طرائق التعقيم

Methods of sterilization

Hiba Fouad Abdulfatah

التعقيم هي عملية تجريد الأجسام أو المواد من الأحياء الدقيقة ومن كافة أنواع الحياة عن طريق تعريضها إلى عوامل فيزيائية أو كيميائية، وهي عملية مطلقة وليست نسبية فأما أن تكون معقمة أو لا تكون.

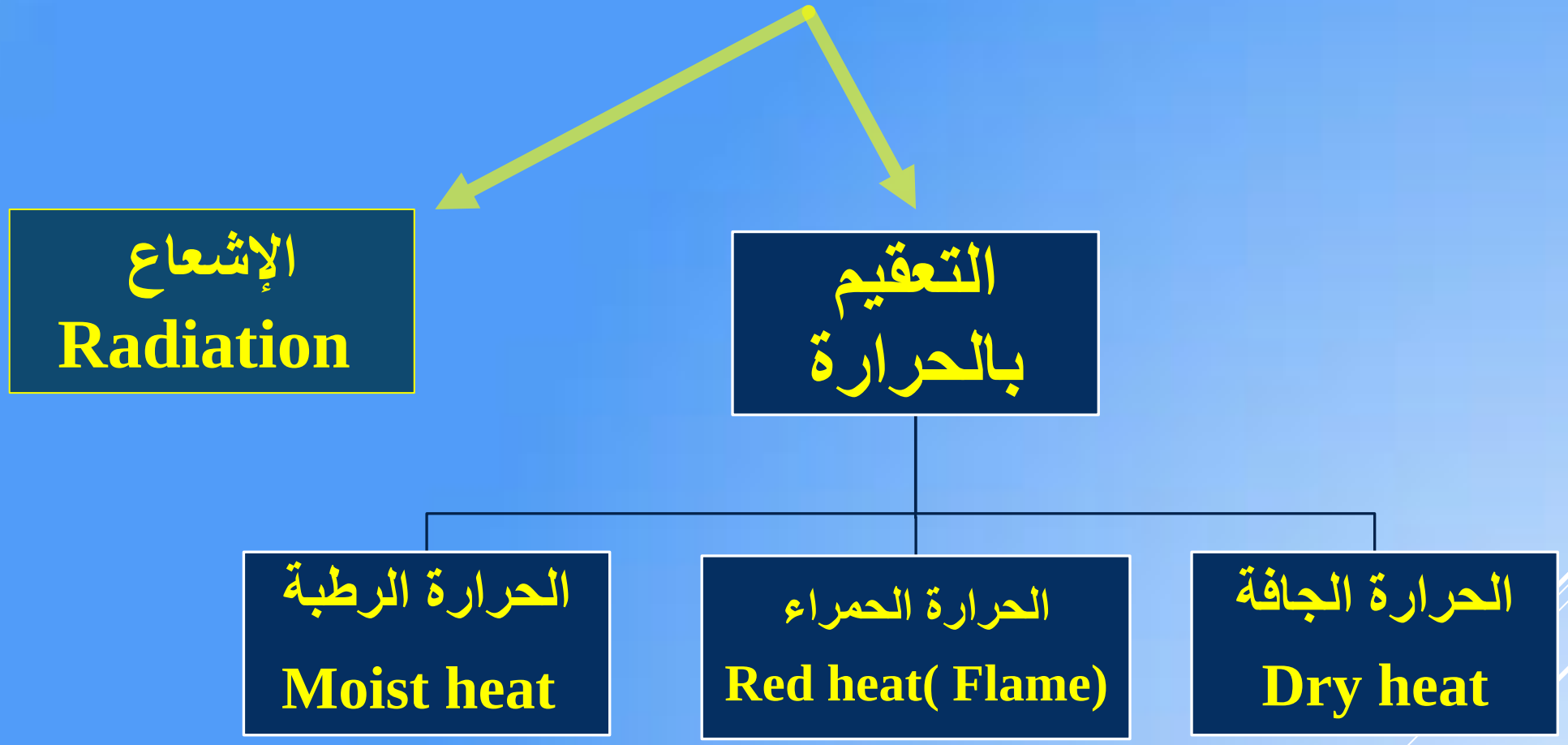
ومن طرق التعقيم المتبعة في مختبرات الفطريات :

