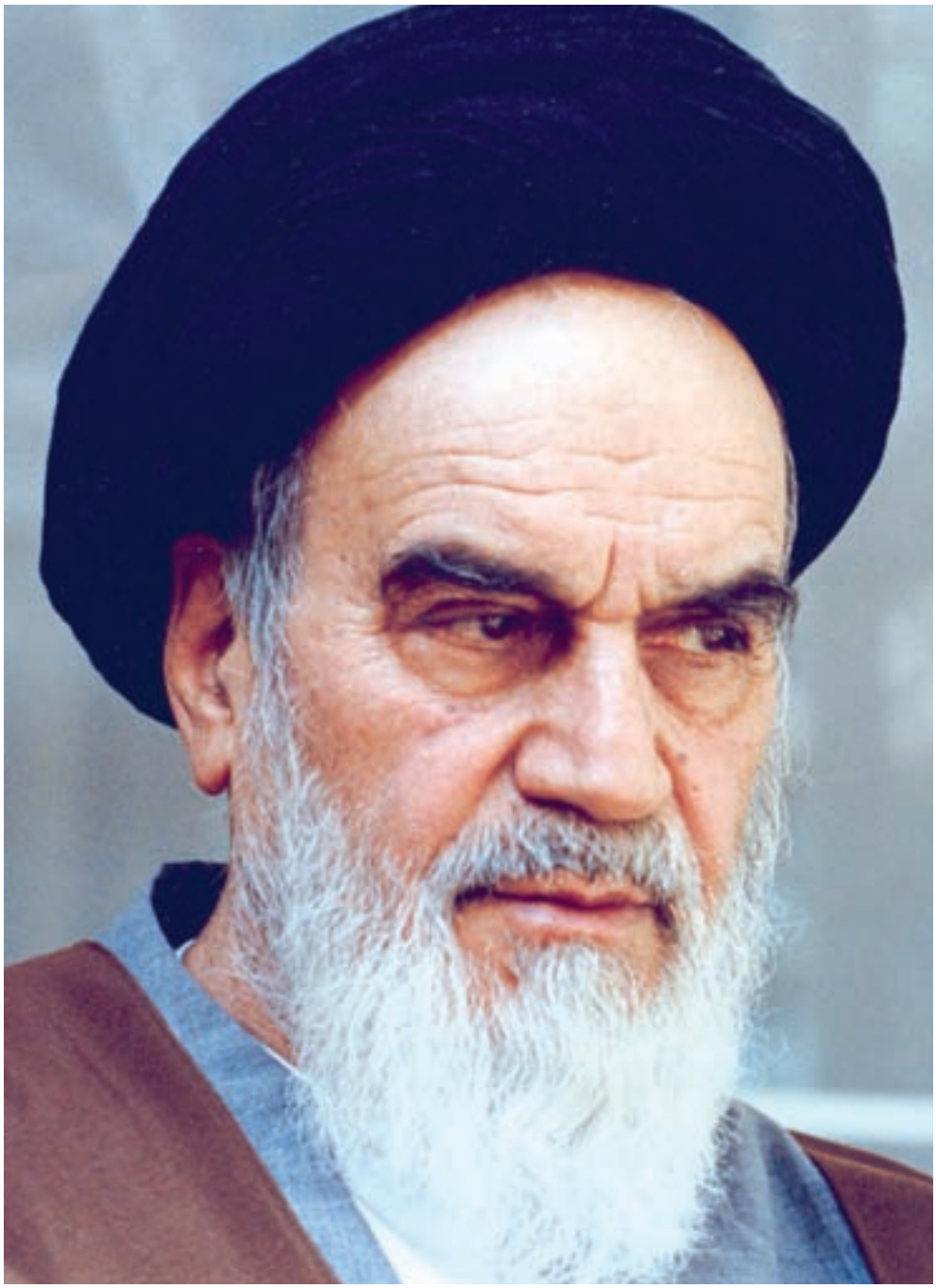


شما عزیزان کوشش کنید که از این وابستگی بیرون آیید و احتیاجات کشور خودتان را برآورده سازید، از نیروی انسانی ایمانی خودتان غافل نباشید و از اتکای به اجانب بپرهیزید.

امام خمینی(ره)

فصل اول

آزمایشگاه میکروبیولژی ۸
دستورالعملهای ایمنی،بهداشتی و زیست محیطی در آزمایشگاه، میکروبیولژی ۹
هشدارهای ایمنی ۹
هشدارهای بهداشتی ۱۲
هشدارهای زیست محیطی ۱۳
دستگاه‌ها، لوازم و تجهیزات میکروبیولوژی ۱۴
هودهای بیولوژیک ۱۴
لامپ‌های ماوراء بنفش ۱۴
اتو کلاو ۱۵
شرایط سترون کردن با اتو کلاو ۱۵
گرمخانه (اینکوباتور) ۱۹
حمام آب‌گرم ۲۱
یخچال ۲۲
ترازو ۲۳
تکان‌دهنده مکانیکی ۲۵
میکروسکوپ ۲۵
آون ۳۰
دستگاه پرگنه شمار ۳۱
معرفی برخی از ظروف آزمایشگاه میکروبیولوژی ۳۲
پیپت ۳۲
سرنگ فلزی ۳۵
ارکن تحت خلا، ارلن مایر، بالن ژوژه، استوانه مدرج، میله شیشه ای، سوزن کشت، لام ولامل ۳۵
واژه‌های فصل اول ۳۶

۱

فصل اول

آزمایشگاه میکروبیولژی

دستورالعمل‌های ایمنی ، بهداشتی و زیست محیطی در آزمایشگاه میکروبیولوژی

دنیای میکروب‌ها جهانی زنده ولی غیر قابل رویت است. به همین دلیل علم میکروب‌شناسی از سایر علوم متمایز می‌باشد. کارکردن با میکروب‌ها مستلزم رعایت نکات خاصی است تا در ضمن اینکه میکروارگانیسم‌های مورد نظر رشد و تکثیر می‌یابند از آلودگی‌های ثانویه و رشد سایر میکروب‌ها جلوگیری به‌عمل آید . همیشه قبل از شروع آزمایش باید تصور شود کلیه میکروارگانیسم‌هایی که مورد آزمایش قرار می‌گیرند می‌توانند بالفعل و بالقوه بیماریزا باشند. به همین جهت کلیه قوانین ایمنی و بهداشتی ضمن مراحل مختلف آزمایش باید مورد توجه قرار گیرد. بسیاری از افرادی که در آزمایشگاه میکروبیولوژی کار می‌کنند ممکن است تصور کنند که میکروارگانیسم‌هایی که با آن ها سرو کار دارند بیماریزا نیستند ، عدم رعایت مقررات شدید ایمنی مسئله‌ای را بوجود نمی‌آورد ،باید توجه داشت که در واقع مرز جدا کننده‌ای بین میکرب‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا وجود ندارد. تعدادی از باکتری‌های ظاهراً بی‌زیان می‌توانند در افراد خاص و در شرایط معین بیماری ایجاد نمایند. کارکنانی که با میکروب‌های خطرناک سروکار دارند باید علیه آن میکروارگانیسم‌ها واکسینه شوند و کلیه افرادی که در آزمایشگاه میکروبیولوژی کار می‌کنند باید با اصول ایمنی و کار در آزمایشگاه آشنا باشند.

