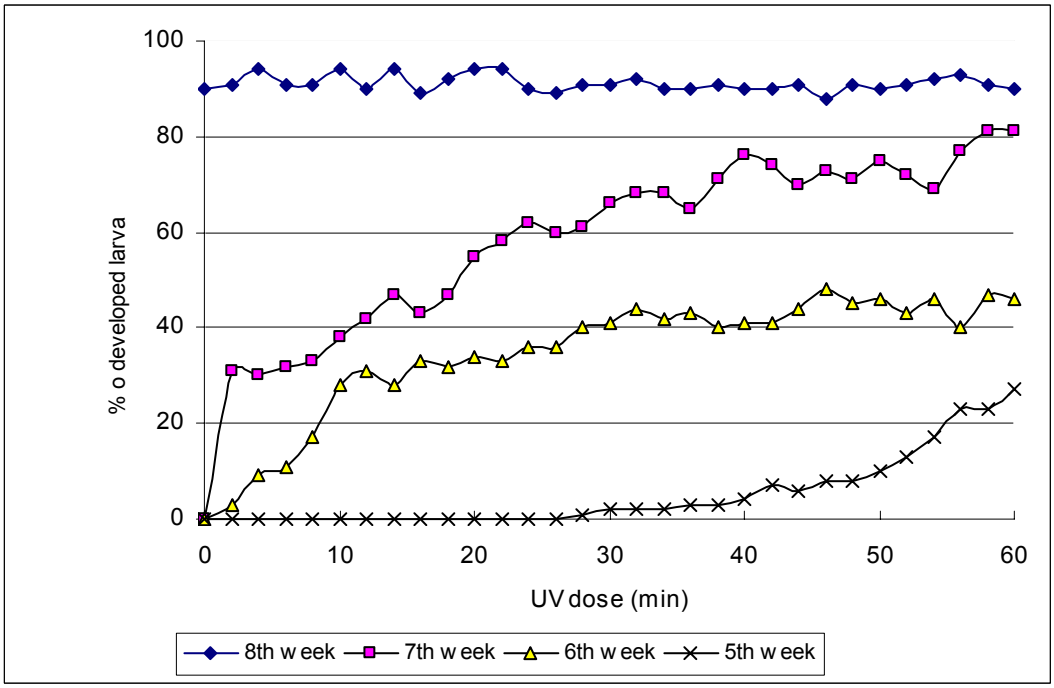
لم يظهر الفحص المجهري للبيوض المشعة بالأشعة الفوق بنفسجية وعند النقطة التي تـم التـشعيع عندها أية تغييرات مورفولوجية عند جميع الأزمان التي تم التشعيع عندها . إن الفحـص المجهـري الأسبوعي أظهر الانقسام الثنائي للخلايا في الأسبوع الأول من الحضن بعد التشعيع وذلك فـي 90 % من البيوض المشعة وعينات الشاهد التي فحصها وقد لوحظ الانقسام السريع في البيـوض المـشعة والتي تم فحصها وذلك ما بين الأسبوع الثاني والأسبوع الخامس حتى وصلت إلى طور اليرقات فـي الأسبوع السادس من الحضن أما عينات الشاهد فلم يتم تطور اليرقات حتى الأسبوع الثامن في نهايـة فترة الحضن وذلك في ظروف التجربة المذكورة . و تظهر الخطوط البيانية التالية (شكل:1و 2و3) علاقة زمن التشعيع بتسريع اكتمال تشكل اليرقة تم فحص حيوية اليرقات للبيوض المشعة والغيـر مشعة وذلك باستخدام تركيز مختلفة من هيبوكلورات الصوديوم ولكنها لم تعطـي أي مؤشـر علـى حيويتها أما فيما يتعلق بصبغة الأزرق الميثيلي والذي تم تجريبه في التحقق من عمله كمؤشر علـى حيوية البيوض وذلك بوضع البيوض في حمام مائي عند درجة حرارة 55 مئويـة لمـدة سـاعتين وفحصت حيوية البيوض الشاهد بواسطة صبغة زرقة الميثيلي (Keller , 1995) حيث أن البيوض لم تسمح بدخول الملون وذلك في 98 % من البيوض المستخدمة وقد طبقـت هـذه الطريقـة علـى البيوض الغير مشعة و المشعة بالأشعة الفوق بنفسجية وهذا أكد على حيوية البيوض وهو ما توصلنا له بعد عملية الحضن .



(*شكل:1*) يوضح العلاقة بين النسبة المئوية لاكتمال تشكل اليرقات اسبوعياً مع زمن جرعة أشعة uv من مرتية الثواني عند شدة اشعاعية قدرها 4.275 ميلي واط/سم^2 .