1 - التعقيم بالطرق الفيزيائية : physical sterilization

التعقيم بالحرارة Heat sterilization

تعتمد هذه الطريقة على قدرتها السريعة لقتل وإتلاف الكائنات الدقيقة باستخدام درجات الحرارة العالية لفترة زمنية معينة حسب نوع وطبيعة المادة المطلوبة تعقيمها اي هناك علاقة بين الوقت ودرجة الحرارة تختلف من كائن حي لآخر، وعند اختيار وسيلة تعقيم عامة يجب أن تستعمل الوقت ودرجة الحرارة التي تقتل كل الكائنات بما فيها المقاومة أو المتحملة للحرارة وتشتمل هذه الطريقة على عدة أنواع هي:

- التعقيم بالطرق الفيزيائية : physical sterilization



ثانيا : التعقيم بالطرائق الكيميائية Chemical sterilization

التعقيم المواد السائلة (التعقيم السطحي)
Surface sterilization

(أ)
الهالوجينات
ومركباتها

(ب)
مركبات
المعادن الثقيلة

(ج)
الكحول

(د)
الفينول

(هـ)
الألدهايد

(و)
أوكسيد
البروبلين

(ح)
التعقيم بالغازات او الأبخرة
اوالدخان (التبخير)
Fumigation

ثالثا : التعقيم بالترشيح sterilization by filtration

مرشح الثقوب الدقيقة
Millipore filter

مرشح زايتس
Sitez Filter

ملاحظات:

أ- تعقيم المواد التي تحتاجها هذه الطريقة مثل الدوارق والأقماع في جهاز الموصدة تحت ضغط 15 باوند/ انج^2 لمدة 20 دقيقة.

ب- هناك مرشحات معقمة وجاهزة للاستخدام لمرة واحدة disposable مصنوعة من البلاستك.

التعقيم بالحرارة

تعتمد هذه الطريقة على قدرتها السريعة لقتل وإتلاف الكائنات الدقيقة باستخدام درجات الحرارة العالية لفترة زمنية معينة حسب نوع وطبيعة المادة المطلوبة تعقيمها اي هناك علاقة بين الوقت ودرجة الحرارة تختلف من كائن حي لآخر، وعند اختيار وسيلة تعقيم عامة يجب أن تستعمل الوقت ودرجة الحرارة التي تقتل كل الكائنات بما فيها المقاومة أو المتحملة للحرارة وتشتمل هذه الطريقة على عدة أنواع هي:

1 - التعقيم بالحرارة الجافة Dry heat

ويتم ذلك باستخدام الفرن الكهربائي Oven، حيث يتم فيه تعقيم الأطباق والزجاجيات الأخرى بالهواء الحار Hot air ويجب الا تكون المواد مرزومة بشكل مرصوص للسماح بدوران الهواء داخل الفرن وان يصل إلى جميع الأجزاء الملوثة. يفضل وضع الزجاجيات في حاويات معدنية مخصصة

يتطلب الانتباه والحذر عند إخراج الزجاجيات من الفرن عندما يكون ساخناً وان لا توضع على سطح بارد لأنها قد تتعرض للكسر بسبب الفرق في درجة الحرارة، وأدناه درجات الحرارة والأوقات المطلوبة **هي كما في الجدول الأتي**

درجة الحرارة (مْ)	الوقت (ساعة)
120	8
140	3
160	2
180	1

2- الحرارة الحمراء Red heat(Flame)

تعتمد هذه الطريقة على استخدام المصابيح ذات اللهب burners والتي تعمل أما بالكحول أو البنزين أو الغاز، وفيها يتم تعقيم أبر التلقيح Needles ، الناقل Loop والملاقط Forceps والادوات المعدنية الأخرى بالتسخين فوق اللهب حتى الإحمرار، ثم تبرد قبل استخدامها، ويمكن تغطيس الأدوات المعدنية المراد تعقيمها بالكحول ثم إلهابها.

