Lab 2

طرق التعقيم والتطهير

Sterilization & Disinfection methods

التعقيم Sterilization : هي عملية إزالة أو قتل جميع الأحياء المجهرية من على سطح شيء معين أو مادة ما, ولا يوجد حد او درجة معينة للتعقيم فإما أن تكون المادة معقمة خالية من الحياة sterile أو غير معقمة non sterile وبهذا يكون على عكس عملية **التطهير Disinfection** التي تعرف بانها عملية إزالة جميع أو معظم الأحياء المجهرية الممرضة بمعنى اخر ان التطهير **قد يبقي بعض الأحياء المجهرية** غير الممرضة أو أعداد قليلة من الأحياء المجهرية الممرضة, يستعمل مصطلح المطهر disinfectant للإشارة إلى العوامل الكيمياوية المستخدمة في تطهير الأشياء الغير حية.

س: قارن بين عملية التعقيم والتطهير.

تقسم طرق التعقيم إلى قسمين رئيسين هما طرق فيزيائية وطرق كيميائية :

أولاً- الطرق الفيزيائية Physical methods :

1- الحرارة Heat
2- الترشيح Filtration
3- الإشعاع Radiation

ثانياً : الطرق الكيميائية Chemical methods

أولاً:الطرق الفيزيائية Physical methods وتشمل الحرارة والترشيح والاشعاع:

1- الحرارة Heat: وتكون بشكلين هما الحرارة الجافة Dry heat والحرارة الرطبة moist heat.

أ- الحرارة الجافة Dry heat ويستعمل من اجل ذلك مصباح بنزن Bunsen Burner ويكون بشكلين هما التلهيب حتى الاحمرار (التلهيب المباشر) Direct flaming وتستعمل لتعقيم اللوب LOOP و ابرة التلقيح inoculating needle (راجع المختبر الاول لمشاهدة الصورة) ايضا هناك عملية ا**لتلهيب القصير Short time flaming:-** تستخدم مع فوهات الأنابيب والقناني الزجاجية المختبرية قبل وبعد كل خطوة من خطوات صب الاوساط .

فرن الهواء الحار Hot air oven ايضا يعتبر احد طرق الحرارة الجافة يستخدم لتعقيم المواد الزجاجية مثل أنابيب الإختبار وأطباق بتري والماصات ...الخ, بالإضافة إلى المواد المعدنية التي لا تتأثر بالحرارة الجافة

ب- الحرارة الرطبة Moist heat: من أهم الطرق التي تستخدم الحرارة الرطبة:-

التعقيم بالمؤصدة Autoclave: يعتمد التعقيم بالمؤصدة على مبدأ استخدام الحرارة الرطبة (البخار) مع الضغط , حيث توضع المواد المراد تعقيمها داخل جهاز المؤصدة autoclave (راجع المختبر الاول لمشاهدة الصورة) وهو عبارة عن قدر للضغط يتم به

التحكم بالحرارة والضغط والزمن اللازم للتعقيم) وتضبط الحرارة على درجة 121 درجة مئوية وضغط 15 باوند/أنج^2 ولمدة تتراوح بين (15-20) دقيقة, تستخدم هذه الطريقة لتعقيم معظم أنواع الأوساط الزرعية والمواد والادوات الزجاجية الحديدية والماء المقطر.

البسترة Pasteurization: - وهي عملية تعريض السوائل مثل الخل والحليب والعصائر إلى درجة حرارة **62 درجة مئوية** لمدة نصف ساعة للقضاء على الأحياء المجهرية الممرضة والفعالة في فساد هذه الأغذية وبنفس الوقت الحفاظ على الطعم والقيمة الغذائية له, وسميت بالبسترة نسبة إلى العالم لويس باستور .
ومن سلبياتها انها لا تقضي على الأبواغ عند وجودها في السائب.

التندلة Tyndalization:- وهي تكرار عملية التعقيم لثلاث مرات بدرجة حرارة 100 م خلال ثلاث ايام متتالية **و** تستخدم لتعقيم الأوساط التي تتلف بالحرارة العالية كالأوساط الحاوية على الحليب والبروتينات , يتم تعريض الوسط في اليوم الأول إلى درجة حرارة 100 درجة مئوية بإستخدام الحمام المائي أو البخار لمدة (30-60) دقيقة وذلك لقتل الخلايا الخضرية , أما السبورات فهي تقاوم هذه الدرجة لذلك يوضع الوسط في الحاضنة إلى اليوم التالي للسماح لعملية إنبات السبورات إلى خلايا خضرية , تعاد العملية في اليوم الثاني (التعريض لبخار الماء ثم التحضين) وذلك لقتل ما تبقى من الخلايا الخضرية والسبورات . مرة أخرى تكرر العملية في اليوم الثالث لضمان قتل جميع الأحياء المجهرية .