(شكل:2 a,b) يوضح العلاقة بين النسبة المئوية لاكتمال تشكل اليرقات اسبوعياً مع زمن جرعـة أشعة uv من مرتية الدقائق عند شدة اشعاعية قدرها 4.275 ميلي واط/سم^2 .



(شكل:3) يوضح العلاقة بين النسبة المئوية لاكتمال تشكل اليرقات اسبوعياً مع زمن جرعة أشعة uv

من مرتبة الدقائق عند شدة اشعاعية قدرها 4.275 ميلي واط/سم^2 .

ب - أكياس الجياردیا:

تم تحضير محلول أم لأكياس الجياردیا من عينة برازية حيث تم أخذ العينة وأضيف لها محلول المصل الفيزيولوجي 9 % ومزجت جيدا حتى تم الحصول على محلول متجانس تماماً . تم تمرير المحلول بعد ذلك عبر سلسلة المصافي السابقة الذكر وهذه المعاملة خاصة عند التعامل مع أشعة UVC لأنهـا ذات نفوذية ضعيفة حيث يمكن للعوالق البرازية أن تمنع وصول الأشعة إلى الأكياس .

بعد التكثيف ثفلت العينة وغسلت بالمصل الفيزيولوجي 9% عدة مرات وحـضر محلـول الأم الـذي يحوي 1 مليون كيس بـ 1 مل .

أجريت التجارب على ثلاثة مجموعات لكل مجموعة ثلاث مكررات مع وجود الشاهد لكل مجموعة .

تم عمليات التشعيع بالبايلوت الحاوي على لمبة UVC السابق الذكر على مسافة 5 سم .

المجموعة الأولى: تتألف من أثني عشر طبق بتري يحوي كل طبق على 5 مل من المحلول الأم بدءاً من 5 ثواني وحتى 60 ثانية بفاصل زمني قدره 5 ثواني بين العينة والعينة .

المجموعة الثانية : تتألف من أثني عشر طبق بتري يحوي كل طبق على 5 مل من المحلول الأم بدءاً من 2 دقيقة وحتى 24 دقيقة بفاصل زمني قدره 2 دقيقة بين العينة والعينة .

المجموعة الثالثة : تتألف من ثمانية أطباق بتري يحوي كل طبق على 5 مل من المحلـول الأم بـدءاً من 25 دقيقة وحتى 60 دقيقة بفاصل زمني قدره 5 دقيقة بين العينة والعينة .

بعد التشعيع مباشرة تم تطبيق طريقة الملونات الحيوية للتميز بين الأكياس الحيـة و الأكيـاس الميتـة وزرعت هذه العينات مع الشاهد على وسط Keister وفحصت لمدة سبعة أيام لمراقبة النمو.

ب –1- النتيجة :

تم الفحص باستخدام كافة الملونات الحيوية بما فيها ملون EA50كما جاء في الجدول رقم (3) ولكن لم يعطي أي نتائج تفريقية بين الأكياس الميتة والأكياس الحية حيث لم يستطيع ملونEA50 الـدخول ضمن الأكياس المشعة وتمييزها عن الأكياس الحية .

تم الزرع على وسط Keister وزرعت العينات المشعة وزرعت أيضاً عينات الشاهد ولكن لم يكن هناك نموات في كافة العينات بما فيها الشاهد .

ج - أكياس الزحار :

تم تحضير محلول أم لأكياس الزحار من عينة برازية حيث تم أخذ العينة وأضيف لها محلول المـصل الفيزيولوجي 9 % ومزجت جيداً حتى تم الحصول على محلول متجانس تماماً بعد ذلـك تـم تمريـر المحلول عبر سلسلة المصافي سابقة الذكر وهذه المعاملة خاصة عند التعامل مع أشـعة UVC لأنهـا ذات نفوذية ضعيفة حيث يمكن للعوالق البرازية أن تمنع وصول الأشعة إلى الأكياس .

بعد التكثيف ثفلت العينة وغسلت بالمصل الفيزيولوجي 9% عدة مرات وحـضر محلـول الأم الـذي يحوي 600 ألف كيس بـ 1 مل .

أجريت التجارب على مجموعتين لكل مجموعة ثلاث مكررات مع وجود الشاهد لكل مجموعة .

أجريت عمليات التشعيع بالبايلوت الحاوي على لمبة UVC السابق الذكر على مسافة 5 سم .

المجموعة الأولى: تتألف من أثني عشر طبق بتري يحوي كل طبق على 5 مل من المحلول الأم بدءاً من 5 ثواني وحتى 60 ثانية بفاصل زمني قدره 5 ثواني بين العينة والعينة .

المجموعة الثانية : تتألف من أثني عشر طبق بتري يحوي كل طبق على 5 مل من المحلول الأم بدءاً من 5 دقيقة وحتى 60 دقيقة بفاصل زمني قدره 5 دقيقة بين العينة والعينة .