نکات مهمی وجود دارند که در حین کار در آزمایشگاه میکروب شناسی باید به آن توجه شود تا از انتشار آلودگی جلوگیری به عمل آید . این نکات به صورت هشدارهای ایمنی ، بهداشتی و زیست محیطی به شرح زیر اعلام می گردد:

a هشدارهای ایمنی

۱–استفاده از روپوش سفید آزمایشگاه ، دستکش و در صورت لزوم عینک، ماسک و ... ضروری است. لباس‌های خود را روی جا لباسی قرار داده و از گذاشتن آن روی میز آزمایشگاه خود داری شود. (شکل های ۱–۱ تا ۱–۴)

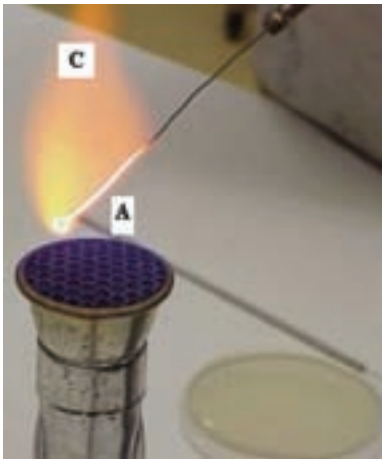
شکل ۱–۱

شکل ۲–۱

شکل ۳–۱

شکل ۴–۱

۲– هنگام سترون کردن سوزن کشت در روی شعله باید توجه داشت که ممکن است میکروارگانیسم‌ها در اثر جریان حرارت شعله، انتشار یابند، لذا با حرکت دادن تدریجی سوزن از قسمت پایین شعله (قسمت A) به قسمت گرم آن (قسمت C) از این پدیده جلوگیری می‌شود. (شکل ۵–۱)



شکل ۵–۱

۳– سرم‌ها ، آنتی سرم‌ها ، معرف‌ها و محلول‌های مورد استفاده ممکن است آلوده ، سمی و یا سرطان‌زا باشند. باید احتیاط لازم در کاربرد آن‌ها رعایت شود. (شکل‌های ۶–۱ تا ۱۱–۱)

شکل ۶–۱

شکل ۷–۱

شکل ۸–۱

شکل ۹–۱

شکل ۱۰–۱

شکل ۱۱–۱

۴– مکیدن مایعات آلوده با پیپت بوسیله دهان ممنوع است برای این منظور باید از پمپ یا سرنگ مخصوص استفاده شود.

شکل ۱۲–۱

شکل ۱۳–۱

شکل ۱۴–۱

۵– در استفاده صحیح از پیپت ، سرنگ و سوزن کشت باید سعی و دقت شود. (شکل‌های ۱۲–۱ تا ۱۴–۱)

۶ – در صورتی که کشت‌های میکروبی به طور تصادفی به زمین ریخته شود نباید خم شد و آن ها را جمع کرد، زیرا عوامل آلوده کننده به صورت ذرات معلق در هوا پراکنده می‌شوند و در اثر تنفس باعث آلودگی و بیماری می گردند. در این گونه موارد باید پس از چند دقیقه مقداری محلول ضد عفونی کننده قوی روی کشت‌ها ریخت تا میزان آلودگی کاهش یابد و پس از مدتی می توان محل آلوده شده را تمیز کرد.

۷– چنانچه انجام آزمایش به انتشار ذرات ریز معلق در هوا و یا هاگ قارچ‌ها در محیط منجر شود، باید در اتاق و فضای محفوظ و ایمن این آزمایش را انجام داد . لازم است درب ظروف حاوی کشت قارچ را با نوار چسب محکم ببندید تا از انتشار هاگ جلوگیری به عمل آید .

۸– درمحل خروج هوا ، بوسیله هواکش‌های آزمایشگاه ، صافی نصب شود.

۹– در هنگام استفاده از سانتریفوژ ومخلوط کردن مواد نهایت دقت انجام شود.

۱۰– در هنگام حوادث ناگهانی مانند بریده شدن انگشتان دست ، شکستن پلیت(پتری دیش) و... فوراً به مسئول آزمایشگاه اطلاع دهید .

۱۱– قبل از ترک آزمایشگاه دقت کنید که شیر های آب و گاز بسته باشد.

a هشدارهای بهداشتی

۱- در آزمایشگاه از خوردن وآشامیدن خودداری نمائید.

۲- دستان خود را مرتب با آب و صابون و مواد ضدعفونی کننده شستشو دهید. قلم ، کاغذ و انگشتان خود را در محل آزمایشگاه به داخل دهان خود نبرید و برای چسباندن بر چسب ها از آب دهان استفاده نکنید. (شکل های ۱۵-۱ و ۱۶-۱)

شکل ۱۵-۱

شکل ۱۶-۱

۳- در تمیز نگه داشتن لوازم آزمایشگاه کوشا باشید. میزهای کار و سطوحی که بر روی آن‌ها آزمایش صورت می گیرد باید مرتباً شسته شده و با مواد ضدعفونی کننده سترون شوند (الکل ۷۰ درجه، فنل ۵۰٪ و ...). (شکل های ۱۷-۱ و ۱۸-۱)

۴- نمونه های وارد شده به آزمایشگاه حاوی تعداد و انواع نامشخصی از میکروارگانیسم ها هستند که باید خطر آن‌ها را بالقوه در نظر گرفت ، لذا برای دریافت نمونه، بهتر است محل جداگانه ای در نظر گرفته شود. این محل می تواند قسمتی از اتاق آزمایشگاه باشد که به قدر کافی روشن است ونیز وسایل مورد استفاده در آن از جنس قابل شستشو و تمیز کردن باشند. در صورتی که ظروف محتوی نمونه نشت کند باید پس از سترون کردن آن‌ها را دور انداخت.

شکل ۱۷-۱

۵- کلیه پتری دیش ها و ظروف کشت باید قبل از آزمایش سترون شوند و ظروف حاوی کشت میکروارگانیسم ها باید به طور روشن و واضح بر چسب گذاری شود و اگر بعد از کشت دادن در پلیت‌ها بخار آب جمع شود ، در حمل ونقل آن‌ها باید کمال دقت مبذول شود زیرا یک منبع آلودگی بالقوه می‌باشد.

۶- برای حمل مواد دورانداختنی و ظروف مصرف شده ، حتماً باید از سینی مخصوص استفاده شود. ظروف و محتویات آلوده آن باید قبل از شستن سترون گردد (دقت شود درب این ظروف قبل از ورود به اتوکلاو کمی شل باشد).

۷- از ورود بی‌رویه و مکرر افراد به داخل آزمایشگاه جلوگیری شود ، افرادی که دارای آلودگی‌های شدید در نواحی دست و صورت هستند نباید در انجام آزمایشات میکروب‌شناسی شرکت کنند زیرا امکان آلودگی متقابل وجود دارد.

۸- بعد از اتمام کار ، لوازم مورد استفاده را در جای خود قرار داده و میز مورد استفاده خود را ضد عفونی کنید ، سپس دستهای خود را با آب و صابون و مواد ضد عفونی کننده شستشو دهید.

a هشدارهای زیست محیطی

۱- هیچگاه محیط کشت حاوی میکروارگانیسم زنده را داخل دستشویی نریزید.

۲- از انتشار میکروب‌ها به خارج از آزمایشگاه جلوگیری کنید.