الغليان Boiling:- وهي طريقة تقليدية تستخدم بشكل واسع في المستشفيات والبيوت , وهي من طرق التطهير أكثر من التعقيم , حيث يتم الغليان لمدة نصف ساعة تقتل فيها البكتريا الخضرية غير المكونة للسبورات مثل بكتريا السل والعنقوديات وتستخدم لتعقيم بعض الأغذية والمفروشات والألبسة الخاصة بالمرض , ومن مساوئها هو إعادة تلوث المادة بعد إزالتها من الغليان.

س: ما هي درجة الحرارة والوقت اللازم عند اجراء العمليات التالية : التندلة,البسترة,التعقيم بالمؤصدة , التعقيم بالغليان؟

2- الترشيح Filtration:- وهي عملية استعمال مرشحات خاصة تعرف ب Millipore filters (راجع المختبر الاول لمشاهدة الصورة) ذات حجم 0.22 مايكروميتر او 0.45 مايكروميتر تطبق في تعقيم المحاليل التي تتأثر بالحرارة مثل الذيفانات toxins ومحاليل السكريات والمضادات الحياتية....الخ.

3- الإشعاع Radiation:- وتتضمن الأشعة السينية X rays وأشعة كاماGamma rays والأشعة فوق البنفسجية ultraviolet light or U.V light والاخير يطبق بكثرة في تعقيم صالات العمليات, غرف العزل, الماء المقطر, الاغلفة والزجاجيات واسطح المعادن وفضاء المختبر وداخل كابينة العزل Fume Hood.

2-الطرق الكيمياوية chemical methods:-

يكون تأثير العوامل الكيميائية Chemical agents إما قاتلا للبكتريا Bactericidal أو مثبطاً لنمو البكتريا Bacteriostatic, والمطهرات Disinfectant هي عبارة عن مواد كيميائية قاتلة للبكتريا والتي تستخدم في تطهير المواد غير الحية مثل الأدوات والأرضيات.

وتشمل العوامل الكيميائية ما يأتي:-

1- كحول الإيثيل : يستخدم بتركيز(50-70%) في تطهير الأيدي أو المناطق المختلفة في الجسم ويرجع تأثيرها المميت إلى تجميعها وتخثيرها للبروتين الخلوي.

2- الكلوروفورم : تعتبر من المطهرات الطيارة وتستخدم في تعقيم بعض المواد مثل مصل الدم ويتم التخلص منه (الكلوروفورم) بتسخينه على حمام مائي على 75 درجة مئوية كي يتطاير.

3-الفينول أو حامض الكربوليك : يستعمل للتعقيم السطحي لأرضيات الغرف والعيادات وبعض الأدوات والأجهزة مثل الفينول بتركيز 5% .

4-كلوريد الزئبقيك : يستخدم لتعقيم الأيدي والمناضد ودرنات البطاطس .يستخدم لتعقيم الأسطح الخارجية للنباتات أثناء عزل الميكروبات الممرضة له والموجودة بداخل النبات.

س: بماذا تعقم ما يلي : LOOP, المشرط , الحليب, الذيفانات, الاوساط الزرعية, الماء المقطر, المضادات الحياتية, المحاليل السكرية, فوهة الانابيب والقناني الزجاجية ؟

الأوساط الزرعية Culture media

تعرف الأوساط الزرعية بأنها البيئة (المادة الغذائية) التي تستعمل لتنمية الأحياء المجهرية المختلفة في المختبر بعد عزلها من مكانها الاصلي مثل العينة المأخوذة من الانسان والحيوان والنبات والبيئة الطبيعية المحيطة بنا، وتحتوي الاوساط الزرعية على جميع المكونات الضرورية للنمو وابسط تشبيه للأوساط الزرعية هي زراعة النباتات في التربة فعندما نحتاج زراعة وتشخيص البكتيريا نزرعها في بيئة خاصة بالميكروبات تسمى بالوسط الزرعي.

