فصل دوم

وسایل و تجهیزات آزمایشگاه میکروبیولوژی

هدف‌های رفتاری: در پایان این فصل، فراگیر باید بتواند :
۱ــ ظروف مورد استفاده در آزمایشگاه را شناخته، نام ببرد.
۲ــ تجهیزات موجود در آزمایشگاه را شناخته، بتواند از آن‌ها استفاده نماید.
۳ــ طرز کار با اتوکلاو را شرح داده، از آن استفاده نماید.
۴ــ قسمت‌های مختلف یک میکروسکوپ را تشریح نماید.
۵ــ بتواند با تنظیم میکروسکوپ، تصویری واضح بدست آورد.

۲ــ وسایل و تجهیزات آزمایشگاه میکروبیولوژی

۱ــ۲ــ ظروف آزمایشگاه

۱ــ۱ــ۲ــ پیپت

ــ **پیپت‌های شیشه‌ای و پلاستیکی:** این پیپت‌ها از مواد غیرسمی تهیه شده‌اند و دارای دیواره مستقیم، نوک گرد هستند و برای استفاده در آزمایشگاه میکروب‌شناسی بکار می‌روند. حداکثر حجمی را که پیپت در مدت ۴ ثانیه خارج می‌کند مقدار یک میلی‌لیتر با اختلاف ۰/۰۲۵± میلی‌لیتر است، این در صورتی است که آخرین قطره‌ی شیر رقیق نشده موجود در پیپت را با دمیدن در پیپت خارج کنید. پیپت باید طوری درجه‌بندی شده باشد که در خط نشانه ۲۰ دارای ۱/۰۷۵ میلی‌لیتر آب باشد، در مورد پیپت‌هایی که از جنس پلاستیک[۱] می‌باشند درجه‌بندی طوری است که در خط نشانه ۲۰ حاوی ۱/۰۵۵ میلی‌لیتر آب هستند. فقط پیپت‌هایی را باید به کار گرفت که نوک آن‌ها سالم و دارای درجه‌بندی‌های با علامت واضح هستند و با رنگ مایع در رقت‌های مورد استفاده، تضاد

۱ــ Styrene Plastic

داشته باشند. پیپت‌هایی را که به علل مختلف آسیب دیده‌اند از رده خارج کنید.

جای مخصوص پیپت: از جنس فولاد زنگ نزن یا آلومینیوم است برای این منظور، از لوازمی که با مس ساخته می‌شوند نباید استفاده نمود.

توجه: پس از کاربرد هر نوع پیپت بایستی آن را از طرف نوک در داخل یک محلول سترون کننده قرار داد.

۲ــ۱ــ۲ــ پتری دیش (پلیت[۱]): این ظروف دارای حداقل ۸۵ میلی‌متر قطر داخلی و ۱۲ میلی‌متر عمق هستند. سطوح داخلی و خارجی این ظروف باید بدون ضایعه یا خراش و حباب باشد. ظروف پتری از شیشه و یا پلاستیک مناسب ساخته می‌شوند و باید دارای کف صاف باشند.

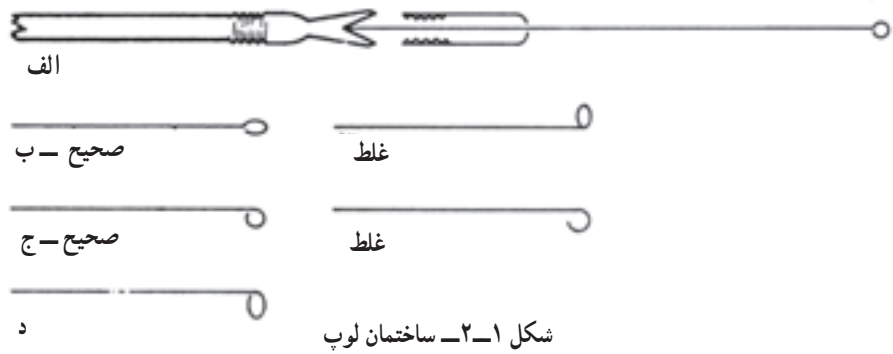
۳ــ۱ــ۲ــ سرنگ فلزی: به منظور انتقال سریع و صحیح مقدار ۰/۰۱ میلی‌لیتر از مواد غذایی مایع می‌توان از سرنگ‌های فلزی استفاده کرد. این سرنگ‌ها دارای یک میله فنری حساس نیمه‌خودکار و یک پیستون مناسب از جنس فولاد زنگ نزن برای لوله‌ای از همین جنس و مدرج می‌باشند. سرنگ‌ها دارای یک سری پیچ هستند که برای نمونه‌برداری مقادیر مختلف مواد غذایی مایع تنظیم می‌گردند. قبل از استفاده باید دقتِ سرنگ را آزمایش کرد و به طور متناوب دقت و صحّت کار آن را بررسی نمود.

تبصره: با این نوع سرنگ‌ها میزان ۰/۰۱ میلی‌لیتر نمونه مایع به طور دقیق برداشته می‌شود. در مورد شیر و خامه‌های سرد و غلیظ هم می‌توان از این سرنگ استفاده کرد.

