

المختبر الاول Lab.1**التعقيم Sterilization**

هي العملية التي يتم فيها قتل و اباده جميع الكائنات الحية الدقيقة .
ويكون بطريقتين :-

1- الطرق الفيزيائية Physical methods

2- الطرق الكيميائية Chemical methods

1- الطرق الفيزيائية Physical methods

تضم انواع مختلفة منها :-

1- الحرارة Heat

وتشمل

أ- الحرارة الجافة Dry heat

1- الحرارة الحمراء Red heat

وهي الحرارة التي تستخدم في تعقيم ابرة التلقيح حيث تعقم على اللهب الى درجة الاحمرار وهو مايسمى بالحرارة الحمراء

2- اللهب Flame

يستخدم عادتاً في تعقيم الملاقط والشرائح الزجاجية وغطيتها وفوهات الاواني الزجاجية .

3- الفرن oven

يستخدم عادتاً في تعقيم الادوات الزجاجية ،المساحيق،الزيوت،الدهون،وكل المواد التي لاتتأثر بالحرارة الجافة العالية ويتم التعقيم عادتاً باستخدام درجة حرارة (160-180م°) ولفترة تتراوح من ساعة الى ساعتين ونصف اعتماداً على طبيعة المادة .

ب- الحرارة الرطبة Hoist heat

ويستخدم جهاز الموعدة الكهربائية **Autoclave** والذي يشبه في عملة قدر الضغط يتم التعقيم بهذا الجهاز باستخدام درجة حرارة تصل الى (121م°) وضغط (1.5 جو) ولمدة (15-20) دقيقة... ويعتمد على غليان الماء في حيز محدود مفرغ من الهواء وبذلك فانه سوف يغلي في درجة حرارة اعلى من 100 م° وهي 121م° . وهذه الطريقة اكثر كفاءة من الحرارة الجافة وتستخدم لتعقيم الاوسط الحاوية على رطوبة او ماء وكل مادة لاتتأثر بالحرارة العالية .

ج- البسترة Pasteurization

تستخدم لتعقيم الحليب وفيها يتم التعقيم بدرجة حرارة اقل من 100م° .

د- التندلة Tyndallization

وفيها تعقم الاوساط الزراعية بغليها الى درجة 100م° وتبريدها في اليوم الاول ثم تغلى وتبرد في اليوم الثاني وكذلك في اليوم الثالث وبذلك يتم القضاء على كل الاحياء المجهرية التي من الممكن ان تتواجد في الوسط الزراعي .

2- الاشعاع Radiation

تستخدم هذه الطريقة لتعقيم غرف العمليات وغرف العزل وغيرها ويستخدم فيها الاشعه فوق البنفسجية ultra-uliolet rays وباطوال موجية اقل من 330 nm وقد يستخدم مصباح بخار الزئبق لتوليد الاشعه فوق البنفسجية وباطوال موجية تتراوح بين (240-280) nm ويستخدم عادتاً في التعقيم السطحي لانها لا تخترق السطوح وتستخدم ايضاً الاشعة الايونية مثل X-rays و Gamma rays ولكن بسبب مضارها الكثيره فان استخدامها محدودة .

3- الترشيح Fihiration

ويستخدم لتعقيم الاوساط السائلة التي تفسد بالحرارة ويتم التعقيم باستخدام اوراق ترشيح خاصة ذات ثقب صغيره دقيقة جدا تقدر ب 0.45mm وبذلك تمنع مرور اصغر انواع الجراثيم من المرور خلالها .

2- الطرق الكيميائية Chemical methods

تقسم الى

أ- المطهرات Disinfectant

وتستخدم عادتاً لاغراض التعقيم السطحي وكذلك للادوات ولكنها طريقة مكلفة وتستخدم فيها مواد مختلفة منها كلوريد الزئبقيك mercuric chloride والكحول الايثيلي ethyl alcohol والكلور والديتول وغيرها .

ب- التبخير Gaseous

تخدم عادتاً في تعقيم التربة والاماكن الزجاجية المغلقة وهذه الطريقة لها مضار كثيرة ولذلك فهي محدودة الاستخدام وتستخدم فيها مواد مثل اوكسيد الاثيلين و اوكسيد البروبلين و الاوزون .

