

# ۱ فصل



## آزمایشگاه میکروبیولوژی

## اهداف آموزشی

### هدف کلی

کاربرد دستگاه‌ها و ابزار آزمایشگاه میکروبیولوژی

### هدف‌های جزئی

- ۱- شناخت مقررات آزمایشگاه میکروبیولوژی؛
- ۲- کاربرد ابزار و دستگاه‌های آزمایشگاه میکروبیولوژی؛
- ۳- نگهداری دستگاه‌ها و رعایت نکات ایمنی مربوط به آن‌ها.

## واژه‌ها و اصطلاحات مهم

اسید	باز	دی اتیل اتر	دی متیل سولفوکسید
حلال	معرف	اتیل الکل	هگزان
آنروسل	پی پت	تولوئن	متلین کلراید
سمپلر	میکروسکوپ	اسید سولفوریک	استالدئید (استیک اسید)
مواد بیولوژیک	لنز چشمی	اسید هیدروکلریک	تری متیل آمین
مواد اسیدی	مواد قلیایی	آب اکسیژنه	ترکیبات کلردار
هودهای ایمنی	میکروب شناسی	هیدروکربن	استونیتریل (متیل سیانید)
عفونت اکتسابی	فیلترهای هپا	اعصاب مرکزی	ترکیبات هالوژنه
بور	سیلیکات	شناساگر	حشره کش
سترون	لامپ یو.وی (UV)	استنشاق	بنزن (بنزول)
میکرون	آمونیاک	بنزیل کلرید (کلروتولوئن)	کلروفرم (تری کلرومتان)
اسید هیدروکلریک	دی اکسیدکربن	دی متیل سولفات (متیل سولفات)	دی متیل سولفو اکسید (د. اس. او)
اسید سیانیدریک	اتانول	۱-۴-دی اکساید (دی اتیلن اکسید)	قرنیه
دیاتیل اتر	متانول	ناراحتی کرومر	اپی کلروهیدرین (۱-کلرو-۲-اپوکسی پروپان)
فنل	بنزن	اتیل استات (استیک اسید)	کونژوکتیویت
کربن دی سولفید	آزبست	اتیلن دی کلرید (۱۹۲ دی کلرواتان)	فرمالین (محلول فرمالدئید)
سیلیس	استن	اکسیدکننده	اتوکلاو
کلروفرم	سیکلوهگزان	ارگانسیم	اسپور

متیلن بلو	کاتالیزور	باسیلوس استناروترموفیلوس	آب مقطر
نیروی گریز از مرکز	سانتریفوژ	پتری دیش	تنظیم کننده حرارت
بوکت	نیروی فراگریز	اسکالپل	پنس
عدسی شیئی	عدسی چشمی	پلی پروپیلن	کاغذ کرافت
چشمی هویگنس	ایمرسیون	گریس	لاستیک سیلیکون
دیافراگم	چشمی رامزدن	باسیلوس سوبتیلیس	ویال شیشه‌ای
لامپ جیوه	لامپ هالوژن	رشد بهینه	اینکوباتور
لامپ گزنون	لامپ تنگستن	ساولون	سولفات مس
وضوح	کندانسور	تینر	بنزین
شار الکترون	میکروسکوپ الکترونی	سدیم کلراید	دترژنت
تخلیص	حد تفکیک	سرد کننده	بن ماری
انگستروم	میکرومتر	اکسیژن	جار بی‌هوازی
کاتد	تنگستن	نیتروژن	بی‌هوازی
تفنگ الکترونی	آند	دی اکسید کربن	هیدروژن
گریس	چگالی	دانه‌های پالادیوم	گاز پک



## رویکردهای آموزشی

باتوجه به درس میکروبیولوژی هنرجویان، در هر فصل در آزمایشگاه اقدام به انجام کار عملی می‌کنند. فصل اول، به منظور آشنایی با دستگاه‌ها و ابزار آزمایشگاهی مفهومی آن‌ها به‌طور کامل برای هنرجویان بیان شود.

## پیام‌های اصلی

### دانشی و مهارتی

#### هنرجو:

- با مقررات آزمایشگاه میکروبیولوژی آشنا می‌شود و آن‌ها را به کار می‌بندد.
- با وسایل و تجهیزات مورد استفاده در آزمایشگاه میکروبیولوژی آشنا می‌شود.
- از وسایل و تجهیزاتی که در آزمایشگاه میکروبیولوژی موجود است به درستی استفاده می‌کند.
- با فناوری و وسایل جدید آشنا می‌شود.

