

المحاضرة الثانية - درس الأحياء المجهرية المتقدم - الجزء العملي-

خامسا: الإشعاع Radiation

يعتمد تأثير الإشعاع في الميكروبات على طول موجة الأشعة، كثافتها، وطول مدة التعرض لها. ويستعمل لهذا الغرض نوعان من الإشعاعات هما:

1. الأشعة المؤينة Ionizing radiation: مثل أشعة إكس وأشعة كاما

2. الأشعة غير المؤينة Non ionizing radiation

وهي أشعة ذات موجات أقصر من تلك التي تميز الإشعاعات المؤينة، ومن أمثلتها إشعاعات الضوء فوق البنفسجي Ultra violet light ومن المجالات التي تستخدم فيها هذه الإشعاعات: تعقيم الهواء في المستشفيات، والمطاعم، .. إلخ، وتستخدم في تعقيم الأمصال واللقاحات والسموم... إلخ. ومن سلبيات هذه الإشعاعات احتمال تأثيرها في العين، وطول التعرض لها يؤدي إلى إحداث حروق بالجلد والإصابة بسرطان الجلد كما أن عدم قدرتها على الاختراق يحتم تعريض الميكروبات لها بطريقة مباشرة إذا أريد الحصول على نتائج فعالة من استخدامها ذلك أن وجود أي حاجز مثل الأوراق والأقمشة... إلخ يمنع وصولها إلى الميكروبات.

يعرف الإشعاع بأنه الطاقة المتحررة من فعالية ذرية يمر من خلال المادة بسرعة فائقة ومن المعروف ان الاشعاع يؤثر على جميع الخلايا الحية .

1- اشعاعات التآين :من امثلتها اشعة الفا، كاما وX-rays

صفتها:

أ -طول موجي قصير جداً (0.1-100) نانومتر

ب -قدرة اختراق عالية جداً للأجسام الصلبة.

ج -مكلفة وتحتاج إلى اجهزة خاصة.

عند مرور هذه الاشعاعات خلال الخلايا، بعض الذرات تمتص الطاقة لتفقد الذرة الكترونها وتتحول إلى ايون موجب .
الالكترون المتحرر يتحد مع ذرة متعادلة ويعطي الايون السالب (أي ينتج زوج من الايونات موجب وسالب)
هذا التغير في التركيب يؤدي إلى تغيرات في الاواصر الكيماوية وبالتالي يتغير التركيب الجزيئي للخلايا وإذا كانت جرعة التشعيع كافية قد تؤدي إلى قتل الخلايا. مثال عن هذا النوع من الاشعاعات هو اشعاع كاما الذي يؤدي الى اضرار بايولوجية بإنتاج جزيئات نشطة مثل OH superoxide - أو O⁻ - الحر عندما تنتقل الطاقة إلى الاحياء المجهرية .
تستخدم لتعقيم المواد الحساسة للحرارة مثل الاجهزة الطبية والأدوية كالبنسلين وتعتبر بديل للتعقيم ethylene oxide
يمكن استخدامها لتعقيم الاجهزة بعد التغليف .

يمكن استخدام اشعاع كاما للتعقيم أو للبيطرة اعتمادا على الجرعة المستخدمة. التعقيم قد يؤثر على طعم المنتج لذلك للبيطرة حيث يقتل الاحياء الممرضة مثل السالمونيلا في اللحوم دون تغير واضح في الطعم كذلك يستخدم الاشعاع في تعقيم التوابل وحتى الحبوب والخضراوات والفواكه للقضاء على الحشرات والاحياء الممرضة ومن المفاهيم الخاطئة لدى الكثير ان الاطعمة المشعة قد تحتوي على الاشعاعات أو مواد مسرطنة carcinogen بينما تشير الدلائل العلمية على انها غير مضره وصالحة للاستهلاك .