الحرارة الرطبة Moist heat

ويتم ذلك باستخدام جهاز الموصدة (الاوتوكلاف) autoclave الذي يعمل بدرجة حرارة عالية تصل إلى 128 مْ وبخار الماء المضغوط الذي يصل إلى 20 باوند/انج^2 ففي هذا الجهاز يتم تعقيم الأوساط والبيئات الغذائية والمحاليل ذات العلاقة بها، ويمكن أيضاً تعقيم الأدوات الزجاجية اختصاراً للوقت لكن يجب أن تغلف بورق اسمر أو ورق صحف لكي لا تبتل أثناء التعقيم، غالباً ما يتم التعقيم تحت ضغط 15 باوند/انج^2 ودرجة حرارة 121 مْ لمدة تتراوح من 15- 20 دقيقة،وفيما يلي أدناه درجات الضغط ودرجات الحرارة المقابلة لها في جهاز الاوتوكلاف:

الضغط (باوند/انج^2)	درجة الحرارة (مْ)
5	107
7	110
10	115
15	121
20	128

ملاحظات هامة :

1 – ان التعقيم بالموصدة قد يقلل من درجة الرقم الهيدروجيني pH بحدود 0.2 – 0.4

2 – قد تتحول المواد السكرية في الأوساط البيئية خاصة بوجود الأحماض الأمينية الى مواد مثبطة للفطريات لذا يجب ان تعقم مثل هذه المواد على حدة ثم تضاف الى الوسط الغذائي المعقم .

3 – استخدام طريقة التعقيم المتقطع التندلة (tyndallization) لتعقيم المواد على درجة حرارة 100 º م لثلاث مرات ولمدة 30 دقيقة وبفواصل زمنية يوم واحد وهذه الطريقة تسمح بإنبات السبورات بعد كل تعقيم وقتلها بالمرة التالية وهكذا يتم التخلص من كل السبورات الموجودة في الوسط .

4 – تعقم التربة بهذه الطريقة ولكن باستخدام الحرارة الرطبة أي تحت ضغط 15 باوند / انج ثلاث مرات لمدة 60 دقيقة والمدة بينهما يوم واحد وعلى مدى ثلاثة أيام .

التعقيم بالاشعاع

ان لبعض الإشعاعات تأثيراً قاتلاً للفطريات والأحياء المجهرية الأخرى مثل الأشعة فوق البنفسجية Ultra Violate (UV) التي يبلغ طولها الموجي 2500 انكستروم، علماً أنها تتواجد بشكل طبيعي في أشعة الشمس، وفي المختبرات توجد أجهزة ذات مصابيح خاصة ببعث هذا النوع من الأشعة. وتستعمل الأشعة فوق البنفسجية بكثرة في المختبرات والمستشفيات للقضاء على الفطريات والأحياء المجهرية المرضية والملوثة، فهي ذات قوة اختراق ضعيفة للأشياء وخاصة الصلبة منها لذلك فهي فعالة في تعقيم الهواء في الغرف وأماكن عزل الفطريات وأسطح المناضد والنماذج وفي تعقيم السوائل والمواد الغذائية والمصول واللقاحات. يتسبب الإشعاع في حالة من الاضطرابات الخلوية التي تؤثر على البروتوبلاست وبالنتيجة موت الخلايا. وبالرغم من ان هذه الطريقة تخفض حمولة الهواء من الأبواغ الفطرية والأحياء المجهرية ولكنها لا تقضي عليها كلياً بسبب عدم قدرة الأشعة في الوصول إلى المناطق والزوايا المظللة، تعرض كابينات العزل أو السطوح للأشعة لمدة ساعة على الأقل قبل استخدامها. ومن الإشعاعات الأخرى المستخدمة هي الأشعة السينية X-rays وتستعمل بشكل تجاري في تعقيم الأوراق والمعادن والمواد البلاستيكية والأدوات الطبية كالحقن والأطباق والمواد الأخرى المغلفة كما تستخدم في تعقيم الأغذية وخصوصاً اللحوم والخضروات.

