المحاضرة الأولى - درس الأحياء المجهرية المتقدم -الجزء العملي-

إرشادات عامة:

العديد من الأحياء المجهرية التي سنتعامل معها خلال هذا المختبر قد تكون ممرضة للإنسان لذلك هناك بعض التعليمات الضرورية لمنع أي احتمال للإصابة بها يرجى قراءتها قبل البدء بالدرس:

1-يجب ارتداء الصدرية عند دخول المختبر لتلافي التلوث والإصباغ.
2-ضع الحقائب ، الكتب ... على مكان بعيد عن منطقة العمل.
3-اغسل اليدين بالماء والصابون ثم الديتول قبل وبعد الانتهاء من العمل.
4-ينظف مكان العمل باستخدام الاسفنجة والديتول أو أي مطهر متوفر قبل وبعد العمل.
5-تجنب الاكل والشرب في جميع الاوقات داخل المختبر وقلل الحركة والكلام اثناء العمل.
6-تجنب وضع الاقلام أو تبلل اللاصق في الفم.
7-اعتني بنظافة المجهر وعدساته.
8-عناية خاصة بمكان العمل .عقم وجفف واعّد الادوات إلى مكانها بعد الانتهاء.
2-حافظ على نظافة المختبر.

المواد المطلوبة:

أ -صدرية.
ب -دفتر مختبر.
ج -قلم تأشير(يكتب على الزجاج.)
د -ورق عدسات.
ه -مطهر.
و -مقدحة.
ي -صابون أو أي منظف قاصر، فلاش،....

الاحياء المجهرية Microorganisms

كائنات تتواجد بشكل خلايا مفردة أو متجمعة و تشمل: البكتريا bacteria الفطريات fungi البدائيات protozoa الفايروسات viruses جميع هذه الكائنات تشترك بكونها ، صغيرة للغاية لا ترى بالعين المجردة ما عدا بعض الحالات مثل mushroom وبعض الطحالب التي قد يصل طولها إلى عدة امتار.

دور الاحياء المجهرية في حياة الانسان

مضار الاحياء المجهرية:

لو استعرضنا الاوبئة والإمراض التي مرت بها البشرية والتي غيرت تاريخ شعوب بأكملها لنجد ان هذه الكائنات قتلت من الناس اضعاف ما قتل بسبب الحروب ومن امثلة ذلك:

* عدد الوفيات المتسبب عن مرض الانفلونزا 1918-1919م كان اكثر من عدد القتلى في الحروب(الحرب العالمية الاولى ، الثانية ، الحرب الكورية ، حرب فيتنام) مجتمعة.
* الطاعون (*Yersinia pertusis*) plaque الذي تسبب بموت اكثر من 1/3 سكان اوربا حوالي 25 مليون في العصور الوسطى اما الان فلا يتجاوز عدد سكان المصابين به 100 في العالم من خلال السيطرة على الجرذان.
* الجدري (مرض فايروسي) ادى إلى موت اكثر من 10 ملايين مريض وهو من الامراض القوية والتي تم السيطرة عليه من خلال برامج عالمية للتلقيح والقضاء على المضيف الوسطي اضافة إلى فساد الاغذية.

فوائد الاحياء المجهرية:

1-تعد المسؤولة عن بقاء الكائنات الحية الاخرى بما فيها الانسان على قيد الحياة .اذ تقوم البكتريا بتحويل غاز النايتروجين الذي يعد الجزء المسؤل عن بناء اهم الجزيئات في الجسم مثل البروتينات .. ، DNA، تقوم البكتريا بتحويل هذا الغاز إلى الصيغة الكيميائية المناسبة للاستهلاك من قبل النبات.