2-الاشعة فوق البنفسجية U-V radiation

-الطول الموجي للأشعة فوق البنفسجية 220-230 نانومتر يؤثر على البيورينات والبيريميدينات (كلاهما موجود في الحوامض النووية DNA، RNA) حيث تمتص اشعاع U-V عند الطول الموجي 260 نانومتر وهناك اطوال موجية قصيرة شديدة التأثير من هذا الاشعاع تصدر من الشمس ولكنها تمتص من قبل طبقة الاوزون في الغلاف الجوي قبل وصولها إلى الارض الاطوال الموجية القصيرة هذه تعتبر قاتلة للإحياء المجهرية ومضرة للكائنات الحية الاخرى ولذلك كان هناك قلق بسبب تلف طبقة الاوزون.

مثال على هذا النوع من الاشعاع الضوء القاتل للجراثيم Germicidal lamp والذي يصدر اطوال موجية قصيرة واشد ضررا توضع في غرف مغلقة لتعقيم الهواء عند خلو الغرفة من الاشخاص هذه الاطوال الموجية تحرق الجلد وتحدث اضرار في العيون .. U.V لا يخترق الزجاج ، الماء أو أي مادة غير الهواء لهذا السبب يستخدم U.V فقط لتعقيم الاسطح والهواء كما توجد وحدات خاصة U.V. لمعالجة المياه ايضا .

3-Microwave:

هذا النوع من الاشعاع لا يقتل الميكروبات بصورة مباشرة وإنما من خلال الحرارة التي تصدر عنه بعض الاحياء المجهرية تقاوم هذا الاشعاع عند تسخين الغذاء بصورة غير متجانسة.

ثانياً- الطرق الكيماوية Chemical methods

1-الكحول (الايثانول والاييز وبروبانول) ان المحاليل المائية (المخففة) لهذه الكحولات 60-80% تقتل الخلايا الخضرية للبكتريا والفطريات بينما ليس لها تأثير على السبورات وبعض الفيروسات يعزى تأثيرها القاتل إلى تحلط الانزيمات وبعض البروتينات الضرورية وذلك بسبب قابلية البروتينات على الذوبان والتلف في المحاليل المائية للكحولات (أي المخففة) اكثر من تلفها في الكحولات النقية .لذلك يكون تأثير الكحول قاتل في التراكيز 60-80% اما التراكيز العالية فتعمل على سحب الماء من الخلايا (أي يكون مثبط لنمو الخلايا) ويسبب الكحول ايضا تلف للأغشية الخلوية.

2-الفينول phenol carbolic acid وهو من اول المطهرات التي استخدمت بتراكيز 2-5% لتعقيم الارضيات في المستشفيات والمختبرات، اما الان فاستخداماته اصبحت محدودة بسبب رائحته القوية وتأثير قاتل على الاحياء المجهرية . فالمطهر مثلا Lysol يحتوي على مركبات فينولية فعالة تستخدم الاخيرة بتراكيز 5-19% حيث تقتل البكتريا الخضرية وحتى بكتريا السل بينما تقاومه بعض انواع الفيروسات.

3-الكلور Chlorine

قاتل لكل انواع الاحياء المجهرية والفيروسات . مهيج للجلد والأغشية المخاطية تستخدم المركبات التي تحرر الكلور مثل Na-hypochlorite لتطهير مياه المسابح، وبتراكيز اقل لمياه الشرب . هذه المحاليل متوفرة وقليلة الكلفة . ان المحلول المطهر يحضر بتخفيف القاصر الاعتيادي 5.25% Na-hypochlorite بنسبة 1:1000 بالماء وهذا يساوي 500 PPM كلور ولا يحطم السبورات اما الاحياء المجهرية تقتل خلال ساعة او اقل 1/2 .
*ملاحظة: ان هذا التركيز يعادل مئات الاضعاف التركيز اللازم لقتل الاحياء المجهرية ولكنه ضروري لضمان تعقيم سريع وفعال .

اضافة إلى ذلك فان وجود مواد عضوية (ملوثة) يتطلب استخدام تركيز 1:10 بدلا من 1:100 وذلك لان المواد العضوية والشوائب تتفاعل الكلور الحر وبالتالي تقلل من التأثير القاتل له يستخدم اما كغاز الكلورين أو Na or Ca - hypochlorite وهو سبب اكسدة مكونات الخلية وتحطم الخلايا الخضرية.
3-الاوزون Ozone هو احد اشكال الاوكسجين O₃ غير المستقر، وهو عامل مؤكسد قوي وفعال، يتحلل بسرعة الكثير من البلدان تستخدمه في تطهير مياه الشرب بدلا من الكلور.

