فصل اول

مقررات کار در آزمایشگاه میکروب‌شناسی

طراحی آزمایشگاه و فضای مورد نیاز

۱ــ۱ــ فضای مربوط به آماده سازی نمونه و آزمایش

برای داشتن یک فضای خوب و مناسب آزمایشگاهی باید برای قسمت‌های زیر فضای جداگانه‌ای در نظر گرفته شود.

ــ دریافت ونگهداری نمونه‌ها

ــ آماده‌سازی نمونه‌ها به ویژه مواد خام

ــ گرمخانه گذاری میکروارگانیسم‌ها

ــ نگهداری سویه‌های مرجع[۱] (سویه‌های میکروبی مرجع که از آزمایشگاه‌ها و مراکز پژوهشی معتبر تهیه می‌شوند)

ــ آماده سازی و سترون‌سازی محیط‌های کشت و وسایل مورد استفاده

ــ انبار محیط‌های کشت آزمایشگاهی، نشانگرها و رنگ‌ها

ــ شستشوی وسایل شیشه‌ای، فلزی و پلاستیکی

ــ انبار نگهداری مواد شیمیایی خطر ساز در اتاق‌ها و قفسه‌ها

ــ فضای عمومی

برای موارد زیر لازم است :

✓ ورودی، راه پله و آسانسور

✓ رخت‌کن و سرویس‌های بهداشتی

✓ انبار مواد و وسایل

✓ فضای عمومی‌مربوط به کارکنان وهنرجویان

به علاوه فضای کاری کافی به منظور حفظ شرایط پاکیزگی و نظم باید وجود داشته باشد. بهتر است این فضا با حجم آزمون‌های مورد نظر و تشکیلات داخلی آزمایشگاه تناسب داشته باشد.

۲ــ۱ــ مکان آزمایش

مکان انجام آزمون‌های میکروبی باید به گونه‌ای ساخته و مجهز شود که خطر آلودگی به وسیله گرد و غبار و میکروارگانیسم‌های

۱ــ Type culture

موجود را کاهش دهد. برای این منظور لازم است موارد زیر در نظر گرفته شود :

ــ دیوار و کف باید صاف باشد تا به سهولت قابل تمیز کردن شود.

ــ کف باید دارای شیب ۲٪ باشد تا از جمع شدن آب روی آن جلوگیری شود.

ــ کف نسبت به شوینده‌ها و سترون کننده‌ها مقاوم بوده و لغزنده نباشد.

ــ به منظور کم کردن جریان هوا هنگام آزمون، پنجره‌ها و درها باید به طور کامل بسته شوند تا از ورود هوای آلوده بیرون به داخل جلوگیری شود.

ــ برای آزمون‌هایی که باید در هوای با آلودگی کم انجام شوند باید از اتاقک ایمن[1] استفاده شود.

ــ استفاده از پرده برای شیشه‌ها و پنجره‌های آزمایشگاه مناسب نیست زیرا خود یک منبع ورود گرد و غبار و سایر عوامل آلوده‌کننده است.

نکته‌های لازم برای مجهز کردن آزمایشگاه

✓ دسترسی به آب سالم برای مصارف مورد نظرمانند شستشوی وسایل

✓ دسترسی به برق با ولتاژ مناسب

✓ وجود نور کافی و استاندارد در هر قسمت آزمایشگاه (راهروها ۱۱۰ لوکس، مکان آزمون ۳۰۰ لوکس، مکان‌های کار خیلی دقیق ۵۰۰ لوکس)

✓ میز کار و صندلی‌های آزمایشگاه باید دارای سطوح صاف و غیر قابل نفوذ باشد و به آسانی قابل تمیز کردن و سترون کردن باشد.

✓ در دسترس بودن وسایل آزمایشگاهی

✓ دسترسی به اتوکلاو برای از بین بردن مواد زاید و محیط‌های کشت آلوده

✓ فراهم کردن سیستم ایمنی برای خاموش کردن آتش، برق اضطراری، دوش اضطراری و وسایل شستشوی چشم

✓ فراهم کردن جعبه کمک‌های اولیه

۳ــ۱ــ تمیز کردن و ضد عفونی کردن سطوح کار

ــ کف، دیوارها، سقف، میز کار آزمایشگاه، وسایل و اتصالات آنها باید به طور منظم از نظر آلودگی کنترل شود زیرا ممکن است منبعی برای آلودگی باشند.

ــ سالم سازی سطوح با استفاده از مواد سترون کننده انجام شود.

ــ وضعیت آلودگی سطوح در تماس با هنرجویان و هنرآموزان و دانش آموزان باید به طور منظم بررسی شود (به فصل مربوط در همین مجموعه مراجعه شود).

۴ ــ۱ــ بهداشت کارکنان و دانش‌آموزان

به منظور پیشگیری از آلودگی نمونه‌ها، محیط‌های کشت آزمایشگاهی و خطر ابتلا به عفونت کارکنان و هنرجویان اقدامات زیر باید انجام شود :

✓ از روپوش، دستکش، کلاه و درصورت امکان کفش یکبار مصرف استفاده شود.

۱ــ Safety cabinet

✓ لباس آزمایشگاه باید خارج از محل کار و رخت کن پوشیده شود.

✓ ناخن‌ها باید تمیز و کوتاه نگه داشته شود.

✓ پیش و پس از انجام آزمون‌های میکروبی لازم است دست‌ها با آب ولرم و صابون مایع همراه با ماده سترون کننده مناسب مانند یدوفور[1] به خوبی شسته شوند. برای خشک کردن دست‌ها از یک خشک کن برقی یا دستمال و حوله یکبار مصرف استفاده شود.

✓ هنگام کار با نمونه‌ها، کشت‌ها و محیط‌های کشت از صحبت‌کردن، سرفه کردن و عطسه‌کردن خودداری شود.

✓ از خوردن، آشامیدن در آزمایشگاه و قراردادن مواد غذایی مورد مصرف در یخچال یا فریزر آزمایشگاه خودداری شود.

✓ از کشیدن سیگار در آزمایشگاه پرهیز گردد.

✓ از مکیدن مایعات آلوده و عفونت زا با پی‌پت، به وسیله دهان پرهیز شود.

✓ آزمون‌های آلوده‌کننده محیط باید به منظور جلوگیری از پراکندگی هاگ قارچ‌ها در اتاقک ایمنی انجام شود.

✓ ظرف های دارای محیط کشت میکروارگانیسم‌ها باید به طور واضح علامت گذاری شوند.

✓ هنگام جابه‌جایی تشتک‌هایی که داخل آنها بخار جمع شده و برای جلوگیری از انتشار آلودگی باید دقت عمل صورت گیرد.

✓ هنگام جابه‌جایی ظرف‌های شیشه‌ای باید دقت شود. اگر به هر دلیل ظرفی شکسته شود و محتوی آن روی لباس کار، میز کار آزمایشگاه یا سطوح دیگر ریخته شود، نسبت به زدودن آلودگی و سترون کردن محل هرچه زودتر اقدام نمود.

۵ــ۱ــ مقررات ایمنی

✓ هنگام وقوع هر حادثه‌ای نخستین هدف باید حفظ سلامتی فرد یا افراد مصدوم باشد. کمک‌های اولیه و اختصاصی پزشکی را باید در نظر گرفت واز حرکت دادن شخص مصدوم تا جای ممکن جلوگیری کرد.

✓ در صورت وجود و پراکندگی ذرات معلق در فضا لازم است منطقه آلوده ترک شود و تا زمان فرو نشستن ذرات روی زمین و سترون کردن محل از رفتن به آنجا خودداری شود.

✓ پس از وقوع هر حادثه باید گزارش کامل و جامعی با تمام جزییات واقعه تهیه و به مسئول مربوط ارائه شود.

✓ از قرار دادن مواد شیمیایی که احتمال واکنش بین مواد فرار آنها وجود دارد، خودداری شود.

✓ در نگهداری موادی که دارای بخارات سمی یا قابل اشتعال هستند دقت کامل به عمل آید.

✓ لوله‌های انتقال گاز از نظر امکان نشت مورد توجه قرار گیرد.

✓ از قرار دادن وسایل شکستنی و سنگین در قسمت‌های بالای قفسه‌ها جلوگیری شود.

✓ از علایم هشداردهنده در آزمایشگاه استفاده شود.

✓ هنگام استفاده از وسایل آزمایشگاهی به توصیه‌های سازنده توجه شود.

✓ هنگام کار با شعله گاز لازم است از ایجاد کوران جلوگیری به عمل آید و دقت شود که از خاموش شدن شعله نیز جلوگیری گردد.

✓ هنگام خروج از آزمایشگاه از بسته بودن شیر اصلی گاز، آب و خاموش بودن کلیه وسایل برقی بدون استفاده، اطمینان حاصل شود.

۱ــ Iodophore

فصل دوم

دستگاه‌ها و وسایل آزمایشگاه میکروبیولوژی

۱ــ۲ــ دستگاه‌ها و وسایل آزمایشگاه میکروب شناسی

وسایل آزمایشگاهی باید تمیز ودر محل مناسب نگهداری شوند و پیش از استفاده و طی زمان کاربری از سلامت و ایمنی آنها اطمینان حاصل شود. در ضمن هنگام انتخاب وسایل باید کاربری آسان،، سهولت تعمیر، تمیز کردن، سترون‌کردن و کالیبراسیون یا تنظیم آنها مورد توجه باشد.

۱ــ۱ــ۲ــ اتاقک‌های محافظ : منظور از اتاقک محافظ، یک محل کار با جریان هوای عمودی و افقی برای زدودن گرد و غبار و ذرات معلق مانند میکروب‌ها از هوا می‌باشد. برای اتاقک‌هایی که در میکروب‌شناسی به کار می‌روند تعداد ذرات معلق در هوا نباید بیش از ۴۰۰۰ در هر متر مکعب باشد. هنگام کار با پودرهای آلوده و میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا باید از اتاقک‌های ایمن استفاده کرد. (شکل ۱ــ۲)

شکل ۱ــ۲ــ اتاقک محافظ آزمایشگاه میکروب شناسی

نکته‌ها

✓ استفاده از شعله گاز در اتاقک‌های محافظ توصیه نمی‌شود و در صورت نیازمشعل گاز باید شعله کوچکی داشته باشد که سبب جریان شدید هوا نشود.

✓ از اتاقک‌های محافظ برابر با شرایط محیط آزمایشگاه و کاربرد مورد نظر استفاده شود. کارایی اتاقک‌های ایمن باید توسط افراد کارآمد و آزموده در فواصل زمانی معین مورد بررسی قرار گیرد.

✓ در اتاقک‌های محافظ نباید از وسایل اضافی استفاده شود. با وجود این لازم است پیش از انجام آزمون برای کم‌کردن حرکت دست به خارج و داخل اتاقک وسایل مورد نیاز را به نحوی درون آن قرار داد که اختلال در جریان هوا ایجاد نشود.

✓ پس از انجام آزمون، محیط کار بهتر است با استفاده از مواد سترون‌کننده غیر خورنده و مناسب سالم‌سازی شود (به فصل مربوطه در همین مجموعه مراجعه شود).