#### نگرشی

#### هنرجو:

- درباره میکروب‌ها کنجکاوی می‌کند.
- کارهای علمی دانشمندان را ارج می‌نهد.
- به اهمیت رعایت مقررات در حفظ سلامتی خود پی می‌برد.
- در برابر حفظ وسایل آزمایشگاهی احساس مسئولیت می‌کند.

## دانستنی‌های مورد نیاز هنرآموز

- مطالعه فصل اول، (بخش راهنمای هنرآموز) او را با نکات بسیار ضروری از شروع، ادامه و خاتمه کلاس درس آشنا می‌کند.
- هنرآموز باید نکات ایمنی کار با دستگاه‌ها و مواد آزمایشگاهی را به طور کامل بداند.
- هنرآموز باید چگونگی عمل و طرز کار دستگاه‌ها را بداند.

## فعالیت‌های پیشنهادی

- هنرآموز می‌تواند با استفاده از اسلاید و پاورپوینت<sup>۱</sup> هنرجویان را با نکات ایمنی، زیست محیطی و بهداشتی آشنا کند.
- هنرآموز می‌تواند هنرجویان را در گروه‌های مختلف، برای تهیه پوسته‌های نکات ایمنی، زیست محیطی و بهداشتی در آزمایشگاه تشویق نماید.
- هنرآموز می‌تواند هنرجویان را برای تهیه لیستی از نکات ایمنی و کار با دستگاه‌های مختلف آزمایشگاه میکروبیولوژی برای نصب در محل دستگاه تشویق نماید.

## موارد ارزش‌یابی

- هنرآموز می‌تواند از طریق امتحان مکتوب یا شفاهی از هنرجویان در مورد نکات ایمنی، زیست-محیطی و بهداشتی پرسش نماید.
- هنرآموز می‌تواند با تهیه علامت‌های اخطار و نصب آن‌ها بر روی مواد مورد استفاده در آزمایشگاه، در خصوص این علائم از هنرجویان پرسش نماید.
- هنرآموز می‌تواند درباره کار با میکروسکوپ، سترون کردن وسایل و محیط‌های کشت آزمایشگاهی، کار با بن‌ماری و اینکوباتور از هنرجو آزمون عملی بگیرد.

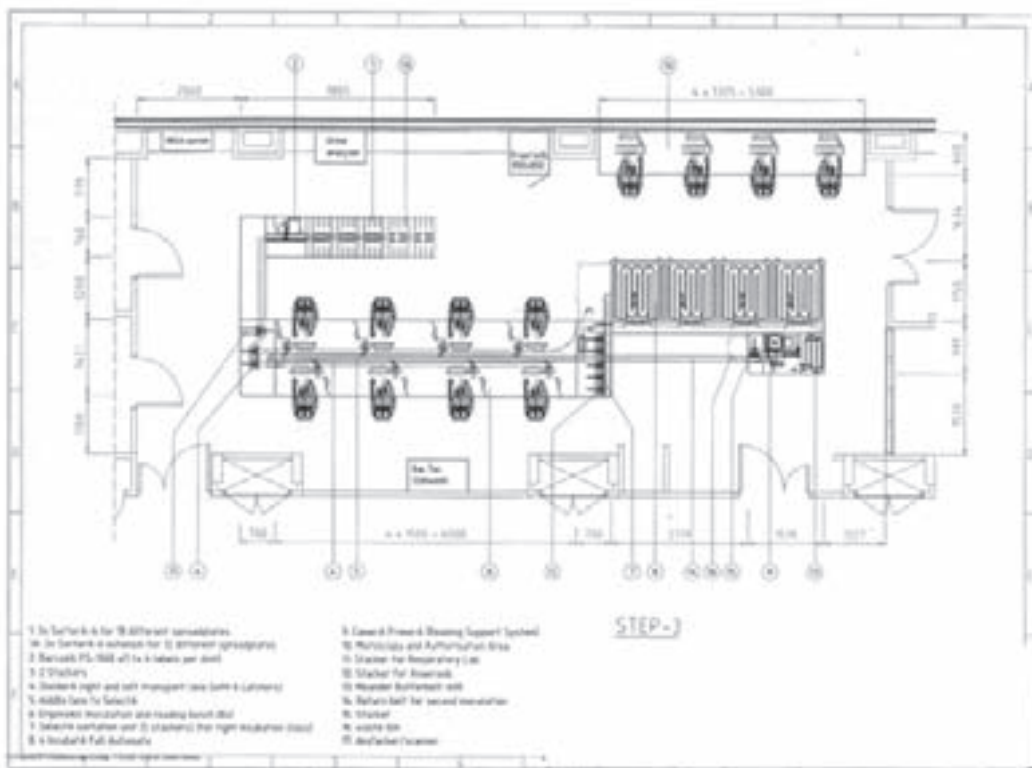
## شرایط مکانی، ساختمانی و ایمنی در آزمایشگاه میکروبیولوژی