۴ــ۱ــ۲ــ سیم کشت: این وسیله از یک قطعه سیم که یک طرف آن آزاد و طرف دیگر آن در داخل دستگیره‌ی از جنس شیشه و یا فلز است، ساخته شده است (شکل ۱ــ۲ــ الف). برحسب نوع آزمایش قسمت آزاد ممکن است به صورت حلقه (Loop) و یا بدون حلقه (شکل ۱ــ۲ــ د) باشد. جنس سیم مورد استفاده، معمولاً از لاتین است ولی می‌توان از انواع دیگر نیز استفاده کرد. طول تمام قسمت (دسته و سیم) معمولاً ۲۵ سانتی‌متر و طول سیم حدود ۸ سانتی‌متر است. در شرایطی که انتهای سیم به صورت حلقه است، مطابق (شکل ۱ــ۲ــ ب و ج)، باید آن را به طریق صحیح خم کرد. این وسیله برای انتقال مقدار کمی از محیط جامد یا مایع واجد باکتری به محیط دیگر به‌کار می‌رود. این وسیله یکی از مهم‌ترین وسایل موردنیاز در آزمایشگاه میکروبیولوژی است.

۵ــ۱ــ۲ــ لوله‌ها: لوله‌ی آزمایش گرد ــ انواع متفاوتی از لوله‌های آزمایش تاکنون ساخته شده است. انواعی که در آزمایشگاه باکتریولوژی بیش‌تر مورد استفاده قرار می‌گیرند، باید در مقابل درجه‌ی حرارت زیاد به هنگام استریل کردن محیط کشت مقاوم باشند. قسمت پایین این لوله‌ها مدور

۱ــ Petri Dishe "Plate"

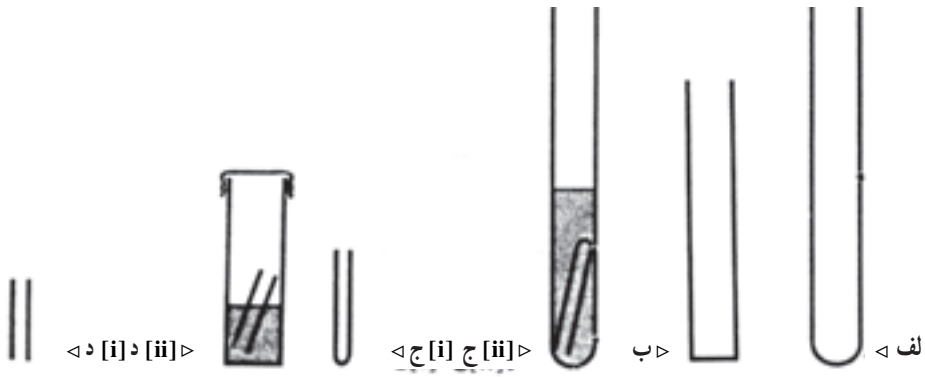


شکل ۱ــ۲ــ ساختمان لوپ

و سر آن‌ها صاف است (شکل ۲ــ۲ــ الف). این لوله‌ها برای حفظ محیط کشت، رشد میکروارگانیسم‌ها و مشاهده‌ی پدیده‌های شیمیایی به‌کار می‌روند.

لوله‌ی آزمایش ته صاف، این نوع لوله‌های آزمایش از هر جهت شبیه به نوع قبلی بوده و فقط ته آن‌ها صاف است و به همین علت می‌توان آن‌ها را به آسانی روی میز کار قرار داد (شکل ۲ــ۲ــ ب).

لوله‌ی دورهام ــ این لوله‌ها کوچک و در قسمت پایین مدوراند. قطر داخلی آن‌ها معمولاً ۰/۷ سانتی‌متر و طول آن‌ها حدود ۲/۵ سانتی‌متر است. این لوله برای پی بردن به وجود گازهای تولید شده توسط برخی از میکروارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (شکل ۲ــ۲ــ ج).



شکل ۲ــ۲ــ انواع مختلف لوله‌های مورداستفاده در آزمایشگاه میکروبیولوژی.
الف ــ لوله‌ی گرد؛ ب ــ لوله‌ی پهن؛ ج ــ لوله‌ی دورهام؛ د ــ لوله‌ی کاریجی

لوله‌ی کاریجی ــ این لوله‌ها در دو انتها باز بوده و قطر آن‌ها حدود ۰/۷ سانتی‌متر و طول آن‌ها ۵ سانتی‌متر است و برای مشاهده‌ی حرکت باکتری‌ها از این لوله‌ها استفاده می‌شود (شکل ۲ــ۲ــ د).

لوله‌های ته‌گرد معمولاً در جا لوله‌ای فلزی و یا در زنبیل‌های سیمی (شکل ۳ــ۲) نگهداری می‌شود.

شکل ۳ــ۲ــ زنبیل سیمی مخصوص نگاهداری لوله‌های واجد محیط کشت

۶ ــ۱ــ۲ ــ بطری‌های رقیق کننده: بطری‌هایی از جنس بور و سیلیکات با درپوش‌های پیچ‌دار یا سربطری‌های لاستیکی به گنجایش ۱۵۰ میلی‌لیتر مورد استفاده قرار می‌گیرند. برای جلوگیری از تراوش مایع از درپوش‌های پیچ‌دار می‌توان از واشرهای مناسب و غیر قابل نفوذ استفاده کرد. بطری‌های تهیه رقت را در حجم ۱± ۹۹ میلی‌لیتر می‌توان با مواد مناسب یا وسیله‌ای که پاک نشود علامت‌گذاری کرد. برای از بین بردن باقیمانده‌ی مواد و مایعات از درب‌های لاستیکی مخصوص بطری، لوله یا سایر ظروف، باید ابتدا آن‌ها را در آب معمولی با حرارت $82^{\circ}C$ و یک ماده پاک‌کننده تمیز کرد.

