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 ومعداتها ونوعية المواد المتداولة فيه واسلوب التعامل مها 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 الأحياء 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 او انسكاب أي مادة او 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 وماصات وشرائح وماصات توضع في الاواني الخاصة بها لحين تنظيفها
١٥- تلقح مزارع الأحياء الدقيقة الخطرة داخل الكابينة الواقية Safety cabinet مع ارتداء القفازات الواقية
١٦- في حالة استخدام القفازات الواقية يجب عدم لمس كافة محتويات المختبر حتى لاتتلوث
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، ابقي هادئة واتبعي الاتي**:
اخبري المشرفة باسرع وقت
ضعي منشفة ورقية او قطعة قطن فوق المادة المسكوبة
اسكبي 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)

<u>التعقيم ابتكار ساهم فى تطور علم الأحياء الدقيقة وهو مؤسس على حقيقتين:</u>

- تحقيق التعقيم
- المحافظة على كفاءة التعقيم

<u>طرق التعقيم:</u>

**** 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 البلاتيني لدرجة الاحمرار وينتج عن ذلك قتل كل الكائنات الملوثة بالإبرة

٢. التلهيب 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 لاتتكسر الدوارق الزجاجية، كما ان الانكماش السريع الذي يحدث داخل الدورق قد يسبب دخول الهواء الملوث الى داخل الدوارق.

ب) الحرارة الرطبة: Moist heat

هذه الطريقة تعتمد على استخدام الماء على هيئة بخار

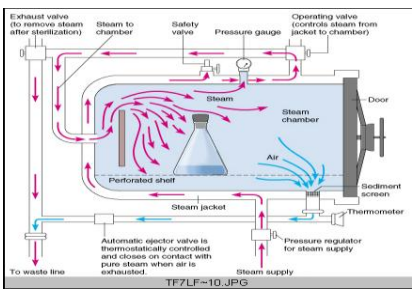
١- استخدام جهاز الاتوكلايف Autoclave

- 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 لايؤدي 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 ١٠٠م 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 االمواد المعقمة
- تفشل هذه الطريقة في قتل الجراثيم الغير نابتة 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 تاثيرها كبير
تستخدم الاشعة لتعقيم غرف العمليات الجرحية ووحدات تعبئة الادوية وفي بعض الصناعات الغذائية والادوات المعملية البلاستيكية
يعزى تاثيرها المميت الى تكوين فوق الاكاسيد في الوسط المعامل او نتيجة التاثير 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 تاثير قاتل وتسمى Germicidal ومنها بعض الغازات مثل الفورمالين Formalin
بعض المواد الكيميائية تستخدم في التطهير Disinfection والتي قد يكون لها تاثير مثبط Germistatic على نمو الاحياء الدقيقة كما قد يكون لها تاثير 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 تاثير المواد الكيميائية قد يكون الجدار الخلوي او بناء البروتين او DNA او تتداخل مع العمليات الايضية للكائن الدقيق

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

الالدهيدات Aldehydes منها الفورمالدهيد Formaldehyde وله تاثير كبير على تثبيط البروتينات

<u>الهالوجينات Halogenes</u>
- الايودين Iodine يعمل على قتل الميكروبات عن طريق التاثير 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 Cl_2 او على هيئة مركبات مثل sodium hypochlorite

<u>المعادن الثقيلة heavy metals</u>
الفضة تعتبر Antiseptic
الزئبق يستخدم Antiseptic لجروح الجلد
النحاس يستخدم في المسابح للتحكم في نمو السيانوبكتيريا Cyanobacteria

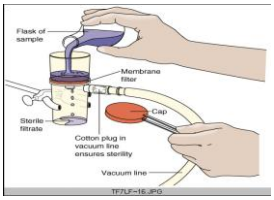
الفينول Phenol بعض مشتقات الفينول مطهرات قوية مثل مشتقات الديتول التي تستخدم لتعقيم الارضيات واسطح المناضد التي يجرى عليها عمليات العزل ويعتبر المادة الاولى المستخدمة لغرض تحطيم الاحياء الدقيقة

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 النيتروسليلوزnitrocellulose تستخدم هذه المرشحات للتخلص من البكتيريا والفيروسات، كما ان هذه المرشحات يمكن ان تستخدم في تعقيم البروتينات وتلك المواد التي تتاثر بدرجة الحرارة. (الشكل التالي وحدة المرشحات الغشائية membrane filter المستخدمة لتعقيم السوائل التي لاتتحمل درجات الحرارة)



الاوساط الغذائية Culture Media

العناصر الغذائية توفر عادة للبكتيريا معمليا في صورة تراكيب مختلفة الصور والاغراض تسمى اوساط 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 الاوساط 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 الاوساط الزراعية حسب تركيبها الكيميائي

أ) **وسط محدود التركيب الكيميائي Chemically defined media**: يتكون من اساس اوقاعدة 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 والببتون

تقسيم الوساط الغذائية حسب القوام

أ) **وسط صلب Solid media**: قد يكون طبيعي مثل شرائح 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** : لايحتوي على أي قوام صلب مثل: المرق المغذي (صناعي) – اللبن (طبيعي)

تقسيم الاوساط الغذائية حسب الغرض منها

اوساط غذائية انتخابية Selective media: (انتقائي) يحتوي على مادة تثبط نمو بعض انواع البكتيريا بينما تساعد نمو انواع اخرى. وهذا النوع من الاوساط يساعد في الحصول على مزرعة نقية من مجموعة متنوعة من الكتيريا، 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

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

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

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

اوساط 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 من٤٥م- 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:

الببتون Peptone: يحضر من بعض المواد الزلالية مثل اللحم غير الدهني بعد هضمه بانزيم الببسين
التربتون Tryptone: يجهز من اللحم الغير دسم بواسطة انزيم التربسين