✓ شبکه‌های سیمی و فیلترها در اتاقک ایمن باید به طور منظم بازبینی شوند و با پارچه آغشته به مواد سترون‌کننده پاک شوند.

✓پس از تمیز کردن سطح می‌توان از لامپ‌های UV[1] (اشعه فرابنفش) برای سترون‌کردن هوا و سطوح استفاده نمود. برای آشنایی با مقررات انجام کار به فصل روش‌های سترون‌کردن مراجعه شود.

۲ــ۱ــ۲ــ ترازوها: ترازو ها بیشتر برای وزن‌کردن نمونه، مواد تشکیل‌دهنده محیط‌های کشت و واکنش‌گرها به کار می‌روند. علاوه بر آن ممکن است برای اندازه‌گیری حجم محلول‌های رقیق کننده برحسب جرم نیز به کار روند. نمونه مورد آزمون به مقدار مشخص وزن می‌شود و رقیق کننده به نسبت مورد نیاز به آن افزوده می‌شود. (به بخش تهیه رقت‌های متوالی مراجعه شود.)

دقت ترازوی آزمایشگاه میکروب شناسی باید مناسب با توزین‌های لازم باشد. دقت‌های حدود ۰/۰۱ یا ۰/۰۰۱ برای این منظور مناسب است. بیشینه خطای مجاز هنگام توزین نمونه باید کمتر از ۰/۰۰۱ باشد.

شکل۲ــ۲ــ ترازوی توزین با دقت ۰/۰۰۱

نکته‌ها

✓ ترازو را باید روی سطح افقی قرار داد و برای اطمینان از تراز بودن آنها را تنظیم کرد و از لرزش و کوران هوا حفاظت کرد.

✓ کارآیی ترازو باید به طور منظم در طی استفاده و پس از تمیز کردن با وزنه‌های کنترل و توسط افراد آزموده بررسی شود. کالیبراسیون باید در فواصل زمانی معین با توجه به کارکرد دستگاه انجام شود.

✓ ترازو را پس از استفاده یا ریختن مواد در حال توزین، لازم است با یک ماده پاک کننده مناسب و غیر خورنده، سالم سازی نمود.

✓ برای توزین نمونه‌ها ترازوی با حساسیت ۰/۱ تا ۰/۰۱ گرم و با مقدار ۲۰۰ گرم مورد نیاز است.

✓ ترازوها باید دارای گواهی کالیبراسیون از شرکت‌های معتبر باشند.

✓ کلیه وسایلی که برای توزین نمونه به کار می‌رود باید از پیش سترون شده باشد. بهتر است برای این منظور یک فویل آلومینیومی را روی سرپوش ظرف‌های شیشه‌ای که نمونه‌ها در آنها ریخته می‌شود قرار داد و ظرف و فویل را با هم استریل کرد. سپس فویل را برداشته روی ترازو قرار داد و از آن برای توزین نمونه روی ترازو استفاده نمود.

۳ــ۱ــ۲ــ همگن کننده، خرد کن[2] و مخلوط کن[3]: این دستگاه‌ها برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه از فرآورده‌های غیرمایع استفاده می‌شوند.

انواع همگن کننده‌ها عبارتند از :

الف) خردکن یا مخلوط کننده چرخشی[4]: با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه و ۴۵۰۰۰ دور در دقیقه با ظرف‌های در پوش شیشه‌ای یا فلزی قابل سترون کردن

ب) تکان دهنده‌های مکانیکی[5]: مناسب برای یکنواخت‌کردن محتوای ظرف‌ها

۱ــ Ultra Violet

۲ــ Blender

۳ــ Mixer

۴ــ Rotary homogenizer

۵ــ Mechanical homogenizer

پ) مخلوط کننده ضربه‌ای[1] : با کیسه‌های سترون و مجهز به وسیله تنظیم کننده سرعت و زمان

ت) مخلوط کننده ارتعاشی[2]

نکته‌های مهم در استفاده از مخلوط کن‌ها

✓ در مخلوط کن ضربه‌ای زمان مخلوط کردن برای مواد غذایی خاص به طور معمول ۱تا ۳ دقیقه می‌باشد.

یادآوری : از همگن‌کننده‌های ضربه‌ای برای آزمون فرآورده‌های غذایی زیر استفاده نشود :

۱ــ فرآورده‌هایی که احتمال سوراخ کردن کیسه را دارند.(دارای قطعات تیز، سخت و خشک)

۲ ــ فرآورده‌هایی که به دلیل داشتن بافت خاص یکنواخت کردن آنها مشکل است مانند سوسیس و کالباس خشک

✓ در مخلوط کن چرخشی تعداد چرخش‌ها باید بین ۱۵۰۰۰تا ۲۰۰۰۰ باشد. حتی با مخلوط کردن کند، این زمان نباید بیش از ۲/۵ دقیقه باشد.

✓ مخلوط کن ارتعاشی را می‌توان برای بیشتر مواد غذایی شامل فرآورده‌های سخت و خشک استفاده کرد. زمان مخلوط کردن به طور معمول۱ تا ۵ دقیقه باشد.

✓ مخلوط کن‌های ضربه‌ای و مخلوط کن‌های ارتعاشی را به طور منظم و پس از هر بار سرریز شدن مواد از کیسه یا نشت کردن مواد، باید تمیز و سترون کرد.

✓ ظرف شیشه‌ای یا فلزی مخلوط کن‌های چرخشی، پس از هر بار استفاده باید تمیز و سترون شود.

✓ این دستگاه‌ها را باید با دستورکار سازنده بررسی و نگهداری نمود.

✓ جهت یکنواخت کردن و هم‌زدن نمونه‌های رقیق شده بهتر است از لوله‌ها و ظرف‌های سرپوش‌دار استفاده کرد تا هنگام مخلوط کردن با همزن‌ها محتوی آنها به بیرون سرازیر نشود.

شکل۳ــ۲ــ خرد کن و مخلوط کن

شکل۴ــ۲ــ مخلوط کن ارتعاشی

ث) مخلوط کن گردابی (ورتکس)[3] : این دستگاه تهیه مخلوط یکنواختی از محیط کشت مایع (مانند رقت‌های متوالی که در فصل‌های بعدی شرح داده خواهند شد) و نمونه‌های مایع و یا سوسپانسیون سلول‌های باکتری در یک مایع را آسان می‌کند. در این دستگاه مخلوط کردن با واسطه حرکت چرخشی گریز از مرکز محتویات لوله یا ظرف، انجام می‌شود و چرخش گرداب مانند به وجود می‌آورد.

۱ــ Peristaltic blender

۲ــ Vibrator

۳ــ Vortex

شکل۵ــ۲ــ مخلوط کن گردابی

برای کار با ورتکس باید لوله یا ظرف های دارای مایع را برای مخلوط کردن به سر مخلوط کن فشار داد. سرعت مخلوط کردن به وسیله تغییر سرعت موتور یا زاویه تماس با سر مخلوط کن کنترل می‌شود.

نکته‌ها

✓ هنگام مخلوط کردن لازم است از سر ریز شدن محتوی لوله یا ظرف‌ها اطمینان حاصل شود. برای این منظور نباید بیش از دوسوم گنجایش آنها پر شود. برای کنترل بهتر لوله و جلوگیری ازبالا رفتن بیش از حد مایع درون لوله، باید آن را ازحدود یک سوم بالای لوله نگه داشت.

✓ پس از مخلوط کردن، برای کاهش انتشار گرد و غبار در هوا، در پوش ظرف یا لوله را باید با احتیاط باز کرد.

یادآوری : مشاهده گرداب در مایع درون لوله، از سر تا ته آن نشان دهنده کافی بودن مخلوط کردن است.

شکل۶ــ۲ــ اتوکلاو

۴ــ۱ــ۲ــ اتوکلاو[1] : اتوکلاوها برای سترون کردن وسایل و موادی به کار می‌روند که ممکن است توسط میکروارگانیسم‌های خطرناک گروه ۱و۲ و۳ آلوده شده باشند. استاندارد حاضر، اتوکلاوهای مورد استفاده برای سترون کردن مواد آلوده شده توسط میکروارگانیسم‌های خطرناک گروه ۴ را که در مورد آنها کنترل و سترون کردن کامل ضروری می‌باشد، در بر نمی‌گیرد. اتوکلاو دستگاهی است که باعث ایجاد بخار آب اشباع شده و فشرده درون یک محفظه می‌شود و برای از بین بردن میکروارگانیسم‌ها چه سلول‌های رویشی و چه آندوسپور باکتری‌ها به کار می‌رود.

کاربردهای مهم اتوکلاو شامل :

الف) سترون کردن مایعات و محیط‌های کشت

ب) سترون کردن وسایل و ظرف‌های شیشه‌ای و فلزی

پ) ایمن سازی مواد و وسایل آلوده

الف) سترون کردن مایعات : فرآیند سترون کردن مواد مایع مانند محیط‌های کشت و رقیق کننده‌ها در ظرف‌های مختلف مانند ارلن، لوله‌های آزمایش و ظرف‌های شیشه‌ای. هنگام آزمون‌های میکروبی باید کلیه محیط‌های کشت و رقیق‌کننده‌ها عاری از هر نوع میکروب باشند. از مهمترین مراحل آماده‌سازی محیط های کشت سترون سازی آنها است که توسط اتوکلاو این کار انجام می‌شود.

نکته : چون برخی از اجزای تشکیل‌دهنده محیط‌های کشت، نسبت به گرما حساس هستند، کنترل‌های زمان و دمای اتوکلاو کردن باید به نحوی باشد که استفاده کننده بتواند ویژگی‌های دوره کاری را هر بار انتخاب کند. دستورکار سازنده این‌گونه محیط‌ها نیز باید مورد توجه قرار گیرد.

ب) سترون کردن وسایل و ظرف‌های شیشه‌ای : فرآیندی که به سترون کردن وسایل جامد تمیز محدود می‌شود. مانند سترون‌سازی همه وسایل شیشه‌ای یا فلزی که پیش از انجام آزمون‌های میکروبی باید انجام شود. مانند سترون‌سازی لوله‌های آزمایش، بطری‌ها و ارلن‌ها.

پ) ایمن سازی مواد و تجهیزات آلوده : عبارت است از فرآیند کاهش میکروب‌ها، به نحوی که بتوان آنها را بدون ترس از

۱ــ Autoclave

احتمال خطر عفونت یا آلودگی محیطی مورد استفاده قرار داده یا جا به جا نمود. این موارد ممکن است شامل ظرف‌های یکبار مصرف باشد که باید دور ریخته شوند ، برای نمونه لوله‌های دارای نمونه (لوله آزمایش پلاستیکی) و تشتک‌های دارای محیط کشت میکروبی ممکن است شامل مواردی برای تمیز کردن، سترون‌کردن و استفاده دوباره باشند ، مانند ظرف‌های شیشه‌ای و فلزی.

● ***طراحی محل نصب***

ــ اتوکلاوها بیشتر سنگین و حجیم می‌باشند. بنابراین هنگام انتخاب محل برای نصب آنها باید قابلیت دسترسی به دستگاه وکاربری آسان آن مورد توجه قرار گیرد. همچنین ظرفیت اتوکلاو، فضای محل نصب، طراحی محل بارگذاری و نحوه بارگذاری (از قسمت جلو یا بالا) نیز باید در نظر گرفته شود.