5- الالديهيدات formaldehyde glutaraldehyde و OPA Orthophaladehyde يحطم الاحياء المجهرية والفيروسات وذلك نتيجة لإيقاف نشاط البروتينات والحوامض النووية اكثر المحاليل استخداما هو 2% محلول قاعدي من مادة glutaraldehyde الذي يستخدم في تعقيم بعض المواد الطبية الحساسة للحرارة حيث تغمر لمدة 10 - 12 ساعة للقضاء على كل اشكال الحياة بضمنها السبورات والفايروسات . هذه المادة سامة لذلك يتطلب غسل المواد المعقمة قبل الاستعمال اما مركب OPA فهو من المطهرات الجيدة . وهو قيد الدراسة كبديل glutaraldehyde .

6-formaldehyde: يتوفر بشكل غاز أو محلول مائي 37% يدعى فورمالين . قاتل فعال لكل اشكال الحياة وخلال دقائق يستخدم لقتل البكتريا وإضعاف الفيروسات في تحضير اللقاحات . استخداماته محدودة بسبب ابخرته المخرشة واحتمالية كونه مادة مسرطنة .

7- Ethyleneoxide (Eto): مادة معقمة فعالة يحطم كل انواع الاحياء المجهرية بضمنها السبورات والفايروسات بتفاعله مع البروتين وهو غاز قابل للاحتراق الاقمشة، الاجهزة الطبية بشكل جيد يستخدم لتعقيم الاطباق البلاستيكية الماصات والسرناجات ويستخدم جهاز مغلق يشابه الموعدة للتعقيم Eto اذ يخلط الغاز مع CO₂ لكونه قابل للانفجار يستغرق 3-12 ساعة وهو مادة مطفرة مسرطنة .

ملاحظات عن التعقيم والتطهير:

- 1-تعتبر محاليل الكلورين من المطهرات الفعالة للمنازل والمختبرات ممكن تحضيره من خلط 10 سم 3 من القاصر مع 7.8 سم 3 من المنظفات في لتر من الماء للحصول على محلول مزيل للبكتريا والأوساخ.
- 2-الحرارة الرطبة تقتل الاحياء المجهرية من خلال تكسير الحوامض النووية وتغيير معالم البروتينات denaturation وتكسير الاغشية الخلوية cell membranes .
- 3-تعتبر المواد الكيماوية في معظم الاحيان مطهرة لانها لا تقتل السبورات وان تأثيرها المطهر معتمد على التركيز، الزمن، الحرارة ووجود مواد عضوية.
- 4-الاديهيادات مثل الفورمالديهايد و glutaraldehyde تعقم وتطهر لأنها قاتلة للسبورات.
- 5- يخرق غاز Eto المواد البلاستيكية المغلفة وهو يحطم كل انواع الحياة بتفاعله مع البروتينات. المعقمات والمطهرات المستخدمة وتأثيرها على الميكروب معقمات او مطهرات استخداماتها تأثيرها عليها .

ثالثا الطرق الميكانيكية Mechanical methods:

وهي طرق تعتمد ميكانيكية الترشيح للتعقيم ، حيث تستخدم مرشحات غشائية تتكون من مركبات مثل خلات السليلوز cellulose acetate نترات السليوز cellulose nitrate الخزف الصيني، وغيرها من المرشحات غالبا ما تكون مواد خاملة chemically inert وحجم ثقبها اقل من اصغر فيروس معروف مثلا مرشحات البكتريا تكون بحجم 0.2-0.4 micrometer تستخدم هذه الطريقة لتعقيم المحاليل الحساسة للحرارة مثل المحاليل البروتينية والسكرية . هنالك ايضا مرشحات للهواء High Efficiency Particulate Air HEPA التي تزيل 97-99% تقريبا من الاحياء المجهرية من الهواء قطرها اكثر من 0.3 Micrometer تستخدم هذ المرشحات الهوائية في غرف المستشفيات خاصة في غرف ومختبرات مرضى السل. تستخدم هذ الطريقة لتعقيم المحاليل الحساسة للحرارة مثل المحاليل البروتينية والسكرية.