ومهما اختلفت هذه الأوساط في التركيب فلابد من احتوائها على مصادر غذائية رئيسية مثل الكاربون والنتروجين والمعادن وعوامل النمو كالفيتامينات والعوامل المساعدة الأخرى.

تسمية الاوساط الزرعية

تسمى الاوساط احيانا حسب احد مكوناتها ويضاف لها كلمة Agar للاشارة الى ان قوام الوسط صلب مثل وسط سترمايد اكار Cetrimide agar الذي يحتوي على مركب السترمايد او قد تسمى حسب الميكروب الذي تنمو عليه مثل وسط SS agar الخاص ببكتريا السالمونيلا والشايكلا.

تقسيم الأوساط الزرعية حسب طبيعة مكوناتها إلى :-

1- الأوساط الطبيعية Natural media:- وهي الأوساط التي تكون مكوناتها طبيعية أي الأوساط التي تكون مكوناتها مجهولة التركيب والتركيز مثل الحليب والبيض والبطاطا ومصل الدم, فعندما يحوي الوسط على الحليب يسمى Milk media culture واذا احتوى على البيض فيسمى Egg media cultur , مثال على ذلك وسط المرق المغذي Nutrient broth المتكون من (خلاصة اللحم Beef extract, البيتون Peptone وخلاصة الخميرة Yeast extract) .

2-الأوساط الصناعية Synthetic media:- وهي الأوساط التي تكون مكوناتها معلومة التركيب والتركيز مثل وسط MacConkey agar و Lactose broth, وتعد هذه الأوساط بيئات غذائية غنية وجيدة لتنمية مدى واسع من البكتريا والأحياء المجهرية الأخرى. وتكون هذه الأوساط إما بحالة صلبة أو شبه صلبة أو سائلة.

3-الأوساط شبه الصناعية Semi-synthetic media:- وهي الأوساط التي تكون بعض مكوناتها معلومة التركيب والتركيز وبعضها الآخر مجهولة التركيب والتركيز مثل وسط Potato dextrose agar.

وتقسم الأوساط الزرعية حسب صلابتها Solidity إلى:-

1- الأوساط السائلة Liquid media:- وهي الأوساط التي لا تحتوي على مواد تصليب مثل الآكار والجيلاتين والشركات المنتجة لهذه الأوساط تضع كلمة Broth عليها مثل وسط Nutrient broth.

2-الأوساط شبه الصلبة Semi-Solid media:- وهي الأوساط التي يضاف لها مواد تصليب تدعى(الاكار)Agar بنسبة1% .

3-الأوساط الصلبة Solid media:- وهي الأوساط التي يضاف لها مواد تصليب (الآكار والجيلاتين) بنسبة (1.5-2%) مما يسمح بتصليبها عند درجة حرارة بين 40-45 درجة مئوية, ويستخدم الآكار بكثرة في مختبرات الأحياء المجهرية اذ يعتبر مادة مصلبة وهو عبارة عن مواد كاربوهيراتية تستخرج من بعض الطحالب الحمراء الموجودة في أعماق البحر وخاصة التابعة للجنس Geledium.

س: اكتب اصناف الاوساط حسب صلابتها مع ذكر مثال لكل منها

تقسم الأوساط الزرعية حسب وضيفتها والغاية من الإستعمال إلى :-

1-الأوساط البسيطة Simple media:- وهي الأوساط التي تحتوي على المواد الغذائية الأساسية كمصدر للنتروجين والكاربون وتنمو فيها معظم البكتريا التي لا تحتاج إلى مواد غذائية نادرة أو معقدة مثل المرق المغذي Nutrient broth, ماء الببتون Peptone water والآكار المغذي Nutrient agar.

2-الأوساط التفريقية Differential media:- وهي الأوساط التي تسمح بنمو نوعين من البكتريا يمكن التمييز بينهما مثل :-

a- وسط آكار الماكونكي MacConkey agar:- يعمل على التفريق بين البكتريا المخمرة لسكر اللاكتوز عن البكتريا غير المخمرة لسكر اللاكتوز, فالبكتريا المخمرة لسكر اللاكتوز تظهر بلون وردي, أما البكتريا غير المخمرة لسكر اللاكتوز فتكون عديمة اللون (ذات لون شاحب).

b- وسط آكار الدم Blood agar:- يعمل على التفريق بين البكتريا المحللة للدم عن تلك غير المحللة للدم ويتكون آكار الدم من الوسط الأساس Blood agar base يضاف له الدم المعقم بتركيز نهائي (5- 10%).