بعد التشعيع مباشرة تم تطبيق طريقة الملونات الحيوية للتميز بين الأكياس الحيـة و الأكيـاس الميتـة وزرعت هذه العينات مع الشاهد على وسط Keister وفحصت لمدة سبعة أيام لمراقبة النمو.

ج – 1 - النتيجة :

تم الفحص باستخدام كافة الملونات الحيوية بما فيها ملون EA50 ولكن لم يعطي أي نتـائج تفريقيـة بين الأكياس الميتة والأكياس الحية حيث لم يستطيع ملونEA50 الدخول ضمن الأكيـاس المـشعة وتميزها عن الأكياس الحية .

تم الانتقال إلى وسط Keister والذي تم تحضيره في المخبر وزرعت العينات المشعة وزرع أيـضاً عينات الشاهد ولكن لم يكن هناك نموات في كافة العينات بما فيها الشاهد .

4-3- نتائج مراقبة مدخل و مخرج المحطة

مراحـــل مراقبـــة المحطة	عينات المدخل			عينات المخرج		
	بيـــوض الديـــدان المعوية	العدد /1ل	الأوالي	بيـــوض الديـــدان المعوية	العـــدد/ 10ل	الأوالي
المرحلـــة الأولى	بيوض اسكاريس ملقحة وغير ملقحة بيـوض محرشـفة صـغيرة وقزمة ملفوات عفجية شعرية رأس و شعرية ذيل بيوض شريطية لحم البقر	20	المتحـــول الزحـــاري المتحـــول الكولـــوني الجيارديـــــــا المـــــــشعرة بلانتيديوم كولي	< 1	-	المتحـــول الزحـــاري المتحـــول الكولـــوني الجيارديـــــــا المـــــــشعرة بلانتيديوم كولي
المرحلـــة الثانية	بيوض اسكاريس ملقحة وغير ملقحة بيـوض محرشـفة صـغيرة وقزمة ملفوات عفجية شعرية رأس و شعرية ذيل بيوض شريطية لحم البقر	15	المتحـــول الزحـــاري المتحـــول الكولـــوني الجيارديـــــــا المـــــــشعرة بلانتيديوم كولي	< 1	-	=
المرحلـــة الثالثة	بيوض اسكاريس ملقحة وغير ملقحة بيـوض محرشـفة صـغيرة وقزمة ملفوات عفجية شعرية رأس و شعرية ذيل بيوض شريطية لحم البقر	-	المتحـــول الزحـــاري المتحـــول الكولـــوني الجيارديـــــــا المـــــــشعرة بلانتيديوم كولي	ملفوات عفجية بيـــــوض اسكاريس	4	=
المرحلـــة الثالثة	بيوض اسكاريس ملقحة وغير ملقحة بيـوض محرشـفة صـغيرة وقزمة ملفوات عفجية شعرية رأس و شعرية ذيل بيوض شريطية لحم البقر	-	المتحـــول الزحـــاري المتحـــول الكولـــوني الجيارديـــــــا المـــــــشعرة بلانتيديوم كولي	بيـــــوض اسكاريس بيـــــوض محرشفةقزمة ملفوات عفجية بيوض شريطية البقر	20	=

	بيوض الديدان المعوية	الأوالي

4-4- نتائج مراقبة الحمأة

	بـــيض الإسكارس	أنواع أخرى	أكياس	نواشط
حمأة طازجة	10/20غ	الشريطية(10/4غ)- حرقص و محرشفة القزمـة و الـصغيرة(1>/غ)- ملفـوات عفجيـة(10/2غ)- المتورقة الكبدية (10/4غ)	لا يوجد	بلانتيـديوم كـولي- براميسيوم – القريبـة القولونية
حمأة مخزنـة 15 يوما"	10/20غ	الشريطية(10/4غ)- حرقص و محرشفة القزمـة و الـصغيرة(1>/غ)- ملفـوات عفجيـة(10/2غ)- المتورقة الكبدية (10/4غ)	لا يوجد	لا يوجد
حمـأة مخزنـة شهرين	10/18غ	لا يوجد	لا يوجد	لا يوجد
حمـأة مخزنـة 6 أشهر	<1	لا يوجد	لا يوجد	لا يوجد
حمأة مخزنـة 10 أشهر	<1	لا يوجد	لا يوجد	لا يوجد
حمأة مخزنة سنة و شهرين	<1	لا يوجد	لا يوجد	لا يوجد
حمـأة مخزنـة 4 سنوات	<1	لا يوجد	لا يوجد	لا يوجد