الايوساط الزرعية Culture media

تزرع الفطريات على اوساط غذائية Nutrient media او تسمى اوساط زرعية Culture media تختلف هذه الأوساط تبعاً لطبيعة الفطر وتبعاً للغرض من زراعته وتعرف الأوساط الزرعية على انها البيئة الغذائية الملائمة لنمو الكائن الحي الدقيق (البكتيريا والفطريات) الذي يحصل على غذائه منها وهذه البيئة تحتوي على الكربون والنايتروجين والأملاح المختلفة وقد تضاف اليها بعض الفيتامينات اما على هيئة مستخلص نباتي او مواد جاهزة كما تضاف اليها بعض المضادات الحياتية من أجل منع نمو البكتيريا و افساح المجال لنمو الفطر فقط او العكس و من هذه المضادات هي , Cyclohexamide : Chloramphenicol , Ampecilline , Streptomycin .

وتقسم على اسس مختلفة منها :-

تقسم الأوساط الزراعية حسب الاستخدام الى:-**1- اوساط روتينية Routine laboralory media**

وهي اوساط تحضر من مواد طبيعية ذات اصل حيواني او نباتي وتستخدم لغرض الزراعة والادامة للفطريات من امثلتها وسط الشعير والخميرة ومستخلص الذرة .

2- اوساط مدعمة Enriched media

وهي اوساط روتينية يتم اغناءها ببعض المواد لتلبية المتطلبات الغذائية للفطريات الحساسة مثل : وسط روتيني معين مضاف له مادة البيبتون .

3- اوساط انتخائية Selective media

وهي اوساط تثبط عمل كافة الفطريات عدا باستثناء الانواع الفطرية المطلوبة وبذلك يمكن عزل مجموعة معينة من الفطريات او نوع معين من لقاح مختلط مثال وسط cycloheximide + sabourayd dextrose agar

4- اوساط تفريقية Differential media

وهي اوساط مجهزة ببعض الكواشف او الكيمياويات يمكن بواسطتها التفريق بين مختلف انواع الكائنات الحية على اسس فروقات مرئية في انماط نموها وهذه شائعة في مختبرات البكتريا مثل وسط اكار الدم blood agar

5- اوساط القياس Assay media

تستخدم هذه الاوساط لقياس الفيتامينات والمضادات الحيوية والانزيمات والاحماض الامينية وغيرها من النواتج الايضية للفطريات .

6- اوساط كيمو - حيوية Biochemicl media

تستخدم هذه الاوساط غالبا في مختبرات البكتريا لتمييز الاحياء الدقيقة على اسس انشطتها الكيمو حيوية وتساعد في دراسة عملياتها الايضية .

تقسم الأوساط الزراعية حسب مكوناتها الكيمياوية الى ثلاثة انواع هي:**1- الأوساط الطبيعية Natural media :**

وهي عبارة عن مستخلصات طبيعية نباتية او حيوانية معقدة غير معروفة التركيب كماً ونوعاً و تحضر غالباً من الأنسجة النباتية او الحيوانية مثل الثمار والخضروات والبيض والحليب ومستخلصات الخميرة والشعير وسوائل الجسم وغيرها. وتمتاز هذه الأوساط بأنها تماثل في تركيبها الوسط الذي ينمو عليه الفطر في الطبيعة علاوة على احتواءها على الفيتامينات والعناصر الأخرى غير الموجودة في باقي الأوساط، كذلك هي رخيصة الثمن وسهلة التحضير كما ان معظم الفطريات تنمو وتتجرت جيداً في مثل هذه الأوساط. ومن امثلتها مستخلصات الأجزاء النباتية كالبطاطا والجزر والفاصوليا والشعير والرز وغيرها.

2- الأوساط الصناعية (المحضرة) Synthetic media :

وهي تتكون من مواد كيميائية عضوية او غير عضوية معروفة التركيب كماً ونوعاً وقد يراعى في مثل هذه الأوساط انها تشابه قدر الامكان تركيب الأنسجة والأعضاء النباتية التي تنمو عليها الفطريات كما يجب مراعاة المواد المستعملة في تركيب مثل هذه الأوساط وحسب الغرض الذي يستخدم من أجله هذه الأوساط وغالباً ما تستعمل هذه الأوساط في الدراسات العلمية التي يقصد منها تأثير التغذية على نمو الفطر وتجرثمه ومثل هذه الأوساط وسط براون Brown's media ووسط ريتشارد Richard's media ووسط زايفك دوكس CZapek bx Agar .