۳- کلیه مواد مصرف شده را در ظروف مخصوص بسته بندی کرده و به خارج از آزمایشگاه انتقال دهید. همچنین از برچسب حاوی اطلاعات داخل بسته ها نیز استفاده کنید.

۴- با دقت در انجام آزمایشات از مصرف بی‌رویه مواد خودداری نمایید.

شکل ۱۸-۱

فکر کنید

۱. چرا در آزمایشگاه میکروبیولوژی رعایت قوانین و مقررات بهداشتی ، ایمنی و زیست محیطی ضروری است؟

۲. چنانچه کشت‌های میکروبی به صورت تصادفی به زمین ریخته شود چگونه عمل می کنید؟

۳. مواد دورریختنی و ظروف مصرف شده پس از پایان آزمایش چگونه معدوم می گردند؟ آیا می توان محیط کشت حاوی میکروارگانیسم‌های زنده را داخل دستشویی ریخت؟

۴. برای سترون‌سازی سوزن کشت چگونه عمل می کنید؟

۵- زمان کار آزمایشگاه تمام شده است، چه اموری را قبل از ترک آزمایشگاه باید انجام دهید؟

دستگاه‌ها، لوازم و تجهیزات آزمایشگاه میکروبیولوژی

آزمایشگاه میکروب‌شناسی دارای تجهیزات و دستگاه های زیر می باشد :

۱– هودهای بیولوژیک[۱] (یا کابینت‌های کاملاً بسته که در آزمایشگاه وجود دارد): برای حفظ و کنترل شرایط سترون کلیه کشت‌های میکروبی و آزمایشات مربوط در زیر هودهای بیولوژیک انجام می‌شود. (شکل های ۱۹–۱ تا ۲۱–۱)

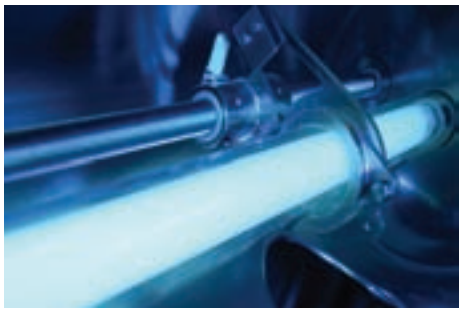
شکل ۱۹–۱

شکل ۲۰–۱

شکل ۲۱–۱

۲– لامپ‌های ماوراء بنفش[۲] (جهت کاهش آلودگی محیط):

از لامپ ماوراء بنفش فقط در زمانی استفاده می‌شود که کسی در محل حضور نداشته باشد . مواد شیمیایی وبیولوژیکی حساس به اشعه و کلیه نمونه‌های مورد آزمایش باید قبل از روشن شدن چراغ در جایی قرار داده شوند که تحت تأثیر تابش مستقیم قرار نگیرند. (شکل ۲۲–۱)



شکل ۲۲–۱

۱ – Biologic Hood (laminar air Flow Cabinet)
۲ – Ultra Videt (U.V)

۳– اتوکلاو[1]:

دستگاهی است که از آن جهت سترون کردن محیط های کشت و محلول های مقاوم به حرارت استفاده می شود و مانند هر دستگاه آزمایشگاهی می تواند دارای ابعاد ، اندازه و ظرفیت‌های مختلف باشد . (شکل های ۲۳–۱ تا ۲۷–۱)

شکل ۲۳–۱

شرایط سترون کردن با اتوکلاو : دستگاه با فشار psi ۱۵(پوند بر اینچ مربع یا $۱۰^۵$ نیوتن بر هر متر مربع) ، درجه حرارت ۱۲۱^{oc} و زمان ۲۰–۱۵ دقیقه ، کلیه موجودات زنده را از بین می‌برد و جسم را سترون می کند.

توجه کنید

این شرایط برای سترون کردن نمونه‌هایی با بار میکروبی معمولی و طبیعی است. در صورت بالا بودن بار میکروبی فشار و زمان سترون کردن افزایش می یابد.

رعایت کنید

آب دستگاه کنترل شده و در صورت لزوم متناسب با ظرفیت دستگاه ، آب مقطر در آن ریخته شود. حداکثر آب دستگاه باید به اندازه‌ای باشد که ظروف (حتی با در نظر گرفتن جوشیدن آب) خارج از آب باشند.

هشدار

آب معمولی به دلیل دارا بودن املاح و ایجاد رسوب در دستگاه ضمن آسیب رساندن به دستگاه می تواند موجب انفجار گردد.

۱– Autoclave

- در هنگام انتقال فلاسک‌های حاوی محیط‌های کشت میکروبی یا محلول های مورد نظر به داخل دستگاه، لازم است از پر کردن بیش از حد ظروف و فلاسک‌ها اجتناب شود. حد اکثر حجم اشغال شده باید یک سوم حجم ظرف باشد در غیر این صورت به دلیل جوشیدن محلول یا محیط کشت ضمن سترون شدن ، محتویات سرریز خواهد شد.
- توجه شود که درب دستگاه به طور کامل بسته شده باشد.
- در این مرحله لازم است شیر خروج هوا تا انتها باز گردد تا ضمن خروج هوا از داخل مخزن بخار آب تشکیل شده جایگزین آن گردد (نفوذ حرارتی و قدرت سترون کنندگی بخار آب بیشتر از هوای گرم می‌باشد).
- دستگاه را روشن کرده و ترموستات آن را روی حداکثر قرار دهید.
- شیر مربوط به خروج هوا را ببندید تا بخار آب در دستگاه جمع شود و فشار آن افزایش یابد. محاسبه زمان سترون کردن از لحظه‌ای است که فشار دستگاه به ۱۵ psi رسیده باشد (در صورتی که هوای مخزن کاملاً تخلیه شده باشد) .
- با اتمام کار دستگاه ، برای باز کردن اتوکلاو لازم است شیر خروج هوا را تا زمانی که فشار به صفر کاهش یابد ، بسته نگه داشت . چنانچه موادی که سترون می‌شوند حاوی مایعات نباشند می توان برای کاهش دادن سریع فشار ، شیر خروج هوا را باز کرد . اما اگر در مخزن اتوکلاو، مایعات وجود داشته باشند ، چنین کاهش فشاری باعث جوش آمدن آن‌ها در ظروف خود شده و پنبه سر درب آن‌ها را خیس کرده و آن را به خارج پرتاب می کند. از این رو در مواقعی که مایعات سترون می‌شوند همیشه لازم است فشار را به تدریج کاهش دهیم.
- پس از آنکه فشار سنج نشان داد که هیچگونه فشار مربوط به بخار آب وجود ندارد می توان درب اتوکلاو را باز نموده و مواد و وسایل را خارج نمود سپس دستگاه را خاموش و از برق جدا می کنیم .

آزمایش کنید : سترون کردن محیط کشت با اتوکلاو

مواد و لوازم مورد نیاز:

- اتو کلاو
- یک نمونه محیط کشت پودری شکل
- آب مقطر
- ارلن
- فویل و پنبه
- همزن مکانیکی
- فویل و پنبه سترون

روش انجام آزمایش:

۱– محیط‌های کشت میکروبی اکثرا به صورت پودری شکل می‌باشد؛ جهت آماده‌سازی آن‌ها قبل از فرایند سترون کردن؛ لازم است ابتدا مطابق دستورالعمل نوشته شده بر روی قوطی محیط کشت؛ مقدار مناسب از آن‌را وزن نموده و با حجم مشخص از آب مقطر مخلوط نمود.