5- المناقشة

يتسبب ري المحاصيل بالمخلفات السائلة غير المعالجة زيادة في الزراعة ، وفي غضون السنة التاليـة (آذار 2003 وحتى آذار 2004) لوحظ تراجع في كفاءة المحطة وقد تبين وجود بيـوض الطفيليـات الأوالي في مياه المخرج للمحطة, أما فيما يتعلق بالحمأة فقد تبين استمرار تواجد الممرضـات مثـل الشريطية والمحرشفة القزمة والحرقص والملقوات العفجية والمتورقة الكبديـة بعـد خروجهـا مـن الهاضمات والتي تبلغ درجة الحرارة فيها 60 درجه مئوية. غير أنها لم تستطع تشكيل يرقات وحتـى بعد حضنها لمدة شهرين في وسط حمض الكبريت 0.1 N حيث يدل ذلك على عدم قدرتها في إحداث العدوى . أما بما يتعلق بالأوالي الموجودة فيجب الانتظار عليها مدة تخزين لا تقـل عـن الـشهرين للتخلص من البلانتديوم كولي والقربية الكولونية .

لذلك فان احتمال تراجع كفاءة أي محطة معالجه وارد وهذا يقتضي إيجاد وسائل أخرى مكملة لتنقيـة تلك المخلفات. ففي حال استخدام تقنية أشعة غاما فان معظم دراسات المعالجة التقنيـة علـى بيـوض الإسـكارس تمـت بتـشريح الديـدان والحـصول منهـا علـى البيـوض مباشـرة (Yeager and O Brien,1983) و (Horak,1994) و (Yeager &Ward 1980) و (Holl , P Schneider,H., 1975) . و في هذا البحث ، جمعت البيـوض المخـصبة ذات الغـشاء المزدوج في حين ارجع (Chang,1961) انخفاض حيوية البيوض لكونه استخدم البيـوض مقـشره وقد أجرى تجربته على 250- 300 بيضه . أمـا (Langly1975) & (Brannen فقـد اسـتخدم 3000 – 10000 بيضه / مل لكل جرعه إشعاعية , وذلك لتحديد الحساسية الإشعاعية للبيوض .

كانت الجرعة الصغرى 1.5 kGy كافيه لقتل جميع البيـوض لـذلك كـان مـن المستحيل تحديد الجرعة الإشعاعية القاتلة لذلك يجب إجراء المزيد من الدراسات لتحديد تلك الجرعـة اعتمادا على التغيرات المورفولوجية . في عام 1975 حصل (Siviniski H.D., 1975) على قتل كامل للبيوض عند الجرعـة 0.95 kGy بواسـطة منبـع كوبالـت فـي محلـول ملحـي. حـصل (Horak ,P1975)على النتيجة نفسها عند الجرعة 1.1 kGy باستخدام المسرع الإلكتروني. وبـين (Enigk, 1975) أن الجرعة 4.8 kGy ضرورية لتحطيم بيوض الأسكارس . من جهة أخرى تبين أن حيوية البيوض لم تتأثر بالجرعة 0.3 kGy وبعدد البيوض الحية بعد التـشعيع وكانـت النتـائج مشابهة للشاهد وبما أنه في هذه الدراسة لم يتم الأخذ بالعوامل الفيزيائية والكيميائيـة المـؤثرة علـى الجرعة الإشعاعية(درجة الحرارة والأكسجين ودرجة الحموضة والأوزون ....) لـذلك نـرى فـي الدراسات اللاحقة الأخذ بتلك العوامل بعين الاعتبار وكذلك عدد البيوض ونسبتها حيث أنها لـم تكـن

كافيه لتحديد الحساسية الإشعاعية للبيوض وذلك في الدراسات اللاحقة. أما في حال استخدام الأشـعة غير المؤينة في تشعيع بيوض الأسكارس فإن معظم دراسات تطور وتحطيم بيوض الإسكارس جرت على بيوض مستخلصة من رحم ديدان (*Ascaris suum*) والتي عادة ما تصيب الخنزير. بـين (Horak, 1994; Ahmed and Sorensen, 1995; Gaspard, 1996; Ahmed and Sorensen1997) أن قيمة الحساسية الإشعاعية للتحطيم اختلفت تبعاً لجنس الديدان أي أنه قد تختلف قيمتها عند *Ascaris suum* عنه في *Ascaris lumbricoides*. ويعزى ذلك للعوامل الجينية كمـا بينه كل من (Nelson and Drby 2001) و(Horak 1994).