التعقيم بالطرق الكيميائية

هناك العديد من المواد الكيمياوية القاتلة للأحياء المجهرية ومنها الفطريات ولكنها قد تحتاج إلى وقت طويل ولا يمكنها الوصول إلى التعقيم الكامل. يتم التعقيم الكيميائي في مختبر الفطريات باستخدام المواد الكيمياوية المعقمة أو المطهرة مثل: الكحول وكلوريد الزئبق والديتول والفورمالين والفينول والهيبوكلوراكس.

التعقيم بالمواد السائلة (التعقيم السطحي) **Surface sterilization**

تستخدم هذه الطريقة لتعقيم بعض الأدوات المختبرية وسطوح أماكن العمل والنماذج النباتية الحاملة للفطريات ويرعى فيها تركيز المادة الكيمياوية، ووقت تعريض النموذج للمادة الكيمياوية ودرجة تلوث النموذج. وهناك عدد من المواد الكيمياوية المستعملة لهذا الغرض منها:

أ- الهالوجينات ومركباتها

وتشمل كل من اليود والكلور وهما من المواد المؤكسدة، ويستعمل الكلور بشكل واسع في التعقيم السطحي للنماذج النباتية والبذور خاصة عند عزل الفطريات المتواجدة داخل الانسجة. يستخدم هايبوكلوريت الصوديوم NaOCl وبنسبة 4-6% كما في محلول القاصر التجاري اي ما يعادل 1% كلور حر.

طريقة العمل:

1- يحضر محلول هيبوكلوريت الصوديوم بتركيز 5% (محلول القاصر التجاري).

2- توضع كمية من محلول التعقيم في طبق بتري او بيكر صغير وحسب الحاجة وحجم النموذج المطلوب تعقيمه.

3- تغمر النماذج في محلول التعقيم لمدة 3- 5 دقائق.

4- تغسل النماذج عدة مرات بنقلها إلى أطباق بتري أو بيكرات تحتوي على ماء مقطر معقم لإزالة آثار الكلور حتى لا يؤثر على نمو الفطريات.

5- تنتقل النماذج إلى ورق ترشيح معقم وتجفف ثم تنقل إلى البيئة أو الوسط الزرعي المعد سلفاً في أطباق بتري لغرض عزل الفطريات منها.

ب- مركبات المعادن الثقيلة

من المعادن الثقيلة المستخدمة في مجالات التعقيم هو الزئبق ومن مركباته السامة للفطريات والأحياء المجهرية هو كلوريد الزئبق $HgCl_2$ ويستعمل بتركيز 1 : 1000، ويستخدم أيضاً في التعقيم السطحي للنماذج النباتية.

طريقة العمل:

تعتمد نفس الخطوات الواردة في طريقه هيبوكلوريت الصوديوم المذكورة في (أ)

جـ الكحول

الكحولات من المواد المعقمة التي تؤدي إلى قتل الفطريات والأحياء المجهرية الأخرى نتيجة لتخثر البروتين المكون الأساسي للبروتوبلاست. ويستخدم الكحول الأتيلي (الايثانول) بتركيز 50-70% لتعقيم الأدوات المعدنية كالأبر، المشارط الملاقط والمقصات ثم لتغطيس إلهابها.

د- الفينول

الفينول مادة سامة وقاتلة وفعالة جداً في قتل الخلايا الخضرية للفطريات نتيجة لتخثر البروتينات في البروتوبلاست وتمزيق جدار الخلايا أو الخيوط الفطرية.

هـ- الالديهايد

يعد الفورمالديهايد HCHO من المركبات الفعالة في عمليات التعقيم وفي قتل وإبادة الفطريات ولكنه نادراً ما يستعمل لتأثيره السام ورائحته النفاذة، ويستخدم بشكل محلول مائي يعرف بالفورمالين Formalin يحتوي على تركيز 37 – 40 % فورمالديهايد. ويعمل من خلال اتحاده بالمجموعات الأمينية الحرة لبروتينات بروتوبلازم الخلايا والخيوط الفطرية.

