زراعة الأحياء الدقيقة
Cultivation of Microorganisms

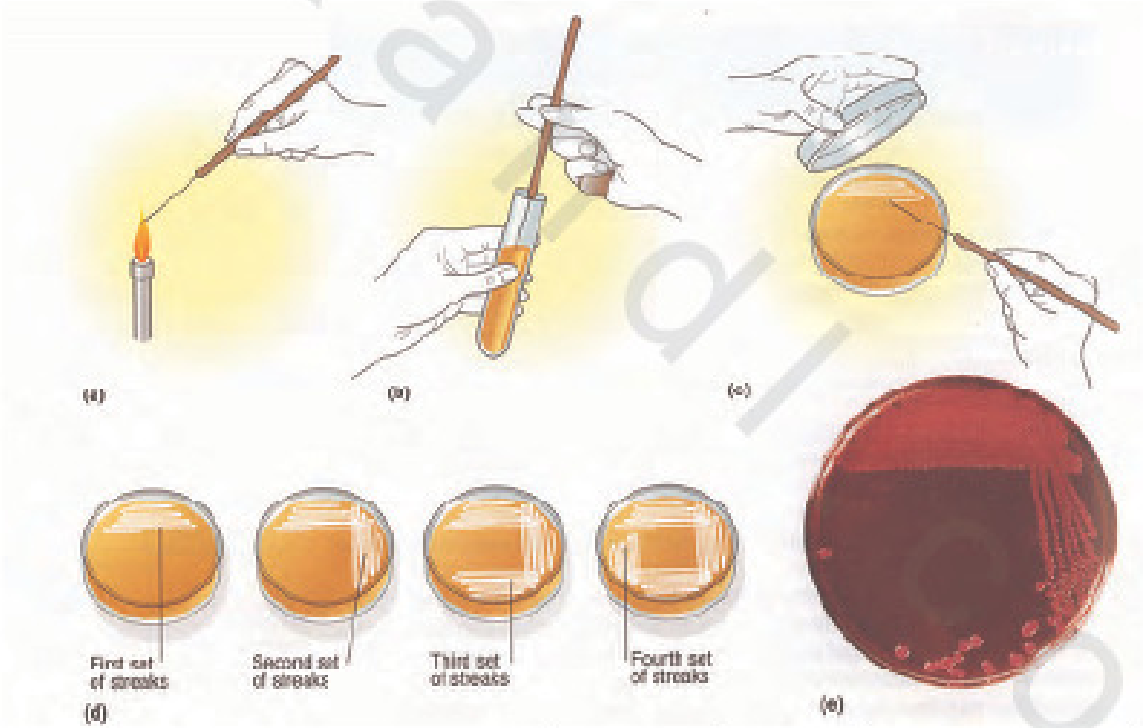
بعد معرفة الاحتياجات الغذائية لكل نوع من الأحياء الدقيقة يتم تحضيرها معملياً على شكل منابت أو أوساط غذائية مزرعية culturas media وتعقيمها مع الأدوات المستخدمة. بعدئذ يتم تطهير أو تعقيم مكان الزراعة سواءً أكان منضدة المعمل أم صندوق الحقن inoculation box، ولكن أفضلها جميعها كبائن الهواء المعقم من خلال المرشحات والتي يتم تعقيمها بالأشعة فوق البنفسجية قبيل الزراعة cultivation (culturing) (الحقن inoculation).

ويلزم معملياً زراعة culturing الأحياء الدقيقة وإعادة استزراعها sub-culturing، كما تستخدم الزراعة أيضاً لعزل isolation الأحياء الدقيقة في مزارع نقية pure cultures التي تكون شرطاً أساسياً للتعرف identification على أي كائن حي دقيق. علاوة على ذلك، تزرع الأحياء الدقيقة من أجل إكثارها propagation وتنميتها ومن أجل أغراض تطبيقية عديدة. وتُجري كل هذه العمليات في ظروف معقمة sterile (غير ملوثة aseptic conditions) التي من بينها أيضاً الحقن أسفل حرارة لهب بنزن Bunzen burne. وتتم الزراعة من خلال عدة عمليات كما يلي:

أولاً: تقنيات الحقن والنقل
Inoculation and Transfer Techniques

بمجرد اختيار البيئة الغذائية المناسبة لزراعة الكائن الدقيق يتم تحضيرها وتعقيمها سواء في صورة سائلة أو صلبة أو شبه صلبة وسواء كانت مجهزة في أنابيب أو أطباق بتري Petri dishes أو دوارق تكون الخطوة التالية هي حقن هذا الوسط الغذائي بمحقن inoculum (الكمية المطلوبة من الكائن الحي المراد زراعته) أو من العينة specimen (من مريض أو تربة أو مياه أو حتى مزرعه سابقه ...إلخ) ويتم الحقن بواسطة أنشوطة (عقدة) loop إبرة الحقن، ويجب أن يتم تعقيم إبرة الحقن inoculation needle (والتي تصنع من سلك رفيع من الصلب أو الأفضل من البلاتين) المستخدمة في نقل الميكروبات بتسخينها مباشرة في لهب بنزن إلى درجة الإحمرار بحيث يكون وضعها عمودياً في اللهب وبحيث تكون ممسوكة من اليد (يفضل أن تكون اليد من الأبنوس أو أي مادة عازلة)، ويتم مسك

الإبرة بحيث تكون تحت مستوى لهب بنزن وألا تتعرض للهواء خارج منطقة اللهب*، كما تمسك الأنبوبة المحتوية على اللقاح باليد اليسرى وبواسطة أصابع اليد اليمنى يتم نزع سدادة (blug) أنبوبة المحقن بحيث يظل الغطاء بين الخنصر وراحة اليد ولا يوضع على طاولة الحقن. كما يلزم أن تكون الأنبوبة في وضع أفقي ولا توجه فوهتها لأعلى منعاً للتلوث، وقبل نقل المحقن من أنبوبة المزرعة إلى الأنبوبة الجديدة (أو أي وعاء آخر) يجب أن تمرر الفوهات الأنابيب أو الدوارق في اللهب ثم تنقل المزرعة وتحقن في الأنبوبة الجديدة وبعدها يتم أيضاً تمرير فوهتي الأنبوبتين في اللهب ويحكم إغلاقهما. أما إبرة الحقن فتحرق مباشرة في اللهب وتوضع في أنبوبة محتوية على ٧٠٪ كحول إيثيلي إلى حين استخدامها في تلقيح مزرعة أخرى (الشكل رقم ٧٩) ويجب الحرص الشديد عند عملية الحقن حتى لا يحدث تلوث في أي من المزارع وذلك بمنع حدوث أية تيارات هوائية أو التحدث، كما يفضل في كل الأحوال إن أمكن وضع قناع واق على الفم. ويلاحظ أن بعض المعامل تستخدم إبر حقن معقمة من البلاستيك وتوجد في عبوات تستخدم لمرة واحدة.



الشكل رقم (٧٩). طريقة حقن الأحياء الدقيقة من أنبوبة مزرعة على أطباق بتري للحصول على مستعمرات مفردة كما يمكن عمل هذا الحقن في أنابيب مزارع سائلة أو آجار مائل أو آجار عميق، وتستخدم طريقة تخطيط الأطباق هذه لعزل الأحياء الدقيقة على شكل مستعمرات نقية مفردة (عن: Alcamo, 2001).

* توجد الآن إبر حقن من البلاستيك معقمة وفي عبوات مختلفة العدد، كما يوجد موقد خاص لا يظهرمن أعلاه اللهب ولكن يتم إدخال الإبرة المعدنية في داخله فالتلهب.

وبالنسبة لكثير من الأحياء الدقيقة مثل البكتيريا والأكتينومايسيتات والفطريات والخمائر فيمكن أن يتم حقنها ونقلها إما على أنابيب الآجار المائل (agar slopes = slants) أو على أطباق بتري محتوية على آجار صلب agar plates = agar Petri dishes. كما يمكن أيضاً أن تحقن في بيئات سائلة (مثل المرق المغذي nutrient broth).