۲– جهت حل شدن مناسب پودر در آب از تکان دهنده مکانیکی استفاده کنید.

۳– درب ارلن را با فویل و پنبه سترون کاملا مسدود نمایید.

۴– مطابق دستوالعمل گفته شده در صفحات قبل محیط کشت را در داخل اتوکلاو سترون نمایید.

گزارش کار

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

نتیجه گیری

.....

.....

فکر کنید

۱– چرا جهت سترون نمودن محیط های کشت میکروبی بجای هوای گرم از بخار آب گرم استفاده می‌شود ؟

۲– دلیل عدم استفاده از آب معمولی در اتوکلاو را بیان کنید ؟

۳– چنانچه موادی که در داخل اتوکلاوسترون می‌شوند مایع نباشند، جهت کاهش سریع فشار در خاتمه سترون‌سازی چگونه عمل می‌شود ؟

مقایسه کنید

در تصاویر زیر چند نمونه دستگاه اتوکلاو نشان داده شده است.دستگاه اتوکلاو آزمایشگاه هنرستان خود را با این نمونه‌ها مقایسه کنید.

شکل ۲۴–۱

شکل ۲۵–۱

شکل ۲۶–۱

شکل ۲۷–۱

۴– گرمخانه (اینکوباتور) :

گرمخانه دستگاهی است که از آن جهت تأمین دمای لازم برای رشد میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شود. (شکل های ۲۸-۱ تا ۳۲-۱)

انواع گرمخانه‌ها عبارتند از :

- گرمخانه معمولی
- گرمخانه بی‌هوازی
- گرمخانه یخچال‌دار .

رعایت کنید

در هنگام کار با دستگاه گرمخانه (اینکوباتور):

- ابتدا دمای مورد نظر(متناسب با نوع میکروارگانیسم و دمای لازم برای رشد آن) با استفاده از ترموستات دستگاه تنظیم می‌شود.
- دمای داخل گرمخانه نباید از حد ^{oc} ۱± تغییر نماید . برای تنظیم و تعادل دمای مورد نظر لازم است دو بار در روز، یکبار صبح در ابتدای شروع کار که درب دستگاه، ساعت ها بسته بوده است و یک مرتبه در پایان کار به کمک یک دماسنج دقیق دمای گرمخانه کنترل گردد.
- گرمخانه باید به صورتی پرشود که فاصله بین ردیف پتری دیش‌ها از یکدیگر و نیز دیواره و کف دستگاه حدود ۲/۵ سانتی‌متر باشد تا هوا به خوبی در آن جریان داشته و دمای دستگاه یکنواخت باشد.
- برای جلوگیری از تجمع رطوبت زیاد در دستگاه دریچه مخصوص کاهش رطوبت را در حالت باز بگذارید .(میزان رطوبت داخل دستگاه باید به نحوی باشد که باعث جمع شدن قطرات آب بر روی ظروف و گسترش سریع کشت نگردد ، از طرف دیگر ظروف حاوی آگار بیش از ۱۵ درصد از رطوبت خود را در مدت ۴۸ ساعت از دست ندهد.)
- برای جلوگیری از تغییرات دمای دستگاه لازم است از باز کردن زیاد درب آن خود داری شود.
- برای جلوگیری از تجمع آلودگی‌ها در دستگاه ، طی فاصله‌های زمانی معین با مواد ضدعفونی کننده، فضای داخل دستگاه تمیز وضد عفونی شود.

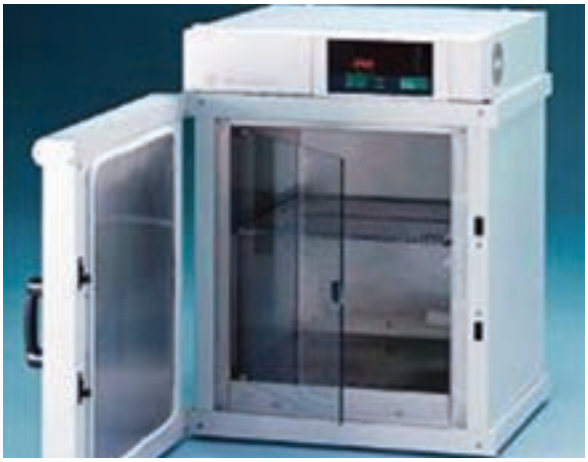
مقایسه کنید

در تصاویر زیر چند نمونه دستگاه گرمخانه نشان داده شده است. گرمخانه آزمایشگاه خود را با آن‌ها مقایسه کنید.

شکل ۱–۲۸

شکل ۱–۲۹

شکل ۱–۳۰



شکل ۱–۳۱

شکل ۱–۳۲

۵– حمام آب‌گرم[1]:

حمام آب‌گرم دستگاهی است که از آن جهت تهیه محیط‌های کشت ، ثابت نگه داشتن دمای محلول‌ها و محیط کشت و به ویژه برای مذاب نگه داشتن محیط‌های جامد استفاده می‌شود. (شکل‌های ۳۳–۱ تا ۳۵–۱)

رعایت کنید

نکات مهم در استفاده از حمام آب‌گرم :

- در شروع کار از وجود آب به میزان کافی در دستگاه مطمئن شوید (اگر دستگاه خشک کار کند احتمال سوختن و آسیب دیدن آن وجود دارد). آب مصرف شده باید آب مقطر باشد تا از ایجاد رسوب در دستگاه که می‌تواند باعث خوردگی و عدم تبادل حرارتی مناسب گردد جلوگیری شود . سطح حداقل آب در اغلب دستگاه‌ها مشخص شده است .
- دمای دستگاه به کمک ترموستات تنظیم می‌شود . برای ثبات دمای دستگاه درب آن را ببندید جهت اطمینان از صحت دمای دستگاه از یک دماسنج دیگر استفاده کنید .
- در صورت عدم استفاده از دستگاه برای مدت طولانی بهتر است جهت جلوگیری از خرابی زود هنگام دستگاه آب داخل آن را تخلیه کنید .

مقایسه کنید

در تصاویر زیر به چند نمونه دستگاه حمام آب‌گرم اشاره شده است. حمام آب‌گرم آزمایشگاه هنرستان خود را با آن‌ها مقایسه کنید.

شکل ۳۳–۱

شکل ۳۴–۱

شکل ۳۵–۱

۱– Water Bath

۶– یخچال :

برای خنک نگه داشتن نمونه‌ها و محیط های کشت از دمای ^{oc} ۴+ استفاده می‌شود . دمای یخچال باید به گونه‌ای تنظیم شود که از انجماد محیط‌های کشت ، آنتی‌سرم ها و نمونه‌ها جلوگیری شود. (شکل‌های ۳۶–۱ تا ۳۹–۱)

رعایت کنید

لازم است از قرار دادن چیزهای متفرقه در یخچال آزمایشگاه میکروب‌شناسی جلوگیری شود .

مقایسه کنید

چند نمونه یخچال آزمایشگاهی در تصاویر زیر نشان داده شده است. یخچال آزمایشگاه هنرستان خود را با آن‌ها مقایسه کنید.