2-كل الكائنات تحتاج إلى الاوكسجين ولو تم استهلاك هذا الغاز من قبل كل الكائنات الحية قد يستنفذ خلال 20 سنة ما لم يعوض الاحياء المجهرية هي المسؤولة الاولى عن تعويض الاوكسجين وتشاركها النباتات في ذلك.
3-تنفرد الاحياء المجهرية بقدرتها على تحليل العديد من المواد في الطبيعة مثلاً الكم الهائل من الكربوهيدرات الموجودة على سطح الارض كالسيليلوز الذي من الصعب هضمه من قبل الانسان أو الحيوان ولولا وجود الاحياء المجهرية لتراكمت كل السيقان والأوراق على وجه الارض لتبقى كما هي في البيئة اضافة إلى ذلك هنالك الملايين من هذه الكائنات في معدة الماشية والأبقار تعمل على هضم السليلوز لإنتاج الطاقة وبالتالي توفر لنا مصدر من البروتين.
4-تلعب دور في تحليل الملوثات في مياه المجاري، التربة والغازات تدعى هذه العملية وهي عملية الاستفادة من الاحياء المجهرية للتخلص من المركبات bioremediation السامة التي قد تؤدي إلى تشوهات خلقية وحدوث السرطان او حتى الموت.
5-تحلل الكائنات الميتة إلى مواد عضوية كما تساعد في تعرية الصخور وتحرير العناصر منها.
6-تساهم في انتاج الوقود والنفط من المتحجرات وهي عملية طويلة الامد تتم بوجود مواد عضوية في اعماق الارض وتحت درجات حرارية عالية وظروف لا هوائية وضغط عال حيث تقوم البكتريا بأكسدة هذه المواد وتحويلها إلى نفط خام.
7-تستخدم الاحياء المجهرية لصناعة الخبز، الخل ، الجبن، الادوية وفي السنوات الاخيرة استخدمت التقنية الحياتية لإنتاج العديد من المواد المهمة مثل الانسولين والانترفيرون .
يعتقد ان البكتريا نشأت ولأول مرة من كيان حياتي معين حينما كان كوكب الارض خال من الاوكسجين ومليء بالبراكين وظروف حرارية عالية تدل المتحجرات على ان عمر الاحياء المجهرية هو بحدود 3.5-3.8 بليون سنة .

السيطرة على الكائنات الحية الدقيقة Control of Microbial Growth

نلجأ عادة إلى السيطرة على الميكروبات إما لمنع انتقال العدوى أو منع التلوث أو لمنع الفساد الغذائي. وللسيطرة على الميكروبات يلاحظ أنه ليس من الضروري قتل جميع الميكروبات الموجودة بل يُلجأ أحيانا إلى وقف نموها ونشاطها أو إزالتها من الجسم المراد تعقيمه وتستخدم عديد من الوسائل والمواد كل منها له مدى معين وحالات خاصة يُستخدم فيها .

المصطلحات العلمية المرتبطة بوسائل السيطرة على النمو الميكروبي

المصطلح	التعريف
التعقيم Sterilization	هو القضاء على جميع أشكال الحياة الميكروبية على الجسم أو المادة المراد تعقيمها، بما فيها تدمير الجراثيم الداخلية حيث إنها أكثر أشكال الحياة الميكروبية مقاومة. والتعقيم يكون مطلقاً، أي لا توجد له درجات.
التطهير Disinfection	هوالقضاء على الخلايا الخضرية الممرضة دون الجراثيم الداخلية أو الفيروسات وتكون المادة المطهرة عادة مادة كيميائية تضاف إلى الجسم المراد تطهيره مما يؤدى إلي تقليل عدد الميكروبات أو تثبيط نموها ولا يؤدى التطهير إلى التعقيم الكامل
المطهرات Antisepsis	هي الكيماويات المستخدمة في إبادة الميكروبات من على جلد الكائن ألحي، أو الأعضاء المخاطية، أو أي أنسجة حية.
قاتلات الجراثيم Germicide cide	المركبات الكيميائية التي تقتل الميكروبات سريعا أي تقتل البروتوبلازم ومن أمثلتها: قاتلات البكتريا Bactericide قاتلات الجراثيمSporicide قاتلات الفطرياتFungicide قاتلات الفيروساتViricide قاتلات الأميبا والبروتوزوا Amoebicide
موقفات النمو البكتيري Bacteriostatic	فيها يتم تثبيط النمو البكتيري وإيقاف التكاثر مع عدم قتل البكتريا، وبالتالي إذا أزيلت هذه المواد يمكن للبكتريا معاودة نشاطها وتكاثرها. وتوجد أيضاً موقفات للنمو الفطرى والتي توقف النمو الفطرى وتكاثره.
الخلو من الميكروبات Asepsis او بدون ميكروبات	هو غياب الميكروبات الممرضة من على شيء ما أو مساحة محددة. وتصُمم تقنية الإخلاء من الميكروبات لمنع دخولها إلي داخل جسم أو مساحة ما. ومثالها إجراء العمليات الجراحية تحت ظروف خالية تماماً من الميكروبات.
إزالة الجراثيم Degerming	هو إزالة الميكروبات من على جلد كائن حي بالتنظيف الميكانيكي أو باستخدام المطهرات.
الوقاية الصحية Sanitization	هو تقليل أعداد الميكروبات الممرضة للارتفاع بمستويات الصحة العام باستخدام الكيماويات أو المطهرات.