وبالنسبة لحقن وزراعة الفيروسات وأنواع أخرى من الميكروبات المُمْرضة أو الخطيرة على صحة الإنسان أو الحيوان أو البيئة، فإنه يلزم استخدام كبائن ترشيح الهواء خلال الرقائق Laminar Sterile air flow أو حجرات حقن كبيرة معقمة الهواء والتي تسمى containment rooms. إلا أن بعض الأحياء الدقيقة المُمْرضة عالية الخطورة (مثل بعض الفيروسات المُمْرضة للإنسان) يتم حقنها وزراعتها في كبائن غير مفتوحة أو قنوات channels تمرر عليها الأدوات للحقن والزراعة كهربياً ومعزولة تماماً ببلاستيك قوي شفاف، ويتم فقط إدخال يدي الباحث من خلال فتحتين بهما قفازات كما يشترط أن يرتدي الباحث ملابس رجال الفضاء وبحيث يعزل تماماً عن أي تلوث ميكروبي كما في الشكل رقم (٨٠).

الشكل رقم (٨٠). كبائن خاصة لحقن وزراعة الفيروسات والأحياء الدقيقة المرضة (Laminar Sterile air flow).

ثانياً: البيئات (المنابت – الأوساط) الغذائية
Nutritional Media

ونظراً لأهمية زراعة وتنمية الأحياء الدقيقة وكذلك حفظها لفترات طويلة في المعمل، لذا يلزم أن تستعمل لهذه الأغراض أنواع مختلفة ونوعية متخصصة من الأوساط الغذائية (المنابت) media. وتحتوي هذه الأوساط الغذائية على جميع المكونات والاحتياجات الغذائية اللازمة لنمو كل كائن حي دقيق بذاته، ومن ثم فإن الأوساط الغذائية تختلف في مكوناتها على حسب نوع الكائن والمجموعة التقسيمية التي ينتمي إليها سواء فيروسات أو بكتيريا

أو فطريات أو طحالب أو أوليات ..إلخ. وهذه الأوساط الغذائية تحاكي البيئات الطبيعية التي تنمو فيها الكائنات الدقيقة. وتنقسم البيئات (الأوساط . المنابت) الغذائية عموماً إلى نوعين :

١- بيئات معروفة التركيب والمكونات.

٢- بيئات معقدة غير معروفة التركيب الكيميائي والتي تتكون من مركبات معقدة.

١- البيئات المركبة Complex Media

وهي بيئات من مواد غير محددة التركيب الكيميائي ولكنها تحتوي على المواد الغذائية nutrients الأساسية اللازمة لنمو الأحياء الدقيقة. ومعظم هذه المواد تكون منتجات طبيعية natural products بشكلها الخام crude form ، ومن ثم فإن تركيب هذه المكونات ونسبتها في الخليط لا تكون معروفة تماماً. ومكونات البيئة المركبة تكون غالباً من النواتج النباتية أو الحيوانية أو منتجات طبيعية مثل التربة كما تشمل نواتج التحلل الإنزيمي أو الحمضي لأنسجة نباتية أو لحوم أو كازين casein أو خلايا خميرة أو متحلل للفول الصويا. ونواتج هذا التحلل تؤدي إلى زيادة محتواها من الببتيدات والأحماض الأمينية والفيتامينات والمعادن ، ومن أمثلة ذلك الببتونات peptones من اللحوم والببتونات النباتية phytopeptones والتربتونات tryptones الناتجة عن التحلل الإنزيمي المائي لبروتينات حيوانية. علاوة على ذلك ، تعد مستخلصات الخميرة ومستنبت الشعير (المولت malt) غنية بالفيتامينات، كما أن هذه النواتج الطبيعية تكون غنية عادة بأنواع من الكربوهيدرات إلا أنها رغم ذلك تزّود بأحد أنواع السكريات عند صناعة البيئة الغذائية.

٢- البيئات المحدَّدة Defined Media

وهي بيئات غذائية معروفة مكوناتها ومحددة في تركيبها الكيميائي وكذلك نسب تواجدها. وعلى هذا الأساس فإن تركيب هذه الأوساط الغذائية يختلف ويتباين على حسب نوع الأحياء الدقيقة التي تنمى عليها. وعلى سبيل المثال فإن البيئة التي تنمو عليها البكتيريا مثل بكتيريا القولون إيشيريشيا كولاي *Escherichia coli* تحتوي على جلوكوز وكلوريد الأمونيا NH_4Cl وفوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين Na_2HPO_4 وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4 وكبريتات المغنسيوم $MgSO_4$. أما العناصر الأساسية الأخرى مثل الحديد والمنجنيز والنحاس فإنها توجد بكميات كافية في الماء.

أما أنواع البكتيريا الأخرى التي تكون في حاجة إلى مكونات غذائية إضافية فتعد ذات احتياجات خاصة fastidious أي ليست سهلة التنمية ؛ لأن قدراتها على التمثيل الغذائي ليست بمثل إمكانيات إيشيريشيا كولاي، ومن ثم فإنها تحتاج إلى تدعيم supplementation من مواد تغذية إضافية مثل الفيتامينات والأملاح المعدنية والبيورينات والبريميدينات.

مكونات الأوساط الغذائية Constituents of Media

أ) مصادر نيتروجينية Nitrogen sources

يعد النيتروجين عنصراً أساسياً من مكونات الكائنات الحية خاصة البروتين والأحماض النووية والفيتامينات. ولهذا فلابد من تزويد الأحياء بهذا العنصر بأي شكل من الأشكال، فبعضها يمكن أن يستخدم أملاح الأمونيوم مثل كلوريد الأمونيوم (NH_4Cl) كنيتروجين غير عضوي، وثمة كائنات أخرى تحتاج إلى نواتج متكسرة من البروتينات مثل البيتون peptone (بروتين متحلل مائياً جزئياً)، والبيبتيدات والأحماض الأمينية، وتنتج بعض أنواع بكتيريا باسيللاس *Bacillus spp* وكثيراً من الفطريات إنزيمات خارج خلوية تحلل البروتينات (proteases) وتكسر الجيلاتين وغيرها من البروتينات إلى مكونات أصغر من البيبتيدات والأحماض الأمينية، ويمكن أن تؤخذ هذه المكونات البسيطة بواسطة الخلايا لمزيد من الأيض metabolism. ويمكن أن تنمو أنواعٌ عديدة من البكتيريا على الآجار المغذي nutrient agar المحتوي على أحد بروتينات اللبن، وهو الكازين casein. ويسبب وجود الكازين ظهور لون أبيض لوسط الآجار وعندما تنمو عليه البكتيريا يتحول اللون الأبيض إلى مناطق شفافة رائقة حول النمو البكتيري الذي يفرز الإنزيمات لهضم كازين اللبن.

ب) الكربون ومصادر الطاقة Carbon and energy sources

يعد الكربون أهم عنصر أساسي تركيبي لكل الكائنات الحية. وتحصل الكائنات الحية على الكربون من مواد مغذية عضوية مثل الكربوهيدرات والبروتينات والدهون أو من مركبات غير عضوية مثل النترات وكذلك من ثاني أكسيد الكربون. وينتج عن الهدم الأيضي catabolism تكسير المواد العضوية إلى سكريات وأحماض أمينية وأحماض دهنية ومواد أخرى.

وتستخدم كل هذه المواد في البناء الأيضي anabolism، ومن ثم تنتج الإنزيمات والبروتينات التركيبية والأحماض النووية والكربوهيدرات والمكونات الكيموحيوية الأخرى التي يحتاج إليها الكائن الحي. ونفس هذه المواد تعد مصدراً للأيض (الطاقة اللازمة للنمو والتكاثر) أو أنها تخزن في صورة مركبات غنية بالطاقة على شكل روابط كيميائية. ويعد الأيض metabolism هو محصلة كلٍ من العمليات البنائية anabolitic والهدمية catabolitic.