وسایل شیشه‌ای دیگر نظیر ارلن مایر درب پیچ‌دار، بشر، لوله آزمایش درب پیچ‌دار، لام و لامل شیشه‌ای، قاشقک نمونه‌برداری، آنس فلزی برای کشت میکروبی، همگی جزو ظروف مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب‌شناسی می‌باشند.

۲ــ۲ــ تجهیزات آزمایشگاه

۱ــ۲ــ۲ــ گرمخانه (اینکوباتور)[1]: دستگاهی است که برای رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌ها در دمای ثابت مورد استفاده قرار می‌گیرد. ساختمان گرمخانه باید صحیح باشد و مرتباً کنترل شود، دمای داخل گرمخانه نباید از حد تنظیم شده بیش از $\pm 1^{\circ}C$ تغییر نماید. اختلافات دمای داخل گرمخانه را در زمانی که ظرفیت آن پر شده است تعیین و مشخص کنید. گرمخانه باید به صورتی پرشود که فاصله بین

۱ــ Incubator

ردیف پتری دیش‌ها و بین آن‌ها و دیواره‌ی گرمخانه از ۲/۵ سانتی‌متر کمتر نباشد، ظروف قرار داده شده در گرمخانه باید در مدت ۲ ساعت به دمای مورد نظر برسند. اتاق‌های گرم باید به خوبی عایق و مجهز به سیستم‌های مناسب پخش حرارت و گردش هوا (پنکه) باشند. میزان رطوبت داخل آن‌ها باید به نحوی باشد که باعث جمع شدن قطرات آب در روی ظروف و گسترش سریع کشت نگردد. از طرف دیگر رطوبت باید به میزانی باشد که ظروف حاوی آگار بیش از ۱۵ درصد رطوبت‌خود را در مدت ۴۸ ساعت از دست ندهد. گرمخانه باید در مکانی قرار گیرد که دمای آن در مواقع مختلف سال بین $۱۶-۲۷^{\circ}C$ باشد برای استفاده بهتر از گرمخانه، کارکنان آزمایشگاه موظف به انجام موارد زیر هستند.

شکل ۴ ــ۲ ــ نمونه‌ای از اینکوباتور یا اتاقک کشت موجود در آزمایشگاه

الف) ثبت دمای قسمت‌های بالایی و پایینی گرمخانه و اتاق‌های گرم به تعداد دوبار در روز یک مرتبه صبح، بعد از این‌که تمام مدت شب در گرمخانه بسته بوده است و یک مرتبه بعد از پایان کار روزانه.

ب) تنظیم دستگاه تنظیم کننده‌ی گرما[۱]: گرماسنج‌ها را در طبقه‌های پایین و بالا و در صورت لزوم در وسط قرار دهید. قسمت حباب مدور گرماسنج‌ها را در داخل یک آمپول به صورت کاملاً بسته قرار دهید و در آب شناور کنید، زیرا درجه گرمای هوا شاخص مطمئنی برای تعیین درجه گرمای آگار به شمار نمی‌آید در صورت تمایل می‌توان برای کنترل و ثبت حرارت گرمخانه و اتاق‌های گرم از ادوات خودکار تنظیم درجه گرما که رقت آن‌ها قبلاً تعیین شده است استفاده کرد. در فواصل زمانی معین می‌توان دقت این ادوات را با درجات گرماسنج‌های استاندارد کنترل نمود. زمانی که از گرماسنج‌های

۱ــ Thermoregulator

استاندارد استفاده می‌شود ممکن است در هر گرمخانه، گرماسنج‌هایی که حداقل و حداکثر درجه گرما را نشان می‌دهند قرار داد تا انحرافات نامعلوم و درجه آن‌ها تعیین شود. برای ثبت روزانه درجه گرما از قرائت این گرماسنج‌های اختصاصی خودداری کنید. زمانی که برای کنترل و ثبت درجات گرما از ادوات خودکار که دقت آن‌ها قبلاً تعیین شده است و به طور مرتب کار می‌کنند استفاده می‌گردد، احتیاجی به کاربرد گرماسنج‌هایی که حداقل و حداکثر درجه حرارت را نشان می‌دهند نیست.

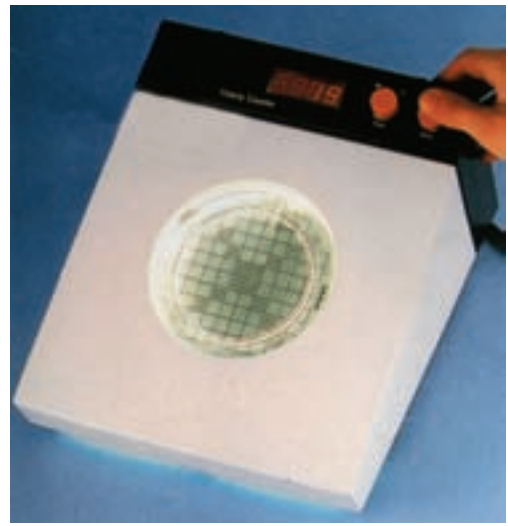
شکل ۵ــ۲ــ نمونه‌ای از ترازوی دیجیتال مخصوص وزن کردن مواد در آزمایشگاه

۲ــ۲ــ۲ــ ترازو: ترازوی با حساسیت ۰/۱ تا ۰/۰۱ گرم و با مقدار ۲۰۰ گرم وزنه مورد نیاز است برای این منظور، ترازوی یک کفه‌ای با ظرفیت ۲ کیلوگرم مناسب‌تر است.

۳ــ۲ــ۲ــ دستگاه کلنی کانتر یا دستگاه پرگنه‌شمار : در مرحله بعد از کشت و طی دوره‌ی رشد و تکثیر، پرگنه (کلنی)های حاصل شده در محیط کشت نشان‌دهنده‌ی تقریبی میزان آلودگی کلی در مقدار کشت داده شده از نمونه می‌باشد و به این صورت که هر یک پرگنه (کلنی) کوچک و یا بزرگ، نمایانگر حداقل یک میکروارگانیسم فعال اولیه در نمونه به‌شمار می‌آید و تعداد کل میکروارگانیسم‌ها براساس تعداد پرگنه (کلنی)ها بر مبنای درجه‌ی دقت نمونه تعیین و محاسبه می‌گردد. برای شمارش تعداد پرگنه (کلنی)ها در محیط کشت معمولاً از دستگاهی به نام کلنی‌کانتر[1]

۱ــ Colony Counter

استفاده می‌شود. این دستگاه از چند قسمت مشخص تشکیل شده است : ذره‌بین، صفحه مدور تقسیم‌بندی شده به اشکال مربع شکل، نمراتور و لامپ برق برای انجام کار، پلیت دارای پرگنه روی صفحه‌ی مدور قرارگرفته، نور چراغ، صفحه را روشن می‌کند فرد شمارش‌کننده با فشار انگشت روی دگمه نمراتور موجب ثبت تعداد پرگنه (کلنی)ها روی قسمت نمراتور می‌گردد. وجود اشکال مربع شکل موجب دقت بیشتر و جلوگیری از خطا در شمردن پرگنه (کلنی)ها می‌گردد.



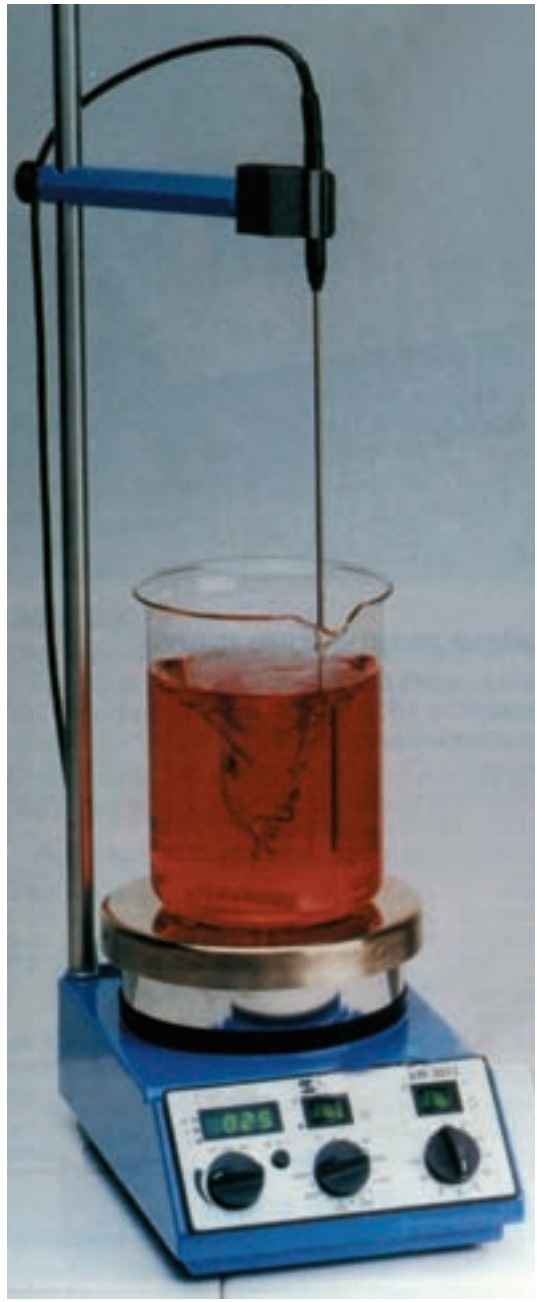
شکل ۶ــ۲ــ دو نمونه از پرگنه‌شمار یا کلنی‌کانتر آزمایشگاه میکروبیولوژی

۴ــ۲ــ۲ــ بن ماری: در اندازه‌های مختلف و مناسب برای مقاصد آزمایشگاه طرح‌ریزی و از آن‌ها برای نگهداری محیط‌های ذوب شده در ۴۶°C – ۴۴ استفاده می‌گردد. در مواقع عدم استفاده از حمام آب، در آن باید بسته باشد. سطح آب داخل آن باید به اندازه‌ای باشد که کاملاً سطح آگار موجود در ارلن یا ظروف دیگر را بپوشاند.

۵ ــ۲ــ۲ــ یخچال: بـرای خنک نگه‌داشتن نمونه‌هـا از یخچال با دمای ۴°C+ استفاده می‌شود. این دستگاه، در صورت تمایل برای نگهداری محیط‌های کشت نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد.

شکل ۷ــ۲ــ نمونه‌ای از بن‌ماری یا حمام آب گرم

شکل ۸ــ۲ــ نمونه‌ای از شیکر مخصوص پتری دیش و ارلن آزمایشگاهی



شکل ۹ــ۲ــ نمونه‌ای از همزن مجهز به هیتر در آزمایشگاه

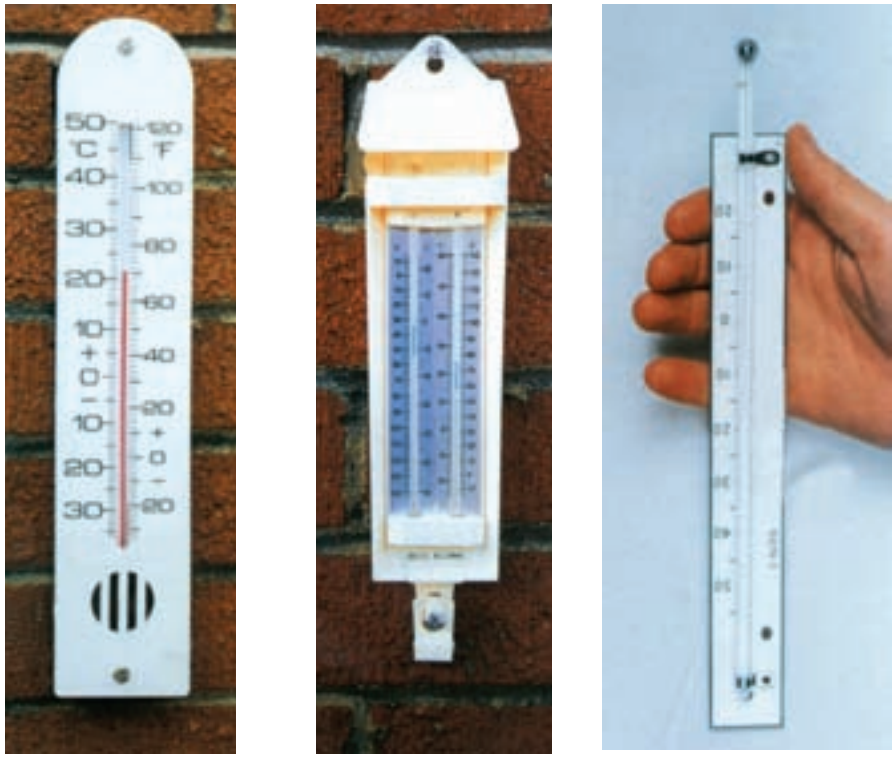
۶ــ۲ــ۲ــ تکان دهنده‌ی مکانیکی[۱]: تکان‌دهنده‌های مکانیکی برای یکنواخت کردن محتوای ظروف مناسب می‌باشند و کار آن‌ها شکستن مجموعه‌های میکروبی در لوله و ارلن است. برای این منظور دستگاه باید دارای حرکت چرخشی باشد.

۷ــ۲ــ۲ــ سانتریفوژ: این دستگاه‌ها دارای انواع مختلف می‌باشند که براساس نیروی گریز از مرکز، موادی را که دارای جرم‌های مخصوص متفاوت هستند از یکدیگر تفکیک می‌کنند.

شکل ۱۰ــ۲ــ نمونه‌ای از دستگاه سانتریفوژ آزمایشگاهی

۸ــ۲ــ۲ــ دماسنج‌ها: با درجه‌بندی مناسب (بالا و پایین صفر)، پر شده از جیوه با فاصله درجه بندی حداقل یک درجه سانتی‌گراد هستند. دقت آن‌ها حداقل هر دو سال یک بار با یک گرماسنج تأیید شده از سوی مؤسسه ملی استاندارد (یا نوع دیگر با دقت مشابه) کنترل شود در مواقعی که ثبت درجه‌ای در یخچال، اتوکلاو، کوره با هوای داغ یا گرمخانه مورد نظر است می‌توان از ادوات ثبت درجه گرمای خودکار استفاده کرد. معمولاً دو نوع گرماسنج جیوه‌ای در آزمایشگاه مورد استفاده قرار می‌گیرد : نوعی که به طور کامل در محیط (مثل گرم‌خانه یا یخچال) قرار می‌گیرد تا گرمای محیط را تعیین کند، نوع دیگر که قسمتی از آن در محیط مورد نظر قرار می‌گیرد (حمام آب)

۱ــ Mechanical Shaker



شکل ۱۱ــ۲ــ نمونه‌ای از دماسنج‌های آزمایشگاهی

در نوع دوم در نقطه‌ای که گرماسنج در آب قرار دارد خطی مشخص دور تا دور بدنه گرماسنج کشیده شده است. ساده‌ترین راه برای امتحان گرماسنج‌های آزمایشگاه، مقایسه‌ی آن‌ها با گرماسنج‌های استاندارد در شرایط مشابه مانند حمام آب است.

۹ــ۲ــ۲ــ چراغ الکلی ــ آون و اتوکلاو برای استریل کردن

استریل کردن[۱]: استریل کردن یعنی عقیم کردن و بی‌حاصل نمودن و در اینجا منظور کشتن و از بین بردن کلیه موجودات ذره‌بینی است.

۳ــ۲ــ روش‌های سترون کردن

روش‌های معمول سترون کردن شامل، سترون کردن با دما، صاف کردن[۲]، گاز دادن[۳] و تابش اشعه[۴] می‌باشد.

۱ــ Sterilization ۲ــ Filtration ۳ــ Fumigation
۴ــ Irradiation

الف ــ سترون کردن به وسیله‌ی دما

۱ــ سوزاندن: میکروارگانیسم‌های موجود روی اجسام را (مانند حلقه کشت) بر روی شعله قرار می‌دهند تا زمانی که جسم کاملاً سرخ شود. اگر میکروارگانیسم موجود بر روی حلقه کشت مخصوص انتقال میکروب فوق‌العاده بیماری‌زا باشد، عمل انتقال و سترون کردن حلقه محیط کشت بهتر است در محفظه به خصوصی صورت گیرد. از سوزاندن برای مواد آلوده‌ای را که قابل مصرف دوباره نیستند، استفاده می‌شود.