ــ اتوکلاوها باید به نحوی نصب شوند که سرویس آنها آسان باشد. نصب اتوکلاو در نزدیکی یک دیواره خارجی موجب سهولت تخلیه و تهویه می‌گردد.

ــ اتوکلاوهای ویژه سترون کردن مواد آلوده باید به راحتی در دسترس بوده و در داخل یا نزدیکترین فاصله ممکن به منطقه‌ای قرار گیرند که مواد آلوده باید بررسی و سامان دهی شوند.

نکته : توصیه می‌شود از جابه جایی مواد آلوده و عبور دادن آنها از اتاق‌هایی که این‌گونه مواد در آنها نگهداری نشده یا روی آنها کاری صورت نمی‌گیرد ، خودداری شود.

ــ نصب اتوکلاو در محلی که در آن محیط‌های میکروبیولوژی تهیه می‌شوند، ضروری می‌باشد. دسترسی به محل بارگذاری و تخلیه مواد ، مایعات و لوازم سترون شده (مواد دورریختنی آلوده را شامل نمی‌شود) باید به طورمستقیم از محل تهیه محیط‌های کشت صورت گیرد.

● ***گرما و تهویه :*** اتوکلاوها پس از یک دوره کاری و به هنگام خالی‌کردن، مقداری بخار، گرما و بوی نامطلوب در فضا پخش می‌کنند. بنابراین برای حفظ جریان هوای مطلوب در نزدیکی اتوکلاو ، تهویه مکانیکی ضروری می‌باشد. در طراحی سیستم تهویه باید بازده انرژی اتوکلاو و تأثیر آن بر محیط کار ، مورد توجه قرار گیرد.

قسمت‌های مختلف دستگاه اتوکلاو

الف) دریچه اطمینان

ب) شیر تخلیه آب

پ) شیر خروجی بخار

ت) شیر ورودی هوای فشرده

ث) وسیله تنظیم دما و حفظ آن تا $\pm 3^{\circ}C$

ج) دماسنج یا ترموکوپل ثابت

چ) فشارسنج

به علاوه اتوکلاو بهتر است به ثبت کننده دما و زمان مجهز باشد.

هنگام کار با اتوکلاو باید به موارد زیر توجه کرد :

۱ــ هنگام سترون سازی با بخار آب لازم است تمام هوای موجود در دستگاه را پیش از بالا رفتن فشار از دستگاه خارج کرد، در غیر این صورت دمای لازم تأمین نمی‌شود.

۲ــ دمای بخار آب اشباع شده در محفظه باید حداقل $121^{\circ}C$ باشد.

۳ــ فشار بخار آب باید ۱۵ پوند بر اینچ مربع باشد.

۴ــ هنگامی‌که دمای اتوکلاو به $121^{\circ}C$ رسید زمان سترون کردن آغاز می‌شود. اگر هوای داخل اتوکلاو به خوبی خارج نشود، گرچه ممکن است فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع باشد اما ممکن است دما به $121^{\circ}C$ نرسد.

۵ ــ باید مراقب بود در محفظه اتوکلاو آب به‌اندازه کافی وجود داشته باشد در غیر این صورت مواد و اجزای داخل آن آسیب می‌بیند.

۶ــ برای سترون سازی مایعات به ویژه محیط های کشت مایع، بهتر است آنها را در ظرف‌های شیشه‌ای در پوش دار سالم‌سازی نمود.

۷ــ پس از مدت طولانی کار با اتوکلاو، مواد آلی و معدنی در محفظه ته‌نشین می‌شوند و بهتر است هر دو یا سه ماه یکبار مقداری آب در اتوکلاو ریخته و اتوکلاو را به دمای جوش رسانده، شیر تخلیه اتوکلاو را باز نگه داشت تا مواد ته نشین شده خارج شود.

نکته‌های ایمنی هنگام کار با اتوکلاو

✓ از اتوکلاو نباید برای سترون‌سازی وسایل تمیز و محیط های کشت آماده شده، همراه با وسایل آلوده به طور همزمان استفاده شود.

✓ وسایل و مواد داخل اتوکلاو تا رسیدن به دمای کمتر از $80^{\circ}C$ نباید از آن خارج شود.

✓ هنگام باز کردن درب اتوکلاو بهتر است کاربر در یک طرف بایستد و درب را طوری باز کند که بخار به صورت او بر خورد نکند.

✓ اگر داخل محفظه، ظرف‌ها دارای مواد مایع باشند، کاهش ناگهانی فشار باعث جوش آمدن آنها شده و در پوش آنها با شدت به خارج پرتاب می‌شود. بنابراین فشاررا به ویژه هنگام سترون سازی مایعات باید به تدریج کاهش داد و یا از هوای فشرده استفاده کرد.

✓ هنگام پایان کار اتوکلاو پیش از خروج لوازم و محیط‌ها بهتر است از جدا بودن سیم برق از دستگاه اطمینان حاصل شود.

رعایت نکته‌های لازم هنگام پایان عمل سترون سازی و باز کردن درب اتوکلاو

الف) اطمینان از بسته بودن دریچه ورودی بخار

ب) بسته نگاه داشتن شیر خروجی بخار تا زمانی که فشار به صفر برسد.

پ) پس از سترون سازی و پیش از جابه جایی مواد و وسایل بهتر است درون اتوکلاو خنک شوند.

نگهداری و کالیبراسیون اتوکلاو : محفظه داخلی دستگاه، فیلتر، شیر تخلیه آب و درزگیرهای دستگاه را باید به طور منظم تمیز کرد. اتوکلاو باید در وضعیت مطلوب نگهداری شود و به طور دائم عملکرد آن ارزیابی شود. بهتر است حس‌گرهای دما به منظور نشان دادن نفوذ کافی به مقدارلازم در جاهای گوناگون دستگاه قرار داده شوند.

۵ ــ۱ــ۲ــ گرمخانه یا انکوباتور[۱] : گرمخانه، همانطور که در شکل (۷ــ۲) نشان داده شده، عبارت است از اتاقک عایق‌بندی شده با قابلیت نگهداری دمای ثابت و توزیع یکنواخت دما با کمترین خطای مجاز در مقدار نوسانات دمایی تعیین شده است که برای کشت و نگهداری میکروارگانیسم‌ها در شرایط دمایی خاص به کار می‌رود. هر گرمخانه باید مجهز به یک ترموکوپل باشد تا دما یا سایر متغیرها را در کل حجم‌کاری ثابت نگه دارد. اگر دمای محیط نزدیک یا بالاتر از دمای گرمخانه باشد لازم است به یک سیستم خنک‌کننده نیز مجهز باشد.

۱ــ Incubator

نکته‌ها

✓ دیواره‌های گرمخانه باید از تابش نور خورشید محافظت شوند.

✓ در صورت امکان در هر دوره کار با گرمخانه، محفظه را باید به طور کامل پر کرد زیرا محیط‌های کشت برای رسیدن به دمای تعادل زمان طولانی و حدود ۲ ساعت را طی می‌کنند تا به دمای مورد نظر برسند.

✓ چیدمان تشتک‌ها[1] در گرمخانه باید به گونه‌ای باشد که فاصله بین آنها و دیواره گرمخانه از ۲/۵ سانتی‌متر کمتر نباشد.

✓ اتاقک های گرمخانه باید به خوبی عایق بندی شوند و مجهز به سیستم پخش دما وگردش هوا باشند.

✓ از باز گذاشتن درب گرمخانه به مدت طولانی باید خودداری شود.

✓ گرمخانه باید در مکانی قرار گیرد که در مواقع مختلف سال دمای آن بین ۲۷ـ۱۶ درجه سانتی‌گراد باشد.

✓ میزان رطوبت داخل گرمخانه باید کمتر از حدی باشدکه باعث کندانسه شدن یا تراکم قطره‌های آب روی ظرف‌ها و کشت‌های میکروبی شود. از طرفی رطوبت باید در حدی باشد که ظرف‌های دارای محیط کشت آگار بیش از ۱۵٪ رطوبت خود را در مدت ۴۸ ساعت از دست ندهند.

شکل۷ـ۲ـ نوعی گرمخانه ویژه آزمایشگاه میکروب شناسی مواد غذایی

✓ دیواره‌های درونی و بیرونی گرمخانه به طور منظم تمیز و بهسازی شود و گرد و غبار از سیستم تهویه آن پاک شود.

✓ برای کنترل دمای داخل گرمخانه دماسنجی باید در محل مناسب داخل گرمخانه قرار داده شود و محدوده عملکرد قابل قبول گرمخانه تعیین گردد.

✓ دمای گرمخانه را باید هر روز کنترل نمود. برای این منظور باید در هر گرمخانه یک یا چند دماسنج که حباب آن درون ظرف دارای گلیسرول باشد قرار داد.

✓ تشتک‌ها باید به صورت وارونه در داخل گرمخانه قرار گیرند یعنی درپوش آنها بر روی سطح قرار داشته باشد و پشت آنها به بالا. این کار از کندانسه شدن قطره‌های بخار آب در داخل آنها جلوگیری می‌کند.

۶ـ۱ـ۲ـ یخچال : یخچال وسیله‌ای برای نگهداری نمونه‌ها در دمای پایین است. دمای نگهداری مواد مورد آزمون به جز در موارد خاص، باید $2^{\circ}C$- تا $3^{\circ}C$ باشد. برای پیشگیری از آلودگی‌های ممکن و به منظور جداسازی فیزیکی، از اتاقک های مختلف یا ظرف های مختلف برای نگهداری موارد زیر استفاده می‌شود :

الف) محیط های کشت تلقیح نشده، رقیق کننده‌ها و معرف‌ها

ب) نمونه‌های مواد غذایی

پ) کشت‌های میکروبی

بهتر است نمونه‌های میکروبی و آلوده را در یک یخچال و نمونه‌های سالم و محیط های کشت سترون شده را در یخچال دیگری قرار داد.

نکته‌ها

✓ دمای داخل یخچال را باید با یک دماسنج که به طور ثابت نصب شده است کنترل کرد.

✓ پیش از قرار دادن تشتک ها ونمونه‌ها در یخچال سطح آن باید با پنبه و الکل اتیلیک ۷۰٪ تمیز و سالم سازی شود.

✓ وسایل را باید به گونه‌ای در یخچال قرار داد که گردش هوای مناسب ایجاد شده و خطر آلودگی کم شود.

۱ـ Petridishe

۷ــ۱ــ۲ــ فریزر : فریزر اتاقکی است که نگهداری مواد در شرایط منجمد را امکان‌پذیر می‌سازد و دمای آن جز در موارد مشخص شده باید کمتر از $-18^{\circ}C$ باشد.

فریزر جهت نگهداری موارد زیر به کار می‌رود :

الف) واکنش‌گرهای تلقیح نشده

ب) نمونه‌های مورد آزمون

پ) کشت میکروارگانیسم‌ها

وسایل را باید به گونه‌ای در فریزر قرار داد تا دمای مورد نظر حفظ شود، به ویژه وقتی فرآورده‌های غیر منجمد در آن قرار داده می‌شود.