وتشمل مصادر الكربوهيدرات المستخدمة للطاقة وكمصدر للكربون النشاء starch والنشاء الحيواني (جليكوجين glycogen) ومختلف السكريات الآحادية الخماسية pentoses والسداسية hexoses والسكريات الثنائية مثل لاكتوز lactose وسكروز sucrose ومالتوز maltose. ولكي تستفيد الكائنات من السكريات العديدة polysaccharides مثل النشاء والجليكوجين والسليولوز، فإنه يجب على هذه الكائنات أن تنتج إنزيمات خارج خلوية extracellular لتكسير هذه المركبات المعقدة إلى بسيطة. فإنزيم أميليز amylase يكسر النشاء إلى وحدات مالتوز يمكن

امتصاصها بواسطة الخلايا. كما أن نفس الإنزيم يكسر سكر المالتوز إلى وحدتين من سكر الجلوكوز. ومن هذا التكسير الهدمي للمركبات المعقدة بواسطة الإنزيمات لا تنتج فقط الوحدات البنائية للبروتين والكربوهيدرات والدهون ولكنه يعطي أيضاً طاقة تستغل بواسطة الكائنات لتؤدي التفاعلات البنائية.

ج) الفيتامينات وعوامل النمو Vitamins and growth factors

إن العديد من الفيتامينات المهمة في علاج أمراض نقص التغذية في الإنسان تكون مطلوبة أيضاً لنمو الأحياء الدقيقة. ولبعض الأنواع من الأحياء الدقيقة القدرة على تمثيل (تخليق) الفيتامينات أما البعض الآخر فيحتاج التزود بها. ومن بين الفيتامينات التي تؤثر على نمو الكائنات الدقيقة :

ثيامين thiamine وريبوفلافين riboflavin وحامض نيكوتينيك nicotinic acid وحامض بانتوثينيك pantothenic acid وبيوتين biotin وحامض بارا أمينوبنزويك para-aminobenzoic acid وبيريدوكسين pyridoxine وحامض فوليك folic acid وسيانوكوبالامين cyanocobalamin (فيتامين ب-١٢) وإينوزيتول inositol.

ويمكن أن تعمل الفيتامينات كمرافقات إنزيمية co-enzymes أو كمكونات متكاملة integrals لبعض المواد الأخرى النشطة حيوياً.

وتحتاج أحياء دقيقة عديدة إلى عوامل نمو أخرى قد تكون هذه المواد هي بادئات (أصول precursors) لتصنيع الفيتامينات مثل حمض بيميليك pimelic acid الذي يعد بادئاً لبناء البيوتين وبيتا آلانين beta-alanine الذي يعد بادئاً لبناء حمض بانتوثينيك.

كما قد تتضمن أيضاً البيورينات purines والبريميدينات pyrimidines وهي القواعد النيتروجينية اللازمة لبناء الأحماض النووية.

علاوة على ذلك، فتوجد مجموعة أخرى من الأحياء الدقيقة تكون لها متطلبات غذائية خاصة ونوعية. مثال ذلك هيموفيلاس إنفلونزي *Haemophilus influenzae* وأنواعٌ معينة من البكتيريا يلزم لها الهيموجلوبين haemoglobin — الموجود بالدم — كمادة ضرورية للنمو بالإضافة إلى مرافق إنزيمي كامل من نيكوتين أميد أدينين ثنائي النيوكلوتيد nicotine amide adenide dinucleatide (إن إيه دي NAD) أو على شكل ثلاثي الفوسفات من نفس المركب triphosphate NADP.

د) أملاح المعادن الأساسية Essential mineral salts

تلعب أنواع مختلفة من أملاح المعادن دوراً أساسياً مهماً في التغذية الميكروبية. وتشمل هذه الفوسفات اللازمة لبناء الأحماض النووية، والكبريتات التي تكون مطلوبة لصنع أنواع معينة من الأحماض الأمينية، أما البوتاسيوم والمغنيسيوم والمنجنيز والحديد والكالسيوم فتعمل كعوامل مشاركة co-factors لإنزيمات معينة، أو أنها تدخل مباشرة

في العديد من التفاعلات الكيموحيوية، فمثلاً يعد الحديد مكوناً للسيتوكرومات cytochromes الأساسية في أيض الطاقة، أما الكالسيوم فهو مكون رئيس في تكوين الجراثيم (الأبواغ) البكتيرية، على حين أن المعادن غير الأساسية (عناصر القلّة trace elements) التي تلزم النمو بكميات ضئيلة جداً تشمل الكوبالت والنحاس والزنك والموليبدينام وهي لازمة لعمل كثير من الإنزيمات لبعض الأحياء الدقيقة وليس لكلها. ولبعض الأنواع من الأحياء الدقيقة احتياجات خاصة ونوعية من الاحتياجات المعدنية، فمثلاً تحتاج الدياتومات (نوع من الطحالب) إلى عنصر السيليكون الذي يدخل في تكوين جدرها الخلوية.

هـ) الماء والضغط الأسموزي Water and osmotic pressure

تحتوي الأحياء الدقيقة في خلاياها سواء البكتيريا أو الفطريات أو الطحالب على كميات كبيرة من الماء تتراوح ما بين ٨٠–٩٦٪ من وزنها. كما يلزم أن تكون الأحياء الدقيقة على اتصال وثيق بمصادر المياه من أجل بقائها ونموها وتكاثرها. ولهذا السبب فهي تنمو في وسط مائي (سائل) أو رطب. وعند تجهيز الأوساط الغذائية الصناعية لتنمية الأحياء الدقيقة معملياً فإنه يلزم إذابة المكونات ingredients = constituents في ماء مقطر وليس ماء الصنبور. ويستخدم الماء المقطّر (وأحياناً الماء مزدوج التقطير double distilled) لتقليل وجود أملاح غير عضوية إضافية أو زائدة الكمية وكذلك لاستبعاد المواد العضوية العالقة بالماء. كذلك فإن التركيب المعدني لماء الصنبور يتغير من وقت لآخر.

أما فيما يتعلق بالضغط الأسموزي osmotic pressure (osmolarity) فيجب أن يكون الضغط الأسموزي لمكونات محلول الوسط الغذائي مساوياً لمثيله في خلايا الأحياء الدقيقة التي تنمو عليه أو فيه، أي يكون متساوي الأسموزية isotonic.

وعندما تؤخذ خلايا الأحياء الدقيقة من وسط النمو متساوي الأسموزية وتوضع في ماء مقطر عند ضغط إسموزي منخفض hypotonic فإن الماء سوف يدخل إلى الخلية بكميات زائدة ويضغط على الخلية ويؤدي إلى انفجار، فيما عدا الخلايا البكتيرية ذات الجدار الخلوي القوي. وتعرف هذه الظاهرة بالانفجار (التحلل) البلزمي plasmolysis. أما إذا وضعت الخلايا في محلول زائد الأسموزية، فإن الماء يخرج من الخلايا وبعدها تتقلص المحتويات الداخلية للخلية وتتشوه ولا تستطيع أن تؤدي العمليات الحيوية نتيجة لفقد الماء وهذه الظاهرة تسمى موت البلزمة plasmolysis.

تحضير الأوساط (المنابت) الغذائية Preparation of Media

لقد تم اختراع الأوساط الغذائية من أجل زراعة أنواع معينة من الأحياء الدقيقة كي تناسب احتياجاتها الغذائية ونموها. وكما سبق القول فإن هذه الأوساط الغذائية قد تكون من مكونات كيميائية معروفة التركيب والمقادير أو أنها تكون معقدة التركيب غير معروف مكوناتها أو نسبها على وجه الدقة. كما أن الأوساط الغذائية قد تكون من مركبات كيميائية محددة ومن ثم تسمى بيئة مخلّقة synthetic أو أنها تتكون من مواد طبيعية نباتية أو حيوانية

أو ميكروبية وتسمى بيئات طبيعية natural أو أنها تتكون من بعض من المواد الكيميائية المعروفة ومضاف إليها بعض من المنتجات الطبيعية فتعرف بالأوساط الغذائية شبه المخلّقة semisynthetic.

ويجب أن يكون من السهل تركيب المنبت الغذائي للأحياء الدقيقة، كما يجب أن تحتوي على الكميات المعروفة اللازمة للنمو مثل النيتروجين والكربوهيدرات والمعادن والفيتامينات والاحتياجات الخاصة للنمو. علاوة على ذلك، يجب أن تكون تركيزات الأملاح متوازنة (أي سوية التركيز isotonic) وأن تكون ذات خواص منظّمة buffered (أي تحتفظ بتوازن الأس الهيدروجيني pH وثباته) وأن تكون ذات لزوجة viscosity مثالية وأن يكون لها جهد أكسدة واختزال oxidation reduction potential معين، علاوة على كونها معقمة sterile.

وقد تم خلال التاريخ الطويل لعلم الأحياء الدقيقة الوصول بالأوساط الغذائية إلى حد الكمال perfection. فقد استخدم باستير المنقوعات infusions ومطبوخات decoctions المصادر الطبيعية (اللحم والحساء = المرق) في تنمية الأحياء الدقيقة. كما استخدم كلٌّ من باستير وناجيلي Nageli أوساط غذائية لا تحتوي على بروتين لزراعة الأحياء الدقيقة، أما كوخ Koch ولوفلر Loeffler فقد استخدما مرق اللحم والببتون وكلوريد الصوديوم لتنمية الأحياء الدقيقة. ويمكن من هذا المنبت السائل (المرق broth) تحضير وسط غذائي صلب بإضافة ١–٢٪ من مادة الآجار آجار agar-agar التي تجعل الوسط الغذائي صلباً مما يتيح عزل المستعمرات الميكروبية المختلطة بعضها عن بعض ولأغراض أخرى. والآجار — يعني هلام jelly باللغة الماليزية — عبارة عن مادة كربوهيدراتية ليفية معقدة تستخرج تجارياً من بعض أنواع الطحالب البحرية الحمراء (أعشاب البحر) مثل جيليديام *Gelidium* وجراسيلاريا *Gracilaria* وروردوفايتا Rhodophyta. وعند طبخ الآجار في الماء أو في المحلول الغذائي يكون هلاماً عند تبريده إلى درجة حرارة الغرفة. ويحتوي الآجار على ٧٠–٧٥٪ كربوهيدرات و٢–٣٪ بروتين ومكونات نيتروجينية أخرى و ٢–٤٪ رماد .. كما أن أهم مكونات الآجار هو آجاروز agarose والآجارويكتين agaropectin.

وبسبب قدرة الآجار على إعطاء الوسط الغذائي الصلابة عند تبريده وكونه مقاوماً للإنزيمات الميكروبية فقد استخدم على نطاق واسع لتحضير الأوساط الغذائية الصلبة solid وشبه الصلبة semi– solid وكذلك في صورة أوساط غذائية جافة dried (مسحوق powdered).

ولتحضير المنابت الغذائية اقترح هوتنجر Hottinger منتجات تكسير البروتين تريبتون tryptone التي لا تحتوي على بيتون ولكن على عديدات الببتيد منخفضة الوزن الجزيئي وكذلك على الأحماض الأمينية. كما استخدم مارتن Martin إنزيم بابين papain لتكسير البروتينات. وفي السنوات الأخيرة استخدمت الأحماض الأمينية الأساسية والفيتامينات النقية في زراعة الأحياء الدقيقة والمزارع الخلوية التي تنمى عليها الفيروسات.

ولتحضير البيئة الغذائية: توزن مقادير مكوناتها مفردة، ثم تذاب على حدة في لتر من الماء المقطر، وقد يلزم ضبط الأس الهيدروجيني pH قبل توزيعها في أوان صغيرة. بعد هذا تعقم الأنابيب أو الدوارق المحتوية على البيئة الغذائية ويتم تعقيمها sterilized في مُعقّم البخار (الأوتوكلاف autoclave) عند ضغط ١,٥ جوي ودرجة حرارة ١٢١°م لمدة ١٥ دقيقة أو حسب التعليمات.

وتحتوي بعض أنواع البيئات الغذائية على مكونات معينة مثل المصل serum (هو سائل الدم بعد فصله من خلايا الدم المتجلط) أو بعض الكربوهيدرات والفيتامينات والتي تكسرها الحرارة، لذا فإنه يتم تعقيم هذه المكونات على حده بواسطة الترشيح العالي ultrafiltration ثم تضاف على باقي مكونات البيئة تحت ظروف معقمة aseptically. كما أنه من الممكن أن ترشح البيئات الغذائية بكامل مكوناتها بالترشيح العالي مثلما يحدث في بيئات زراعة الفيروسات وغيرها.

أنواع البيئات الغذائية Types of Media

تلزم زراعة الأحياء الدقيقة لأي من الأسباب التالية:

١- عزلها isolation في صورة نقية، ٢- التعرف عليها identification ومعرفة اسمها وموقعها التصنيفي، ٣- التعرف على الأنواع الجديدة أو الطفرات منها، ٤- الحساسية للمضادات الحيوية antibiotic sensitivities للكائنات المُمْرضة pathogens المعزولة من المرضي، ٥- اختبار خلو المنتجات المستخدمة للإنسان من الميكروبات sterility test، ٦- التحاليل الميكروبية microbial analyses للأغذية والمياه، ٧- التحكم البيئي environmental control للتلوث الميكروبي، ٨- معايرات assays الفيتامينات والمضادات الحيوية ٩- اختبار المواد الحيوية مثل اللقاحات vaccines.

وتوجد مئات الأنواع من البيئات الغذائية ولكن اختيار واحدة أو أكثر منها يعتمد على عدة عوامل أهمها الكائن المراد تنميته وزراعته أو عزله. ويوجد من أنواع البيئات الغذائية (المنابت = الأوساط) ما يلي:

أ) البيئات العادية (البسيطة) Ordinary (simple) media

ومن أمثلتها مرق اللحم والبيبتون وكذلك آجار اللحم والبيبتون.

ب) البيئات الخاصة Special media

مثل آجار المصل ومرق المصل والمصل المخثّر coagulated serum والبطاطس والشعير المستنبت (مولت malt) والنشاء، وآجار مرق الدم .. إلخ.

ج) البيئات التفضيلية (التعريفية) Differential media

يمكن استخدام العديد من التوافقات combinations من المواد المغذية والأس الهيدروجيني من أجل إنتاج بيئات غذائية لتمايز differentiate وتفرّق في نمو الكائنات الدقيقة التي تزرع عليها، أي أنها تسمح بنمو أنواع معينة

— وأحياناً نوع واحد = دون الكائنات الأخرى، فالوسط الغذائي التفاضلي هو البيئة التي تدعم نمو مختلف الأنواع والتي توفر وسطاً من شأنه أن يجعل التمييز والتفريق ما بين مختلف الكائنات أمراً سهلاً، فمثلاً ، البيئة المثراة enriched بالدم مثل آجار الدم blood agar يمكن أن تستخدم للتفريق بين العديد من الأنواع species التابعة لجنس البكتيريا العنقودية ستافيلوكوكاس *Staphylococcus*، ولإجراء ذلك، يضاف ٥–١٠٪ من دم الغنم إلى وسط أساس base medium (يعني وسطاً غذائياً عادياً)، حيث يتم تعقيمهما منفصلين ويضافان معاً بعد تبريدهما، كما يستخدم آجار الدم أيضاً للتفريق بين أنواع البكتيريا السبحية ستربتوكوكساي *Streptococci* لأن المستعمرات المختلفة تعطي علامات مرئية مختلفة بسبب إنتاجها للإنزيمات ومواد أخرى مما يسهل تقسيمها إلى مجموعات. فالسبحيات التي تنتج حولها مناطق خضراء شفافة تنتمي إلى مجموعة ألفا للتحلل الدموي α-hemolysis أما التي تنتج مناطق رائقة فتنتمي إلى مجموعة التحلل الدموي بيتا β-hemolysis، على حين أن التي لا تحدث أي تغيير في اللون الأحمر للبيئة فتتبع مجموعة التحلل الدموي جاما γ-hemolysis. ولا يقتصر التحلل الدموي على البكتيريا السبحية ولكن بعض الأنواع الأخرى تسبب نفس الظاهرة أيضاً.

وعلاوة على المصادر المختلفة لدم الثدييات تستخدم مواد أخرى لعمل بيئات تفضيلية مثل الكربوهيدرات والدهون والبروتينات وبعض المواد المغذية الأخرى، كما يمكن أيضاً استخدام كواشف الأس الهيدروجيني pH indicators والفينول الأحمر phenol red.

وباختصار فإن الأوساط الغذائية التفضيلية تحتوي على مادة أو مواد تُهَاجَمْ بنوع أو أنواع من الأحياء الدقيقة التي تنمو عليها فتعطي لوناً أو تفاعلاً مميزاً لها على حين أنها تسمح أيضاً بنمو الكائنات الأخرى التي تمتلك مثل هذه الخواص الإنزيمية. ومن ثم فمن أنواع هذه البيئات تلك التي: ١- تمتلك إنزيمات محللة للبروتين، ٢- التي تخمِّر نوعاً أو أنواعاً معينة من الكربوهيدرات، ٣- التي تفاضل بين البكتيريا التي تحلل والتي لا تحلل سكر اللاكتوز، ٤- التي تحدد نشاط التحلل الدموي، ٥- التي تقدِّر النشاط الاختزالي reductive activity للأحياء الدقيقة ٦- التي تحتوي على مواد يستخدمها فقط نوع واحد من الأحياء الدقيقة.

د) البيئات الانتخابية (الانتقائية) Selective media

إن البيئة التي تحتوي ضمن مكوناتها مادة من شأنها أن تتداخل interfere مع نمو أحياء دقيقة معينة أو تمنعها على حين تسمح لباقي الأحياء الدقيقة بالنمو تسمى بيئة انتخابية أو انتقائية selective. وتوفر البيئات الانتخابية وسائل لعزل أنواع معينة أو مجموعات خاصة من الأحياء الدقيقة. ومن بين المواد التي يمكن استخدامها كعوامل انتخابية: بنفسجي الكريستال crystal violet وإيوسين واي eosin Y والأخضر اللامع brilliant green وأزرق الميثيلين وكلها تثبط نمو البكتيريا الموجبة لجرام، كما يمكن أيضاً استخدام أملاح المرارة bile salts وتركيزات عالية من كلوريد

الصوديوم لهذا الغرض. كما يمكن أيضاً جعل البيئة الغذائية العادية انتخابية بزيادة الأس الهيدروجيني أو خفضه وهذا مما يسمح بنمو بعض الكائنات على حين يثبط نمو الكائنات الأخرى. ومن أمثلة الأوساط الغذائية الانتخابية التي تنمى عليها الفطريات بيئة سابورود جلوكوز آجار Sabouraud's glucose agar عند أس هيدروجيني ٥.٦. ومن بين المواد التي تستخدم لصناعة بيئات انتخابية كل من المضادات الحيوية مثل سايكلوهيكسيميد cyclobeximide وكاناميسين Kanamycin ونيومايسين neomycin وفانكومايسين vancomycin.

ومن الواضح أنه يمكن عمل الوسط الغذائي انتخابياً عن طريق: ١- التحكم في مكونات الوسط بالحذف أو الإضافة، ٢- تغيير الظروف الجوية للبيئة و ٣- ضبط درجة حرارة التحضين. ومن أمثلة الأوساط الغذائية بيئة باكتوآجار الأخضر اللامع Bacto Brilliant Green Agar، فهذه البيئة عالية الانتخابية وتستخدم في عزل أنواع سالمونيللا *Salmonella species* عدا سالمونيللا تايفي *S. typhi* المسببة للتيفود، من البراز أو العينات الأخرى. ويثبط نمو الكائنات الأخرى تماماً بسبب وجود صبغة الأخضر اللامع. كما يحتوي هذا الوسط أيضاً على سكري لاكتوز وسكروز اللازمان كمواد تفاعل إنزيمية. وتكوّن السالمونيللا المثالية على هذا الوسط مستعمرات قرنفلية بيضاء معتمة محاطة بمساحة حمراء لامعة. أما الأنواع الأخرى التي تخمر سكر لاكتوز أو سكروز فإنها تنمو أيضاً على هذا الوسط ولكن يمكن تمييزها بسهولة عن السالمونيللا عن طريق تكوينها مستعمرات خضراء مصفرة محاطة بمناطق كثيفة من اللون الأخضر المصفر.

كذلك فإن إضافة سيتريميد citrimide إلى بيئة الآجار المغذي بمعدل ٠.٣ جم/لتر يثبط نمو كل الميكروبات فيما عدا أنواع سيدوموناس *Pseudomonas spp*.

أما بيئة آجار ماكونكي MacConky فإنها تستخدم لانتخاب البكتيريا المعوية السالبة للجرام، إذ أن أملاح المرارة وبنفسجي الكريستال الموجودين بها يثبطان نمو الكائنات الموجبة للجرام. وتقوم أملاح المرارة بخفض التوتر السطحي الذي يعمل كمثبط لنمو البكتيريا الموجبة للجرام، على حين أن بنفسجي الكريستال يثبط خطوة مهمة في تخليق الجدر الخلوية لأنواع معينة من البكتيريا الموجبة للجرام. أما سكر اللاكتوز الموجود بالوسط فإنه يعمل كمادة وسط substrate عندما يتم تخميره، حيث يعطي مستعمرات قرنفلية حمراء محاطة بمناطق قرنفلية نتيجة لترسيب أملاح المرارة.

وتتميز بيئة آجار مانيتول الملح mannitol salt agar بأنها يمكن أن تستخدم كبيئة انتخابية لأنواع بكتيرية معينة علاوة على كونها تفضيلية حيث يمكنها تفريق الكائنات الممرضة من غير الممرضة. ويستخدم غالباً آجار مانيتول الملح في عزل ستافيلوكوكاس أورياس. وبالإضافة إلى سكر المانيتول، يحتوي هذا الوسط على ٧.٥٪ كلوريد صوديوم وكاشف للأس الهيدروجيني من الفينول الأحمر. وتنمو على هذا الوسط بكتيريا ستافيلوكوكاس أورياس المُمْرضة حيث تخمر المانيتول منتجة حامضاً كما تحول اللون الأحمر للوسط إلى الأصفر.

أنواع أخرى من البيئات Other Media

حتى اليوم تنمى بعض الأحياء الدقيقة المُمْرضة على أنواع محوَّرة modified من المنابت الغذائية التي استخدمت لعدة سنوات ماضية، مثال ذلك كوريني باكتيريام دفثيري *Corynebacterium diphtheriae* المسببة للدفتريا حيث تنمى على تحوير من البيئة الأصلية التي وضعها لوفلر Loeffler عام ١٨٧٠م. ويحتوي هذا المنبت الغذائي على مصل دم البقر ومستخلص لحم البقر وتربتوز tryptose (بيتون) وديكستروز dextrose (جلوكوز) وكلوريد الصوديوم والماء المقطر. أما مايكوباكتيريام تيوبركيولوزيس *Mycobacterium tuberculosis* المسببة لمرض السل فلا تزال تنمى على منبت غذائي كوَّنه لوينشتاين Lowenstein عام ١٩٣١م وطوَّره جينسين Jensen عام ١٩٣٢م. ويحتوي هذا الوسط الغذائي على الماء والبيض والحامض الأميني أسباراجين asparagine وفوسفات البوتاسيوم وكبريتات الماغنسيوم وأخضر مالاكيت malachite green، وتعمل صبغة أخضر مالاكيت على تثبيط نمو معظم البكتيريا الأخرى الموجودة بالعينة عدا مايكوباكتيريام.

تخزين البيئات الغذائية Storage of Media

يجب عند تحضير البيئات الغذائية وإذابة مكوناتها الكيميائية في الماء أن توزع في الأواني مباشرة إن كانت سائلة أو أن يضاف إليها الآجار إن كانت صلبة أو شبه صلبة ثم تطبخ إلى أن يتجانس الآجار المتصهر، ثم توزع في الأوعية حسب الكميات المطلوبة وتعقم في المعقم (الأوتوكلاف autoclave) وإن كان يخشى من وجود مواد حيوية تتكسر بالحرارة فتعقم بالمرشحات العالية. وفي كل الأحوال يتم تخزين الكميات الكبيرة المجهزة من البيئات الغذائية تحت ظروف تمنع الجفاف dehydration. وعادة يتم حفظ البيئات الغذائية في الثلاجات في عبوات محكمة الإغلاق. وفي كل الأحوال فإنه يجب أن تحضَّن البيئات الغذائية المعقمة أولا لمدة (١٢ ساعة) ليلاً للإطمئنان إلى أن تعقيمها سليماً. وكل العينات التي يحدث فيها تلوثاً يجب أن يعاد تعقيمها والتخلص منها. كما تجدر الإشارة إلى أن كل البيئات السائلة أو الصلبة المعدَّة للتعقيم يجب تعقيمها في نفس اليوم إلا إذا كانت خلطة المكونات الكيميائية لم يتم بعد إضافة الماء إليها.

أما بيئة هيكتوين للبكتيريا المعوية Hektoen enteric agar، والتي تحتوي على اللاكتوز والسكروز وسكر ساليسين salicin والأحماض الأمينية المحتوية على كبريت فهي بيئة تفريقية إنتخابية (DS) حيث تتميز بما يلي:

١- البكتيريا المخمرة لسكر اللاكتوز تعطي مستعمرات قرنفلية سلمونية pink-salmon.

٢- البكتيريا التي لا تخمر اللاكتوز تعطي مستعمرات خضراء غالباً.

٣- البكتيريا التي تخمر سكر ساليسين تعطي مناطق قرنفلية حول المستعمرات.

٤- البكتيريا التي لا تخمر ساليسين لا يتغير لونها.

٥- البكتيريا المنتجة لكبريتيد الهيدروجين H_2S تعطي مستعمرات مراكزها سوداء.

كما تعد أيضاً بيئة آجار الأيوسين وأزرق الميثيلين eosin-methylene blue بيئة تفريقية انتخابية (DS) وهي تحتوي على سكر لاكتوز وسكر سكروز وتتميز بما يلي :

١- البكتيريا التي تخمر سكر لاكتوز تظهر مستعمراتها إما قرنفلية غامقة وإما مستعمرات سوداء المركز حوافها شفافة عديمة اللون.

٢- البكتيريا التي لا تخمر اللاكتوز أو السكروز تكون عديمة اللون.

هذا وتقوم المعامل الدراسية والطلاب والباحثون بتجهيز مكونات الأوساط الغذائية وأدواتها كما تقوم شركات متخصصة بتوفير كل هذه البيئات المتنوعة جاهزة للكشف مباشرة.

ثالثاً: تعقيم البيئات والمحاليل الحيوية وأدوات زراعة الأحياء الدقيقة

Sterilization of Media, Biological Fluids and Equipments for Cultivation of Microorganisms

تعريف التعقيم Sterilization

هو إبادة أو قتل destruction أو إزالة removal جميع الكائنات الحية الموجودة بالوسط الغذائي أو استخدام وسائل ومعاملات ذات تأثير قوي على عشائر الأحياء الدقيقة. ومن بين الطرق التي يعتمد عليها في التعقيم :

١- استخدام بخار الماء الحار المشبع تحت ضغط باستخدام جهاز الأوتوكلاف autoclave.

٢- استخدام الحرارة الجافة العالية (الهواء الساخن) مثلما يحدث في أفران تعقيم الأدوات الزجاجية وغيرها.

٣- التعريض لبعض الغازات مثل أكسيد الإيثيلين (ETO) ethylene oxide.

٤- التعريض للأبخرة الساخنة غير المشبعة وهي توليفة من المواد الكيماوية توضع في جهاز يسمى المعقم الكيميائي كيميكلاف chemiclave والذي يستخدم في عيادات أطباء الأسنان. وعموماً تنحصر طرق تعقيم البيئات الغذائية والأدوات على وسائل فيزيائية وأخرى كيميائية. وفيما يلي شرح مختصر لمختلف هذه الوسائل :

١- الطرق الفيزيائية Physical Methods

تتضمن الطرق الفيزيائية كلاً من : (أ) الحرارة الرطبة والجافة (ب) البرودة (ج) الترشيح العالي ultrafiltration (د) الموجات فوق الصوتية ultrasonication (هـ) التشعيع irradiation.

أ) الحرارة الرطبة Moist heat

تسبب الحرارة الرطبة تدمير الأحياء الدقيقة عن طريق تخثر coagulation البروتينات بما فيها إنزيمات الخلية وأغشية الخلية والأحماض النووية.

ب) الغليان Boiling

يعد غليان السوائل والمحاليل وسيلة فعالة في التعقيم. ولكن الغليان ليس مبيداً للجراثيم sporocidal. وتستخدم هذه الطريقة في تعقيم الأدوات المعدنية إلا أنها ليست جيدة ويحدث تلوث للأدوات أثناء إخراجها أو تناولها.

ج) التعقيم ببخار الماء المشبع الحار تحت ضغط (الأوتوكلاف Autoclaving)

وهو جهاز معدني من الصلب منه ماهو عمودي أو أفقي ويعمل ببخار الماء الحار تحت ضغط ويشبه في نظامه استخدام أواني الطهي تحت الضغط pressure cookeries. وهو أهم وسيلة يعتمد عليها في التعقيم. ويتم التعقيم بعد إخراج الهواء الموجود بالجهاز وإحلال بخار الماء محله ثم يقفل على البخار الذي يصل ضغطه إلى ١,٥ ضغط جوي عند درجة حرارة ١٢١°م ويكتمل التعقيم بعد ١٥–٢٠ دقيقة في معظم الحالات حيث يقضي على كل الملوثات الميكروبية بما فيها الجراثيم البكتيرية. وعند تعقيم التربة يمكن تكرار تعقيمها ثلاث مرات على ٣ أيام متتابعة عند ضغط ٢ ضغط جوي أو ١,٥ ضغط جوي لمدة نصف ساعة.

د) البسترة Pasteurization

هي عملية تعقيم المواد والمنتجات — مثل اللبن باستخدام الحرارة الرطبة وتستخدم في عملية البسترة حرارة معتدلة تكفي لتدمير الكائنات المُمْرضة أو الأشكال الخضرية منها غير المرغوب فيها، على حين أنها تحتفظ بطبيعة ومذاق السوائل أو تحافظ على محتوياتها دون تغير أو نشاط ميكروبي لفترة طويلة نسبياً بشرط الحفاظ على درجات حرارة منخفضة. ومن المتوقع أن بسترة اللبن تقضي على الكائنات المُمْرضة الخضرية التي سقطت فيه. ولو تعرضت هذه السوائل لدرجة حرارة عالية يقصر وقت البسترة والعكس صحيح أيضاً حيث يعقم اللبن عند درجة ٦٢,٩°م لمدة دقيقة أو أن يمرر كغشاء رقيق على أنابيب أو صحون مسخنة عند درجة ٧١,٢°م لمدة ١٥ ثانية.

هـ) التعقيم المتقطع (بالبخار) Intermittent sterilization

وفيه يتم تعقيم المواد بتعريضها للبخار (١٠٠°م) لمدة ٣٠ دقيقة يومياً لمدة ثلاثة أيام متتالية مع تركها فترة قدرها ٢٤ ساعة بين كل تعقيمين. ونظراً لطول وصعوبة هذه الطريقة فإنها لا تعد مناسبة.

و) التعقيم بالحرارة الجافة Dry heat sterilization

- **أفران الهواء الحار Hot-air ovens**: يعد الهواء الحار غير كفء وبطيء في تعقيم المواد المحتوية على مكوّنات كيموحيوية، وإنما يستخدم في تعقيم الأدوات الزجاجية مثل الماصات وأطباق البتري وخلافه. ويتم التعقيم إما عن درجة ١٦٠°م لمدة ساعتين وإما عن درجة ١٨٠°م لمدة ساعة. كما يتم تعقيم الزيوت والمساحيق والشمع بهذه الطريقة.
- **الحرق Incineration**: تزود كثير من المستشفيات وبعض معامل الأحياء الدقيقة بمحرقة incinerator، وذلك من أجل التخلص تماماً من كثير من الأدوات والمواد والبيئات وبيض الدجاج والمزارع النسيجية والحيوانات المصابة أو الملوثة بأحياء دقيقة خطيرة مثل الفيروسات أو البكتيريا وغيرها. كذلك يتم أيضاً تعقيم إبر الحقن inoculation needles خاصة الأنشوطة loop في لهب بنزن المباشر. ولهذا الغرض يجب أن تمسك إبر الحقن من يدها

بحيث يوضع السلك وطرف العقدة في منطقة اللهب عمودياً لوقت كافي لإحمرارها ولهذا الغرض تصنع عقدة الإبرة من سلك من البلاتين أو أنواع من السلك الذي لا يصدأ.

ز) الترشيح العالي Ultra filtration

تستخدم مواد مسامية مختلفة لإزالة الأحياء الدقيقة من السوائل والهواء. وتوجد تطبيقات عديدة لهذه المرشحات بالنسبة لعلم الأحياء الدقيقة: ١- تعقيم السوائل والهواء، ٢- فصل الأحياء الدقيقة المختلفة الأحجام بعضها عن بعض (الفيروسات عن البكتيريا)، ٣- تحضير محاليل بدون خلايا cell free وخالية من السموم toxins والأنتيجينات antigens والإنزيمات، ٤- ترويق وإزالة عكارة clarification المحاليل، ٥- تقدير حجم الفيروسات.

وتصنيع المرشحات العالية من الفخار غير المصقول unglazed porcelain أو طبقات مضغوطة من الأسبستوس asbestos وتربة الدياتومات diatomaceous earth والزجاج المصنفر sintered glass. وقد حل محل هذه المواد حديثاً استخدام مواد ورقية رقيقة مثل ثلاثي خلات السيليلوز cellulose acetate أو خليط من إسترات السيليلوز أو مبلمرات من الفينيل venyl أو غيره من البوليميرات. وهذه الأغشية الورقية تتميز بطبيعتها شبه الغربالية التي تسهل الترشيح العالي حيث يمكن التحكم بدقة في أقطار الثقوب وتكون أكثر انتظاماً، كما أنها تتفوق على الأنواع القديمة بزيادة معدل انسياب السوائل منها وكذلك التحكم في أحجام الثقوب. وتمكّن هذه المرشحات العالية من فصل الفيروسات وكذلك البروتينات الصغيرة.

ح) الترشيح العالي الكفاءة لرقائق الهواء (هيبا) High Efficiency Particulate Air Filters (HEPA)

وتستخدم مرشحات رقائق الهواء عالية الكفاءة في إزالة الدقائق particles بما فيها الأحياء الدقيقة من الهواء، وتستخدم بصفة خاصة في صناعة كابينات (كبائن) cabinets ينساب فيها الهواء من خلال مرشحات الهواء نقياً داخل الكابينة. وهذا النوع من الكبائن يستخدم لزراعة المزارع الخلوية والفيروسات.

ط) الموجات فوق الصوتية Ultrasonics

وتستخدم لهذا الغرض موجات صوتية عالية الكفاءة فوق مستوى مسمع البشر. وللموجات فوق الصوتية تطبيقات عديدة في مجال الأحياء الدقيقة وفي المجالات المتعلقة بالصحة.

وتستخدم في المعامل لتفكيك الخلايا cell disintegration وفي التعقيم وتطهير السطوح كي تكون نظيفة. وتعتمد فكرة هذه الأجهزة على تحويل الطاقة الكهربية إلى طاقة ميكانيكية من موجات عالية التذبذب. ومن أهم أدواتها منظفات cleaners الموجات فوق الصوتية حيث تملأ تانكات أو أحواض أو حمامات مائية بمحلول (أو ماء) تمر خلاله الموجات عالية التذبذب. وتتميز هذه المنظفات بقدرتها الفائقة على إزالة الأوساخ soils من على الأدوات والزجاجيات، حيث تتفوق على استخدام الفرش brushes، بعد غمس الأدوات فيها لمدة ١٥ ثانية.

ي) التشعيع Irradiation

تؤثر الطاقة الكهرومغناطيسية على مختلف أنواع الخلايا بطرق عديدة اعتماداً على الطول الموجي وشدته ومدة التعرض له. وقد ينتج عن الطاقة الممتصة توليد حرارة (مثل الأشعة تحت الحمراء infrared والأشعة فوق البنفسجية ultraviolet أو تغيرات كيميائية ضوئية photochemical حيث تحدث في الجزيئات الممتصة لها إعادة ترتيب داخلي ومن ثم تتحلل (الأشعة فوق البنفسجية والأشعة المتأينة ionizing).

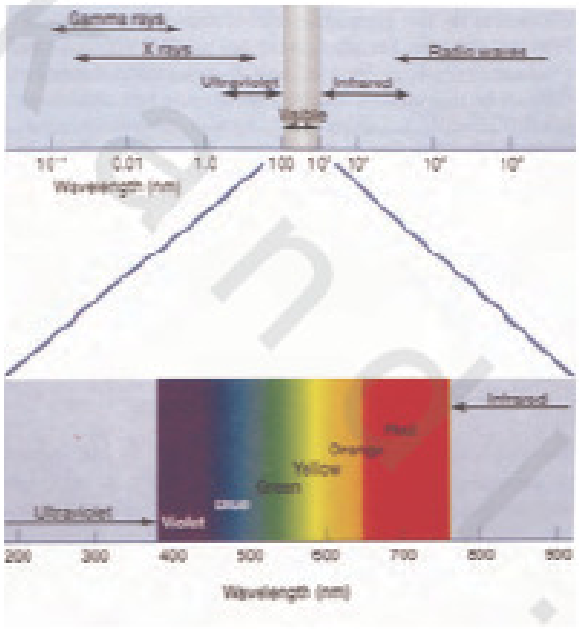
- **الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolelet (UV) radiation:** يؤدي امتصاص الأشعة فوق البنفسجية إلى تفاعلات كيميائية ضوئية، خاصة في الحامض النووي منزوع الأوكسيجين د.ن.أ (ح ن د: دي إن إيه DNA). ومن بين هذه التغيرات تكوين طفرات mutations أو القتل عن طريق التأثير المبيد للميكروبات microbicidal effect. وتسبب الأشعة فوق البنفسجية على المستوى الجزيئي تكوين ثنائيات البريميدين pyrimidine dimers مثل ثنائيات ثايميدين (T:T) مما يحدث لخبطة في تركيب د.ن.أ (دي إن إيه). ويتراوح الطول الموجي الذي يؤدي للتأثير المبيد للبكتيريا bactericidal بين ٢٦٠–٢٨٠ نانومتراً، ويكون الطول الموجي الأمثل للإبادة هو ٢٦٠ نانومتراً لأنه يمثل قمة امتصاص د.ن.أ (DNA).

ومن تطبيقات التشعيع بالأشعة فوق البنفسجية مكافحة الأحياء الدقيقة الموجودة بالهواء. ويستخدم لذلك مصابيح مبيدة للجراثيم germicidal lamps التي تولد أشعة فوق بنفسجية قصيرة الأمواج (٢٥٣,٧ نانومتراً). ويتم تعقيم الهواء في المستشفيات في حجرات العمليات الجراحية وغرف زراعة الميكروبات والحضّانات والكافيتيريات بواسطة مصابيح أشعة فوق بنفسجية معلقة في الأسقف. كذلك تستخدم في تعقيم المواد الحيوية مثل اللقاحات والسموم وغيرها. ولكن من قصور الأشعة البنفسجية أنها منخفضة الاختراق low penetrability إذ يجب أن تعرُّض الأحياء الدقيقة مباشرة لهذه الأشعة حيث إن الأحياء الدقيقة الموجودة في أواني صلبة أو المغطاة بأية طبقة واقية مثل الزجاج أو الورق أو الأنسجة لا تتأثر أيضاً. علاوة على ذلك، فإن تعرض البشر لفترات طويلة للأشعة فوق البنفسجية قد يؤدي إلى حروق في الجلد أو لالتهاب العينين ومشاكل صحية أخرى.

- **الأشعة المتأينة Ionizing radiation:** يمكن للأشعة الكهرومغناطيسية قصيرة الموجة أن تحرر الإلكترونات من مداراتها على الذرات وعندما توجه هذه الأشعة على الأحياء الدقيقة يكون لها تأثيرات قوية. وتشمل الأشعة الكهرومغناطيسية قصيرة الموجه أشعة جاما gamma rays والأشعة السينية X-rays الناتجة عن مُسرِّعات إلكترونية electrons accelerators، وكذلك من الأشعة الناتجة عن تحلل المواد النشطة إشعاعياً radioactive substances. وعندما تمر هذه الأشعة خلال المادة فإن طاقة الأشعة تحدث قذفاً للإلكترونات تاركة الذرات بشحنة موجبة وتتصل الإلكترونات بذرات أخرى لتجعلها سالبة الشحنة.

ويعتقد أن الأشعة المتأينة تؤثر في المواد بإحدى طريقتين: الأولى حيث تتأثر مباشرة أيونات جزيئات مثل د.ن.أ (DNA) مما يؤدي إلى تدميرها بطريقة غير عكسية. أما التأثير الثاني فيكون غير مباشر حيث تؤدي الإشعاعات إلى تأين ماء الخلايا أو الجزيئات الحيوية فينتج عنها جزيئات هيدروكسيل OH التي تعمل كعوامل أكسدة، كما ينتج عنها أيضاً شقوق الهيدروجين H radicals التي تعمل كعامل اختزال. ومن ثم فإن هذه الشقوق تعمل ثانوياً على الجزيئات الحيوية خصوصاً د.ن.أ (DNA).

وتتميز الأشعة المتأينة بمقدرتها على تجنب كلّ من الحرارة والرطوبة، وكذلك قدرتها الكبيرة على الاختراق، حيث إن أشعة جاما يمكنها أن تخترق حتى ٢ قدم في الوسط المائي. والأهم من ذلك أنها تستطيع أن تخترق المواد المعلبة أو المغلقة وتعقمها تماماً (انظر الشكل رقم ٨١).



الشكل رقم (٨١). يوضح أنواع الأشعة والأطوال الموجية المختلفة التي يمكن استخدامها في عملية التعقيم.

ويستفاد من هذه الأشعة في تعقيم الأدوية pharmaceuticals والمواد والأدوات الطبية والمستخدمة في طب الأسنان والخيوط الجراحية وأدوات المعامل وحفظ الأغذية وغيرها.

٢- المطهرات الكيميائية Chemical Disinfectants

تستخدم المواد الكيميائية لتعقيم sterilization وتطهير disinfection سطوح جسم الإنسان والأشياء غير الحية وتسمى هذه المواد مطهرات disinfectants أو مبيدات الجراثيم germicides. وتوجد بعض الأحوال التي لا يمكن فيها تحقيق تعقيم تام أو أن التعقيم الكامل لها ليس مطلوباً، حيث يكون المطلوب هو اختزال أعداد الأحياء الدقيقة إلى

مستوى مأمون أو التخلص من كائنات تكون عادة مُمْرضة وتوجد في أشكال خضرية. ومن الجدير بالذكر أنه يمكن التوصل إلى تعقيم كامل بمواد كيميائية تحت الظروف المقننة ويطلق على مثل هذه المواد المعقمات الكيميائية chemosterilizers. وتشمل المعقمات الكيميائية أكسيد الإيثيلين ethylene oxide وبيتابروبيولاكتون betapropiolactone وبعض المركبات الفينولية والهالوجينات والأحماض والقواعد القوية وفورمالدهيد formaldehyde وجلوتارالدهيد glutaraldehyde. ومثلما لا توجد طريقة فيزيائية واحدة لكل مشاكل التعقيم والتطهير كذلك الحال مع المطهرات الكيميائية. ولابد من الاختيار المناسب للمادة المطهرة والتي يجب أن ينطبق عليها المواصفات المثالية التالية:

١- أن تدمر كل أشكال الأحياء الدقيقة المستهدفة خلال فترة زمنية محددة وتطبيقية.
٢- ألاّ تتداخل في عملها مع المواد العضوية أو التربة.
٣- ألاّ تكون مولدة للحساسية أو سامة وأن تكون غير مهيجة للأنسجة.
٤- ألاّ تحدث تآكلاً (non corrosive) وألاّ تترك مواد حريفة أو سامة.
٥- أن تكون سهلة الذوبان في المذيبات خاصة الماء.
٦- أن تكون ثابتة كيميائياً حيث لا تتبخر هي أو مذيبها وألاّ يحدث فيها تغيراً من شأنه أن تصبح أكثر تركيزاً أو سامة.
٧- ألا تترك خَبَثاً أو رائحة غير مرغوب فيهما.
٨- ألا تكون باهظة الثمن.

وتعمل هذه المعقّمات/المطهرات الكيميائية على الأحياء الدقيقة إما على تركيب وإما على عدة تراكيب فيها فتصيبها بالعطب، قد يكون ذلك على الدهون أو أحد الإنزيمات أو البروتينات أو الأحماض النووية. ويحدث ذلك إما بزيادة النفاذية وإما بالتفاعل مع مجموعات وظيفية في البروتين (SH, OH, NH_2, COOH) مثال ذلك أكسيد الإيثيلين والفورمالدهيد. كما قد تحدث أكسدة في البروتينات التي تحتوي على مجموعة سلفهيدريل SH- ومثال ذلك الكلور وفوق أكسيد الهيدروجين اللذان يحولان SH إلى الشكل المؤكسد S-S. ومن أمثلة المطهرات:

١- الفينول phenol والفينولات phenolics: مثل هكساكلوروفين hexachlorophene وكلوروفين ومن منتجاتها التجارية ديتول Dettol.

٢- الكحولات alcohols: وهي تُخرج البروتين عن طبيعته denature proteins وهي مبيدة للبكتيريا والفطريات ومن أمثلتها الكحول الإيثيلي وأيزوبروبيل isopropyl في تركيز ٧٠٪.

٣- الهالوجينات halogens: حيث تسبب أكسدة للبروتينات وإضافة للهالوجين، ويستخدم الكلور الصفري (غاز) أو مركباته غير العضوية في تطهير المخالب والمسابح وبرك السباحة وفي التطهير المنزلي. أما مركبات اليود (صبغة اليود) فتستخدم في تطهير الجروح والجلد والترمومترات.

٤- عوامل الألكيل alkylating agents : وهي عوامل تسبب التطهير عن طريق إحلال مجموعة ألكيل alkyl group محل هيدروجين المجموعات الفعالة الموجودة بالإنزيمات أو الأحماض النووية أو البروتينات. وبعضها يستخدم كمحاليل أو في صورة غازية أو بخار ومن أمثلتها فورمالدهيد (سائل وبخار) وأكسيد الإيثيلين (غاز) وجلوتارالدهيد (سائل).

٥- المعادن الثقيلة، ومعظم هذه المطهرات من مركبات الزئبق والفضة، لكن للأضرار الناتجة عنها تستبدل بدلاً عنها المطهرات الأخرى.

obeikandl.com