شکل ۳۶–۱

شکل ۳۷–۱

شکل ۳۸–۱

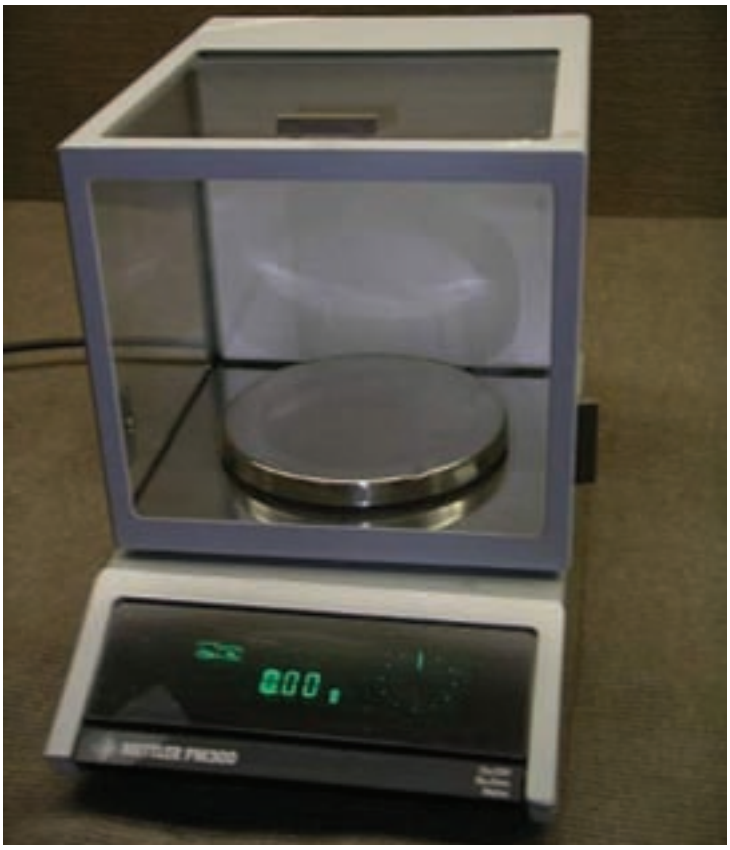
شکل ۳۹–۱

۷– ترازو :

در آزمایشگاه از ترازوهای مختلف جهت توزین نمونه‌ها، پودر محیط های کشت و مواد شیمیایی تشکیل دهنده محلول‌ها و محیط‌های کشت استفاده می‌شود . در آزمایشگاه حداقل یک ترازو با ظرفیت ۲۵۰۰ گرم و حساسیت یک دهم گرم مورد نیاز است. (شکل ۴۰–۱)

رعایت کنید

- اگر از ترازوهای دیجیتالی در آزمایشگاه استفاده می‌شود ،جهت جلوگیری از کم شدن حساسیت و دقت ترازو از توزین اجسام سنگین با آن خودداری شود .
- لازم است ترازوها دور از جریان هوا ورفت وآمد و به صورت تراز قرار گیرند تا میزان خطای دستگاه کاهش یابد.



شکل ۴۰–۱

آزمایش کنید : توزین نمونه‌های آزمایشی

مواد و لوازم مورد نیاز:

a از طرف مسئول آزمایشگاه در اختیار هنر آموز قرار می گیرد.

روش انجام آزمایش:

چند نمونه از موادی که مسئول آزمایشگاه در اختیار شما می گذارد ، را وزن کنید. هر نمونه را چند بار وزن کنید. جرم آن‌ها را در جدول زیر یادداشت کنید. میزان حساسیت دستگاه را در نظر بگیرید و از درستی آن اطمینان حاصل نمایید. برای این منظور از جرم‌های استاندارد موجود در آزمایشگاه استفاده نمایید.

گزارش کار

نام جسم توزین شده					
جرم جسم					
جرم جسم تکرار ۲					
جرم جسم تکرار ۳					

.....

.....

.....

.....

.....

.....

نتیجه گیری

.....

.....

.....

۸– تکان دهنده مکانیکی[۱]:

تکان دهنده مکانیکی برای یکنواخت کردن محتوای ظروف به کار می‌رود و کار آن شکستن مجموعه های میکروبی در لوله های آزمایش و ارلن است. برای این منظور دستگاه باید در جهت پایین و بالا حداقل به مدت ۷ ثانیه کار کند. (شکل‌های ۴۱–۱ و ۴۲–۱)

شکل ۴۱–۱

شکل ۴۲–۱

۹– میکروسکوپ :

امروزه انواع مختلفی از میکروسکوپ ها جهت شناسایی و بررسی میکروارگانیسم ها به کار می رود مانند میکروسکوپ نوری ، میکروسکوپ فلورسانس ، میکروسکوپ الکترونی، میکروسکوپ فاز متضاد و غیره . متداول ترین میکروسکوپی که در آزمایشگاه های میکروبیولوژی به کار می رود میکروسکوپ نوری است که در آن جسم با نور مرئی دیده می شود. (شکل ۴۳–۱)

قسمت های مختلف میکروسکوپ : یک میکروسکوپ به طور عمده از عدسی های چشمی[۲] و عدسی های شیئی[۳] با بزرگ نمایی های مختلف (که حاصل ضرب درشت نمایی آن ها تعیین کننده بزرگ نمایی کل می باشد) تشکیل شده است .

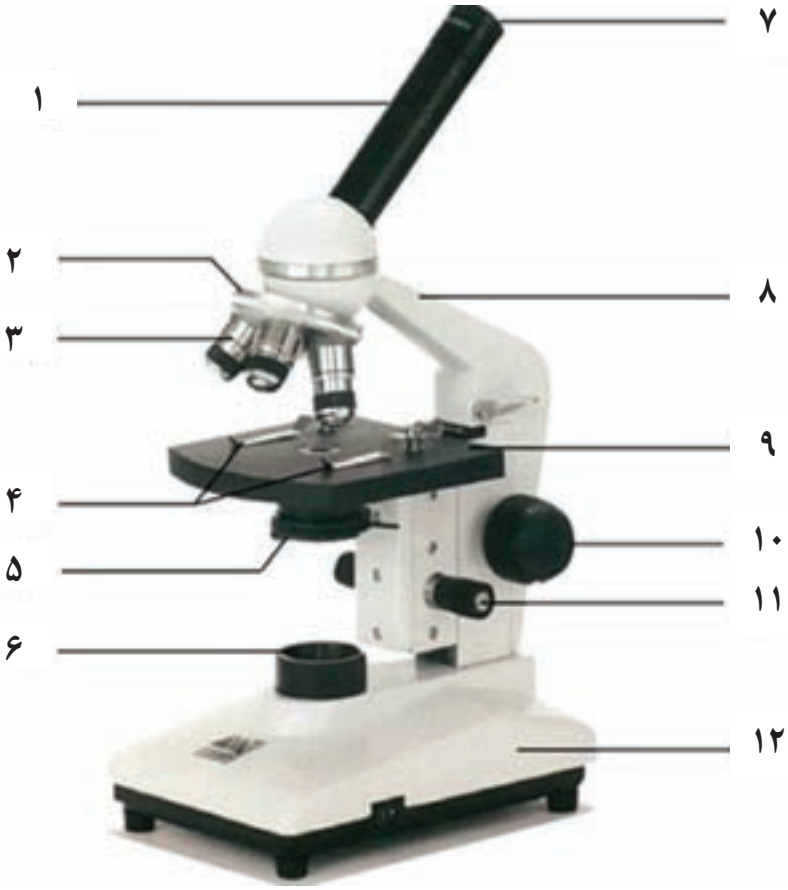
عدسی های چشمی بر دونوع می باشند . عدسی چشمی معمولی[۴] برای استفاده با عدسی های شیئی اکروماتیک[۵] یا برون رنگ و عدسی های هویژنیان[۶] برای استفاده با عدسی های شیئی رنگی اپواکروماتیک[۷] یا رنگی مورد نظر می باشند. لوله ثابت کننده عدسی چشمی[۸] به طول معمول ۶۰ میلیمتر است که در میکروسکوپ دو چشمی از طریق یک قسمت متحرک قابل تنظیم به لوله محل قرار گرفتن عدسی های چشمی مربوط می گردد . از طریق لوله بدنه میکروسکوپ عدسی چشمی با صفحه گردان عدسی های شیئی ارتباط می یابد . عدسی های شیئی معمولاً در چهار اندازه مختلف شامل : عدسی شیئی با بزرگ نمایی کم (۳/۲ ×) و (۱۰ ×) ، عدسی شیئی با