۸ ــ۱ــ۲ــ حمام مایع[1] یا بن ماری : حمام با دمای ثابت که با یک مایع مانند آب یا اتیلن گلایکول یا روغن پر می‌شود و دارای درب جهت محدود ساختن تبخیر است و به منظور ثبت دمای مشخص به کار برده می‌شود. حمام‌های درپوش دار برای دماهای بالاتر استفاده می‌شوند. درپوش آن به گونه‌ای طراحی شده که مانع چکیدن قطره‌های ناشی از بخار آب بر روی وسایل درون آن شود.

حمام مایع در موارد زیر کاربرد دارد :

شکل ۸ ــ۲ــ بن ماری

الف) گرمخانه‌گذاری محیط‌های کشت تلقیح شده که باید در دمای ثابت قرار داده شوند.

ب) نگهداری محیط‌های کشت جامد سترون و ذوب شده پیش از ریختن آنها در تشتک.

پ) تعدیل دمای محیط کشت جامد ذوب شده و سترون برای استفاده در تهیه برخی از محیط‌های کشت مانند محیط کشت آگار خوندار که ابتدا محیط کشت آگار آماده شده و سترون شده باید در حمام مایع به دمای معین برسد و سپس خون به محیط آگار افزوده شود.

ت) آماده سازی سوسپانسیون‌های اولیه یا محلول‌ها در دمای کنترل شده

نکته‌ها

✓ در صورت ضرورت کنترل دقیق دما، حمام باید به پمپ گردش آب و سیستم تنظیم کننده دمای خودکار مجهز باشد.

✓ حرکت مایع درون حمام نباید به گونه‌ای باشد که سبب پاشیده شدن قطره‌های آب به اطراف شود.

✓ محیط‌های کشت تلقیح شده را باید به گونه‌ای در حمام قرار داد که حداقل ۲ سانتی‌متر پایین‌تر از سطح مایع درون حمام باشد.

✓ عمق مایع حمام اندازه‌ای باشدکه آب از در پوش ظرف‌ها وارد آنها نشود.

✓ برای نگهداری وسایل درون حمام می‌توان از نگهدارنده‌ها استفاده کرد.

✓ ظرف‌ها و وسایلی که از حمام خارج می‌شوند باید پیش از استفادهٔ بعدی خشک شوند. بهتر است پس از خروج از حمام و پیش از استفاده دوباره خشک شوند.

۱ــ Control bath

✓ دمای حمام باید با استفاده از یک دماسنج یا ترموکوپل تنظیم وتثبیت شود.

✓ برای نگهداری محیط‌های کشت بهتر است از آب مقطر استفاده شود.

✓ هنگام تماس با مایع درون حمام بهتر است از قطع برق سیستم اطمینان حاصل کرد.

✓ سطح مایع حمام برای اطمینان از کارکرد درست و شناوری صحیح وسایل قرار گرفته در آن بایدبه طور منظم کنترل شود. سطح مایع باید همیشه المنت‌های گرم کننده را بپوشاند.

یادآوری : حمام مایع بهتر است با مایعی که کارخانه سازنده آن توصیه کرده پر شود و به طور منظم سطح مایع درون آن کنترل شود.

۹ــ۱ــ۲ــ آون‌سترون‌سازی[1] : اتاقکی است که قابلیت تثبیت دمای C°۱۸۰ــ۱۶۰ و خشک را برای از بین بردن میکروارگانیسم‌ها دارد. آون باید مجهز به یک دماسنج یا ترموکوپل و نشانگر زمان باشد. آون تنها برای سترون‌سازی وسایل مقاوم به گرمای خشک، مانند وسایل فلزی (جای پیپت‌ها و جای لوله‌های آزمایش) وشیشه‌ای (ارلن، بشر، استوانه‌های مدرج و پیپت‌ها) استفاده می‌شود.

نکته‌ها

✓ پیش از سترون سازی وسایل، لازم است به خوبی تمیز شوند.

✓ وقتی شرایط دمایی بر قرار شد، روند سترون سازی باید برای مدت کمتراز ۱ ساعت در دمای C °۱۷۰ ادامه یابد.

✓ پس از سترون‌سازی به منظور پیشگیری از شکستن ظرف‌های شیشه‌ای بهتر است پیش از خارج کردن آنها از آون، آنها را خنک کرد.

یادآوری : برای برداشتن ظرف های سترون شده و داغ باید از دستکش های ویژه استفاده کرد.

شکل ۹ــ۲ــ آون سترون‌سازی

۱۰ــ۱ــ۲ــ پرگنه شمار[2] : دستگاه های شمارشگر دستی هستند که دارای یک وسیله شمارشگر حساس به فشار و یک شمارنده دیجیتال می باشند که با هر فشار پشت تشتک یک صدای خفیف ایجاد می‌کند. همانطور که در شکل (۱۰ــ۲) نشان داده شده است این دستگاه‌ها ممکن است یک وسیله ساده مانند قلم یا یک صفحه مدرج نورانی برای تشتک همراه با بزرگ نمایی تصویر برای کمک به شمارش پرگنه‌ها یا کلنی ها باشند. شمارشگرهای کلنی الکترونیکی خودکار (دیجیتال)که تصویر ایجاد شده را ثبت می‌کنند به وسیله ترکیبی از سیستم‌های سخت افزاری و نرم افزاری با استفاده از دوربین و نمایشگر عمل می‌کنند. پرگنه شمار همانطور که از نامش مشخص است وسیله‌ای برای شمارش پرگنه‌های باکتری ها در محیط های کشت میکروبی است.

شکل ۱۰ــ۲ــ نوعی پرگنه شمار

۱ــ Sterilizing oven

۲ــ Colony counter

پرگنه شمار دستی از یک ذره‌بین، صفحه مدورتقسیم شده به اشکال مربع شکل، شمارشگر و یک لامپ برای روشن شدن محیط تشکیل شده است. تشتک مورد نظر بر روی صفحه مدور قرار گرفته، لامپ روشن می‌شود و فرد شمارش کننده با فشار انگشت روی دگمه شمارشگر موجب ثبت تعداد پرگنه‌ها روی نمایشگر می‌شود. وجود اشکال مربع شکل موجب دقت بیشتر و جلوگیری از خطا در شمردن پرگنه‌ها می‌گردد.

نکته‌ها

✓ پیش از انجام کار حساسیت شمارشگر کلنی خودکار را تنظیم کرده تا از شمارش تمام کلنی‌های مورد نظر اطمینان حاصل شود.

✓ شمارشگر کلنی خودکار باید هر روز با استفاده از یک تشتک کالیبره شده با تعداد مشخص ذرات یا کلنی‌های شمارش شده، کنترل شود.

✓ برای اطمینان از دقیق بودن شمارش‌های به دست آمده از پرگنه شمار، شمارش‌ها باید در فواصل منظم به صورت دستی کنترل گردد.

✓ دستگاه باید به طور دایم تمیز و از آلوده شدن به گرد و غبار حفظ شود.

۱۱ــ۱ــ۲ــ سانتریفوژ[1] : سانتریفوژها وسایل مکانیکی یا الکتریکی هستند که با استفاده از نیروی گریز از مرکز، ذرات معلق، مانند میکروارگانیسم‌ها را از مایعات جدا می‌کنند. در برخی موارد حذف آب محیط میکروارگانیسم‌ها به صورت ایجاد رسوب به وسیله سانتریفوژ کردن نمونه‌های مایع انجام می‌شود و این مایع دوباره رقیق شده و برای آزمون‌های بعدی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

شکل ۱۱ــ۲ــ سانتریفوژ

نکته‌ها

✓ برای پیشگیری از تولید آئروسل‌ها (ذرات موجود در گرد و غبار) و اثر آلودگی‌های مواد و وسایل روی هم از راه کاربرد درست سانتریفوژ باید اقدامات لازم انجام گیرد.

✓ باید از لوله‌ها و ظرف‌های ویژه سانتریفوژ که درب دار و سترون شده هستند، استفاده شود.

✓ در مواردی که سرعت سانتریفوژ دارای اهمیت است و یا برای موارد ویژه، میزان آن مشخص شده، بهتر است سرعت سانتریفوژ به طور منظم و پس از هر بار تغییر دوباره کالیبره شود.

✓ پس از هر بار استفاده از سانتریفوژ برای نمونه‌های میکروبی بهتر است سانتریفوژ تمیز و سترون شود.

۱۲ــ۱ــ۲ــ وسایل کشت در شرایط اتمسفر تغییر یافته[2] **:**

جار بی هوازی[3] : این وسیله ممکن است یک جار غیر قابل نفوذ یا هر وسیله مناسب دیگری باشد که بتواند به‌ایجاد شرایط اتمسفر تغییر یافته (مانند شرایط بی‌هوازی برای باکتری‌های بی‌هوازی) در طی مدت گرمخانه‌گذاری محیط کشت کمک کند. ترکیب اتمسفر می‌تواند به وسیله افزودن مخلوطی از گازها پس از تخلیه هوای جار و جایگزینی اتمسفربا استفاده از سیستم گاز ساز[4]

۱ــ Centrifuge

۲ــ Modified atmosphere

۳ــ Anaerobic Jar

۴ــ Gas pack

یا به طور بسیار ساده‌تر از راه روشن کردن یک شمع در جار و بستن درب آن انجام شود. (شمع تا زمانی روشن می‌ماند که داخل جار اکسیژن موجود باشد.)

یادآوری: این روش نمی‌تواند شرایط بی هوازی مطلق به‌وجود آورد و توان آن تا ایجاد شرایط بی هوازی اختیاری است.

طرز کار بسته گاز: این بسته ها دارای پوشش‌های پخش‌کننده گازی و پودر پالادیوم (کاتالیزور) است. برای استفاده از این بسته، تشتک‌های کشت شده درون جار قرار داده می‌شوند و با توجه به‌اندازه جار ممکن است ۱تا ۳پوشش پخش‌کننده گازی برای ایجاد شرایط بی‌هوازی استفاده شود. همانطور که در شکل (۱۲ــ۲) نشان داده شده است،این پوشش‌ها باز شده و به صورت عمودی در جار قرار داده می‌شوند. سپس ۱۰ میلی لیتر آب مقطر به آنها اضافه می‌شود و در نهایت درپوش جار بسته می‌شود. آب در پوشش با یک قرص سدیم بور هیدرید واکنش می‌دهد و هیدروژن تولید می‌کند و هیدروژن با اکسیژن ترکیب شده (در حضور کاتالیزور پالادیوم) و آب تولید می‌کند و اکسیژن از محیط حذف می‌شود. به علاوه پوشش پخش کننده دارای سدیم بی‌کربنات به اضافه اسیدسیتریک است که در حضور آب تولید CO_2 می‌کنند. دی‌اکسیدکربن برای رشد برخی از باکتری‌های بی هوازی تحریک کننده رشد است. در آخر سیستم جار آماده شده در گرمخانه قرار می‌گیرد.