العوامل المؤثرة في عملية السيطرة على الميكروبات

1. درجة الحرارة Temperature وتركيز أيون الهيدروجين pH
2. نوع الميكروبات وعددها Population size and composition of microogranism
1. الحالة الفسيولوجية للميكروب Physiological state of microbe
2. العوامل البيئية المحيطة Surrounding enviromental factors
3. تركيز العامل المستخدم Concentration and intensity of used factor

ميكانيكية تأثير العوامل المستخدمة في السيطرة على الميكروبات تتفاوت الميكانيكية التي تعمل بها مختلف الكيماويات والعوامل الفيزيائية في تأثيرها في الميكروبات، والذي يؤدي في النهاية إلي قتلها أو تثبيط فاعليتها. ويمكن إيجاز ميكانيكية تأثير هذه العوامل في :

1- تغيير نفاذية الغشاء الخلوي Altration of membrane permeability

2- تدمير البروتين والأحماض النووية Destruction of protein and nuclic acids

الطرق الفيزيائية للسيطرة على الميكروبات Microbial Control by Physical Methods

أولا: الحرارة Heat

تُعتبر الحرارة من أكثر الطرق استعمالا لقتل الميكروبات وبالذات في مجال حفظ الأغذية ، وتعقيم أدوات المختبرات والمستشفيات. وتعتبر الحرارة من أكثر طرق التعقيم استعمالا نظراً لتكلفتها الاقتصادية وسهولة السيطرة عليها. وتقتل الحرارة الخلايا الميكروبية عن طريق إتلاف النظام الإنزيمي للخلايا وتدميره. وعند استخدام عمليات التعقيم بالحرارة يجب أن يؤخذ في الاعتبار عدة عوامل منها:

1. Thermal Death Point (TDP)

ويقصد بها أقل درجة حرارة تكفي لقتل جميع الخلايا الميكروبية الموجودة في المادة السائلة في مدة 10 دقائق. ذلك أن قدرة الخلايا على تحمل الحرارة تتفاوت بين ميكروب وآخر.

2. Thermal Death Time (TDT)

ويقصد به أقصر فترة تكفي لقتل 90 % من الميكروبات الموجودة في بيئة سائلة عند درجة حرارة ثابتة.

وتعتبر كل من TDP، TDT على درجة كبيرة من الأهمية لتحديد كمية الحرارة التي نستخدمها في التعقيم لقتل الميكروبات الموجودة في المادة.

3. Decimal Reduction Time

ويقصد به الوقت بالدقائق الكافي لقتل 90 % من خلايا البكتيريا عند درجة حرارة ثابتة. ويعتبر هذا العامل مهمًا جدًا ، وبالذات في صناعة التعليب. وتستخدم الحرارة في عمليات التعقيم إما في صورة جافة Dry heat أو في صورة رطبة Moist heat. فالحرارة الجافة تقتل الميكروبات بفعل عامل الأكسدة Oxidation بينما الحرارة الرطبة تقتل الميكروبات بفعل وجود الرطوبة التي تساعد على سرعة تكسير روابط الهيدروجين التي تربط جزيئات البروتين في صورتها الثلاثية الأبعاد Three dimensional structure .

1. التعقيم بالحرارة الجافة Dry heat sterilization

- استخدام اللهب المباشر :

يعتبر من أبسط صور التعقيم باستخدام الحرارة الجافة، وتستخدم هذه الطريقة في المختبرات لتعقيم إبر التلقيح حيث تعرض هذه الإبر للهب المباشر حتى تصل إلى درجة الاحمرار وبهذه الطريقة يمكن القضاء على جميع صور الحياة الميكروبية على الإبرة.

- استخدام الهواء الجاف الساخن:

توضع الأدوات المراد تعقيمها في جهاز يشبه الفرن عند درجة حرارة 170° م لمدة ساعتين وفي هذه الطريقة كلما ارتفعت درجة الحرارة وطالت مدة التعريض حصلنا على نتائج أفضل ، نظرا لبطء توصيل الحرارة الجافة ، مقارنة بالحرارة الرطبة .