و- أوكسيد البروبلين

أوكسيد البروبلين C_3H_6O سائل سام شديد التطاير والتبخر ويذوب في الماء والكحول ويستخدم في تعقيم المرشحات والمصافي الورقية والمواد المشابهة لها بتعريضها له لمدة يوم واحد بوضعها في وعاء مغلق ويستخدم بمعدل 1 مل/ لتر ماء مقطر.

التعقييم بالغازات أو الأبخرة أو الدخان (التبخير) Fumigation

تستخدم هذه الطريقة لتعقيم الغرف والمختبرات والمخازن والمواد ذات السطوح غير المنتظمة، حيث تعرض المواد والأماكن المراد تعقيمها لغازات ثاني أوكسيد الاتيلين أو أوكسيد البروبلين، كما يمكن استخدام الغازات المنبعثة من الفورمالين لتعقيم المختبرات والغرف الصغيرة بعد أن تفتح قنينة الفورمالين في الحيز المطلوب تعقيمه لفترة 24 ساعة بشرط أن يكون محكم الإغلاق، او أن تغلق جميع نوافذ المختبر ثم توضع كمية من برمنغنات البوتاسيوم في أوعية حديدية في أرضية المختبر ثم تبلل بالفورمالين التجاري ويغلق المختبر بسرعة ويمنع الدخول إليه لمدة 24 ساعة، أما الكميات المطلوبة هي 250 مل فورمالين مع 250 غم برمنغنات لكل 10م^3 حيز فارغ.

ثالثاً: التعقيم بالترشيح Sterilization by filteration

التعقيم بالترشيح تستخدم هذه الطريقة في تعقيم المحاليل والسوائل التي لا يمكن تعقيمها بالحرارة لأنها تؤدي إلى تغيير صفاتها الطبيعية مثل المضادات الحيوية والانزيمات والسموم وغيرها من المواد التي تتأثر بالحرارة من خلال إزالة الفطريات والأحياء المجهرية باستخدام المرشحات، وهذا النوع من التعقيم يسمى أيضاً بالتعقيم الميكانيكي mechanical sterilization. حيث تمرر المحاليل المعدة للتعقيم خلال مرشحات ذو مساميه قليلة كافية لمنع أو حجز أي كائنات حية مجهرية أو دقيقة معلقة فيها من العبور مع المحلول، ومن بين المرشحات المستخدمة في هذه الطريقة هي:

مرشح الثقوب الدقيقية Millipore filter

وهو مرشح قرصي ورقي رقيق غشائي membrane filter ، مصنوع من نترات السليلوز أو خلات السليلوز مثقب بأقطار تتراوح بين 0.1 – 0.5 مايكرون ويعمل على منع مرور الفطريات والبكتريا من خلاله، و0.005 مايكرون لمنع الفايروسات.

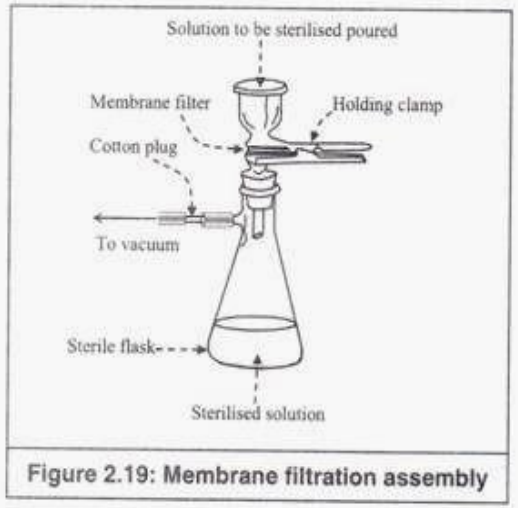


Figure 2.19: Membrane filtration assembly

مرشح زايتس Sitez filter

وهو مرشح قرصي مصنوع من الاسبستوس أو من الزجاج وهو لا يعمل على منع مرور البكتريا من خلاله وإنما يعتمد على امتزاز البكتريا.

المصادر: عبد الرضا طه سرحان ،الفطريات العملي