3- الأوساط الانتخابية Selective media:- وهي الأوساط التي تسمح بنمو مجموعة من البكتريا دون غيرها وتحتوي هذه الأوساط على مواد مثبطة للبكتريا الغير مرغوب فيها وبنفس الوقت تعزز من نمو البكتريا المراد عزلها مثل:-

a- وسط بزموث سلفايت Bismuth sulphite agar:- ويستعمل هذا الوسط لعزل جراثيم السالمونيلا Salmonella , أهم مكونات الوسط هي الأخضر اللماع Brilliant agreen الذي يعمل كمثبط لنمو البكتريا بالإضافة إلى احتواءه على كاشف Bismuth sulphite indicator وبهذا يعد هذا الوسط انتخابي وتفريقي في نفس الوقت.

b- وسط سكر المانيتول Mannitol salt agar:- يستعمل هذا الوسط لعزل جراثيم المكورات العنقودية Staphylococci حيث يتم تثبيط البكتريا الأخرى باحتوائه على تركيز عالي (7.5 %) من ملح الطعام NaCl كما يحتوي الوسط على سكر المانتول الذي يعمل على

التفريق بين جراثيم المكورات العنقودية المخمرة للسكر والتي تظهر بلون أصفر عن غير المخمرة للسكر والتي تظهر بلون أحمر وبهذا يعد هذا الوسط انتخابي وتفريقي في نفس الوقت.

4-الأوساط الغنية Enriched media: - وهي أوساط بسيطة مضافا" إليها مواد غذائية غنية مثل الدم, المصل, مستخلصات النباتات أو الحيوانات لمواجهة متطلبات النمو الصعب الإرضاء مثل آكار الدم Blood agar, جوكليت اكار (Chocolate agar) التي تنتج من غليان الدم Heated blood agar, آكار نقيع المخ والقلب Brain heart infusion agar.

5-الأوساط الناقلة Transport media: - وهي أوساط بسيطة تستعمل لنقل العينات من مناطق بعيدة وذلك للحفاظ عليها من الجفاف لحين وصول العينة إلى المختبر مثل وسط Stuart Transport medium.

س: اكتب اصناف الاوساط حسب وضيفتها مع ذكر مثال لكل نوع

طريقة تحضير الوسط الزرعي:-

1- قم بتشغيل الميزان الحساس المختبري *(راجع المختبر الاول لمشاهدة الصورة)*.
2- ضع قطعة من ورق القصدير على قرص الوزن المثبت في وسط الميزان .
3- قم بتصفير الميزان من خلال الضغط على زر TARE .
4- خذ الكمية التي تريد وزنها باستعمال الملعقة Spatula او المغرفة Scoopula وبشكل خفيف لتلافي الخلل في عملية الوزن كما بإمكان سحب الكمية الزائدة لحين الوصول للوزن المطلوب.
5- ع الكمية في الدورق المخروطي ذو الحجم المطلوب.
6- قم بإضافة الحجم المحدد من المذيب أي الماء المقطر باستعمال الاسطوانة الحجمية Graduated cylinder .
7- ضع الدورق المخروطي الحاوي على الوسط والماء على الطبق الساخن الخلاط Hotplate with magnetic stirrer وفي هذه الخطوة ضع قطة المغناطيس Magnetic bar داخل الدورق المخروطي لتسريع المزج والاذابة ولا تنسى سحب قطعة المغناطيس من الدورق قبل وضع الوسط في الاوتوكليف.
8- ضع القارورة في جهاز التعقيم بالبخار (Autoclave) لمدة 15 دقيقة تحت ضغط 1 بار او 0.15 MPa ودرجة حرارة 121 درجة مئوية لهدف التعقيم.
9- اخرجها من الجهاز وأنتظر حتى تبرد قليلا من خلال امكانية لمسها وبعدها يتم صب الوسط في أطباق بتري من مصدر حراري وتبقى الأطباق مفتوحة حتى لا يتكثف البخار على غطاء الطبق بعد التصليب وتغطى الأطباق وتحفظ في الثلاجة .إذا كان الوسط سائلا فلا داعي للصب وتخرج الأنابيب من جهاز التعقيم وينتظر حتى تبرد ثم تحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال.