

مختبر الاحياء الدقيقة Microbiology laboratory

- يعتبر مختبر الاحياء الدقيقة المعمل الرئيسي في جميع المؤسسات الطبية والصحية سواء كانت تعليمية او بحثية او علاجية
- يتطلب العمل في هذه المختبرات دراية كافية بمحتوياتها ومعداتنا ونوعية المواد المتداولة فيه واسلوب التعامل بها بما يضمن سلامة العاملين والمجتمع نظرا لوجود خطر كامن في جميع الميكروبات.
- لذا تم وضع بعض التوجيهات الهامة التي يجب مراعاتها والتقيد بها لتحقيق سلامة الجميع ياذن الله باقل قدر من الخسائر واعلى قدر من الجودة

احتياطات السلامة داخل مختبرات الاحياء الدقيقة وكيفية التعامل مع المزارع البكتيرية

Microbiological Laboratory Safety

- ١- ارتداء المعطف النظيف Laboratory coat قبل الدخول للمعمل ويجب غلق المعطف
- ٢- الحضور الى المختبر في موعد الدرس
- ٣- التعامل مع أي عينة بالمختبر مهما كان نوعها على أنها عينة معدية
- ٤- عدم الأكل والشرب أو جلب الأغراض الشخصية داخل المعمل
- ٥- الانتباه لشرح التجارب المعملية وتنفيذها بدقة
- ٦- تنظيف طاولة العمل Bench بالمطهر المناسب قبل وبعد العمل
- ٧- يجب إبلاغ المشرفة على المعمل في حال تلوث أو انسكاب أي مادة أو كسر أي اداة زجاجية
- ٨- عدم حمل العينات او المزارع الميكروبية خارج المعمل
- ٩- كتابة جميع البيانات التوضيحية على كل عينة
- ١٠- الحرص على نظافة وسلامة الاجهزة والمعدات
- ١١- غسل اليدين جيدا بالماء والصابون قبل مغادرة المعمل
- ١٢- يجب التعامل مع جميع المواد الكيميائية بحذر والتعامل معها حسب توصيات الصانعين
- ١٣- عدم لمس العينين او استخدام الفم اثناء العمل داخل المختبر
- ١٤- كافة ادوات المختبر المستخدمة من أنابيب ومصاصات وشرائح ومصاصات توضع في الاواني الخاصة بها لحين تنظيفها
- ١٥- تلقح مزارع الاحياء الدقيقة الخطرة داخل الكابينة الواقية Safety cabinet مع ارتداء القفازات الواقية
- ١٦- في حالة استخدام القفازات الواقية يجب عدم لمس كافة محتويات المختبر حتى لا تتلوث
- ١٧- العينات والمزارع الملقحة والقفازات الملوثة المراد التخلص منها توضع في الانية المحددة لذلك حتى يتم تعقيمها والتخلص منها بالطرق الصحيحة المناسبة
- ١٨- الشعر الطويل يجب أن يربط للخلف لتلافي خطر الاحتراق والتلوث
- ١٩- تحرق ابرة التلقيح Loop او الابرة الناقلة قبل وبعد الاستعمال
- ٢٠- المجهر Microscope يعتبر الصديق المصاحب لطالب علم الاحياء الدقيقة فيجب صيانته والتعامل معه بدقة، ويجب تنظيف العدسات وازالة اثار زيت السيدر وعدم ترك الشريحة على المجهر وغلق المجهر بعد الانتهاء من الفحص
- ٢١- عدم رمي المواد التالفة والاوساخ في حوض الغسيل
- ٢٢- الحرص على اطفاء اللهب بعد الانتهاء من العمل
- ٢٣- في حال وقوع مزارع ميكروبية حية، ابقى هادئة واتبعي الاتي:
اخبري المشرفة باسرع وقت
ضعي منشفة ورقية او قطعة قطن فوق المادة المسكوبة
اسكي مادة مطهرة بكمية وافرة فوقها
ارفعي المنشفة او القطن بعد ١٥ دقيقة وضعيها في الوعاء المخصص

- ٢٤- يجب كتابة تقرير Report لكل تجربة يتضمن النقاط التالية: عنوان التجربة- الهدف من التجربة- طريقة العمل- النتائج تذكر كما هي وان كانت غير مشجعة- المناقشة

التحكم بالأحياء الدقيقة (Controlling of Microbes)

طرق التحكم (Methods of control)

التعقيم Sterilization هو عملية إزالة أو إبادة لكافة صور الأحياء الدقيقة سواء كانت خضرية أو جرثومية من الشيء المراد تعقيمه (قتل أو إزالة ميكانيكية)

التعقيم ابتكار ساهم في تطور علم الأحياء الدقيقة وهو مؤسس على حقيقتين:

• تحقيق التعقيم

• المحافظة على كفاءة التعقيم

طرق التعقيم:

** الطرق الفيزيائية (الطبيعية)

أ- الحرارة:

أ) الحرارة الجافة: **Dry heat**

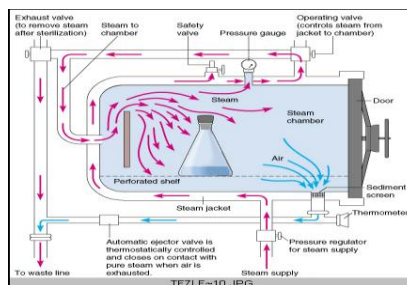
١. **الحرق Incineration** باستخدام اللهب المباشر (مصباح بنزن) يستخدم لتعقيم ابر التلقيح حيث يسخن السلك البلاستيكي لدرجة الاحمرار وينتج عن ذلك قتل كل الكائنات الملوثة بالإبرة
٢. **التلهب الكحولي Alcohol-flamed** يستخدم اللهب والكحول معا حيث يتم غمس المشارط او الملاقط في الكحول ثم تمرر في اللهب وينتج عن ذلك اشتعال الكحول وبالتالي تحدث عملية التعقيم
٣. **الهواء الساخن Hot air** باستخدام افران الهواء الساخن عند درجات حرارة مختلفة (١٦٠م لمدة ساعتين او ١٨٠م لمدة نصف ساعة او ١٠٠م لمدة ٨ ساعات)، تستخدم الافران لتعقيم الادوات الزجاجية كالدوارق والماصات. عند استخدام هذه الطريقة للتعقيم يراعى عدم فتح الفرن وهو ساخن حتى لا تنكسر الدوارق الزجاجية، كما ان الانكماش السريع الذي يحدث داخل الدورق قد يسبب دخول الهواء الملوث الى داخل الدورق.

ب) الحرارة الرطبة: **Moist heat**

هذه الطريقة تعتمد على استخدام الماء على هيئة بخار

١- استخدام جهاز الاتوكلايف **Autoclave**

- يعتمد على درجة حرارة تبلغ ١٢١م وضغط جوي عالي يبلغ ١٥ رطل لكل بوصة مربعة لمدة من ١٥ - ٢٠ دقيقة)
 - بعض المواد تحتاج فترات اطول مثل كمية كبيرة من التربة قد يحتاج تعقيمها ساعة من الزمن)
 - يستخدم لتعقيم الاوساط الغذائية التي تتحمل درجات حرارة عالية
 - استخدام هذا الجهاز يوفر الوقت البخار يساعد على تغلغل الحرارة داخل الخلايا بسرعة وبالتالي تكون عملية تجمع البروتين الخلوي وتخثره اسرع مما هو الحال عليه عند استخدام الحرارة الجافة
- عند استخدام جهاز الاتوكلايف يؤخذ في الاعتبار عدة احتياطات منها:
- احتواء الجهاز على كمية مناسبة من الماء
 - فتح الصمام الخاص باخراج الهواء بعد بدء عمل الجهاز ثم يغلق بعد بدء ظهور البخار منه (وجود هواء داخل الجهاز يقلل كفاءة التعقيم)
 - بعد انتهاء عملية التعقيم لايفتح صمام اخراج الهواء قبل ان يبرد الجهاز حتى لا يؤدي الى غليان البيئة وتطاير السدادات القطنية ثم فشل عملية التعقيم.
- (الشكل عبارة عن مقطع في جهاز الاتوكلايف يوضح التركيب العام له ومسار بخار الماء داخله)



٢ - استخدام جهاز ارنولد Arnold sterilizer

يعرف ايضا بالتعقيم المتقطع Intermittent او التندلة Tyndlization

- يعتمد على استخدام درجة حرارة ١٠٠ م على ثلاث فترات مدة كل فترة ٣٠ دقيقة بين كل فترة والاخرى يوم كامل وذلك عند ضغط جوي عادي
- هذا الاسلوب في التعقيم يستخدم للمواد التي لاتتحمل درجة حرارة عالية مثل بعض السكريات وسيرم الدم
- فكرة عمل الجهاز انه في حالة التعقيم الاول يتم قتل كل الخلايا الخضرية، وبعد التحضين الاول يتم انبات الجراثيم الباقية من التعقيم الاول ثم يتم قتلها بعد التعقيم الثاني وكذلك الحال في التعقيم للمرة الثالثة حيث تقتل الجراثيم التي انبتت بعد التعقيم الثاني

عيوب استخدام هذا الاسلوب في التعقيم:

- يستغرق وقت طويل وقد تحدث بعض التغيرات غير المرغوبة في المواد المعقمة
- تفشل هذه الطريقة في قتل الجراثيم الغير نابثة والمقاومة للحرارة
- فشل هذه الطريقة في قتل الجراثيم اللاهوائية

ب استخدام الاشعة Radiation :

اساس عملها في التعقيم انه كلما كان الطول الموجي قصير كلما كان تأثيرها كبير تستخدم الاشعة لتعقيم غرف العمليات الجراحية ووحدات تعبئة الادوية وفي بعض الصناعات الغذائية والادوات المعملية البلاستيكية يعزى تأثيرها المميت الى تكوين فوق الاكاسيد في الوسط المعامل او نتيجة التأثير المباشر على المادة الوراثية في الخلية DNA يمثلها الاشعة السينية X-ray، اشعة جاما Gamma ray (اشعة مؤينة ذات قدرة كبيرة على الاختراق) والاشعة فوق البنفسجية (غير مؤينة وقدرتها على الاختراق ضعيفة)

**** الطرق الكيميائية Chemical methods**

قليل من المواد الكيميائية تستخدم في التعقيم (Sterilization) وهذه يكون لها تأثير قاتل وتسمى Germicidal ومنها بعض الغازات مثل الفورمالين Formalin بعض المواد الكيميائية تستخدم في التطهير Disinfection والتي قد يكون لها تأثير مثبت Germistatic على نمو الاحياء الدقيقة كما قد يكون لها تأثير قاتل Germicidal المواد الكيميائية التي تستخدم لقتل الاحياء الدقيقة على الاجسام الغير حية تسمى Disinfectants chemical المواد الكيميائية التي تستخدم لقتل او تقليل الاحياء الدقيقة على الاجسام الحية تسمى Antiseptic chemical موقع تأثير المواد الكيميائية قد يكون الجدار الخلوي او بناء البروتين او DNA او تتداخل مع العمليات الايضية للكائن الدقيق

الكحول الابثيلي Ethyl alcohol عند تركيز ٧٠% يعمل على قتل الكائن الدقيق نظرا لقدرة هذا التركيز من الكحول على تخثير Coagulation البروتين واذابة الدهون Dissolves وهذا تأثير Germicidal، في حين ان التركيز ١٠٠% يعمل على تجفيف Dehydration الخلايا دون قتلها وهذا تأثير Germistatic بناء على ذلك فان درجة تأثير المادة الكيميائية على الكائن الدقيق لايرتبط بالتركيز العالي للمادة الكيميائية

الدهيدات Aldehydes منها الفورمالدهيد Formaldehyde وله تأثير كبير على تثبيط البروتينات

الهالوجينات Halogenes

- **اليودين Iodine** يعمل على قتل الميكروبات عن طريق التأثير المباشر على الانزيمات والبروتينات الخلوية حيث يرتبط مع الحامض الاميني التيروسين Tyrosine
- **الكلورين Chlorine** يعمل على تقليل عدد الاحياء الدقيقة في المياه حيث انه يكون حمض فوق اكسيد الكلورين Hypochlorous acid عندما يضاف للماء، كما يمكن ان يستخدم على هيئة غاز Cl₂ او على هيئة مركبات مثل sodium hypochlorite