شکل ۱۲ــ۲ــ جار بی هوازی همراه با بسته‌های گاز ساز

۱۳ــ۱ــ۲ــ توزیع کننده درون تشتک[1]: این دستگاه برای توزیع نمودن مایع، نمونه رقیق شده و نمونه یکنواخت شده بر روی یک محیط کشت جامد و سپس شمارش کلنی‌ها پس از گرمخانه گذاری به کار می‌رود. ابتدا حجم از پیش تعیین شده مایع را از بالای سطح یک تشتک آگار در حال چرخش در آن می‌ریزند.

بر طبق شکل (۱۳ــ۲) توزیع مایع به وسیله حرکت از مرکز تشتک به طرف لبه خارجی با افزایش شعاع چرخش می‌باشد. حجم توزیع شده در نتیجه توزیع با سوزن‌های متحرک از مرکز به لبه تشتک کاهش می‌یابد. بنابراین بین حجم تلقیح شده و شعاع چرخش رابطه معکوس وجود دارد. در این حالت کلنی باکتری‌ها در امتداد خطوطی که مایع تلقیح شده است، رشد می‌کنند. تعداد کلنی‌ها در یک محدوده شناخته شده با استفاده از یک صفحه شمارش خط‌کشی شده که همراه با دستگاه می‌باشد، شمارش می‌شود.

شکل ۱۳ــ۲ــ توزیع کننده درون تشتک

نکته‌ها

- ✓ سطح تشتک‌های جامد استفاده شده با تشتک پرکن اسپیرال باید تراز و عاری از حباب هوا باشد.
- ✓ برای اطمینان از حذف رطوبت اضافی تشتک‌ها، پیش از استفاده باید آنها را خشک کرد.
- ✓ پیش از نمونه‌برداری و پس از استفاده بهتر است با آب سترون شده تمیز شود.

۱۴ــ۱ــ۲ــ دستگاه آب مقطرگیری[2]: دستگاهی است که برای تهیه آب مقطر یا آب بدون مواد معدنی یا یون با کیفیت مورد

۱ــ Spiral platter

۲ــ Water distillator

نیاز برای تهیه محیط‌های کشت میکروبیولوژی یا واکنش‌گرها و سایر کاربردهای آزمایشگاهی به کار می‌رود. قابلیت هدایت آب باید هنگام استفاده یا پس از ذخیره‌سازی در حد مطلوب نگهداری شود و به طور منظم کنترل شود.

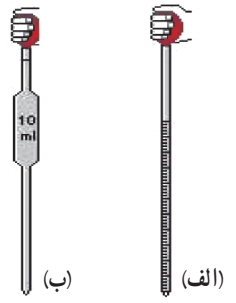
نکته : دستگاه آب مقطرگیری باید با توجه به سختی آب ورودی، در یک دوره زمانی خاص تمیز و رسوب زدایی شود.

۲ــ۲ــ وسایل آزمایشگاهی

۱ــ۲ــ۲ــ پی‌پت[1] : پی‌پت‌ها وسایل شیشه‌ای یا پلاستیکی یک بار مصرف هستند که برای جابه‌جایی حجم‌های معین مواد مایع یا غلیظ به کار می‌روند، پی‌پت‌های مدرج حجم‌های مشخص را با دقت مربوطه جابه جا می‌کنند.

در آزمایشگاه‌ها از دو نوع پی‌پت استفاده می‌شود :

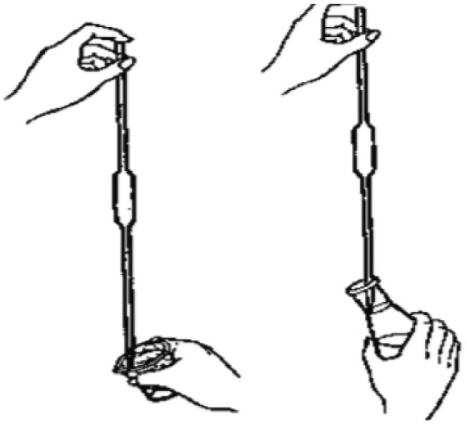
الف) پی‌پت حباب دار : یک پی‌پت حباب دار دارای مخزنی است که گنجایش پی‌پت روی آن نوشته شده است. همان‌طور که در شکل (۱۴ــ۲ــ ب) نشان داده شده است در بالای حباب در قسمت باریک خط نشانه (به صورت دایره سفیدرنگی) وجود دارد که باید پی‌پت را تا این خط نشانه پُر کرد. پی‌پت حباب‌دار برای برداشتن حجم‌های استاندارد مانند ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و... میلی‌لیتر به کار می‌رود.



شکل ۱۴ــ۲ــ الف) پی پت ساده، ب) پی‌پت حباب‌دار

ب) پی‌پت ساده : مانند بورت درجه‌بندی شده است و صفر آن در بالا قرار دارد و باید آن را مانند بورت روی درجه صفر تنظیم و تا آخر خالی کرد. پی‌پت مدرج برای برداشتن حجم‌های غیراستاندارد مانند ۳ میلی لیتر یا حجم‌های ممیزدار مانند ۲ و نیم و غیره به کار می‌رود.

طرز استفاده از پی‌پت : همانطور که در شکل (۱۵ــ۲) نشان داده شده است، برای پر کردن پی‌پت، نخست باید نوک آن را در قسمت زیر سطح و نزدیک ته محلول قرار داد تا هنگام مکیدن محلول هوا داخل پی‌پت نشود. زیرا در این صورت محلول به سرعت بالا می‌آید و وارد دهان می‌شود (در صورت کم بودن حجم محلول در ظرف). وقتی سطح محلول درون پی‌پت حدود ۲ میلی لیتر از خط نشانه گذشت، باید دهانه پی‌پت را با انگشت بست و آن را با ظرف محلول بالا آورد تا هم سطح چشم شود و به طور عمودی نگاه داشت. با کم کردن فشار انگشت، قطره قطره، زیادی محلول را خارج کرده تا سطح زیرین مایع به خط نشانه برسد و در این وضعیت دوباره با فشار انگشت بر دهانه پی‌پت، مانع خارج شدن مایع شد. سپس باید نوک پی‌پت را از محلول خارج کرد و در ظرفی که محلول در آن باید ریخته شود قرار داد. برای خالی کردن پی‌پت، فشار انگشت را باید کم کرد. هنگام خارج کردن پی‌پت از ظرف دوم، ظرف را باید کج کرد و نوک پی‌پت را در جایی که محلول نباشد، به جداره ظرف تماس داد. به‌این ترتیب قسمتی از مایع که در نوک پی‌پت مانده خارج می‌شود. برای خارج کردن این قسمت از مایع نباید به داخل پی‌پت فوت کرد.


شکل ۱۵ــ۲ــ طرز استفاده از پی پت

نکته : از پی‌پت‌ها باید برای جابه‌جایی مواد مایع یکنواخت شده و سوسپانسیون‌های میکروبی استفاده شود. چنانچه‌این کار از پیش انجام نشده باشد لازم است ده بار پی‌پت را در جا و با احتیاط پر وخالی کرد تا یکنواخت شود.

۱ــ Pipete

شکل ۱۶ــ۲ــ پیپتور

۲ــ۲ــ۲ــ پی‌پت پرکن : دستگاه بسیار ساده‌ای است که دارای یک مخزن مایع و یک پی‌پت دو راهه است. به طوری که با کشیدن پیستون مایع از یک راه وارد پی‌پت شده و با فشردن پیستون از راه دیگر خارج می‌شود. از پیپتور برای سرعت عمل و انتقال حجم معین از مواد مایع ویژه یا سمی‌استفاده می‌شود.

زمانی که نمونه مورد آزمون آلوده است، برای برداشتن مایعات سمی نباید با مکیدن پی‌پت از راه دهان حجم مورد نظر را برداشت، بلکه بهتر است از مکنده یا پوآر استفاده کرد.

روش استفاده از مکنده پلاستیکی: مکنده پلاستیکی دارای ۳ کلید A ،S و E است که پس از نصب پی‌پت در محل خود بر روی مکنده مانند شکل(۱۷ــ۲)، برای برداشتن مقداری ازمواد مایع به ترتیب زیر استفاده می‌شود :

شکل ۱۷ــ۲ــ مکنده

الف) کلید A و حباب لاستیکی را فشار داده تا هوا خارج شود.

ب) پی‌پت را وارد ظرف محتوی مایع کرده و وقتی سر پی‌پت به‌اندازه کافی داخل مایع شد کلید S را به آرامی فشار دهید تا بر اثر مکش حباب که در مرحله اول فشرده و خالی شده، مایع وارد پی‌پت شده و بالا بیاید (نباید مایع وارد مکنده شود).

پ) پس از این که به‌اندازه لازم مایع وارد حباب شد پی‌پت را وارد ظرفی که باید مایع داخل آن خالی شود نموده و کلید E را فشار دهید تا مایع داخل پی‌پت خالی شود.

نکته‌ها

✓ پی‌پت‌های آسیب دیده و شکسته باید دور انداخته شود.

✓ برای پیشگیری از آلودگی سر پی‌پت‌های مدرج و ساده لازم است سرهای پی‌پت‌ها و پیپتورها با پنبه غیر جاذب، پنبه گذاری شود.

✓ در آزمایشگاه میکروبیولوژی غیر از جابه جایی مواد مایع غیر آلوده، برای مکش نباید از دهان استفاده شود.

✓ پی‌پت‌ها باید در جای ویژه نگهداری پی‌پت که از جنس فولاد زنگ نزن یا آلومینیوم است نگهداری شوند و هنگام سترون‌سازی پی‌پت‌ها درون جا پی‌پتی قرار داده شده و در آون با دمای ۱۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت سترون شوند.

✓ پس از استفاده از پی‌پت‌ها به ویژه هنگام کار با مواد مایع آلوده باید از طرف نوک آنها را در یک استوانه مدرج بزرگ که دارای محلول سترون کننده است قرار داد تا تمیز و سالم سازی شده، سپس درون آون سترون گردند.

۳ــ۲ــ۲ــ دماسنج[۱] : دماسنج وسیله‌ای است که برای پایش دما در محدوده فعالیت‌های آزمایشگاهی به کار می‌رود. در بیشتر موارد از یک لوله شیشه‌ای که دو طرف آن بسته و در قسمت پایین آن حبابی پر از جیوه یا الکل قرار دارد تشکیل می‌گردد، برای مدرج ساختن آن، دماسنج جیوه‌ای را در کنار دریا در ظرف بخار آبی که در حال جوش است قرار می‌دهند، جیوه بر اساس خاصیت انبساط

۱ــ Thermometer

اجسام در اثر گرما در لوله بالا می‌رود و در نقطه‌ای می‌ایستد که آن نقطه را با عدد ۱۰۰ علامت می‌گذارند. سپس مخزن جیوه را در خرده یخ در حال گداز می‌گذارند. جیوه از لوله پایین می‌آید و در نقطه‌ای می‌ایستد که آن را، نقطه صفر دماسنج فرض می‌کنند که در حقیقت نقطه انجماد آب یا نقطه ذوب یخ است. آنگاه میان این دو رقم را به صد قسمت مساوی تقسیم می‌کنند و هر قسمت یک درجه سانتی‌گراد است. این‌گونه دماسنج که به صد درجه تقسیم شده‌اند دماسنج سانتی‌گرادی نامیده می‌شوند. به جز این درجه بندی انواع دیگری نیز وجود داردکه از آن جمله دماسنج رئومور و دماسنج فارنهایت است.دماسنج رئومور که در این گرماسنج نقطه انجماد یا ذوب یخ با صفر درجه سانتی‌گراد برابر است ولی نقطه جوش آب در این دماسنج ۸۰ درجه سانتی‌گراد است. این دماسنج توسط یک دانشمند فرانسوی طراحی و ساخته شده است.