تختلف الحساسية الإشعاعية في حال الحصول على البيض من براز عائل مصاب عنه في حـال تـم الحصول عليها من الدودة مباشرة . وضـح البـاحثون (Nelson and Darby 2001) و(1996) Gaspard *et al*. أن الصعوبة الرئيسية في الحصول على بيوض حية من الديدان إضافة إلى سـمية المواد المستعملة في استخلاص تلك البيوض إضافة إلى قلة بيوض الديـدان فـي الـدول المتقدمـة والمتطورة لذلك في هذا البحث تم الحصول على البيوض من براز مريض مـصاب بهـذه الديـدان *Ascari lumbricoides* ولقد تم تجنب استخدام مواد الاستخلاص السامة باسـتعمال المناخـل ذات المسامية المناسبة لهذا الغرض ولقد احتوت العينة على عدد كبير من البيوض الكافية لأجراء التجارب . إن تقنية التعطيل بواسطة الأشعة فوق البنفسجية تحكمها عوامل كثيرة وتؤثر فيها نذكر منها نوعيـة مياه الصرف الصحي والمواد الصلبة الموجودة في هذه المياه إضافة إلى امتصا صيتها وعوامل أخرى تتعلق بالمصدر الإشعاعي كتصميم الخلية الإشعاعية وانتشار الأشعة فوق البنفسجية أي بمعنـى آخـر استقبال الأشعة وشدتها .ولقد أشار (Gaspard *et al* .1996) بأن بعـض المركبـات العـضوية الموجودة في مياه الصرف الصحي لها تأثير معطل على تطور البيوض عند فحـصهم فـي بيئـات مختلفة ولتجنب هذا التأثير السلبي و تحفيز الشدة الإشعاعية فأنهم لجأوا إلى ترشيح مياه الوسط وهـي مياه المخرج لمحطة المعالجة . إن النتائج التي حصلنا عليها تمشت مع النتائج التـي توصـل لهـا (NolfS 1932) والذي قال بان هناك تأثير للأشعة الفوق بنفسجية على حيويـة بيـوض الإسـكارس والتي اتفقت في عام مع(Warlton 1983)الذي قال بان بيوض الإسكارس تقاوم الكلور والرقم الهيدروجيني العالي والمنخفض والأشعة فوق البنفسجية ولقد اهتم كثير من العلمـاء بتـأثير الحـرارة والرطوبة والتهوية وبعض الإضافات إلى وسط الحضن كمعايير لزيادة أو تخفيض سـرعة التطـور الجنينـي للوصـول إلـى مرحلـة اليرقـات (Seamster, 1950 1995) (Arene1986Gaspard *et.al* .

بينت الدراسة الحالية أن تعريض بيوض الإسكاريس للأشعة فوق البنفسجية قد سـرعت مـن تطـور البيض وذلك في كافة المراحل الزمنية للتشعيع. وقد يكون الـسبب فـي ذلـك بعـد البيـوض عـن

مصدرالأشعة بمسافة 5 سم، ويمكن التوقع بأنه في حال ملامسة البيوض للأشعة فإن تـأثير الأشـعة سيكون قاتلاً (Brian *et al* ., 1992) .

يمنع تركيب القشرة الخارجية لبيضة الإسكارس المخصبة اختراق الأشعة فوق بنفسجية لكامل البيضة مما يعطيها حماية لمكوناتها الهامة مثل DNA من التحطيم وبالتالي موت البيضة ولتفـسير زيـادة معدل الانقسام الجنيني يمكن أن يفسر بأن الأشعة فوق بنفسجية تعمل على تغييرات في الوسط المشعع الذي يعمل على تحفيز العمليات الفسيولوجية التي تعمل على زيادة سرعة فقس البيوض (Fairbairn 1961 ,) لذلك يمكن الاستنتاج من هذا العمل بأن معالجة مخلفات الصرف الصحي بواسطة الأشـعة فوق بنفسجية وفي ظروف هذه التجربة لا تؤدي إلى قتل بيوض الإسكارس لمبريكويـدز بـل علـى العكس من ذلك فقد أعطت الفرصة للبيوض بتسريع عملية الانقسام الجنيني بـصورة أسـرع بالمقارنة مع البيوض الغير مشععة .

أما بما يتعلق بالمتحول الزحاري والجياردیا فلقد وجد أثناء البحث في الدراسات الموجودة على أكياس الجياردیا اللامبليا وأكياس الزحار أنها تمت بتأثير أشعة UV كعامل للقضاء عليها ويفتقر هذا المجال دراسة تأثير أشعة غاما على هذه الطفيليات.

ومعظم الدراسات التي تمت على تأثير أشعة غاما على الطفيليات تناولت جانب الديدان المعوية بشكل عام وبيوض الإسكارس بشكل خاص (Yeager and O'Brien, 1983

,Horák (1994), (Holl and Schneider, 1975).