2. التعقيم بالحرارة الرطبة Moist heat sterilization

الغلي هو أحدى طرق التعقيم بالحرارة الرطبة إلا أن الغليان لا يمكن اعتباره طريقة تعقيمية يعتمد عليها في كل الأحوال. وللحصول على وسيلة تعقيم آمنة ومضمونة باستعمال الحرارة الرطبة، فإنه من الضروري الوصول بدرجة الحرارة إلى أعلى من درجة الغليان وذلك باستعمال البخار تحت ضغط داخل الجهاز المعروف باسم Autoclave .
وتستخدم في الحالات التي لا تتأثر فيها المواد المراد تعقيمها بالحرارة أو الرطوبة تحت الضغط. ويلاحظ أنه كلما ارتفع الضغط المستعمل زادت درجة الحرارة وكلما زاد الضغط زادت درجة الحرارة وفي أجهزة الأوتوكلاف Autoclaves فإن البخار تحت ضغط 15 باوند/البوصة المربعة تصل درجة حرارته إلى 121°م وهذه كافية لقتل جميع صور الحياة الميكروبية بما فيها الجراثيم في مدة 15 دقيقة أو أكثر بقليل حسب كمية المادة المراد تعقيمها.
وتستخدم طريقة التعقيم هذه Autoclaving لتعقيم البيئات المغذية، الأدوات، لقطن،... إلخ، وكل ما يستطيع تحمل درجة الحرارة والضغط العالي.

3. البسترة Pasteurization

العالم لويس باستير في بداية نشأة علم الميكروبيولوجي طور هذه الطريقة للقضاء على الميكروبات التي كانت تسبب فساد النبيذ في فرنسا، وسميت هذة الطريقة باسمه .

ثانيا: الترشيح Filtration

يُعرف الترشيح بأنه مرور أي مادة سائلة أو غازية خلال سطح يحتوي على ثقوب صغيرة جدا لدرجة تكفي لمنع مرور الأحياء الدقيقة خلالها.. وتستخدم هذه الطريقة لتعقيم المواد الحساسة للحرارة (أي التي تتأثر عند تعقيمها بالحرارة)، مثل المضادات الحيوية، بعض البيئات المغذية، ألإنزيمات اللقاحات.

ثالثا: التجفيف Dessication

يعتبر وجود الماء ضروريا لنمو الأحياء الدقيقة وتكاثرها. وفي حالة سحب الماء من المادة تنشأ لدينا حالة الجفاف Dessication حيث لا تستطيع فيها الأحياء الدقيقة النمو أو التكاثر، ولكنها تستطيع أن تعيش كامنة لعدة سنين. وعند إعادة الماء بوسيلة أو بأخرى إلى هذه المادة تستعيد الميكروبات نشاطها المتمثل في النمو والتكاثر. ويُعتمد على هذا المبدأ في عمليات حفظ المزارع الميكروبية في المختبرات بطريقة التجفيد Lyophilization.

رابعا: الضغط الأسموزى Osmotic pressure

يعتمد استخدام الأملاح والسكريات لحفظ الأطعمة وحمايتها من الفساد الميكروبي على تأثير الضغط الأسموزى Osmotic pressure، ذلك أن زيادة تركيز هذه المواد (سكريات، أملاح) في الوسط الخارجي يؤدى إلى خلق ظروف بيئة مرتفعة التركيز Hypertonic تؤدي إلى سحب الماء من داخل الخلية الميكروبية. وهذه الطريقة تشبه إلى حد كبير طريقه التجفيف Dessication المذكورة أعلاه من حيث اعتماد كلتا الطريقتين على مبدأ سحب الماء من الخلية، وبالتالي وقف نشاطها الحيوي مع أن كلتا الطريقتين لا تؤديان إلى موت الخلية مباشرة. ويلاحظ أنه بمجرد سحب الماء من الخلية ينكمش الغشاء البلازمي ويبتعد عن جدار الخلية، وتسمى هذه العملية البلزمة Plasmolyses ، ويقف النمو والتكاثر.
وتستخدم هذه الطريقة في حفظ الأطعمة ومنع الفساد الميكروبي فيها وذلك باستخدام التمليح في حالة اللحوم والتسكير في حالة الفواكه وغيرها غير أنه يلاحظ أن قدرة الفطريات(اعفان وخمائر) على تحمل الضغط الأسموزى العالي والجفاف ، إضافة إلى قدرتها على النمو في الوسط الحمضي مقارنة بالبكتيريا، يجعلها أكثر قدرة على إفساد الفواكه وبعض المواد الغذائية حتى المعاملة منها بالسكريات أو الأملاح.