۱– Mechanical Shaker
۲– Ocular
۳– Objective
۴– Regular
۵– Achromatic
۶– Huygenian
۷– Apo achromatic
۸– fixed dry tube

بزرگ نمایی زیاد (۴۰×) و عدسی شیئی شناور در روغن[1] (۱۰۰×) می باشد . در زیر صفحه گردان عدسی‌های شیئی ، صفحه مربع شکل با گیره مخصوص برای قرار دادن لام (اسلاید) وجود دارد . این صفحه را می توان با پیچ‌های تنظیم مربوط در قسمت های جلو و عقب به حرکت در آورد . برای بدست آوردن تصویر از لام (اسلاید) روی صفحه میکروسکوپ و تنظیم فاصله عدسی‌های شیئی با اسلاید ، پیچ‌های تنظیم بزرگ و کوچک در روی بازو (بدنه) میکروسکوپ تعبیه شده است. که با استفاده از آن‌ها می توان فاصله مورد نظر را در حد کم وزیاد تغییر داد. در زیر صفحه جای لام (اسلاید) به ترتیب کندانسور ، دیافراگم ، آیینه و لامپ میکروسکوپ قرار دارد . نور متصاعد شده از منبع نور (لامپ) و آیینه پس از گذشتن از دیافراگم و کندانسور به شیئ مورد نظر در سطح لام و سپس عدسی‌های شیئی و چشمی انعکاس می‌یابد . تمام قسمت‌های یک میکروسکوپ بر روی پایه مخصوص قرار دارد .

تکمیل کنید:

۱ ....عدسی چشمی
۲ ....عدسی شیی
۳ ....کندانسور
۴ ....صفحه پلاتین
۵ ....صفحه گردان
۶ ....پیچ تنظیم دقیق
۷ ....دیافراگم
۸ ....منبع نور
۹ ....دسته میکروسکوپ
۱۰ ....پیچ تنظیم سریع
۱۱ ....پایه میکروسکوپ
۱۲ ....گیره



شکل ۴۳–۱

۱– Oil – Immersion

رعایت کنید

در هنگام استفاده از میکروسکوپ:

- تهیه دقیق و مناسب نمونه، بررسی میکروسکوپی را ساده‌تر می کند .
- متناسب با نوع نمونه تهیه شده و دقت مورد نظر باید لنز مناسب انتخاب شود .
- تنظیم نور دستگاه نیز متناسب با نمونه تهیه شده انجام می‌شود . برای مثال در نمونه‌هایی که رنگ‌آمیزی نشده و یا کم رنگ هستند باید از نور کم استفاده شود و در نمونه‌های ضخیم و پر رنگ باید از حداکثر شدت نور استفاده شود .
- برای بدست آوردن تصویر مناسب از لام ، عدسی‌های شیئی باید هر کدام در فواصل معینی قرار داشته باشند . میزان فاصله (۳/۲ ×) با لام برابر با ۲۳ میلیمتر ، عدسی شیئی (۱۰ ×) با لام معادل ۵ میلیمتر ، عدسی شیئی (۴۰×) با لام برابر با ۱/۲ – ۱ میلیمتر ، عدسی شیئی (۱۰۰×) برابر با ۰/۹ میلیمتر است.
- در استفاده از عدسی (۱۰۰×) حتماً لازم است برای ایجاد تصویر واضح از یک قطره روغن ایمرسیون استفاده شود .
- جهت تنظیم میکروسکوپ ابتدا لام را روی صفحه میکروسکوپ داخل گیره آن قرار داده سپس با پیچ‌های حرکت دهنده لام را طوری روی صفحه میزان کنید که شعاع نور از وسط گسترش (نمونه) بگذرد . در بررسی با عدسی (۱۰۰×) بعد از انتخاب عدسی و تنظیم شدت نور ، صفحه میکروسکوپ را به کمک پیچ تنظیم ماکرو بالا آورده و با روغن روی لام تماس دهید . سپس با پیچ تنظیم میکرو جهت ایجاد تصویر واضح کوشش کنید .

هشدار

هرگز قبل از دیدن تصویر واضح با پیچ‌های حرکت دهنده لام کار نکنید زیرا ممکن است موجب آسیب دیدن عدسی و نمونه گردد .

آزمایش کنید : کار با میکروسکوپ

هدف از انجام آزمایش زیر آشنایی با میکروسکوپ و مشاهده میکروارگانیسم‌ها از طریق میکروسکوپ جهت شناخت بیشتر میکروسکوپ و میکروارگانیسم‌ها می باشد .

مواد و لوازم مورد نیاز:

- میکروسکوپ
- لام (اسلاید) و لامل
- روغن سدر(روغن ایمرسیون)
- محیط کشت دارای مخمر
- لوله آزمایش
- آنس حلقوی

روش انجام آزمایش :

۱- میکروسکوپ را به نحوی روی میز کارتان قرار دهید که بازوی خمیده آن در نزدیک‌ترین فاصله ممکن با شما باشد . قبل از مشاهده میکروسکوپی ، تمام قسمت‌های آن را مورد بررسی قرار دهید تا از طرز کار صحیح آن مطمئن گردید و چنانچه در هر مورد سوالی داشتید با مسئول آزمایشگاه تماس بگیرید.

۲- با اتصال دو شاخه و چرخاندن کلید ، لامپ میکروسکوپ را روشن نمائید .

۳- با استفاده از آنس ، یکی از کلنی (پرگنه) های مخمر را از محیط کشت مورد نظر جدا نموده و در لوله آزمایش دارای یک میلی لیتر آب سترون قرار دهید.سپس با کمک آنس از مخمرهای داخل محلول آب برداشته و به آرامی روی لام شیشه‌ای منتقل نموده و روی آن یک لامل قرار دهید. اکنون اسلاید تهیه شده فوق را روی صفحه مربع شکل در محل مخصوص خود گذارده و مورد مشاهده میکروسکوپی قرار دهید .

۴- شکل و اندازه سلول مخمر را با استفاده از عدسی شیئی با بزرگ نمایی (۱۰×) مورد مشاهده قرار دهید.

۵- با چرخاندن صفحه گردان عدسی های شیئی عدسی شیئی، با بزرگ نمایی (۴۰×) را روی اسلاید مورد نظر تنظیم و مشاهده نمایید . به همین طریق بعد از افزودن یک قطره روغن سدر روی لامل و تنظیم عدسی شیئی (۱۰۰×) و مشاهده از طریق عدسی چشمی به تدریج عدسی شیئی را تا کسب تصویر مشخص به سطح لامل و لام نزدیک نمایید.

۶- در صورتی که وقت اجازه دهد می توانید جهت کسب آموزش و تجربه بیشتر با استفاده از یک رشته مو و یک قطعه کاغذ صافی مطابق آنچه در مورد نمونه اسلاید مخمر انجام دادید ، نمونه‌های ذکر شده را مورد مشاهده میکروسکوپی قرار دهید .

گزارش کار

نتیجه گیری

فکر کنید

۱- آیا با مشاهده میکروارگانیسم‌ها در زیر میکروسکوپ می‌توان به زنده یا مرده بودن آن‌ها پی‌برد؟

۲- برای مشاهده تصویر مناسب از جسم ، عدسی‌های شیی باید در فواصل معینی قرار بگیرند، دلیل این امر به نظر شما چیست ؟

۳- نقش روغن ایمرسیون (سدر) در مشاهده تصویر با عدسی شیئی (۱۰۰×) چیست ؟

۱۰ - آون[1] (فور)

آون دستگاهی است که جهت سترون نمودن وسایل ، ابزار ها و ظروف مقاوم در برابر حرارت استفاده می‌شود. (شکل‌های ۴۴-۱ تا ۴۶-۱)

رعایت کنید

وسایل و ظروفی که باید سترون شوند کاملاً تمیز و خشک بوده وقبل از قرار گرفتن در دستگاه ، مجاری باز آن‌ها با فویل ، پنبه و ... پوشانده شود تا پس از خارج شدن از دستگاه تا لحظه استفاده با آلودگی‌های محیط اطراف در تماس نبوده و غیرسترون نگردند .

مقایسه کنید

آون آزمایشگاه محل تحصیل خود را با نمونه‌های کتاب مقایسه کنید.

شکل ۴۴-۱

شکل ۴۵-۱

شکل ۴۶-۱

۱- Oven

۱۱–دستگاه پرگنه شمار

پرگنه شمار برای شمارش دقیق و آسان پرگنه‌ها به کار می‌رود. در اکثر این دستگاه‌ها یک ذره‌بین، صفحه شطرنجی، شماره‌انداز و منبع نوری جهت روشن کردن سطح پلیت برای بررسی دقیق و راحت‌تر پلیت‌ها تعبیه شده است. (شکل‌های ۴۷–۱ تا ۵۰–۱)

رعایت کنید

در زمان استفاده از دستگاه :

- مشخصات پشت پلیت‌ها پس از ثبت آن‌ها در دفتر کار باید به طور کامل پاک گردد.
- پلیت را در جایگاه مخصوص روی دستگاه قرار داده و توجه شود گاهی به دلیل رنگ خاص محیط کشت و نوع پرگنه‌های آن بررسی پلیت از سمت پشت پلیت راحت‌تر است.
- با استفاده از درشت نمایی ذره بین، روشنایی ایجاد شده با منبع نوری و با کمک گرفتن از خطوط صفحه شطرنجی به شمارش ردیف به ردیف پرگنه‌ها اقدام کنید.
- به منظور جلوگیری از گسترش آلودگی بر روی دستگاه بعد از هر بار استفاده، با مواد ضدعفونی کننده مناسب مانند الکل ۷۰ درجه، سطح دستگاه را تمیز و ضدعفونی کنید.

تصاویر چند نمونه دستگاه پرگنه شمار نشان داده شده است.

شکل ۴۷–۱

شکل ۴۸–۱

شکل ۴۹–۱

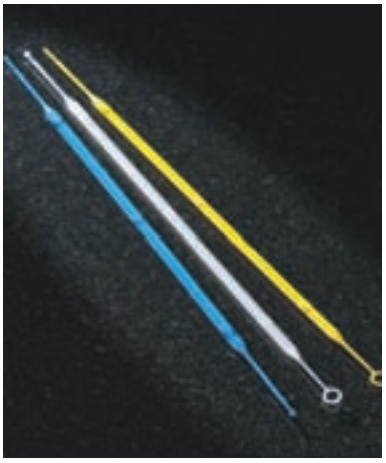
شکل ۵۰–۱

معرفی برخی از ظروف آزمایشگاه میکروبیولوژی

۱– پیپت :

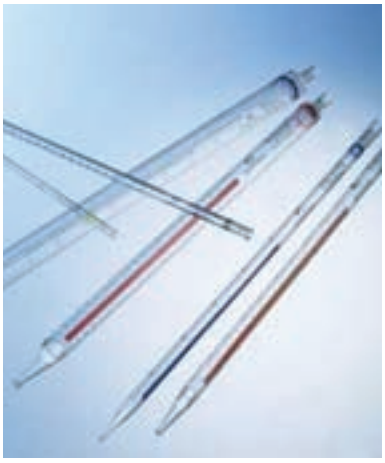
الف) پیپت شیر : این پیپت‌ها فقط به منظور آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی و برای برداشت و انتقال ۰/۰۱ میلی‌لیتر شیر ، تنظیم ودرجه بندی شده است وقطر نوک آن مشابه پیپت های معمولی مدرج است و با اولین خط ۴۰ تا ۶۰ میلی‌متر فاصله دارد. (شکل‌های ۵۱–۱ تا ۵۳–۱)

ب) پیپت‌های شیشه‌ای وپلاستیکی : این پیپت‌ها از مواد غیر سمی تهیه شده‌اند و دارای دیواره مستقیم و نوک گرد می‌باشند و برای استفاده در آزمایشگاه میکروب‌شناسی به کار می‌روند . حداکثر حجمی را که در مدت ۴ ثانیه خارج می کند مقدار یک میلی‌لیتر با اختلاف ۰/۰۳۵±میلی‌لیتر است . این در حالی است که آخرین قطره شیر رقیق نشده موجود در پیپت رامی‌توانید با دمیدن در پیپت خارج کنید .