لذلك وجدنا من الضروري إجراء دراسة تأثير أشعة غاما على أكثر الكائنات الأوالي مقاومة لعوامـل الطبيعة ولذلك اخترنا من صنف الجواذر المتحول الزحاري ومن صنف السوطيات اخترنـا أكيـاس الجياردیا (Lorenzo-lorenzo et.al 1993)

بينت الدراسة التي أجريت على هذه الطفيليات أن الجرعة المثلى للقضاء علـى 95 % مـن أكيـاس الجياردیا وأكياس المتحول الزحاري هي 6 kGy والتي تم التحقق منها بواسطة الملونـات الحيويـة لتحديدها. ولذلك ينبغي أخذ هذه الجرعة بعين الاعتبار بالنسبة لمحطات الصرف الصحي التي تعـالج مياهها بأشعة غاما . لذلك فقد أظهرت أشعة غاما أظهرت فاعليه في القضاء على بيوض الأسـكارس أما الأشعة فوق البنفسجية وفي ظروف التجارب والجهاز الـذي اسـتخدم كـان تأثيرهـا معاكـسا ولو أنه استخدم التشعيع بتلامس المياه مع المصدر الضوئي للأشعة فوق البنفسجية أو كانت المـسافة ما بين المصدر الضوئي والعينة اقرب بحيث تكون الشدة الإشعاعية اكبر لأعطت نتائج ايجابيه وممـا يدلل على ذلك هو تأثير الشمس على الحمأة المخزنة لمدة شهرين حيث كان لهـا دورا ايجابيـا فـي القضاء على جميع بيوض الطفيليات والأوالي الموجودة في الحمأة .

أما بما يتعلق بالجياردیا والزحار فكانت الجرعهالإشعاعية6 كيلـو غـراي كافيـه للقـضاء علـى هذه الطفيليات وبذلك تكون الجرعه 6 كيلو غراي جرعه كافيه لتطهير المياه العادمـه مـن بيـوض

الطفيليات الأوالي المسببة للأمراض المعوية وقد أمكن التأكد من ذلك باستخدام الملونات الحيوية الأزرق الميثيلي في حال الكشف عن الأسكارس وبابا نيكولا في حال الكشف عن الزحار والجيارديا أما أوساط الزرع لم تعط أي نتائج ايجابية .

أما في حال استخدام الأشعة فوق البنفسجية استخدمت الأشعة فوق البنفسجية بشكل واسع في أمريكا الشمالية لتطهير المياه العادمه حيث أن الأثر القاتل للأشعة فوق البنفسجية الصادرة من مصادر طبيعية أو صنعيه ينتج عن امتصاص فوتونات الأشعة فوق البنفسجية من قبل الحمض الريبي النووي منقوص الأكسجين مسببا شطر السلسلة (Sontag&Schuchmann1992).

هناك العديد من المراجع المتوفرة , وقد اثبت (Rice and Hoff 1981) و (Lorenzo et.al1993) إن الأوالي المتكيسة غير حساسة للأشعة فوق البنفسجية .وفي بحثنا هذا استخدمنا الشدهالإشعاعية15390 mw/cm² وبتطبيق الملون الحيوي EA 50 حيث لم يتم تسجيل لدخول اللون سواء في عينات الشاهد أو عينات التجربة مما يؤكد مقاومة هذه الأكياس للأشعة فوق البنفسجية وهذا تطابق مع ما توصل له(Rice and Hoff) و(Lorenzo,et.al1993)

لم تعط تقنية الزرع أية نتائج إيجابية بسبب عدم استعمال البيئة المناسبة، ويمكن إجراء دراسات أخرى تستعمل فيها أوساط زرع أخرى كتلك التي استعملها كل من (Lorenzo et.al1993) أو (meyer 1970) .

المراجع

1. Ahmed, A.U., Sorensen, D.L., 1995 .Kinetics of pathogen destruction during storage of dewatered biosolids. Water environment-research .v. 67(2) p. 143-150.

2. Ahmed, A.U., Sorensen, D.L,1997. Autoheating and pathogen destruction during storage of dewatered biosolids with minimal mixing v. 69(1) p. 81-94.

3. Akin, E.W., 1983, Infective dose of wastewater Pathogens, Proc. 2nd National Symposium Municipal Wastewater Disinfection, Orlando, Florida, Health Effects Research Laboratory, Cincinnati, OH.

4. Arene, F. O. I.,(1986). Ascaris suum: Influence of embryonation temperature on the viability of infective larva. J. Therm. Biol. Vol. 11, No. 1, pp. 9-15.

5. Arfaa, F. (1978). The effect of various chemicals and temperature in destruction of the egges of Ascaris lumbricoides: A progress report. Iranian J. Public Health, 7(4): 186-195.

6. Ayres, R.M. (1992). On the removal of Nematode Eggs in Waste Stabilization Ponds and Consequent Potential Health Risks from effluent reuse. PhD Thesis, Department of Civil Engineering and Pure and Applied Biology, University of Leeds, England.

7. Bhaskaran, T. R., Sampathkumaran, M. A., Sur, T.C. and Radhakrishnan O. (1956). Studies on the effect of sewage treatment process on the survival of intestinal parasites. Indian Journal of Medical Research, 44(1): 163-180.

8. Bird. A. F. and McClure, M. A. (1976). The tylenchid (Nematoda) eggs shell: structure, composition and permeability. Parasitology, 72: 19-28.

9. Branner,J,P.,Garst,D.M.,Langley,S.,1975. Inactivation of Ascaris lumbricoides eggs by heat, radiation and thermo-radiation. SAND 75-0163, Report prepared by Sandia Laboratories, Albuquerque, NM87115.

10. Brown, H. W. (1928). A quantitative study of the influence of oxygen and temperature on the embryonic of the pig ascarid (Ascaris suum, Goetze). J. Parasitology, 14 (3): 141-160.

11. Bryan, F.L., 1977, Disease transmitted by foods contaminated by wastewater, J. Food Protection 40: 45-52.

12. Bryan, E. H., Dick, R. I., Swinwood, J. F., Chairman, P. K., Carlson, D. A., Hare, G., Waite, T., 1992. Radiation energy treatment of water, wastewater and sludge. A State-of-the-Art report. American Society of Civil Engineers, New York. ISBN 0-87262-901-5.

13. Burge, W.D. and P.D. Millner, 1980, Health aspects of composting: Primary and secondary pathogens, pp. 245-266, G. Bitton, B.L. Damron, G.T. Edds and J.M. Davidson (Eds.), Sludge- Health Risks of Land Application, Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI.

14. Cram, E. B. (1924). The influence of low temperatures and disinfection on the eggs of Ascaris lumbricoides. Journal of Agricultural Research, XXVII (3): 167-175.

15. Cram, E. B. (1943). The effect of various treatment processes on the survival of helminth and protozoan cysts in sewage. Swage Works J., 15: 1119-1138.

16. Carrington, E. G. and Harman, S. A. (1981). Recovery of Ascaris eggs from sludge. WRC Process Evaluation. Stevenage, U.K., Water Research Centre.

17. Enigk, K., Holl, P., Dey- Hazra A., 1975. Erradication of parasitic cysts and ova in sewage sludge by irradiation with low energy electrons. Zb1. Bakt. Hyg., I. Abt., Orig. B 161,61-71 (in German).

18. -Fairbairn, D., 1961. The in vitro hatching of Ascaris lumbricoides eggs. Canadian Journal Zoology. vol., 39. pp 153-162

19. Fairbairn, D. (1970). Biochemical adaptation and loss of genetic in helminth parasites. Biological Reviews, 45: 29-72.

20. Farrell, J.B., V. Bhide and J.E. Smith, Jr., 1996, Development of EPA's new methods to quantity vector attraction of wastewater sludges, Water Environ. Res. 68: 286-294.

21. Fleming, W. F. (1987). Ecdysteroids during embryonation of eggs of Ascaris sum. Comparative Biochemistry and physiology, 87A (3): 803-805.

22. Foster, D.H. and R.S. Engelbrecht, 1973, Microbial hazards in disposing of wastewater on soil, pp. 247-270, W.E. Sopper and L.T. Kardos (Eds.), Recycling treated municipal Wastewater and Sludge through Forest and Cropland, Pennsylvania State University Press, University Park.

23. Gaspard,P., Wiart, J., Schwartzbrod, J., 1996. A method for assessing the viability of nematode eggs in sludge. Environmental Technology. V. 17(4) p. 415-42

24. Hass, D. K. and Todd, A. C. (1962). Extension of a technique for hatching ascarid eggs In Vitro. American Journal of Veterinary Research, 11: 169-170.

25. Holl, P., Schneider, H., 1975. Disinfection of sludge and wastewater by irradiation with electrons of low accelerating voltage. In: Radiation for a Clean Environment, Proceedings of a Symposium, International Atomic Energy Agency, Vienna, 123-138.

26. -Horak, P., 1994. Experimental destruction of ascarid ova in sewage sludge by accelerated electron Department of Parasitology. Water Research. V. 28(4) p. 939-941.

27. Jones, F., A.F. Godfree, P. Rhodes and D.C. Watson, 1983, Salmonellae and sewage sludge –Microbiological monitoring, standard and control in disposing sludge to agricultural lands, pp. 95-114, P.M. Wallis and D.L. Lehmann (Eds.), Biological

Health Risks of Sludge Disposal to Land in Cold Regions, University of Calgary Press, Alberta.

28. Keister DB (1983). Axenic culture of Giardia lamblia in TY1-S-33 medium supplemented with bile. Trans Roy Soc Trop Med Hyg,. 77 (4): 487-488.

29. Keller, P., 1951.Sterilization of sewage sludge.II. The influence of heat treatment on the ova of Ascaris lumbricoides. Journal of the Institute of Sewage Purification. 1. 100- 109.

30. Kiff, R. J. and Lewis-Jones, R. (1984). Factors that govern the survival of selected parasites in sewage sludge. Ch. 25 in Sewage Sludge Stabilization and Disinfection, ed. Bruce, A. M., Chichester, Ellis Horwood, 453-461.

31. Lorenzo- Lorenzo M. J., Ares-Mazas M. E., Villacorta-Martinez de Maturana I. and Duran-Oreiro D . (1993) Effect of ultraviolet disinfection of drinking water on the viability of Cryptosporidium parvum oocysts. Journal of Parasitology 79(1), 67-70.

32. Nelson, K. L., Darby J. L., 2001 Inactivation of viable Ascaris eggs by reagents during enumeration. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 67, No. 12. p. 5453- 5459.

33. Nolf, L. O., 1932. Experimental studies on certain factors influencing the development and viability of the ova of the human Trichuris as compared with those of the human Ascaris . American journal of Hygiene. 16. p. 288- 322.

34. Oksanen, A., Eriksen, L., Roepstorff, A., Ilose, B., Nansen, P. And Lind. P. (1990). Embryonation and infectivity of Ascaris suum eggs: A comparison of eggs collected from worm uteri with eggs isolated from pig faeces. Acta Vet. Scand., 31 (4): 393-398.

35. Pahren, H.R., 1987, Microorganisms in municipal solid waste and public health implications, CRC Crit. Rev. Environ. Control 17(3): 187-228.

36. Passey, R. F. and Fairbain, D. (1955). The respiration of Ascaris lumbricoides eggs. Canadian Journal of biochemistry and Physiology, 33: 1033-1046.

37. Pedersen, D.C., 1981, Density levels of pathogenic organisms in municipal wastewater sludge review, U.S. Environmental Protection Agency, EPA-600/S2-81-170, Cincinnati, OH.

38. Phillips, H. J. (1973). Dye exclusion tests for cell viability. In P. F. Kruse and M. K. Patterson (ed.). Tissue and Culture. London and New York: Academic Press, 406—408.

39. Reimers, R.S., W.S. Bankston, G.L. Goldstein, Y. Yang and S. Liu, 1996, Disinfection of pathogens by biosolids processing, pp. 51-74, Stabilization and Disinfection-What Are Our Concerns?, Water Environment Federation, Dallas, TX.

40. Reimers, R. S., Little, M. D., Akers T. G., Henriques, W. D., Bordeaux, R. C. and McDonnell, D. (1989). Persistence of pathogens in lagoon-stored sludge. EPA, 600/2-89/015.

41. Rice E. W. and Hoff J. C. (1981) Inactivation of Giardia lamblia cysts by ultraviolet irradiation. Appl. Envir. Microbiol. 42(3), 546-547.

42. Seamster, A. P. 1950. Developmental studies concerning the eggs of Ascaris lumbricoides var. suum. American Midland Naturalist, 43, pp 450-470.

43. Shamma, M., and Al-Adawi, M.A., The morphological changes of Ascaris Lumbricoides ova in sewage sludge water treated by gamma irradiation. Radiation Physics and Chemistry, ?

44. Sivinski, H. D., 1975. Treatment of sewage sludge with combinations of heat and ionizing radiation (thermo-radiation). In: Radiation for a Clean Environment, Proceeding of Symposium, International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 151-167.

45. Smith, G. and Schad, G. A. (1989). Ancylostoma duodenale and Necator americanus: effect of temperature on egg development and mortality. Parasitology, 99: 127-132.

46. Stedman's Medical Dictionary, 1977, 23ed., Williams, Baltimore, MD.

47. Tromba, F. G. (1978a). Evaluation of an ultraviolet attenuated vaccine for swine ascariasis. In: proceeding of the Fourth International Congress of Parasitology, Section E, 128.

48. USEPA (1992c). Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge. EPA/625/R-92/013, Environmental Regulation and Technology; United States of Environmental Protection Agency.

49. Visvesvara GS, Schuster FL. Efficacy of novel antimicrobials against clinical isolates of opportunistic amebas. Journal of Eukaryotic Microbiology, 1998, (45) , Iss 6, pp 612-618

50. Wharton, D. A. (1980). Nematode egg-shells. Parasitology, 81: 447-463.

51. Wharton, D. A., (1983). The production and functional morphology of helminth egg-she ll. Parasitology 86. p. 85- 86.

52. World Health Organization, (1967). Report of a WHO Expert Committee on Cotrol of Ascariasis. Techn. Rep. Ser. No. 379, 19.

53. Yeager, J. G., O'Brien, R. T., 1983. Irradiation as a means to minimize public health risks from sludge-borne pathogens. Journal of Water Pollution Control Federation. 55(7), 977-983.

54. -Yeager, J. G., Ward, R. L., 1980. Effectiveness of irradiation in killing pathogens. National Symposium on the Use of Cesium-137 to Process Sludge for Further

Reduction of Pathogens. Sandia Labs. 80-2744 (Report prepared by Sandia Laboratories, Albuquerque, New Mexico 87115 , pp. 80-83.