المعادن الثقيلة heavy metals

الفضة تعتبر Antiseptic الزئبق يستخدم Antiseptic لجروح الجلد النحاس يستخدم في المسابح للتحكم في نمو السيانوبكتيريا Cyanobacteria

الفينول Phenol بعض مشتقات الفينول مطهرات قوية مثل مشتقات الديتول التي تستخدم لتعقيم الارضيات واسطح المناضد التي يجرى عليها عمليات العزل ويعتبر المادة الاولى المستخدمة لغرض تحطيم الاحياء الدقيقة

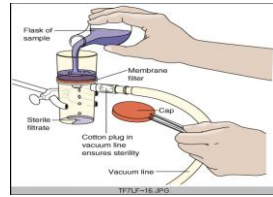
المنظفات Detergents مثل الصابون يعمل على تبليل الوسط كما انها تقلل من ظاهرة التوتر السطحي للوسط

اكسيد الايثلين Ethylene oxide يستخدم لتعقيم الورق والجلود والجروح

** الطرق الميكانيكية (الترشيح)

تعتمد هذه الطرق على تمرير المواد المراد تعقيمها عبر مرشحات ذات احجام مسامية قادرة على حجز أي كائن دقيق (مسامات لاتسمح بمرور الاحياء الدقيقة)

عادة يستخدم المرشحات الغشائية والتي تصنع من اسيتات السليلوز Cellulose acetate او النيتروسليلوز nitrocellulose تستخدم هذه المرشحات للتخلص من البكتيريا والفيروسات، كما ان هذه المرشحات يمكن ان تستخدم في تعقيم البروتينات وتلك المواد التي تتأثر بدرجة الحرارة. (الشكل التالي وحدة المرشحات الغشائية membrane filter المستخدمة لتعقيم السوائل التي لاتتحمل درجات الحرارة)



الاسواط الغذائية Culture Media

العناصر الغذائية توفر عادة للبكتيريا معمليا في صورة تراكيب مختلفة الصور والاعراض تسمى اسواط غذائية او مستنبتات الزرع (عبارة عن مخلوط متزن من العناصر الغذائية المختلفة اللازمة لنمو البكتيريا) الوسط الغذائي قد يكون بسيط او معقد التركيب وفي كل صورة يعمل على توفير الطاقة والوحدات الاساسية لبناء اجزاء الخلية

الغرض من استخدام الاسواط الغذائية:

تنمية وحفظ النوع البكتيري
دراسة تاثير الكائنات الدقيقة على احد المواد الغذائية الموجودة بالوسط
استحثاث البكتيريا على انتاج او تكوين بعض المواد
تصنيف البكتيريا ودراسة صفاتها المزرعية

تقسيم الاسواط الزراعية حسب تركيبها الكيميائي

- أ) وسط محدود التركيب الكيميائي **Chemically defined media**: يتكون من اساس او قاعدة من الاملاح المعدنية مضاف لها بعض مصادر الكربون او النيتروجين او عوامل النمو، ويمكن تجهيزها كل مرة بنفس الدقة لذا يسهل استعمالها في المختبرات البكتيريولوجية، مثل: وسط الاجار المغذي
- ب) وسط غير محدود التركيب الكيميائي **Chemically nondefined media**: ليس لها تركيب محدد ويتاثر تركيبها بتغير طبيعة المادة المستخدمة في تحضيرها لذت يصعب تحضيرها كل مرة بنفس الدقة، مثل: مستخلص اللحم والدم والبيتون

تقسيم الوساط الغذائية حسب القوام

- أ) وسط صلب **Solid media**: قد يكون طبيعي مثل شرانح البطاطس – غير قابل للاسالة
قد يكون صناعي مثل الاجار المغذي – قابل للاسالة
الوسط الصلب يهيء سطح مستوي يساعد على نمو البكتيريا على هيئة مستعمرات فردية يسهل عزلها بحالة نقية
- ب) وسط نصف صلب **Semi solid media**: يحتوي على نصف او ربع كمية الاجار المضاف للوسط الصلب القابل للاسالة
- ج) وسط سائل **Liquid media**: لا يحتوي على أي قوام صلب مثل: المرق المغذي (صناعي) – اللبن (طبيعي)

