الجمهورية العربية السورية
وزارة التعليم العالي
جامعة حماة
كلية الزراعة

علم الأحياء الدقيقة

(الجزء العملي)

الجلسة العملية الثانية

إعداد

الدكتور عبد الواحد الطحلي

دكتوراه باختصاص الأحياء الدقيقة

جامعة حماة 2020 - 2021

طرائق التعقيم
Sterilization Methods

- **مقدمة Introduction:**

التعقيم Sterilization هو التخلص من جميع أشكال الحياة وإتلاف جميع الأحياء الدقيقة من جراثيم وأبواغ وفطريات وطفيليات وفيروسات التي يمكن أن تكون في الأواني والأجهزة والأوساط الغذائية المستعملة. يجب التفريق بين التعقيم والتطهير Disinfection الذي يعني تقليل العدد الكلي للجراثيم الملوثة بقتل الخلايا الإعاشية دون قتل أبواغها علماً بأننا غالباً ما نستعمل التعبيرين للغرض نفسه وخاصة عند وجود جراثيم غير متبوغة حيث يتساوى المعنيان، وقد عرّف بعضهم عملية التطهير بأنها قتل الجراثيم الممرضة.

❖ **آلية التعقيم:**

تختلف آلية التعقيم باختلاف الطريقة المستعملة لكنها تؤدي إلى تثبيط الإنزيمات الموجودة في الخلية مما يؤدي إلى وقف عمليات الاستقلاب الخلوية، ومِنْ ثَمَّ وقف قدرتها على النمو والتكاثر.

❖ **طرائق التعقيم:**

تضم الطرائق الشائعة للتعقيم استخدام الحرارة الجافة أو الرطبة، والترشيح، والإشعاعات وأحياناً استخدام بعض المواد الكيميائية خاصةً الغازية للتعقيم على البارد، ولكل طريقة استخداماتها.

أولاً- التعقيم بالحرارة:

للحرارة المرتفعة تأثير قاتل على الأحياء الدقيقة لتأثر مكونات الخلية فيها كتخثر البروتينات وصهر الدهون مما يؤدي إلى تعطيل الوظيفة الحيوية التي تقوم بها وبالتالي الموت. أما الحرارة المنخفضة فهي تؤدي لحفظ حيوية الأحياء الدقيقة لفترة من الزمن.

1- التعقيم بالحرارة الجافة Dry heat:

تقوم الحرارة الجافة بأكسدة المركبات الكيميائية للخلية، وكثيراً ما تستعمل إحدى الطريقتين الآتيتين:

أ- التعقيم باللهب:

يمكن أن نستعمل اللهب للتعقيم بعمليتي الإحماء والتلهيب.

الإحماء: يستعمل لتعقيم الإبر وبعض الأدوات المعدنية التي لا تتغير إذا سخنت حتى الاحمرار، ولا تستعمل الأداة المعقمة إلا بعد أن تبرد لمرة واحدة فقط، ويجب إعادة تعقيمها قبل كل استعمال.

التلهيب: تعقيم الأشياء الملساء كأطراف الممص والقضبان الزجاجية وفوهات الأنابيب والقوارير بتعريضها للّهب بإمرارها (3–4) مرات بحركة ليست بالسريعة أو البطيئة مع تدويرها. تعقم المشارط المعدنية وإبر التلقيح بغمسها في الكحول أولاً ثم تعريضها إلى اللهب مما يقلل من تلوثها وترسب الكربون عليها.

ب– التعقيم بأفران الهواء الساخن:

يستند مبدأ هذه الطريقة إلى رفع درجة حرارة الهواء الموجود داخل الأفران وضبط هذه الدرجة بالمنظم الحراري (الترموستات) على أن تبقى ثابتة طيلة مدة التعقيم. تعقم بهذه الأفران جميع الأدوات المعدنية والزجاجية بعد لفها وتهيئتها لمنع تلوثها أو وضعها في علب معدنية، ودرجة الحرارة المستعملة في تعقيم هذه الأدوات هي 180°م لمدة نصف ساعة، أما الأدوات المغطاة بسدادات قطنية كالماصات والدوارق فتستخدم درجة الحرارة 160°م لمدة ساعة حتى لا يحترق القطن، والحرارة الأكثر استخداماً فهي من (160°م) حتى (190°م) حسب الجدول (1).

جدول رقم /1/ يبين الحد الأدنى للزمن المناسب

الموافق للحرارة الجافة المستخدمة للتعقيم

درجة الحرارة المئوية	الزمن بالدقيقة
°140	180
°150	150
°160	120
°170	60
°180	30

2- التعقيم بالحرارة الرطبة Water heat:

إنَّ الحرارة المصحوبة بالرطوبة أكثر كفاءة في التعقيم من الحرارة الجافة بسبب فرق الناقلية للحرارة بين الماء والهواء وطبيعة تخثر البروتين حيث تقوم الحرارة الرطبة بتخثر سريع لبروتينات الخلايا، ويمكن إجراء التعقيم بالحرارة الرطبة بعدة طرائق:

أ – التعقيم بالبخار تحت الضغط:

يعتمد مبدأ هذه الطريقة على التسخين في جو مشبع ببخار الماء تحت ضغط مناسب، وكما هو معروف فإن درجة غليان الماء ترتفع كلما ارتفع الضغط فوق سطحه فالماء يغلي عند درجة حرارة (100°م) تحت الضغط الجوي العادي (1جو) أو صفر ليبرة/إنش² لأن ضغط بخار الماء عند هذه الدرجة يساوي 1 ضغط جوي، ولا ترتفع درجة حرارة غليان الماء مع زيادة كمية الحرارة بل تزداد كمية البخار المنطلق، وهناك تناسب طردي بين زيادة الضغط وارتفاع درجة حرارة غليان الماء كما هو مبين بالجدول (2) الآتي:

جدول رقم /2/ يبين درجة حرارة غليان الماء المقابلة للضغط المطبق على سطحه في جهاز التعقيم Autoclave

ضغط بخار الماء ليبرة/ انش²	درجة الحرارة	ضغط بخار الماء ليبرة/ انش²	درجة الحرارة
صفر	°100	12	°118
1	°102.3	13	°119.1
3	°105.7	14	°120.2
5	°108.8	15	°121.3
7	°111.7	16	°122.4
9	°114.3	17	°123.3
10	°115.6	18	°124.3
11	°116.8	20	°126.2

يبين الجدول (3) الآتي الزمن اللازم للتعقيم بالحرارة الرطبة بمختلف درجات الحرارة:

جدول رقم /3/ يبين الزمن المناسب الموافق لدرجة الحرارة المستخدمة للتعقيم بالحرارة الرطبة مع الضغط المطبق في جهاز Autoclave.

درجة الحرارة المئوية	الزمن بالدقيقة	الضغط (ليبرة/ انش²)
°121	15	15
°126	10	20
°134	5	30

هذه الطريقة من أفضل طرائق التعقيم وأكثرها استخداماً، كما تمتاز بميزيَّتين الأولى التسخين السريع، والثانية وفرة الرطوبة مِمَّا يسهل عملية تخثر البروتينات الخلوية بزمن قصير، وتستخدم هذه الطريقة لتعقيم الأوساط الغذائية التي لا تتخرب بدرجة الحرارة 121°م وإنما تتخرب بالدرجات الأعلى من الحرارة كذلك تعقم فيه جميع المواد الزجاجية والمعدنية والورقية والمواد الغذائية التي لا تخرب بتلك الدرجات من الحرارة، ويستعمل لهذا الغرض جهاز التعقيم Autoclave أو ما يسمى بالصاد الموصد أو الموصدة، أما طريقة استعمال الجهاز فهي كالآتي:

توضع المواد المراد تعقيمها بالسلة المعدنية المرفقة بالجهاز ويوضع كمية كافية من الماء في الجهاز حسب التعليمات الواردة في دليل تشغيل الجهاز، ثم نغلق الغطاء بإحكام ونفتح منفذ البخار، ونسخن الجهاز حتى غليان الماء بداخله فيخرج الهواء من منفذ البخار متقطعاً ثم ممزوجاً مع البخار بشكل صفارة متواصلة عندها نغلق منفذ البخار فتبدأ إبرة مقياس الضغط بالحركة أي يبدأ الضغط بالارتفاع وترتفع معه درجة الحرارة. ينظم الجهاز على تلك الدرجة من الحرارة لمدة كافية وعادة المدة الكافية للتعقيم هي 20 دقيقة بدرجة 121°م تحت الضغط 15 ليبره/إنش² أو ما يساوي 2 بار. بعدها نطفئ الجهاز وننتظر عودة إبرة مقياس الضغط إلى الصفر ثمّ نقوم بإخراج المواد.

ينبغي ملاحظة ما يلي عند التعقيم بجهاز الصاد الموصد:

1- يعتبر بدء التعقيم اعتباراً من الوصول للحرارة المطلوبة 121°م، ويجب أن تبقى هذه الحرارة ثابتة خلال مدة التعقيم.

2- لا يبدأ رفع الضغط في الصاد الموصد إلا بعد طرد الهواء كلياً ووجود الهواء داخل الجهاز يؤثر على عملية التعقيم لأن نفوذ الحرارة الرطبة في الجسم أشد من نفوذ الحرارة الجافة وهذا ما يعلل أنّ التعقيم في الصاد الموصد يجري بدرجة حرارة أقل وزمن أقصر مما يستعمل في طريقة التعقيم بالحرارة الجافة كما أن بقاء الهواء داخل الجهاز من شأنه أن يخفض درجة الحرارة المسجلة مقارنة بالضغط المشار إليه بالجهاز، فالضغط لا يقتل الأحياء إنما درجة الحرارة العالية للبخار المضغوط هي التي تقتل الخلايا.

3- بعد الانتهاء من التعقيم يجب أن ننتظر دوماً انخفاض حرارة الجهاز حتى تصبح مساوية لحرارة جو المخبر قبل إخراج الأدوات خشية تصدعها نتيجة فارق الحرارة أو فارق الضغط.

4- بعض الفطريات والجراثيم والأبواغ والبريونات تقاوم حتى درجة حرارة 130°م، ولا تتلف إلا بدرجة حرارة 140°م مدة 20 دقيقة لذا يجب الانتباه إلى ذلك عند التعقيم.

ب- التعقيم بالبخار المتقطع بدرجة حرارة 100°م أو التندلة Tantalization:

سميت هذه الطريقة بالتندلة نسبة إلى الباحث جون تيندال مكتشف هذه الطريقة في التعقيم، وتستخدم هذه الطريقة لتعقيم المواد التي تتغير خواصها الطبيعية أو الكيميائية وتخرب بدرجات الحرارة العالية مثل وسط الجيلاتين ووسط السكريات.

تتم هذه الطريقة بجهاز خاص يدعى آرنولد Arnold وهو نوع من الصاد الموصد يحتوي على منفذ للبخار يبقى مفتوحاً بشكل لا يسمح بتجاوز درجة الحرارة 100°م، أو يمكن أن نستخدم الصاد الموصد نفسه بعد فتح منفذ البخار، ويجري التعقيم فيه بتعريض الأوساط المراد تعقيمها للبخار ثلاث مرات لمدة نصف ساعة في ثلاثة أيام متتالية متناوبة مع أوقات من الحضن ممَّا يؤدي إلى انتاش الأبواغ الموجودة في هذه الأوساط والقضاء عليها أثناء تعريضها للبخار في اليوم التالي.

ملاحظة: إن غلي الأدوات بالماء بدرجة حرارة 100°م لا يعتبر تعقيماً خاصة لبضعة دقائق، وإنما هو تطهير، فالتعقيم بالغليان يحتاج إلى ساعتين على الأقل لاسيما أن بعض الفيروسات خاصة الفيروس الذي يسبب داء الإنتان الكبدي لا يتلف بحرارة الغليان وينتقل بالحُقَن غير المعقمة.

جـ- التعقيم بالتسخين المتقطع بدرجة أقل من 100°م أو البسترة Pasteurization:

تستعمل هذه الطريقة في تعقيم المواد التي تفسد بالحرارة المرتفعة كالمصل الدموي الذي يتخثر بدرجة حرارة أعلى من 56°م، ويتم التعقيم بغمس السوائل المراد تعقيمها والموضوعة في زجاجات مغلقة بحمام مائي بشكل يعلو فيه مستوى الماء الساخن مستوى السائل الموجود في الزجاجة. يمكن أن تُجرى عملية البسترة لمرة واحدة أو لعدة مرات 3 – 8 يفصل بين كل مرة مدة 24 ساعة من الحضن، وذلك حسب المادة المراد تعقيمها. على سبيل المثال يسخن المصل الدموي بدرجة حرارة 56° م ويعاد تسخينه سبع مرات بفاصل يوم واحد من الحضن بين المرة والأخرى، أما المواد الغذائية (لبن- حليب) والمراد حفظها لمدة مؤقتة فتعقم بدرجة حرارة 75°م أو 85°م لمرة واحدة، وذلك بإمرارها نصف دقيقة بالحرارة المطلوبة ضمن أجهزة خاصة، وعند بسترة الحليب تقتل الخلايا الإعاشية وتبقى الأبواغ حية لذلك يتلف الحليب بعد مدة من الزمن. يفضل إجراء عملية تبريد مفاجئ للمواد الغذائية المعقمة بالبسترة لمرة واحدة بعد التسخين مباشرة فهذا من شأنه إحداث صدمة للأبواغ ومن ثم يقتل منها قسماً لا بأس به.

❖ **الترميد:**

عملية الترميد هي عملية معالجة المخلفات وتتضمن احتراق المواد العضوية الموجودة في النفايات. تحول هذه العملية أي كائن حي إلى رماد وتستخدم لتعقيم النفايات الطبية والمخاطر الجرثومية الأخرى قبل التخلص منها مع النفايات الأخرى غير الخطرة. ترميد البكتيريا يتم داخل أفران تقتل جميع انواع الميكروبات الدقيقة التي قد تكون موجودة على العروات السلكية الملقحة أو الأسلاك.

ثانياً- التعقيم بالأشعة:

1- الأشعة ذات الأمواج القصيرة (غاما δ-X):

هي أشعة مؤينة أو مشردة Ionization لبعض المكونات الخلوية بسبب قصر موجتها (أشعة X من1- 100 A°، وأشعة غاما δ من 0.01 -1A°)، واحتوائها على طاقة عالية تؤدي إلى نفوذها الشديد داخل الخلية الجرثومية فتمنع تركيب DNA وتسبب تراكم RNA في السيتوبلاسما وتوقف الانقسام الخلوي فهي أكثر أنواع الأشعة فتكاً بالأحياء. تعد جراثيم *Pseudomonas* أكثر الأنواع الجرثومية تأثراً بهذه الأشعة، بينما تعد جراثيم *Clostridium* أقلها تأثراً، أما بالنسبة للأبواغ Spores والفيروسات فإنها تتأثر أيضاً على أن تكون كمية الأشعة التي تتعرض لها كبيرة.

2- الأشعة فوق البنفسجية Ultra Violet:

تستعمل الأشعة فوق البنفسجية بشكل خاص لتعقيم المياه والهواء بسبب عدم قدرتها على النفوذ داخل الأجسام الصلبة. إنَّ طول الموجة الضوئية لهذه الأشعة يتراوح بين 2500 – 2800°A، ويُعدّ كافياً لقتل الجراثيم لأنه يؤثر في الأحماض النووية محدثاً الجذور الحرة، وإن أفضل طول موجة لقتل الجراثيم هو (253.7 نانومتر)، ويقتصر استخدام هذه الأشعة على تعقيم السطوح فقط. تجدر الإشارة أنَّ للأشعة فوق البنفسجية تأثيراً ضاراً بالعيون لذلك يجب إطفاء هذه الأشعة أثناء وجودنا في المختبر.

3- الضوء:

إن الظلام ضروري لنمو بعض الجراثيم ويمكن استخدام هذه الخاصة لقتل بعض الجراثيم فعلى سبيل المثال العصيات التيفية تتلف بتعرضها للضوء مدة 4 ساعات.

4- التعقيم بالأشعة تحت الحمراء Infra Red:

تستعمل الحرارة الصادرة عن الأشعة تحت الحمراء في تعقيم الأدوات الصغيرة مثل إبر التلقيح والماصات ويضبط الجهاز بحيث يتم التعقيم خلال 15 دقيقة على درجة حرارة 180°م أما الزمن الكلي للتعقيم فهو 22 دقيقة.

5- التعقيم بالأمواج الدقيقة Micro Waves:

تستعمل الأمواج التي تقع بين 1000- 2500 ميغاهرتز للتعقيم والبسترة والتجفيف. تكمن أهمية هذه الأمواج بسرعة تسخينها للوسط فهي تحمل الحرارة بسرعة إلى جميع أجزاء المادة المراد تعقيمها خلال زمن قصير بحيث يقصر زمن التعقيم بالمقارنة مع الزمن اللازم لوسائل التعقيم الأخرى.

ثالثاً- التعقيم بالترشيح:

يستعمل الترشيح لتعقيم السوائل التي قد تتغير صفاتها عند تعقيمها بالحرارة أي يستخدم لتعقيم المواد السائلة الحساسة لدرجات الحرارة العالية كالدم وبعض السكاكر والفيتامينات والمضادات الحيوية وبعض المنتجات الدوائية إذْ تقوم المرشحات بإيقاف الجراثيم والتخلص منها بطريقتين:

- الطريقة الأولى ميكانيكية: تعتمد مبدأ الغربلة وتتوقف على قطر الثقوب الدقيقة لهذه المرشحات، ويسحب السائل بمساعدة مضخة تفريغ مثل مرشح سايتس Seitz (أقراص أسبستوس مضغوط)،

ومرشح شمبرلند Chamberland وهو مصنوع من الخزف، والمرشحات الغشائية.

- الطريقة الثانية كهربائية: تتضمن امتزاز الجراثيم نتيجة الاختلاف في الشحنات الكهربائية لكل من الفلتر والخلايا الجرثومية.

رابعاً: التعقيم بالغازات وأبخرتها:

يطلق على التعقيم بالغازات اسم التعقيم بالبرودة وكثيراً ما يستعمل لتعقيم المواد التي لا تتحمل درجات الحرارة العالية ولا تقبل الترشيح ومن أهم الغازات السائدة أوكسيد الإيتلين $C_2 H_4 O$، أوكسيد البروبلين، الفورم ألدهيد، الأوزون O_3، بيتا بروبيولاكتون β-Propiolactone.

خامساً- التعقيم الكيميائي (المطهرات):

تستخدم المطهرات Disinfectants كالكلوروفورم والكحول في تطهير الأيدي والمناضد وغرف العمليات الجراحية وحظائر الدواجن وخلايا النحل وغيرها، ويستعمل بعضها مثل الفينول والكريزول بتركيز 5 % لتعقيم الأدوات الجراحية فهي مواد تحلّ الدهون ونظراً لطبيعة الغشاء السيتوبلاسمي الدهنية فإنه يتحلل بتأثير هذه المواد مما يؤدي إلى دخول وخروج المواد من الخلية عشوائياً وانسياب السيتوبلاسما خارج الخلية وبالتالي موتها، وعموماً فإن هذه المواد تقتل الجراثيم لكنها لا تؤثر في الأبواغ الجرثومية. من أهم المطهرات المستخدمة إضافة للمواد السابقة الماء الأوكسجيني- اليود Iode- برمنغنات البوتاسيوم- الكلور- الفورمول- الإيزوبروبانول- بعض الملونات كالبلورات البنفسجية وأخضر الميتيل- الأسيتون- الألدهيدات- مركبات الأمونيوم الرباعية، ومن الجدير بالذكر أنه ثَمَّةَ مواد تمنع نمو الجراثيم دون أن تقتلها كما هو الحال في بعض المنظفات المنزلية حيث تخفض المنظفات التوتر السطحي بين الأحياء الدقيقة والسطوح الأخرى.

أ- الكحولات Alcohols:

هي مواد كيميائية مفيدة عندما تُستخدم ضد الجراثيم والفطريات لكنها لا تؤثر على الأبواغ الجرثومية تعتمد آلية عملها على تمسخ البروتينات، والنوع الأكثر استخداماً هو الكحول الإيتيلي Ethyl alcohol (الإيتانول) بتركيز مثالي يتراوح مابين 60-90 %.

ب- الفينول Phenol:

الفينول من أوائل المواد الكيميائية التي استخدمت للتطهير وهو المعيار القياسي لمعظم المطهرات الأخرى فهو يخرب أغشية الخلية ويبدل طبيعة البروتينات ويعطل إنزيمات الأحياء الدقيقة. من العوامل الكيميائية التي تشبه الفينول هي الكلورهيكسيدين Chlorhexidine التي تُستخدم لتطهير الجلد ضد الجراثيم.

ج- الهالوجينات Halogens:

تشمل اليود والكلور بشكل رئيسي، وتكون آلية عملها بتعطيل الزمر السلفهيدريلية للإنزيمات، وتتحد مع بروتينات الجراثيم. يُستخدم الكلور بشكل مركبات تطلق الكلور مثل هيبوكلوريت الصوديوم، وهيبوكلوريت الكالسيوم كمطهر للحفاظ على عدد جرثومي منخفض في مياه الشرب، ولتطهير المعدات في مصانع الألبان والمطاعم والمسالخ وغيرها. يُستخدم اليود مع جزيئات عضوية تطلق اليود الفعال مثل البوفيدون Povidone (بولي فينيل أيودين PVP).

استعملت قديماً الأحماض كمادةً حافظة للأغذية ويستخدم بعضها الآن كمادةً مطهرة ضعيفة وأدوية مثل حمض الخل، حمض البنزويك، وحمض اللاكتيك.

سادساً- المضادات الحيوية:

هي مواد كيميائية متباينة في تأثيرها على الأحياء فتتحسس بعض الأنواع بشدة من مركب ما، بينما لا تتأثر به أنواع أخرى. تنتج المضادات في الطبيعة من أحياء دقيقة لتؤثر على أحياء أخرى في الصراع الطبيعي من أجل البقاء منها على سبيل المثال: البنسيلين، ستربتومايسين، تتراسيكلين، تيرامايسين، كلورامفينيكول، سيفاليكس وغيرها. تستخدم المضادات الحيوية في البيئات المغذية (نوعين على الأقل) لاستبعاد نمو أنواع من الأحياء الدقيقة سلبية وإيجابية غرام، وفي معالجة أمراض الإنسان والحيوان.

شاع استخدام الأدوات البلاستيكية في المختبرات بشكل ملحوظ، وبسبب الاختلاف الجوهري بينها وبين الأدوات الزجاجية فإنها تتطلب مجموعة مختلفة من أساليب التنظيف، ويجب ألا تتعرض الأدوات والأواني البلاستيكية للأحماض القوية ولا يتم تسخينها على لهب مكشوف أو السخان الكهربائي المسطح بغرض التنظيف، ويمكن استخدام فرن الميكروويف لتسخين الإناء ولكن ينبغي أن يملأ بمادة تمتص الموجات مثل الماء قبل وضعه داخل فرن الميكروويف. لإزالة المواد العضوية من الأدوات البلاستيكية وتنظيف الزجاجيات والماصات تُغمر في محلول حمض الكروم الذي يتم تحضيره بإذابة 20 غ ثنائي كرومات الصوديوم في 200 مل ماء مقطر وبعد أن يبرد المحلول يضاف له 20 مل حمض الكبريت المركز، ويجب ألا تتجاوز مدة الغمر 4 ساعات على الأكثر حتى لا تتأثر مادة البلاستيك وتصير هشة، ويمكن إعادة استخدام المحلول عدة مرات إلى أن يفقد قدرته على التنظيف ويصبح لونه مائلا للأخضر، ولإزالة بقايا المواد العضوية قبل إعادة استخدام إحدى الأدوات يمكن شطفها بمذيب عضوي مثل الكحول أو الكلوروفورم ثم ماء مقطر. تُصنع بعض المواد البلاستيكية لتستخدم مرة واحدة، ولكن يجب تعقيم هذه الأدوات بالبخار المضغوط (الأوتوغلاف) قبل التخلص منها خصوصاً إذا تم استخدامها في تداول مواد خطرة.

انتهت المحاضرة