۲ــ دمای خشک: برای وسایلی مانند پیپت‌ها و تشتک‌های پتری سترون کردن با حرارت خشک انجام می‌شود. همه‌ی وسایل را می‌توان در هوای گرم دستگاه سترون کننده گذاشت و درجه حرارت را به مدت یک ساعت در ۱۷۰ درجه سانتی‌گراد نگه داشت. برای موادی که به وسیله‌ی حرارت خشک یا حرارت مرطوب بالا خراب می‌شوند سترون کردن متناوب (تیندالیزاسیون[1]) به کار می‌رود. مواد را به مدت ۳۰ دقیقه در سه روز متوالی با جریان بخار آب (۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) حرارت داده، بین مراحل حرارت دادن، بگذارید درجه حرارت آن برابر درجه حرارت آزمایشگاه باشد. این روش سترون کردن به دلیل اشکالات آن در بیشتر موارد رضایت‌بخش نیست.

شکل۱۲ــ۲ــ طریقه‌ی صحیح سترون کردن حلقه محیط کشت

۳ــ دمای مرطوب: برای بیشتر انواع محیط‌های کشت، لباس‌ها، مواد لاستیکی، و سایر موادی که با حرارت خشک خراب می‌شوند، روش سترون کردن به وسیله‌ی حرارت مرطوب و زیر فشار بکار می‌رود. چنین موادی را در حرارت ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ الی ۳۰ دقیقه با بکار بردن بخار آب با ۱۵ پوند فشار اتوکلاو می‌کنند. گاهی زمان لازم برای سترون کردن کامل، برحسب نوع و مقدار مواد به کار رفته تغییر می‌کند.

روش کار با اتوکلاو

هدف: *آشنایی با روش کار دستگاه اتوکلاو و طرز تهیه ظروف، وسایل آزمایشگاهی و محیط کشت استریل*

---

۱ ــ Tyndallization

طرز کار دستگاه سترون کننده فشار ــ بخار یا اتوکلاو

۱ ــ فلاسک‌های حاوی محیط کشت میکروبی را که قبلاً تهیه کرده‌اید در دستگاه سترون کننده قرار دهید.

۲ ــ در دستگاه را بسته، آن را قفل کنید.

۳ ــ شیر دستگاه (دریچه‌ی خروج هوا) را باز کنید تا بخاری که تشکیل می‌شود جانشین هوای داخل دستگاه گردد (تا زمانی که بخار بدون هوا خارج می‌شود).

۴ ــ شیر مربوط به قسمت بخار را ببندید. این کار باعث می‌شود که بخار در داخل اتوکلاو جمع شده، فشار آن افزایش یافته و دما به حد مورد نظر برسد.

توجه: در بعضی از دستگاه‌ها، شیر خروج هوا به طور خودکار به وسیله‌ی تنظیم ترمواستاتیکی[۱] بسته می‌شود.

اتوکلاوهایی که برای سترون کردن در آزمایشگاه‌های معمولی به کار می‌روند اغلب برای ۱۵ پوند بر اینچ مربع[۲] فشار تنظیم شده‌اند که ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد (۲۵۰ درجه فارنهایت) گرما تولید می‌کنند. زمان مناسب برای حرارت دهی در این حد (سترون کردن) بستگی به عوامل مختلف دارد. هنگامی که درجه حرارت به ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد رسید، زمان شروع سترون کردن به حساب می‌آید. توجه داشته باشید که حرارت‌سنج، درجه حرارت بخار را در لوله‌ی خروج بخار اندازه‌گیری می‌کند. اگر هوا به طور کامل از اتوکلاو خارج نشده باشد گرچه فشارسنج ۱۵ پوند بر اینچ مربع فشار را نشان دهد، درجه حرارت به ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد نخواهد رسید. بنابراین شروع سترون کردن را باید لحظه‌ای دانست که حرارت‌سنج به ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد برسد، نه از زمانی که فشارسنج ۱۵ پوند بر اینچ مربع فشار را نشان می‌دهد.

۵ ــ با خاتمه‌ی سترون کردن، برای باز کردن اتوکلاو، کاری را که باید انجام دهید عبارتست از ۱ــ بستن دریچه ورودی ؛ ۲ــ بسته نگه داشتن شیر خروج بخار دستگاه تا هنگامی‌که فشار به صفر نزدیک شود. اگر موادی که سترون می‌شوند حاوی مایعات نباشند می‌توانید برای کاهش دادن سریعتر فشار، شیر خروج بخار را باز کنید. اگر در اتاقک اتوکلاو مایعات وجود داشته باشند، چنین کاهش فشاری، باعث جوش آمدن آن‌ها در ظروف خود شده، پنبه سر درب آن‌ها را خیس کرده، آن‌ها را به خارج پرتاب می‌کند. از این رو در مواقعی که مایعات سترون می‌شوند، همیشه لازم است فشار را به تدریج کاهش داد. بیشتر اتوکلاوهای جدید، که خیلی از آن‌ها کاملاً اتوماتیک هستند دارای قفل‌های

۱ــ Thermostatic ۲ــ PSI

خودکار بر روی در خود می‌باشند، تا وقتی که فشار کاهش نیافته به در اجازه باز شدن نمی‌دهند.

۶ ــ بعد از آن که فشارسنج نشان داد که دیگر هیچگونه فشار مربوط به بخار وجود ندارد می‌توانید دراِاتوکلاو را باز کرده، مواد و وسایل داخل آن را خارج کنید. اگر مواد سترون کردن در اثر حرارت طولانی یا در اثر بخار آب امکان فاسد شدن دارند، آن‌ها را بدون وقفه خنک کنید.

