

تأثير الصبغات والمواد المطهرة

التجربة الثامنة / دراسة تأثير الصبغات على فسيولوجيا البكتيريا

هناك عدد كبير من الصبغات يتميز بأنه ذو قدرة على وقف نشاط الأنواع البكتيرية ومنها على سبيل المثال لا الحصر الكريستال البنفسجي أو أخضر الملاكيت .

- وجد في تجارب معملية أنه إذا تم نمو بكتيريا غير معروفة على بيئة آجار تحتوي على كمية مناسبة من هذه الصبغة وبالتالي فإن حدوث نمو يعني أن البكتيريا تابعة للبكتيريا السالبة لجرام وذلك بسبب كون أن الصبغة تمنع نمو البكتيريا الموجبة لجرام، وثبت أن البكتيريا المقاومة للأحماض تتأثر بهذه الصبغة.
- تتأثر بشكل عام البكتيريا **الموجبة لجرام** بالصبغات أكثر مقارنة بالبكتيريا السالبة لجرام.
- يمكن الاستفادة من ذلك في إعداد ما يعرف بالبيئات الانتخائية selective media لمنع نمو بعض الانواع البكتيرية الغير مرغوب فيها .
- وجد ان **الصبغات القاعدية** مثل الكريستال البنفسجي ، أزرق الميثيلين ، الفوكسين القاعدي ، أخضر الملاكيت تتميز بقابليتها للاتحاد مع **المكونات الحامضية** (المجاميع الحامضية الفعالة) لبروتوبلازم الخلية البكتيرية (البروتين الخلوي) وهذا يؤدي إلى إيقاف أيض البكتيريا.
- أما **الصبغات الحامضية** مثل الفوكسين الحامضي يميل للاتحاد مع **المكونات القاعدية** لبروتوبلازم البكتيريا، وهنا يرجع تأثير الصبغة الحامضية للاتحاد مع المجاميع القاعدية الفعالة من البروتين الخلوي وبالتالي يتوقف أيض البكتيريا.
- وقد عرف عن الصبغات تخصصها أي أنها تؤثر على أحد أنواع البكتيريا دون الآخر وعرف عن البكتيريا اختلاف درجة حساسيتها تجاه الصبغة لذلك يلزم دائما التأكد من فعالية الصبغة ضد البكتيريا قبل اختيارها كعامل لوقوف نشاطها.

❏ الغرض من التجربة :

دراسة تأثير صبغة الكرسنال البنفسجي على فسيولوجيا البكتريا .

❏ الطريقة المستخدمة :

بشكل عام عند دراسة او القيام بتقييم وتحديد تأثير أي مادة كيميائية هل هي Germistatic agent او Germicidal agents او هل هي antiseptic or disinfectant وعلاقتها بالكائن المختبر وكذلك مقارنة التأثير الفعال لماده معينة بماده اخرى او بتركيز اخر من نفس الماده يستخدم ما يعرف The filter paper disk method . او يتم عمل ثقب في بيئة الاجار المغذي باستخدام قاعده ماصه باستير . هذه الطريقة يتم بها تخطيط البيئة المناسبة لنمو الكائن المختبر بالكائن الدقيق، ويتم استخدام اوراق ترشيح لها نفس المقاس مغمورة بالماده ذات تركيز معين ،ثم توضع على سطح بيئة النمو وتحضن الاطباق لمدته 48ساعه .

خلال فترة الحضانة تنتشر الماده الكيميائية من القرص الى البيئة وفي حاله كان لها تأثير على النمو يتكون ما يعرف بـ zone of inhibition التي تختلف باختلاف انتشار الماده، حجم اللقاح، نوع البيئة، والعديد من العوامل الاخرى. ويتم تحديد قطر هذه المساحة ومقارنتها بالمناطق الاخرى المتكونه حسب طبيعة الدراسة او التجربة.

❏ المواد والادوات اللازمة:

- مزارع بكتيرية حديثة العمر. (*Bacillus subtilis* - *E.coli*)
- ماصه باستير – كحول – بيئة الاجار المغذي- ابر تلقيح .
- تخفيفات مختلفة من الكرسنال البنفسجي .

• طريقة العمل :

اولا /تحضير التراكيز المختلفة من صبغة الكرسنال البنفسجي :

- 1- في ظروف التعقيم المثالية يتم وزن 0.25 جرام من الصبغه ويضاف الى 52 مل ماء مقطر معقم ، ويحرك جيدا حتى تذوب الصبغة في الماء ونحصل على التركيز 1: 100 .

2- ينقل مقدار 2.5 مل من الدورق الاول الى دورق ثاني يحتوي على 22.5 مل ماء مقطر معقم ، يحرك جيدا للحصول على التركيز 1: 1000 .