انواع دماسنج آزمایشگاهی

الف) دماسنج دارای حباب مایع دار: این نوع دماسنج یکی از رایج‌ترین دماسنج ها می‌باشد. دماسنج دارای حباب مایع دار را به عنوان دماسنج‌های جیوه‌ای یا الکلی می‌شناسیم. ساختمان این نوع دماسنج از یک مخزن مایع و یک لوله مویین تشکیل شده که مایع درون مخزن در اثر انبساط از لوله مویین بالا رفته و دما را نشان می‌دهد. این نوع دماسنج را می‌توان برای اندازه‌گیری دما از ۳۷/۸°C تا ۳۱۵°C استفاده نمود.اما اگرفضای بالای سطح جیوه را از گاز ازت پر نمایند، می‌توان تا دمای ۵۳۸°C از آن استفاده نمود.

شکل ۱۸ــ۲ــ دماسنج دارای حباب مایع دار(دماسنج جیوه‌ای)

ب) دماسنج انبساط سیال: این نوع دماسنج یکی از باصرفه‌ترین و رایج‌ترین وسایل اندازه‌گیری دما در صنعت می‌باشد.اساس کار این دماسنج در شکل(۱۹ــ۲) نشان داده شده است. همان گونه که ملاحظه می‌شود با بالا رفتن دما فشار درون حباب که می‌تواند پر از مایع، گاز یا بخار باشد، بالا رفته و توسط فشارسنج اندازه گیری می‌شود. طول لوله مویین می‌تواند تا ۶۰ متر باشد؛ اما این مقدار بر دقت اندازه‌گیری دما تأثیرگذار خواهد بود.

شکل ۱۹ــ۲ــ دماسنج الکتریکی

پ) دماسنج الکتریکی: این نوع دماسنج کاربردهای فراوانی در صنعت داشته و می‌توانند از دماهای پایین تا دماهای بسیار بالا را اندازه‌گیری نمایند که به صورت مقاومتی و ترموکوپل هستند.

ت) دماسنج مقاومتی: دماسنج مقاومتی به صورت یک سیم بلند و ظریف است که آن را به دور یک قاب نازک می‌پیچند تا از فشار ناشی از تغییر طول سیم که در اثر انقباض آن در موقع سرد شدن پیش می‌آید، جلوگیری کند. در شرایط ویژه می‌توان سیم را به دور جسمی‌که به منظور اندازه‌گیری دمای آن است، پیچید یا در داخل آن قرار داد (در گستره دمای خیلی پایین). دماسنج‌های مقاومتی بیشتراز مقاومت‌های کوچک رادیویی با ترکیب کربن یا بلور ژرمانیوم که ناخالصی آن آرسنیک بوده و جسم حاصل در درون یک کپسول بسته پر از هلیوم قرار دارد، تشکیل می‌شوند. این دماسنج را می‌توان بر روی سطح جسمی‌که برای اندازه گیری دمای آن است سوار کرد یا در حفره‌ای که برای این منظور ایجاد شده، قرار داد. دماسنج مقاومتی پلاتین را می‌توان برای کارهای خیلی دقیق در گستره ۲۵۳°C تا ۱۲۰۰°C به‌کار برد.

ث)ترموکوپل: ترموکوپل وسیله دیگری است که برای اندازه‌گیری دما مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این نوع دماسنج از خاصیت انبساط و انقباض اجسام جامد استفاده می‌گردد. دامنه دمایی یک ترموکوپل بستگی به موادی دارد که ترموکوپل از آن

ساخته شده است برای نمونه، دامنه یک ترموکوپل پلاتینیوم ـ ایریدیوم که ۱۰ درصد پلاتینیوم دارد از صفر تا $1600^{\circ}C$ است. مزیت ترموکوپل در این است که به خاطر جرم کوچک، خیلی سریع با سیستمی که اندازه‌گیری دمای آن مورد نظر است، به حال تعادل گرمایی در می‌آید. بنابراین تغییرات دما به آسانی بر آن اثر می‌کند، ولی دقت دماسنج مقاومتی پلاتین را ندارد.

نکته‌ها

✓ دماسنج‌های مرجع و سایر وسایل پایش دما باید به روشی کالیبره شوند که با استانداردهای ملی و جهانی قابل بررسی باشد.

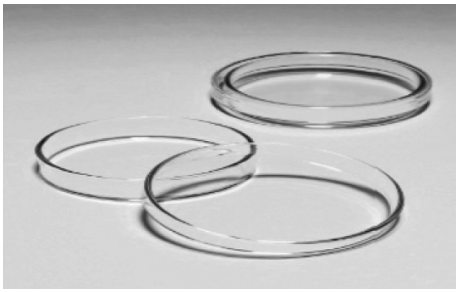
✓ دماسنج‌ها و ترموکوپل‌هایی که در گرمخانه قرار دارند به منظور پیشگیری از هدررفتن گرما هنگام باز بودن در گرمخانه و برای خواندن درست، بهتر است در ظرف‌های مناسب دارای گلیسرول، پارافین مایع یا پلی پروپیلن گلیکول قرار داده شوند.

✓ چنانچه ستون جیوه یا الکل دماسنج شکسته شود باید دور انداخته شود.

✓ دماسنج‌ها و ترموکوپل‌ها بهتر است در نقطه انجماد و یا با دماسنج‌های مرجع در محدود دمای آزمایشگاه کنترل شوند.

یادآوری : جیوه برای سلامتی انسان خطرناک است. در صورت شکسته شدن حباب و ریختن جیوه، لازم است از دست زدن به آن و تنفس در برابر آن خودداری کرده و مکان‌های آلوده به آن را تمیز و سالم سازی نمود.

۴ــ۲ــ۲ــ تشتک‌ها یا پتری دیش‌ها[1] : تشتک‌ها ظرف‌هایی هستند از جنس شیشه یا پلاستیک یک بار مصرف که دارای قطر ۸۵ میلی‌متر و عمق ۱۲ میلی‌متر هستند. تشتک‌ها برای تهیه محیط‌های کشت جامد و سپس کشت باکتری‌ها به کار برده می‌شوند.



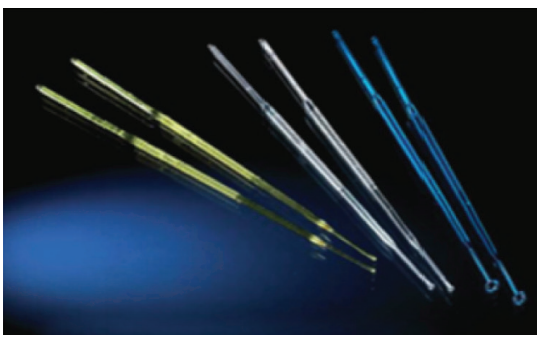
شکل ۲۰ــ۲ــ تشتک یا پتری دیش

نکته‌ها

✓ پس از کشت باکتری‌ها در تشتک‌های دارای محیط کشت، هنگام قرار دادن در گرمخانه درب آنها باید روی سطح گرمخانه و پشت آنها به سمت بالا قرار گیرد.

✓ تشتک‌های کشت شده میکروبی را پس از استفاده و پیش از دور ریختن باید در اتوکلاو درون یک کیسه بزرگ سترون کرده و سپس دور ریخت.

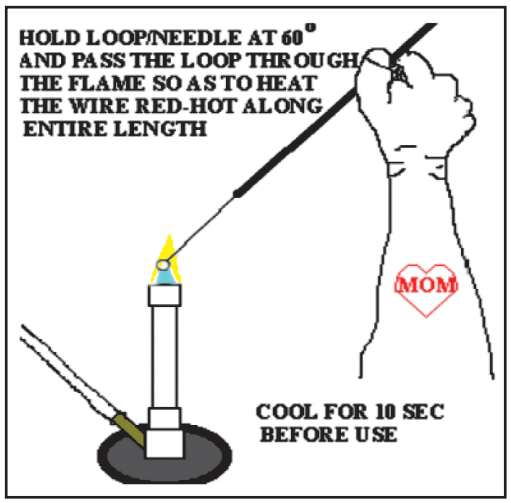
۵ ــ ۲ ــ۲ــ سیم کشت : این وسیله از یک قطعه سیم که یک طرف آن آزاد و طرف دیگر آن در داخل دستگیره‌ای از جنس شیشه یا فلز است، ساخته شده که از آن هم برای برداشت باکتری‌ها از محیط‌های کشت میکروبی و هم برای کشت باکتری ها به روش خطی استفاده می‌شود. همانطور که در شکل(۲۱ــ۲) نشان داده شده است، بر حسب نوع آزمایش انتهای آن می تواند به صورت حلقه[2] باشد که در این صورت فیلدوپلاتین یا حلقه کشت نام دارد و یا می‌تواند بدون حلقه باشد که در این صورت آنس یا سوزن کشت نامیده می‌شود.



شکل ۲۱ــ۲ــ سمت راست، حلقه کشت و سمت چپ سوزن کشت

۱ــ Petri dishes

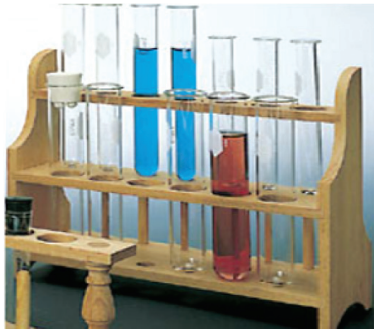
۲ــ Loop



شکل ۲۲ــ۲ــ روش سترون کردن حلقه و سوزن کشت

نکته : مهم‌ترین نکته در رابطه با استفاده از لوپ و آنس، سترون‌کردن آنها پیش و پس از کار و تماس با کشت میکروبی و محیط‌های آلوده است. برای این منظور، همانند شکل(۲۲ــ۲) باید چراغ گازی یا الکلی را روشن کرده و لوپ را با زاویه ۶۰ درجه سانتی‌گراد در قسمت آبی شعله نگه داشت تا قسمت فلزی آن گداخته شود، سپس از شعله خارج کرده و حدود ۱۰ ثانیه به حال خود قرار داد تا خنک شود و برای کاربرد مورد نظر آماده شود.

۶ــ۲ــ۲ــ لوله‌های آزمایش : لوله‌های آزمایش مقاوم در برابر گرمای زیاد و در اندازه‌های گوناگون هستند. همانطور که در شکل (۲۳ــ۲) نشان داده شده است، قسمت پایین لوله گرد و سر آنها صاف است. این لوله‌ها برای نگهداری محیط‌های کشت مایع، رشد میکروارگانیسم‌ها در محیط مایع وانجام و مشاهده واکنش‌های بیوشیمیایی باکتری‌ها درمحیط‌های متابولیکی به کار می‌روند.