المجهر واكتشافه

احياء صغيرة لا ترى بالعين المجردة .لذلك لم تكتشف إلا بعد اكتشاف عدسات ذلك بسيطة مكبرة يصل تكبيرها إلى 10-20 X ثم في عام 1590 سجل اكبر انجاز في الوقت من قبل العالم هوك الذي تمكن من الحصول على تكبير 200 X اخيرا في عام 1676 استطاع العالم ليفنهوك ان يصنع اول مجهر ذو قوة تكبير 300 X . استخدم ليفنهوك مجهر البسيط لفحص عينات من الادرار، الاسنان، الدم وغيرها وفي العديد من هذه العينات لاحظ اجسام صغيرة متحركة البعض منها يعرف الان بالابتدائيات والبعض الاخر سماها بكتريا جميعاً "animalcules" قام بعد ذلك بتقديم هذه الملاحظات الدقيقة إلى الجمعية الملكية في بريطانيا كان هذا الحدث اشبه بنزول الانسان على القمر منذ ذلك الوقت توالى الاكتشافات لأنواع عديدة من المجاهر المختلفة.

يعتبر المجهر المركب compound microscope او المجهر الضوئي Bright field microscope من اهم مستلزمات مختبر الاحياء المجهرية يستخدم هذا المجهر لفحص العينات الذي تصل له قوة التكبير إلى 1000 X وهي كافية لفحص شكل حجم وحركة الكائنات المجهرية .

يحتوي على نوعين من العدسات:

1-العدسات العينية (10x) ocular lens .

2- العدسات الشيئية . objective lens (4x, 10x, 40x, 100x)

هذه العدسات تعمل معا لتعطي تكبيرا يساوي حاصل ضرب العدسة العينية X تكبير العدسة الشيئية اما

المكثف condenser الذي يقع بين المصدر الضوئي والشريحة فليس له علاقة بالتكبير بل لتوضيح الاضاءة.

ان فائدة المجهر لا تقتصر على التكبير بل تتحدد بقدره التمييز **resolving power** وتعرف بأنها اقل مسافة بين شيئين ممكن رؤيتهما منفصلين عن بعضهما وهي تعتمد على نوعية العدسات، قوة التكبير، وطريقة تحضير الشريحة. كذلك تتحدد قوة التمييز عند التكبير العالي بالطول الموجي للضوء. اذ كلما كان الطول الموجي قصير كانت قوة التمييز اعلى وعلى هذا الاساس ان الحد الاعلى لقوة التمييز في المجاهر الضوئية تساوي **0.2 micrometer** وهي تكفي لدراسة المظهر العام للخلية ولكن لا تكفي لتوضيح جزيئة الفايروس.

للحصول اعلى قوة تمييز باستخدام العدسة الزيتية **oil immersion lens 100 X** ويستخدم احد انواع الزيوت المستخرجة من خشب نبات **cedarwood oil** ليحل محل الهواء بين الشريحة والعدسة فائدة هذا الزيت تكمن في ان معامل انكسار الزيت يساوي معامل انكسار الزجاج وبالتالي يمنع تشتت أو تغيير مسار الاشعة الضوئية أي انه يعمل على تجميع الحزمة الضوئية المارة خلال العينة .

***ملاحظة مهمة يجب ان يكون الزيت رائق خال من التضبب**

بعض الاجراءات الهامة لصيانة وحماية المجهر:

* عند نقل المجهر من مكان إلى اخر يرفع المجهر من الذراع بيد وتوضع اليد الاخرى تحت القاعدة.

* يحفظ في دولاب مغلق بعيداً عن الاتربة.

* تتظف العدسات قبل وبعد الاستخدام بورق تنظيف العدسات والزايلين **Xylene** أو الاستيون + كحول.

* تحذير الاستيون لوحد مذيّب قوي قد يذيب المادة اللاصقة للعدسات لذلك يحذر من استخدامه. كما يمكن استخدام **cotton swab** بدلا من ورق العدسات.