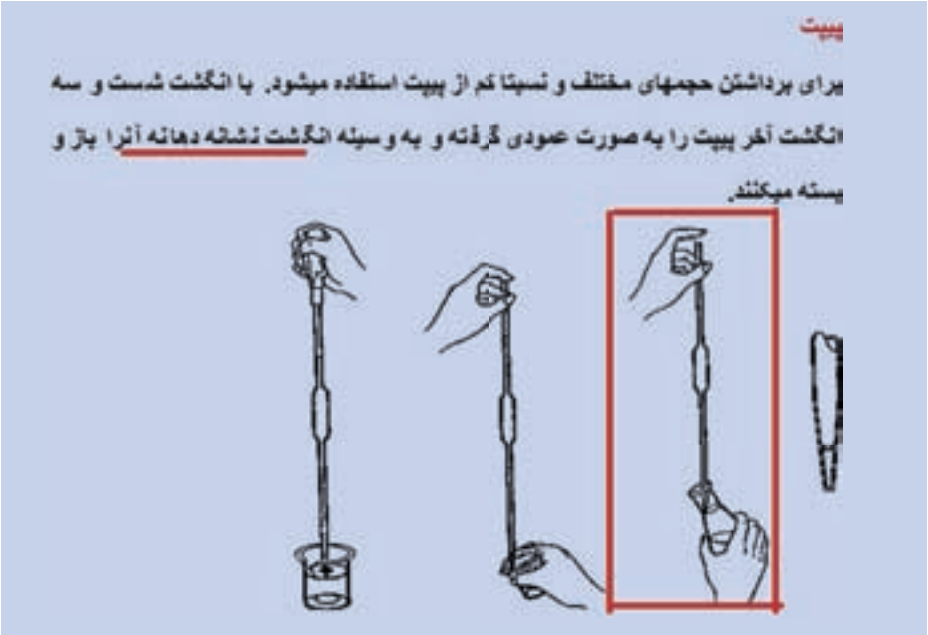


شکل ۵۱–۱

شکل ۵۲–۱



شکل ۵۳–۱



استفاده از پیپت

موفقیت در آزمایشاتی که با پیپت انجام می‌شود ، به روش صحیح آن بستگی دارد . درگذشته ، محلول میکروبی را با دهان به داخل پیپت می کشیدند ولی به لحاظ خطر آشکار آن امروزه برای این منظور از مکنده‌های دستی استفاده می‌شود .مسئول آزمایشگاه شما ، روش استفاده از آن را به شما یاد خواهد داد .

رعایت کنید

- وقتی می خواهید یک پیپت را از جا پیپت درآورید این کار را طوری انجام دهید که انگشتان شما ، انتهای پیپت‌های دیگر را آلوده نکنند . با تکان دادن جا پیپتی ، یک پیپت از بقیه جدا شده و می توان آنرا براحتی بیرون آورد.
- پس از برداشتن پیپت در پوش جا پیپتی را بگذارید تا بقیه پیپت‌ها سترون بمانند .
- بدنه پیپت را با انگشتتان نگیرید وقبل و بعد از استفاده ، آن را روی میز نگذارید و در طی کاربرد آن سترون نگهدارید و روی میز و یا خودتان را با آن آلوده نکنید .
- برای کشیدن محلول به پیپت ، همیشه از یک مکنده مکانیکی استفاده کنید .
- اگر سه پیپت نیاز است ، آن ها را یکی‌یکی از جا پیپتی در آورید .
- وقتی کارتان با پیپت تمام شد آن را در داخل ظرف حاوی مایع ضدعفونی کننده قرار دهید . در انتهای کار ، پیپت‌های قابل شستشو را شسته، سترون کنید وپیپت های یک بار مصرف را دور بریزید .

آزمایش کنید : جابه‌جایی مایعات و اندازه گیری آن‌ها با استفاده از پیپت

مواد و لوازم مورد نیاز :

- پیپت در حجم‌های مختلف
- بشر
- ترازوی آزمایشگاه
- آب بهداشتی

روش انجام آزمایش :

ظرف محتوی آب بهداشتی را در اختیار بگیرید و با انواع پیپت به برداشت حجم معینی از آب اقدام کنید. برای توزین آن از انواع بشر که قبلا وزن آن را بدست آورده‌اید و از ترازوی آزمایشگاه بهره ببرید.

گزارش کار

نتیجه گیری

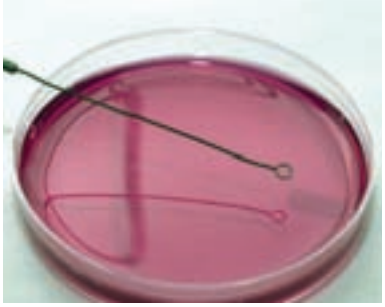
توجه کنید

در انتهای بالایی پیپت‌ها یک یا دو خط دایره‌ای دیده می‌شود که مفهوم آن این است که در صورتی که یک خط وجود داشته باشد می‌بایست با دمیدن داخل پیپت باقی مانده مایع را خارج ساخت و مورد محاسبه قرار داد و در صورتی که دو خط وجود داشته باشد، باقی مانده مایع داخل پیپت مورد محاسبه قرار نمی گیرد.

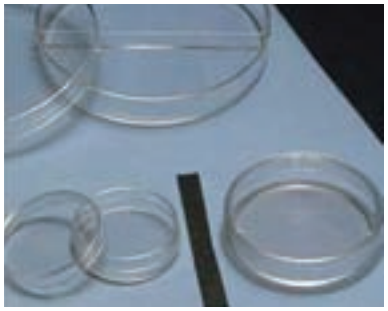
محل نگهداری پیپت :

در مواقعی که پیپت مورد استفاده قرار نمی گیرد آن را از طرف نوک به داخل یک محلول مناسب پاک کننده‌ی بدون کف غوطه‌ور سازید و در مواقع استفاده سطح خارجی و دهانه پیپت را کاملاً با آب شستشو داده تا از ماده پاک کننده عاری شود . جهت سترون نمودن پیپت‌ها آن‌ها را در داخل ظرف استوانه ای شکل ویژه‌ای که از فولاد ضد زنگ یا آلومینیوم شکل تشکیل شده است قرار می‌دهند (ظرف مخصوص پیپت).

۲– پتری‌دیش (پلیت)[1] : این ظروف از جنس شیشه‌ای و یا پلاستیک می‌باشند . دارای کف صاف بوده و قطر آنها بین ۸ تا ۱۰ سانتیمتر می‌باشند . عمق این ظروف اکثراً ۱۲ میلیمتر است . (شکل‌های ۵۴–۱ تا ۵۶–۱)



شکل ۵۴–۱



شکل ۵۵–۱

شکل ۵۶–۱

۳– سرنگ فلزی : به منظور انتقال حجم معینی از مایعات مورد استفاده قرار می گیرد . این سرنگ‌ها دارای یک میله فلزی حساس نیمه خودکار و یک پیستون مناسب از جنس فولاد ضد زنگ می‌باشند.

۴ – ارلن تحت خلاء (شکل ۵۹–۱)، **ارلن مایر** (شکل ۵۷–۱) ، **بشر** (شکل ۶۰–۱) ، **بالن ژوژه** (شکل ۶۱–۱) ، **استوانه مدرج** (شکل ۶۲–۱) ، **میله شیشه‌ای ، سوزن کشت** (شکل ۵۸–۱)، **لام و لامل** از جمله وسایل مورد استفاده در آزمایشگاه میکروبیولوژی می‌باشند.

شکل ۵۷–۱

شکل ۵۸–۱

شکل ۵۹–۱

شکل ۶۰–۱

شکل ۶۱–۱

شکل ۶۲–۱

1– Petri – Dished «Plate»

فکر کنید

۱- چرا تنظیم رطوبت داخل گرمخانه (اینکوباتور) اهمیت دارد ؟ افزایش یا کاهش رطوبت داخل گرمخانه چه اثری بر رشد سلول‌های باکتری دارد ؟

۲- در بیشتر آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی ترجیحا از پلیت پلاستیکی برای کشت استفاده می‌شود ، دلیل این کار به نظر شما چیست ؟

A واژه های فصل اول

دستور العمل های بهداشتی

دستورالعمل های ایمنی

میکروبیولوژی

هودهای بیولوژیک

اتوکلاو

گرمخانه(اینکوباتور)

حمام آب گرم

یخچال

ترازو

تکان دهنده مکانیکی

میکروسکوپ

آون (فور)

دستگاه پرگنه شمار

پیپت

پتری‌دیش

سرنگ فلزی

ارلن

بشر

بالن ژوژه

استوانه مدرج

میله شیشه‌ای

لام

لامل