شکل ۲۳ــ۲ــ لوله‌های آزمایش همراه با جالوله‌ای

نکته‌ها

✓ لوله‌های آزمایش را پیش و پس از آزمون‌های میکروبی باید در آون با دمای ۱۷۰°C سترون کرد.

✓ بهتر است از لوله‌هایی استفاده شود که درپوش یا چوب پنبه روی در آنها قرار دارد.

✓ برای نگهداری لوله‌های آزمایش از جا لوله‌ای که می‌تواند مانند شکل(۲۳ــ۲) چوبی و یا فلزی و پلاستیکی قابل شستشو باشد، استفاده شود.

✓ برای برداشتن لوله‌های آزمایش سترون شده و داغ باید از دستکش ویژه و یا گیره چوبی استفاده شود.

✓ برای شستشوی لوله‌های آزمایش و از بین رفتن کامل مواد ته نشین شده در لوله‌ها باید از برس لوله استفاده شود.

شکل ۲۴ــ۲ــ گیره چوبی

شکل ۲۵ــ۲ــ برس شستشوی لوله

شکل ۲۶ــ۲ــ چراغ گازی

۷ــ۲ــ۲ــ چراغ گازی[۱] : در این چراغ نوعی گاز مانند متان یا بوتان با هوا مخلوط شده و می‌سوزد که به یاد مخترع آن بونزن (شیمیدان آلمانی) نامگذاری شده است. در آزمایشگاه میکروبیولوژی کلیه آزمون‌های میکروبی را باید در فاصله حدود ۳۰ سانتی‌متری شعله انجام داد. چراغ گازی برای سترون سازی لوپ و آنس با شعله مستقیم، تهیه گسترش میکروبی بر روی لام که در فصل‌های بعد شرح داده خواهد شد و در انواع رنگ آمیزی ها به کار می‌رود و برای حرارت دادن محیط‌های کشت جامد هنگام آماده سازی آنها به‌کار برده می‌شود.

نکته‌ها

✓ هنگام کار با چراغ گازی ابتدا باید شیر اصلی گاز را باز کرد.

✓ در آزمایشگاه‌ها باید روی میزهای کار هنرجویان به تعداد لازم چراغ گازی قرار داده شود که هر کدام علاوه بر این که به شیر اصلی گاز وصل هستند دارای شیرهای جانبی نیز باشند وهنگام کار با آنها با باز و بسته کردن شیر جانبی می‌توان آنها را به طور جداگانه روشن و خاموش کرد.

✓ برای روشن کردن مشعل باید شیر جانبی را باز کرده وسپس برای جلوگیری از نشت گاز به اطراف، کبریت را روشن نموده و با آن مشعل را روشن کرده و برای تنظیم شعله از حلقه نزدیک پایه مشعل استفاده کرد. اگر حلقه گاز باز باشد و گاز از دهانه به اطراف پراکنده شود با روشن کردن شعله کبریت منجر به‌ایجاد شعله بسیار شدید خواهد شد.

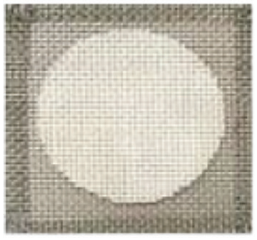
✓ هنگام روش کردن شعله مشعل بهتر است سر را کنار و دور از دهانه مشعل قرار داد تا اگر بر اثر بی‌احتیاطی، شعله گاز به اطراف پراکنده شد به صورت برخورد نکند.

✓ پس از کار با چراغ گازی باید شیر جانبی بسته شود.

✓ در صورت بروز خطر و ایجاد شعله زیاد در اثر نشت گاز باید بلافاصله شیرهای جانبی و اصلی را بسته و مراتب را گزارش داده و برای بر طرف شدن نقص اقدام لازم را به عمل آورد.

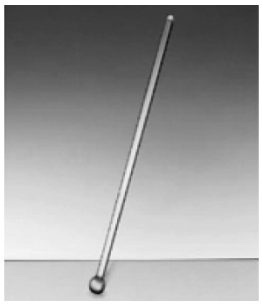
✓ برای گرم کردن محلول‌ها و محیط‌های کشت جامد (فصل آماده‌سازی محیط‌های کشت) تا زمانی که شفاف شوند باید یک سه پایه فلزی همراه با توری نسوز که در شکل (۲۷ــ۲) نشان داده شده است، روی شعله قرار داد و سپس ظرف دارای محیط را روی آن گذاشت.

۸ ــ۲ــ۲ــ سه پایه فلزی و توری نسوز : وسیله‌ای است که برای نگه داشتن وسایل و گرم کردن آنها در بالای شعله چراغ کار آزمایشگاهی کاربرد دارد.



شکل۲۷ــ۲ــ سمت راست، توری نسوز و سمت چپ، سه پایه فلزی

۱ــ Bunzen burner



شکل۲۸ــ۲ــ میله شیشه‌ای همزن

۹ــ۲ــ۲ــ میله‌های شیشه‌ای همزن و سرکج : میله‌های شیشه‌ای همزن برای یکنواخت کردن نمونه‌های مورد آزمون به ویژه حل کردن مواد جامد در رقیق‌کننده به کار می‌روند. میله‌های شیشه‌ای سرکج برای انجام یک نوع کشت میکروبی که برای شمارش باکتری‌ها در محیط جامد به کار می‌رود، استفاده می‌شوند.(به فصل روش‌های کشت میکروارگانیسم ها نگاه کنید)

نکته : هنگام کار با میله‌های شیشه‌ای باید ابتدا آنها را از قسمت سر، درون ظرف دارای اتانول ۷۰ درصد قرار داد تا سترون شوند و موقع استفاده یک بار ازروی شعله عبور داده تا الکل روی میله‌ها سوخته یا بخار شود.

شکل۲۹ــ۲ــ قاشقک

۱۰ــ۲ــ۲ــ قاشقک[1] : وسیله‌ای است که برای برداشتن و وزن کردن مواد اولیه محیط‌های کشت و مواد مشابه که به صورت پودر هستند به کار می‌رود. در صورت نیاز لازم است پیش از کاربری تمیز و سترون شود.

۱۱ــ۲ــ۲ــ لام (اسلاید) : برای تهیه گسترش میکروبی، رنگ‌آمیزی و مشاهده زیر میکروسکوپ به کار می‌روند. لام‌ها یا به صورت یکبار مصرف هستند یا شیشه‌ای. برای استفاده دوباره از لام‌های شیشه‌ای باید آنها را درون محلول سترون‌کننده قرار داده و سالم‌سازی نمود.

سایر وسایل آزمایشگاهی شامل استوانه‌های مدرج برای برداشت حجم مشخص مواد مایع و رقیق کننده‌ها، بشر، ارلن، پنس برای برداشتن نمونه‌های آلوده و نمونه‌هایی که با دست نمی‌توان گرفت.

۳ــ۲ــ میکروسکوپ

میکروسکوپ مجموعه‌ای از لنزهای دارای بزرگ‌نمایی است. امروزه میکروسکوپ‌های معمولی می‌توانند شکل‌ها را تا ۱۰۰۰ برابر بزرگتر کنند که این رقم تنها مشاهده اندازه، شکل و حرکت سلول‌های باکتری را امکان پذیر می‌سازد. میکروسکوپ های اختصاصی‌تر با بزرگ‌نمایی بیشتر مانند میکروسکوپ الکترونی، شکل‌ها را تا ۱۰۰۰۰۰ برابر بزرگتر می‌کنند و مشاهده ویروس ها و حتی اتم‌ها را امکان‌پذیر می‌سازند. ساده‌ترین نوع میکروسکوپی که در بیشتر آزمایشگاه‌ها به کار برده می‌شود میکروسکوپ نوری معمولی است.

۱ــ۳ــ۲ــ ساختمان میکروسکوپ نوری : هر میکروسکوپ نوری دارای قسمت‌های زیر است :

الف) منبع نور یا لومیناتور[2] : که در زیر محل قرار گرفتن اسلاید نمونه است.

ب) کندانسور[3] : نوعی عدسی است که نور خارج شده از منبع نوری را روی اسلاید نمونه متمرکزمی‌کند و زیر صفحه قرار دارد.

پ) صفحه[4] : صفحه‌ای است که نمونه روی آن قرار داده می‌شود.

ت) عدسی چشمی[5] : یک جفت عدسی که بالای بدنه میکروسکوپ قرار دارد و دارای بزرگ نمایی ۱۰ است.

۱ــ Spatule

۲ــ Luminator

۳ــ Condensor

۴ــ Stage

۵ــ Ocular lense

ث) عدسی‌های شیئی[1] : عدسی‌هایی که مستقیم بالای صفحه و روی یک صفحه چرخان قرار دارند، عدسی‌های شیئی با بزرگ‌نمایی‌های۴، ۱۰، ۴۰، ۱۰۰ می‌باشند.

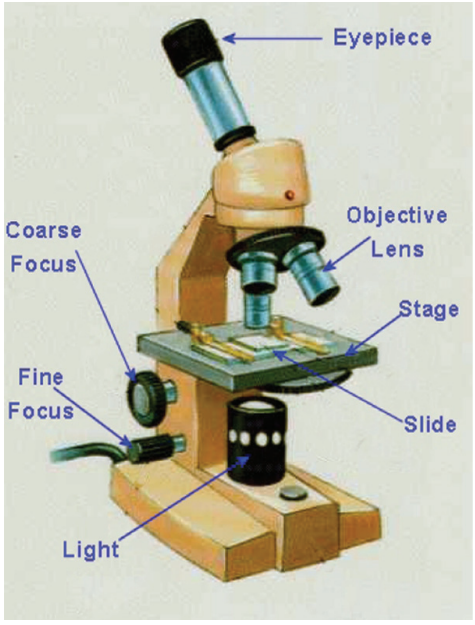
یادآوری : عدسی ۱۰۰ عدسی همراه با روغن سدر یا ایمرسیون[2] است. زیرا در بزرگ‌نمایی ۱۰۰ به دلیل اختلاف ضریب شکست نوری شیشه و هوا نور به خوبی منعکس نمی‌شود و شکل کدر خواهد شد. روغن ایمرسیون یا روغن سدر این عیب را بر طرف می‌کند زیرا ضریب شکست نوری مشابه شیشه دارد و نور را به خوبی منعکس می‌کند و تصویر واضح و شفاف خواهد شد.

ج) دریچه دیافراگم : زیر کندانسور و صفحه قرار دارد و میزان نوری را که به کندانسور می‌رسد با باز و بسته کردن دریچه می‌توان تنظیم کرد.

چ) پیچ‌های تنظیم[3] دو نوع هستند : ماکرومتر و میکرومتر؛ که بر روی بازوی میکروسکوپ قرار دارند.

پیچ تنظیم یا فوکوس بزرگتر یا ماکرومتر چسبیده به بازو است و برای تنظیم و وضوح تصویر در حد ماکرومتر به کار می‌رود. با چرخش آن صفحه در حد قابل رؤیت بالا و پایین می‌رود. پیچ تنظیم کوچکتر یا میکرومترکه چسبیده به ماکرومتر است و تنظیم تصویر را در حد میکرو انجام می‌دهد.

در شکل(۳۰ــ ۲) قسمت‌های میکروسکوپ نشان داده شده است.



شکل۳۰ــ۲ــ نما و اجزای میکروسکوپ نوری

۲ــ۳ــ۲ــ روش استفاده از میکروسکوپ نوری :

الف) کلید جریان برق را فشار داده و منبع نور را وصل کنید.

ب) صفحه عدسی‌های شیئی را بچرخانید تا عدسی به پایین‌ترین بزرگ‌نمایی برسد. در عدسی با بزرگ‌نمایی پایین قسمت بیشتری ازسطح اسلاید نمونه رادر میدان دید قرار می‌دهد. بنابراین ابتدا عدسی‌های پایین برای تنظیم اولیه شکل به کار می‌روند و در

۱ــ Objective lenses

۲ــ Immersion

۳ــ Adjustment Knobe

آخر در صورت نیاز عدسی ۱۰۰ با روغن ایمرسیون استفاده می‌شود.

پ) اسلاید نمونه را روی صفحه و بین خط کش‌ها قرار دهید. گیره کنترل را بالا بگیرید تا اسلاید درست روی صفحه و بالای مرکز نور قرار گیرد.

ت) در حالی که از کنار نگاه می‌کنید، صفحه را به آرامی تا جایی که امکان دارد بالا ببرید تا متوقف شود.

یادآوری : همیشه عدسی و صفحه را دور نگه دارید. زمانی که لازم است به هم نزدیک شوند، از کنار به دقت نگاه کنید و حرکت صفحه به بالا را به آرامی انجام دهید تا عدسی آسیب نبیند.

ث) با عدسی‌های چشمی نگاه کنید و صفحه را با پیچ تنظیم ماکرومتر به آرامی پایین بیاورید تا صفحه دید مورد نظرتان ظاهر شود.

ج) برای واضح شدن شکل از پیچ تنظیم یا میکرومتر استفاده کنید. با حرکت بسیار آرام پیچ، می‌توان وضوح تصویر را به دلخواه تنظیم کرد.

چ) همزمان برای وضوح تصویر می‌توان با باز و بسته کردن دریچه دیافراگم نیز به این کار کمک کرد.

ح) پس از تنظیم شکل با پایین‌ترین بزرگ‌نمایی، صفحه را بچرخانید تا به عدسی بالا برسید.

یادآوری : عدسی‌ها باید با دقت جابه جا شوند تا تنظیم شکل تغییرنکند. در هر صورت بهتر است پس از تغییر عدسی‌ها تنظیم دوباره انجام شود.

خ) هنگام کار با عدسی شیئی با بزرگ نمایی ۱۰۰ باید از روغن ایمرسیون استفاده شود. یک قطره روغن بر روی ناحیه روشن روی اسلاید قرار دهید و صفحه را بچرخانید تا به عدسی ۱۰۰ برسید و دوباره تنظیم را مانند پیش انجام دهید.

یادآوری : پس از پایان کار با روغن ایمرسیون، تنها عدسی شیئی ۱۰۰ را با پارچه ویژه و گزیلل پاک کنید.

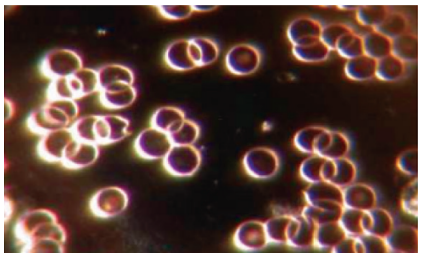
۴ــ۲ــ انواع میکروسکوپ

۱ــ۴ــ۲ــ میکروسکوپ زمینه روشن[۴] : میکروسکوپ نوری معمولی است که به طور کامل شرح داده شد. همانطور که در شکل (۳۱ــ۲) سمت راست نشان داده شده است، نور از منبع آن خارج شده و روی اسلاید نمونه متمرکز می‌شود. نمونه بیشتر امواج نوررا منعکس و برخی را جذب می‌کند. در این میکروسکوپ با رنگ آمیزی نمونه‌ها، شکل به صورت نمونه رنگ آمیزی شده در زمینه روشن مشاهده می‌شود. هدف از کاربرد میکروسکوپ نوری معمولی با زمینه روشن،مشاهده شکل و ترتیب قرار گرفتن باکتری‌ها، مشاهده اجزای بیرونی آنها مانند تاژه، کپسول و نیز مشاهده اسپور باکتری‌ها است.

شکل۳۱ــ۲ــ سمت راست، چگونگی تشکیل شکل توسط میکروسکوپ نوری زمینه روشن. سمت چپ، شکل گرفته شده توسط میکروسکوپ نوری زمینه روشن.

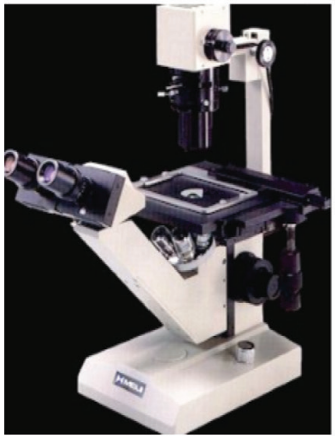
۴ــ Bright field Microscope

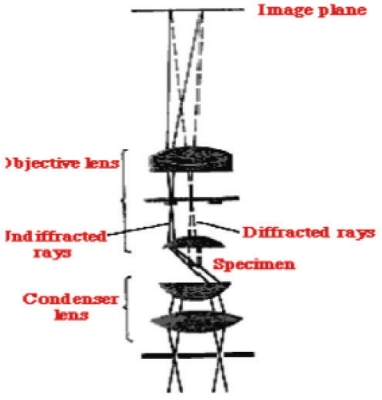
۲ــ۴ــ۲ــ میکروسکوپ زمینه تاریک[۱] : این میکروسکوپ نور را از منبع آن روی نمونه متمرکز می‌کند. نمونه بیشتر امواج نوری را جذب و برخی را به سمت عدسی شیء منعکس می‌کند. زمینه دید تاریک شده و نمونه روشن و شفاف دیده می‌شود.



شکل۳۲ــ۲ــ شکل گرفته شده توسط میکروسکوپ زمینه تاریک

۳ــ۴ــ۲ــ میکروسکوپ فاز متضاد[۲] : این میکروسکوپ نور خارج شده از منبع آن را که به نمونه می‌رسد به جای انعکاس، منحرف می‌کند که حرکت نور خارج از فاز گفته می‌شود. این نوع میکروسکوپ نیازی به رنگ آمیزی نمونه ندارد بنابراین برای مشاهده باکتری‌های زنده در گسترش مرطوب و مشاهده حرکت باکتری‌ها به کار برده می‌شود.

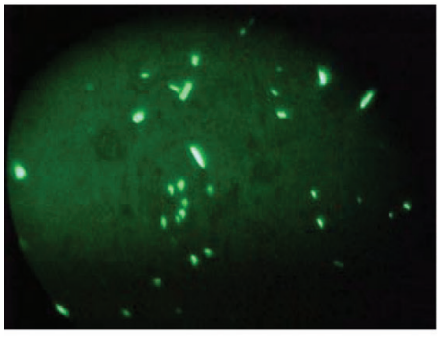




شکل۳۳ــ۲ــ سمت چپ، میکروسکوپ فاز متضاد و سمت راست، چگونگی تشکیل شکل توسط میکروسکوپ متضاد

۴ــ۴ــ۲ــ میکروسکوپ فلورسنت[۳] :
میکروسکوپ فلورسنت برای مشاهده سلول یا موادی که به طور طبیعی ویژگی فلورسنت دارند یا با رنگ‌های فلورسنت رنگ آمیزی می‌شوند، به‌کار می‌رود. در میکروسکوپ فلورسنت از نور فرابنفش (UV)[۴] برای روشن کردن میدان دید استفاده می‌شود. نمونه بسیار درخشان در زمینه دید تاریک مشاهده می‌شود.

(الف)



(ب)

شکل۳۴ــ۲ــ (الف)، میکروسکوپ فلورسنت و(ب)، شکل گرفته شده توسط میکروسکوپ فلورسنت

۱ــ Dark Field Microscope
۲ــ Phase Contrast Microscope
۳ــ Flourescent Microscope
۴ــ Ultra Violet

۵ــ۴ــ۲ــ میکروسکوپ الکترونی : میکروسکوپ نوری برای مشاهده اجزای داخلی سلول باکتری‌ها بوده و برای مشاهده ویروس‌ها کارایی ندارد. برای این منظور از میکروسکوپ الکترونی با بزرگ نمایی تا ۱۰۰۰۰۰ برابر استفاده می‌شود. در این میکروسکوپ‌ها به جای منبع نور، از امواج الکترونی و به جای عدسی‌های شیشه‌ای از عدسی‌های الکترومغناطیس استفاده می‌شود. قدرت تفکیک میکروسکوپ الکترونی ۰/۳ بر حسب نانومتر است. البته کار با این میکروسکوپ فنی و دشوار است زیرا عدسی و نمونه باید در خلاء باشند و نیاز به آماده سازی پیچیده نمونه دارند. عکس گرفته شده از میکروسکوپ الکترونی میکروگراف نام دارد.

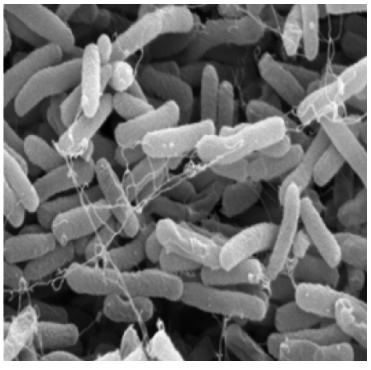
دو نوع میکروسکوپ الکترونی وجود دارد :

الف) میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)[1] : این نوع میکروسکوپ در شکل (۳۵ــ۲ــ ب) نشان داده شده، دارای بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰۰۰ برابر است و تصویر سه بعدی ارائه می‌دهد و تنها برای مشاهده شکل و سطوح بیرونی سلول‌ها به کار برده می‌شود نه اجزای داخلی آنها. نمونه‌ها به صورت لایه بسیار نازک بریده شده و با یک لایه طلا و پالادیوم پوشیده می‌شوند و سپس جهت مشاهده با میکروسکوپ الکترونی به کار می‌روند.

ب) میکروسکوپ الکترونی گذاره(TEM)[2] : در شکل (۳۵ــ۲ــ الف) نشان داده شده است، بزرگ‌نمایی بسیار بالا دارد در حد ۲۰۰۰۰۰ برابر و تصویر را به صورت دو بعدی نشان می‌دهد. برای مشاهده اجزای داخلی علاوه بر شکل سلول و بخش‌های خارجی آن به کار می‌رود.

(ب)

(الف)



(پ)

شکل۳۵ــ۲ــ(الف) میکروسکوپ الکترونی گذاره، (ب) میکروسکوپ الکترونی نگاره و(پ) تصویرسه بعدی گرفته شده با میکروسکوپ الکترونی نگاره

۱ــ Scanning Electron Microscope

۲ــ Transmission Electron Microscope