3- ينقل مقدار 2.5 مل من الدورق الثاني الى دورق ثالث يحتوي على 22.5 مل ماء مقطر معقم ، يحرك جيدا للحصول على التركيز 1: 10000.

4- ينقل مقدار 2.5 مل من الدورق الثالث الى دورق رابع يحتوي على 22.5 مل ماء مقطر معقم ، يحرك جيدا للحصول على التركيز 1: 100000.

ثانيا /خطوات التجربة الاساسية :

1- يتم تلقيح بيئة الاجار المغذي بالتخطيط المكثف .

2- تقسم قاعده الاطباق الى اربع اجزاء ويكتب على كل جزء قيمة التركيز المستخدم .

3- باستخدام طريقة التلبيب الكحولي يتم اجراء ثقب في منتصف كل منطقه داخل الطبق .

4- تنقل كميته ثابته من كل تخفيف بداخل الثقب .

5- تكرر الخطوات السابقة مع التراكيز المتبقية

6- تحضن الاطباق عند 37°م لمدة 48 ساعه .

7- بعد الانتهاء من فترة التحضين تدون النتائج في جدول ، على اساس قياس قطر zone of inhibition كما

في الجدول التالي :

قطر هالة التثبيط /نوع الصبغه وتركيزها			نوع البكتريا
10000 كريستال بنفسجي	1000 كريستال بنفسجي	100 كريستال بنفسجي	

او باستخدام دلائل النمو .

من خلال النتائج، حاولي وضع استنتاجات وتفسيرات كما يلي :

- أي التراكيز المستخدمة أكثر فعالية ضد *E.coli* ؟
- أي التراكيز المستخدمة يعتبر أكثر فعالية ضد الأنواع البكتيرية المختبرة ؟
- هل تتشابه البكتريا بدرجة حساسيتها لنفس الصبغة ولنفس التركيز ؟ لماذا ؟
- هل هناك علاقة بين تركيز المادة وقطر هاله التثبيط ؟ وضح ذلك ؟

التجربة التاسعة / دراسة تأثير بعض المواد مثل اليود ، الديتول ، الكلوركس ، الكحول

على فسيولوجيا البكتريا

٢٢ بعد دراسة غالبية العوامل او المواد التي تعمل على التحكم الميكروبي سواء القضاء او تثبيط النمو ، وجد انها تعمل على اساسين مهمين وهما :

1. **التأثير على نفاذية الغشاء البلازمي** / يقع الغشاء البلازمي الى الداخل من جدار الخلية ويمثل الهدف للعديد من عوامل التحكم الميكروبي ، حيث يقوم الغشاء بتنظيم والتحكم بمرور المواد من والى الخلية .ويتكون في البكتريا بشكل اساسي من phospholipid وبروتين ، وينتظم في شكل طبقتين متوازيتين يطلق عليها lipid bilayer.

- كل جزء من phospholipid يتكون راس قطبي يحتوي على مجموعة الفوسفات والجليسيرول (محببة وقابلة للذوبان في الماء hydrophilic) و من ذيل غير قطبي يتكون من الاحماض الدهنية (الغير محبة للماء hydrophobic) وتكون الجهة القطبية عادة في الخارج لكلا اتجاهي الغشاء .

- اما البروتينات فهي تنتظم بعدة طرق : احدها يطلق عليها peripheral protein وتقع على السطح الخارجي او الداخلي للغشاء وتعمل كإنزيمات ، داعمة ، وتنظم شكل الخلية اثناء الحركة .والنوع الاخر يعرف integral protein ويمكن ازالته من الغشاء بعدة طرق احدها استخدام detergents وتعمل بعض هذه البروتينات كقنوات تنتقل من خلالها المواد .واي خلل او تحطم في الدهون والبروتينات التي تدخل في تركيب الغشاء البلازمي يتسبب في فقد محتويات الخلية او يؤثر على نمو الخلية .

2. **الحاق الضرر بالبروتين او الاحماض النووية** /تعتبر الخلية البكتيرية حقيبة صغيرة من الانزيمات ،وتعتبر

الانزيمات بروتينات حيوية وضرورية لجميع نشاطات الخلية .وتتأثر العديد من هذه البروتينات بالمواد الكيميائية المستخدمة بالتحكم الميكروبي.

وتحمل الاحماض النووية المعلومات الوراثية للخلية الميكروبية واي خلل او تحطم يلحق بها تأثيرات قاتلة او يحدث لها تغيرات غير طبيعية في وظائفها الحيوية.

❏ تأثير اليود Iodine:

- يعتبر Iodine من اقدم واكثر الـ antiseptics فعالية ضد جميع انواع البكتريا ،والعديد من endospores.