تقسيم الاسواط الغذائية حسب الغرض منها

اسواط غذائية انتخابية **Selective media**: (انتقائي) يحتوي على مادة تثبط نمو بعض انواع البكتيريا بينما تساعد نمو انواع اخرى. وهذا النوع من الاسواط يساعد في الحصول على مزرعة نقية من مجموعة متنوعة من البكتيريا، مثل بيئة المكونكي MacConkey تستخدم لعزل البكتيريا المعوية (يحتوي على املاح الصفراء يثبط البكتيريا الغير معوية ويحتوي على صبغة حمراء تساعد في التعرف على قدرة البكتيريا على تخمر اللاكتوز) ويعتبر هذا الوسط ايضا وسط مميز Defferential حيث يساعد على تشخيص البكتيريا

اسواط غذائية تفرقية **Differential media**: وسط يضاف له بعض المواد الكيميائية او الطبيعية ويسمح بالتفريق بين نمو المجاميع المختلفة من البكتيريا، مثل: بيئة ابوسين ازرق الميثلين (EMB) يستخدم لتمييز بكتيريا E.coli (مستعمرات ذات مركز اسود وبريق معدني مخضر) عن باقي انواع بكتيريا القولون

اسواط غذائية غنية **Enrichment media**: وسط مدعم بالمغذيات او بعض الظروف الخاصة لنوع بكتيري بحيث ينمو بصورة اوسع من الانواع الاخرى. مثل بيئة النتراتيونيت المستخدمة لتشخيص بكتيريا التيفونيد الممرضة

اسواط غذائية خاصة **Specific media**: تستخدم لتنمية انواع معينة من البكتيريا، وتساعد على التعرف على سلالات تلك الانواع، مثل بيئة Lowenstien-jensen المستخدمة لتنمية بكتيريا Mycobacteria المسببة لمرض السل في الانسان

اسواط تساعد على تحديد صفات البكتيريا **Media for characterization of bacteria**: تساعد على تحديد بعض صفات البكتيريا مثل قدرتها على تحمل تراكيز عالية من السكر

اوساط التقدير الحيوي **Biological assay media**: ذات تركيب كيميائي معلوم يستخدم للتقدير الكمي الحيوي لنوع من انواع الفيتامينات او الاحماض الامينية وتحديد مدى حاجة البكتيريا لهذه المواد

أهم المواد المستخدمة في تصليب الاوساط الغذائية

الاجار Agar: مادة كربوهيدراتيه تستخرج من بعض انواع الطحالب الحمراء، ويمتاز الاجار بـ درجة ثبات عالية- لايتاثر بدرجة حرارة الاتوكلايف في الظروف المعتدلة او قليلة الحموضة- يسيل الاجار المتصلب عند ٩٨م ولايتجمد الا عند درجة حرارة اقل من ٤٥م- يسهل تحضينة عند درجات حرارة مرتفعة دون الخوف من انصهاره

الجيلاتين Gelatin: من عيوب استخدامه: ينصهر في درجة حرارة الغرفة من ٢٠-٢٥م- يتحلل بفعل بعض الانزيمات البروتينية البكتيرية- يذوب في الماء المغلي وليس البارد- اذا ارتفعت درجة حرارته الى ١٠٠م فانه ينصهر ولا يذوب مرة اخرى- يتحلل في الوسط الحمضي او القلوي عند حرارة عالية

السيليكا Silica: مادة غير قابلة للاسالة- ذات قوام هلامي عند درجة حرارة الغرفة وهذه المادة الهلامية اذا تصلبت لاتسيل- السيلكاجل ليست مادة غذائية حيث تستخدم لتنمية البكتيريا ذاتية التغذية ومنع نمو الكائنات الغير ذاتية التغذية.

بعض المواد الغذائية الشائع استخدامها في اعداد الاوساط الغذائية:

البيتون Peptone: يحضر من بعض المواد الزلالية مثل اللحم غير الدهني بعد هضمه بانزيم البيسين
التربتون Tryptone: يجهز من اللحم الغير دسم بواسطة انزيم التريسين