الطرق الكيميائية للسيطرة على الميكروبات Chemical Methods of Microbial Control

تستخدم الكيماويات في مقاومة الميكروبات على الأنسجة الحية وبعض الأدوات والسطوح. ويجب أن تتوفر في المادة الكيمائية المستخدمة كمطهر لمقاومة الميكروبات التالي:

1. سرعة التأثير.
2. ذات مدى تأثير واسع على الميكروبات.

3. القدرة على التخلل داخل الجسم المعامل.
4. قابليتها للخلط مع الماء لتكوين محلول أو مستحلب ثابت.
5. لا تتأثر بالمواد العضوية التي قد تكون موجودة على المادة المراد معاملتها.
6. لا تتحلل وتفقد فعاليتها عند تعرضها للضوء ، أو الحرارة ، أو الظروف غير المناسبة.
7. لا تؤثر في المادة المعاملة بالصبغ أو التدمير،...إلخ.
8. ليس لها تأثير ضار على الإنسان أو الحيوان إذا كانت ستستخدم كمطهر للجروح.
9. يستحسن أن تكون لها رائحة مقبولة واقتصادية في السعر وسهلة النقل.

الطرق الفيزيائية المستخدمة للسيطرة على نمو الميكروبات

أولا: طرق التعقيم بالحرارة

الطريقة	ميكانيكية التأثير	المواد ـ الأدوات	ملاحظات
التعقيم بالحرارة الرطبة			
الغليان أو تيار البخار	تغيير طبيعة الميكروب	أطباق بتري، الأحواض الزجاجية، مختلف الأجهزة	قتل البكتريا السالبة والفطريات الممرضة والعديد من الفيروسات خلال 10 دقائق.أقل تأثيراً على الجراثيم الداخليه
التعقيم بالأتوكلاف	تغيير طبيعة الميكروب	البيئات الميكروبية، المحاليل، الأدوات، الملابس، الأجهزة، وأي أدوات تتحمل درجات الحرارة المرتفعة مع الضغط.	طريقة فعالة جداً للتعقيم، ويكون على 121° م تحت ضغط 15 رطل / بوصة^2. وفيها تُقتل جميع الخلايا الخضرية والجراثيم الداخلية خلال حوالى 15 دقيقة.
التعقيم بالحرارة الجافة			
اللهب المباشر	الاحتراق الكامل والتحويل إلى رماد	إبر التلقيح والمشارط والملاقط	طريقة فعالة جداً للتعقيم التام
الحرق	الاحتراق الكامل والتحويل إلى رماد	الأكواب الورقية، الملابس ، الأكياس، المناشف الورقية.	طريقة فعالة جداً للتعقيم التام
التعقيم بالهواء الساخن	تغيير طبيعة الميكروب	الزجاجات الفارغة ، الماصات ، السرنجات..	طريقة فعالة جداً ولكن تحتاج إلى درجة حرارة 170° م لمدة ساعتين تقريباً.
البسترة	تغيير طبيعة الميكروب	اللبن ، الكريم ، بعض المشروبات الروحية.	معاملة اللبن على درجة حرارة 72م لمدة 15 ثا يؤدى إلى قتل كل البكتريا الممرضة وبعض غير الممرضة
الحرارة المنخفضة التبريد	يؤدى إلى قلة التفاعلات الكيميائية والتغيرات في البروتينات.	الأغذية، الأدوية، حفظ المزارع الميكروبية.	لها تأثير موقف لنمو البكتريا
التجميد	يؤدى إلى قلة التفاعلات الكيميائية والتغيرات الممكنة في البروتينات.	الأغذية ، الأدوية ، حفظ المزارع الميكروبية.	طريقة فعالة لحفظ المزارع الميكروبية ما بين– 5 –95° م.

ثانيا طرق التعقيم الأخرى

الضغط الأسموزي	بلزمة الخلايا الميكروبية	حفظ الأغذية	من نتيجتها أن تفقد الخلايا الميكروبية الماء الموجود داخلها.
الإشعاع			
1. المتأين	تدمير DNA باستخدام أشعة X وكاما وكذلك حزم إلكترونية عالية الطاقة.	تستخدم في تعقيم المركبات الدوائية، المكونات الطبية وكذلك الخاصة بالأسنان	ليس شائع الاستخدام في التعقيم المعتاد.
2. غير المتأين	إحداث أضرار DNA بواسطة الأشعة فوق البنفسجية.	تُطبق عملياً باستخدام الأشعة فوق البنفسجية.	الإشعاع ليست لديه قدرة كبيرة على النفاذية.