- Iodine يضعف تخليق البروتين و يغير غشاء الخلية ،حيث يكون complexes مع الاحماض الامينية والأحماض الدهنية الغير مشبعة. بالاضافة الى تفاعله مع مجموعة Thiol في الانزيمات والبروتين .

- يتوفر iodine اما على هيئة tincture وهو عبارة عن محلول مائي – كحول ،او على هيئة iodophor وهو عبارة عن مزيج من iodine مع organic molecule حيث يتحرر جزء الايودين بصورة ابطا .واكثر صور المحاليل التجارية شهرة هو Betadine .

❏ تأثير الكلوركس:

- التركيب الكيميائي للكلوركس calcium hypochlorite والمستخدم كثيرا household disinfectant كذلك يستخدم في مصانع الاغذية والالبان و انظمة غسيل الكلى hemodialysis system .

- استخدمت محاليل chlorine dioxide بكثرة على اساس surface disinfectant كونها لا تترك اثر او رائحة ولها فعالية في التركيزات العالية ضد مدى واسع من البكتريا و endospore .

- يعتبر الكلور عامل اكسدة قوي يمنع من انزيمات الانظمة الحيوية بالخلية من القيام بدورها.

❏ تأثير الديتول Dettol:

- هو عبارة عن مركب أروماتي مشتق من الفينول ويحتوي على ذرة الكلور ، والتي تساعد في القضاء على الكائنات الدقيقة .ويسمى الديتول 4-chloro-3,5 dimethylphenol .

- مكونات الديتول: 4,8 % منه عبارة عن الجزيء (C_8H_9ClO) والنسب المتبقية عبارة عن: زيت الصنوبر ، والكحول الأيزوبروبيلي ، وزيت الخروع .
- يؤثر على المواد الدهنية التي تدخل في تركيب الجدار .

❏ تأثير الكحول :

- يؤثر الكحول بكفاءة على الخلايا البكتيرية (الخلايا الخضرية) لكن غير فعال على الجراثيم endospore وميكانيكية التأثير للكحول تكون عن طريق protein denaturation كما يمكن ان يؤثر على الأغشية ويذيب الدهون التي تدخل في تركيبه بالإضافة الى انه يعمل على تجفيف الخلايا. ومن أكثر مميزات الكحول انه سريع التأثير وسريع التبخر دون ان يترك اثر.
- اكثر انواع الكحول استعمالا ethanol و isopropanol ، ويوصى بان يكون optimum concentration for ethanol 70% aqueous solutions على الرغم من ان تركيزات من 60-90 % تكون قاتلة ايضا . الايثانول المطلق pure ethanol اقل فعالية من محلوله المائي لان اغلب عمليات denaturation تتطلب وجود الماء . ويستخدم تركيز 62-65 % منه مع المرطبات في صابون الايدي .
- Isopropanol عاده ما يستخدم كـ rubbing alcohol ويتفوق على الايثانول قليلا في كونه antiseptic و disinfectant. نظرا لأنه اقل تطايرا ، ارخص سعرا وسهولة الحصول عليه .
- يستخدم ethanol و isopropanol لتعزيز كفاءة وقدرة بعض chemical agent الاخرى.
- الإيثانول له تأثير على mycobacteria ، 95% تركيز استطاع القضاء على *M. tuberculosis* خلال 15 ثانية اما 70% فانه يتطلب وقت اطول للقضاء يصل الى 30 ثانية وتركيز 50% تطلب 60 ثانية .
- لا يمتلك الإيثانول أي نشاط sporicidal activity وقد سجلت حالات لتلوث الإيثانول 70% بجراثيم *Clostridium perfringens* .

❏ الغرض من التجربة :

دراسة تأثير تركيزات مختلفة من الكحول الايثيلي ، الديتول ، الكلوركس واليود على فسيولوجيا البكتريا .

❏ المواد والادوات اللازمة :

- مزارع حديثة العمر لبكتريا *E.coli* , *Bacillus subtilis* .
- بيئة الاجار المغذي .
- تركيزات مختلفة من الكحول الايثيلي والايذوبربانول 100 % ، 70% ، 50% ، 90% . كذلك تركيزات مختلفة من بقية المواد محل الاختبار (الديتول، الكلوركس ، اليود)
- ماصات معقمة سعة 1مل.
- كحول 75% للتعقيم الكحولي، ماصه باستير .

❏ طريقة العمل نفسها المتبعة في التجربة السابقة The filter paper disk method. او اجراء ثقب

بواسطة ماصه باستير .

- تدون النتائج في جدول كما في السابق .
- من خلال النتائج ، حاولي وضع استنتاجات وتفسيرات كما يلي :
- أي التركيزات ذات تأثير افضل في القضاء على النمو البكتيري ؟
 - هل يتماثل تأثير الكحول في التركيزات المختلفة ؟
 - أي المواد افضل تأثيرا ؟