3- الأوساط شبه الصناعية Semi Synthetic media:

وهي خليط من النوعين السابقين وذلك لأحتوائها على واحدة او اكثر من المواد الطبيعية غير معروفة التراكيب بالإضافة إلى مركبات كيميائية معروفة التراكيب الكيماوي لذلك تمتاز باكتسابها ميزات كل من النوعين السابقين وتستخدم في الدراسات الفسلجية للفطريات ومن امثلتها وسط البطاطا والدكستروز Potato Dextrose Agar ويرمز له (PDA) والذي يستخدم بشكل شائع في تنمية أغلب الفطريات وعزلها .

كما تقسم الأوساط الغذائية حسب حالتها الفيزيائية الى ثلاثة انواع هي :

1- الأوساط أصلية Solid media:

وهي نوع من الأنواع الثلاثة السابقة مضافاً إليها مادة الأكار (Agar) والاكار مادة عضوية معقدة التراكيب تستخرج من بعض الطحالب البحرية ويوجد منها عدة انواع تجارية تمتاز فيما بينها بدرجة نقاوتها يضاف الى الأوساط الغذائية لكي يساعد على تصلبها عند درجة حرارة اقل 45°م ويصبح سائلاً عند الدرجات الحرارية العالية (95م °) يضاف الى الوسط بنسبة 20-15% من الوسط اي 20 – 15 غم لكل لتر من الوسط الغذائي. تمتاز الأوساط الصلبة بسهولة الأستعمال والنقل واكتشاف التلوث كما تستخدم بنجاح في عزل وتنقية الفطريات كذلك في حفظ مزارع الفطريات المختلفة كأصول في الثلاجة لفترات طويلة وتحضر هذه الاوساط اما في انابيب اختبار مائلة او عميقة او يصلبها في اطباق بتري . كما يعتبر الاكار افضل من الجلاتين الذي تكون درجة ذوبانه واطنة وكونه يتحلل مائياً من قبل العديد من البكتريا المحللة للبروتين في درجة الحرارة العادية .

ب - الاوساط السائلة liquid media :

وهي الاوساط المحضره بدون اضافة مادة الاكار لذلك يجب الاحتياط عند نقلها لتفادي وصول الوسط الى السدادات القطنية ومن فوائد هذه الاوساط انها تسمح بتهوية المزارع ويمكن من وزن الغزل الفطري وتحليل المنتجات الايضية بسهولة وتستخدم في الدراسات الغذائية كنقص العناصر الغذائية والفيتامينات وتأثير اضافتها للفطريات كما تستخدم هذه الاوساط في الدراسات الايضية الثانويه من قبل الفطريات مثل افراز المضادات الحياتيه والسموم والانزيمات وغيرها وتحضر هذه الاوساط في دوارق مخروطيه مختلفه الحجم وحسب نوع الدراسه ولغرض تهويتها فانها تتعرض الى هز ميكانيكي باستخدام هزاز shaker .

ج- الأوساط شبه الصلبة semi solid media :

وهي أوساط ذات قوام جيلاتيني وتحتوي على كميته قليلة من الأكار أو بعض العوامل المصلبه الاخرى كالجلاتين وتستخدم هذه الاوساط لأغراض خاصه منها دراسة التراكيب التكاثرية المتحركة للفطريات او البكتريا .

نماذج من الأوساط الزراعية الشائعة :

ان جميع الفطريات الغير اجبارية التطفل قد يمكن زراعتها وإكثارها على لأوساط الزرعية . فالوسط الزرعى الصلب عادة ما يكون مفضلا في عمليات العزل Isolation والاكثار Cultivation والتنقية Purification وكما هو معروف ان المصدر الذي يعطي صفة الصلابة الزرعية هو الاكار agar

ونستعرض هنا وسط زرعى شائع الاستخدام في مختبر الفطريات :

طريقة تحضير وسط PDA : Pototo carrot agar

يتكون من

20g بطاطا

20g جزر

20g اكار

1000ml ماء مقطر

1.تؤخذ درنات البطاطا والجزر كل منهما بمقدار 20 g وتغسل جيدا ثم تقطع الى قطع صغيرة وتطبخ في دورق لمدة نصف ساعة مع نصف لتر من الماء المقطر .

2.ترشح البطاطا المسلوقه والجزر خلال قطعة قماش شاش .

3.ياخذ الراشح ثم يضاف الاكار تدريجيا الى الراشح حتى لا يتكتل الاكار) .

4.يكمل الحجم الى لتر بإضافة النصف المتبقى من الماء المقطر ثم يضاف مضاد حيوى مثل Chloromphenicol بمقدار 250 ملغم فى اللتر الواحد ثم يعقم الوسط بجهاز التعقيم autoclave .