بعضی از عوامل مؤثر در سترون کردن به وسیله‌ی فشار و بخار در دستگاه اتوکلاو

الف ــ درجه حرارت: آندوسپور باکتری‌ها در برابر مرگ در اثر حرارت بیشترین مقاومت را دارند و درجه حرارت کشنده برای آن‌ها فقط هنگامی حاصل می‌شود که بخار آب دارای فشار زیاد باشد. درجه حرارت ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد هنگامی که برای مدت مناسبی ادامه یابد شرایط خوبی را برای سترون کردن ایجاد می‌کند.

ب ــ رطوبت: انعقاد ترکیبات پروتوپلاسم باکتری‌ها (پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و غیره) در دمای اتوکلاو، به‌رطوبت نیاز دارد و هنگامی که رطوبت در محیط نباشد، دمایی که برای انعقاد ضروری است به سرعت افزایش می‌یابد. اگر بخار خیلی گرم شود، خشک‌تر می‌شود، بنابراین درجه حرارت و مدت لازم برای سترون کردن باید افزوده شده، به میزان سترون کردن در هوای خشک (۱۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت) برسد. بنابراین حرارت دادن زیاد بخار می‌تواند مقداری از اثر آن را به عنوان عامل کشنده از بین ببرد. علاوه بر این، افزایش درجه حرارت می‌تواند روی موادی که سترون می‌شوند اثر تخریب کننده داشته باشد.

شکل ۱۳ــ۲ــ نمونه‌ای از دستگاه اتوکلاو مخصوص استریل کردن با بخار تحت فشار

ج ــ فشار: فشار به میزانی که در اتوکلاو به کار می‌رود، هیچ گونه اثری در سترون کردن ندارد. فشار فقط برای رساندن درجه حرارت بخار به بالاتر از ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد لازم است.

د ــ زمان: زمان برای نفوذ بخار آب و گرم کردن مواد تا درجه حرارت سترون کردن ضروری است. حتی، هنگامی که چنین درجه حرارتی حاصل شود، اسپورها و سلول‌های جوان همه یک باره کشته نمی‌شوند. میزان مرگ و میر در یک درجه حرارت مشخص ثابت است و در مقابل یک عامل کشنده، در هر واحد زمانی، نسبت ثابتی از یک تعداد معین میکروبی کشته می‌شوند. (به طور طبیعی در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و گرمای مرطوب) ۲/۵ دقیقه وقت لازم است تا آندوسپور باکتری‌های گرمادوست کشته شوند.

هـ ــ مزاحمت هوا: هوای داخل اتوکلاو در درجه حرارت سترون کردن بیش از دو برابر بخار سنگینی دارد. اگر این هوا خارج نشود، در داخل اتوکلاو چند طبقه تشکیل می‌شود. از آنجا که بخار و هوا به کندی مخلوط می‌شوند تفاوت درجه حرارت لایه بالایی و لایه پایینی ممکن است خیلی زیاد باشد از این رو خارج کردن تمام هوا لازم است. گرماسنجی که در شیر تخلیه قرار دارد وقتی که ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد، مشخص می‌کند که تمام هوای داخل اتوکلاو خارج شده است.

و ــ ماهیت بار اتوکلاو: معمولاً مواد حجیم و تقریباً غیر قابل نفوذ احتیاج به زمان بیشتری برای سترون شدن دارند. بنابراین بهتر است آن‌ها را در واحدهای کوچکتر سترون کرد یا برای مثال به‌جای یک فلاسک ۵ لیتری بهتر است آن‌ها را در ۵ فلاسک یک لیتری قرار داد. موادی‌که در برابر بخار قابلیت نفوذ کم دارند و مواد خیلی حجیمی که نمی‌توان از راه تماس آن‌ها را حرارت داد، احتیاج به زمان طولانی‌تری دارند. سر فلاسک‌ها را باید به وسیله‌ی پنبه یا کاغذ پوشاند. اگر به کار بردن درب لاستیکی، درب پیچی، یا درب پلاستیکی ضرورت دارد، برای این که هوا براحتی خارج شود، همین‌طور برای جلوگیری از شکستن و پرتاب شدن درب و ظروف در اثر خروج بخار، و برای داخل‌شدن و نفوذ بهتر بخار به داخل ظروف نباید سر آن‌ها را محکم بست.

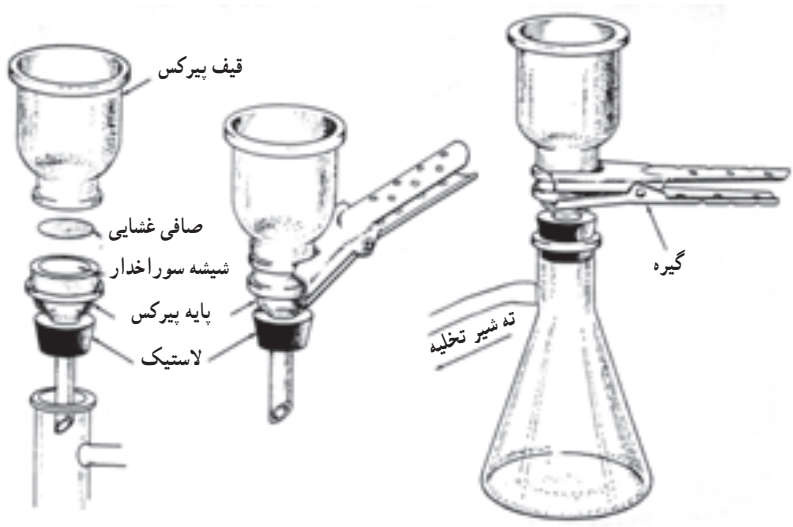
فکر کنید و پاسخ دهید:

۱ــ فرضیه‌ای که براساس آن سترون کردن متناوب پایه‌گذاری شده است چیست؟

۲ــ به عنوان یک عامل سترون کننده، دمای خشک مؤثرتر است یا دمای مرطوب؟ چرا؟

ب ــ صافی‌ها: خیلی از مواد (مثلاً بعضی قندها و سرم‌های خون) در درجه حرارتی که معمولاً برای سترون کردن به کار می‌رود، خراب می‌شوند. برای سترون کردن این مواد حساس به گرما که ممکن است مایع و یا به صورت محلول باشند می‌توان از صاف کردن[1] استفاده کرد. در این روش صافی‌ها به دو طریق باکتری‌ها را می‌گیرند. یکی به وسیله‌ی عمل مکانیکی غربال مانند سوراخ‌های کوچک صافی و دیگری با جذب میکروب‌ها توسط صافی به دلیل تفاوت بار الکتریکی آن‌ها.

صافی‌ای که به طور گسترده در میکروبیولوژی به کار می‌رود صافی غشایی است. صافی غشایی، یک غشای سلولز و یا پلاستیکی است که سوراخ‌های کوچکی دارد (معمولاً ۰/۴۵ میکرون) و می‌تواند باکتری‌ها را از یک مایع گرفته، جدا کند. سایر صافی‌هایی که در سترون کردن به کار می‌روند عبارتند از صافی شیشه‌ای ؛ صافی ساتیز[2] که از پنبه نسوز است ؛ صافی‌های شمعی شکل شامبرلان و سلاس[3] و صافی مندلر[4]. صافی شیشه‌ای را معمولاً از شیشه پیرکس گداخته به ترتیبی تهیه می‌کنند که سوراخ‌دار باشد و اندازه و بار الکتریکی جاذب سوراخ‌ها به اندازه‌ای است که برای گرفتن باکتری‌ها کافی است. صافی‌های ساتیز صفحات گرد فشرده پنبه نسوز هستند که دارای سوراخ‌های کوچک مناسب برای گرفتن باکتری‌ها می‌باشند. صافی‌های شامبرلان و سلاس از سفال بدون لعاب و صافی مندلر از خاک دیاتومه ساخته شده‌اند. سه صافی اخیر، به شکل استوانه‌های دراز

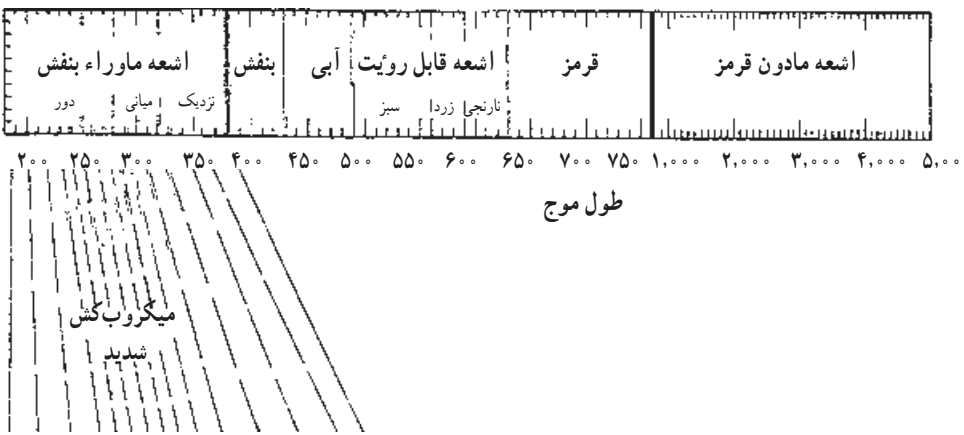


شکل ۱۴ــ۲ــ دستگاه صافی غشایی

۱ ــ filtration ۲ــ Seitz ۳ــ Selas ۴ــ Mandler

و توخالی شبیه شمع هستند که یک طرف آن‌ها باز است. تمام این صافی‌ها را به یک فلاسک مکنده وصل کرده، با به‌کار بردن نیروی مکش مواد مایع را از درون آن‌ها می‌گذرانند و بدین طریق کلیه میکروب‌های آلوده‌کننده را گرفته، از محیط خارج می‌کنند. در شکل زیر نمایش صاف کردن را که یکی از روش‌های سترون‌کردن است ملاحظه کنید.

ج ــ لامپ اشعه U.V: برای سترون سازی محیط آزمایشگاه کاربرد دارد. این لامپ باید زمانی روشن باشد که کارکنان در محل کار حضور ندارند.



شکل ۱۵ــ۲ــ طیف نور در منطقه مؤثر در استریل کردن

خودآزمایی

۱ــ مشخصات ظروف پتری‌دیش را بنویسید.

۲ــ استریل کردن را تعریف نموده، انواع روش‌های آن را نام ببرید.

۳ــ تیندالیزاسیون چیست؟

۴ــ طرز سترون کردن با صافی را شرح دهید.

۵ــ روش کار با اتوکلاو را شرح دهید.

۶ــ نقش فشار بخار در اتوکلاو برای سترون کردن چیست؟

۷ــ وسیله‌ی شمارش تعداد پرگنه‌ها چه نامیده می‌شود و از چه قسمت‌هایی تشکیل شده است؟

۸ ــ کار تکان دهنده‌ی مکانیکی در آزمایشگاه چیست؟