قبل از هرگونه طراحی باید عملکرد و وسعت کاری آزمایشگاه، تعداد و اندازه تجهیزات و نیز نیروی کاری مورد نیاز را مدنظر قرار داد. باید توجه کرد که بخش‌های اداری کاملاً از بخش‌های فنی آزمایشگاه مجزا باشد و افراد برای دسترسی به آن‌ها، مجبور نباشند که از بخش‌های دیگر عبور نمایند. فضای آبدارخانه و رخت‌کن نیز باید با فاصله مناسب از قسمت‌های فنی آزمایشگاه قرار داشته باشد.

در یک آزمایشگاه باید:

- الزامات و قوانین کشور در موقع احداث بنا از جهت وقوع بلایای طبیعی مثل زلزله، آتش‌سوزی و غیره رعایت شود.
- سقف‌ها، دیوارها و کف آزمایشگاه باید صاف و در مقابل مایعات، مواد شیمیایی و سایر مواد ضدعفونی‌کننده‌ای که معمولاً در آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند مقاوم باشند.
- سطوح کاری باید به اسیدها، بازها، حلال‌ها، و سایر مواد شیمیایی، همچنین به مایعات، درجه حرارت کم و زیاد، ضربه و مواد ضدعفونی‌کننده مقاوم و جنس آن‌ها به گونه‌ای باشد که سنگینی وسایل را تحمل کنند.
- دست‌شویی در همه اتاق‌ها و ترجیحاً در کنار درب خروجی نصب گردد و بهتر است که شیرهای آب با حرکت آرنج، فشارپا و غیره باز شوند.

- سرویس‌های بهداشتی به تعداد کافی و به طور جداگانه برای کارکنان زن و مرد وجود داشته باشد.
- منبع نیروی برق مستقل برای پشتیبانی از وسایل و تجهیزات در زمان قطع برق وجود داشته باشد.
- سیستم سیم‌کشی داخلی دارای هادی متصل به زمین باشد.
- منبع ذخیره آب با کیفیت مناسب برای شست‌وشوی وسایل، دست و غیره باید در نظر گرفته شود.
- فضای مناسبی به صورت انبار برای ذخیره نمودن مواد، معرف‌ها و وسایل باید در نظر گرفته شود.
- کل ساختمان از سیستم امنیتی مناسبی برخوردار باشد.
- تمام مناطق آزمایشگاه باید از سیستم روشنایی مناسب و کافی (نور طبیعی یا مصنوعی) برخوردار باشد تا شرایط کارکرد ایمن فراهم شود.
- در بخش‌هایی که مواد سوزاننده، خورنده یا دیگر مواد شیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرند، باید جایگاه ثابتی را برای شست‌وشوی چشم در نظر گرفت.
- در مکان‌هایی که با مواد آلوده کار می‌شود و احتمال ایجاد آئروسول وجود دارد، هودهای ایمنی نصب شود. تهویه مکانیکی یا طبیعی هوا در اتاق‌های آزمایشگاه باید به نحو مطلوبی انجام پذیرد.
- محیط کاری از درجه حرارت مناسب و مطلوبی برخوردار باشد.
- در آزمایشگاه مکانی برای ارائه کمک‌های اولیه در نظر گرفته شود.
- مکان مناسبی برای نگهداری پسماندها قبل از دفع در نظر گرفته شود.
- در آزمایشگاه دوش‌های اضطراری، مخصوصاً در بخش‌هایی که از مواد شیمیایی سوزاننده استفاده می‌شود، نصب شود (تعداد دوش‌ها بستگی به وسعت کاری و فضای آزمایشگاه دارد).



شکل ۱-۱- طرح ساختمانی یک آزمایشگاه

## دستورالعمل‌های ایمنی و بهداشتی در آزمایشگاه

**محافظت شخصی:** استفاده از دهان برای کشیدن مواد مختلف به وسیلهٔ پی‌پت اکیداً ممنوع است. امروزه وسایل مختلفی برای برداشتن نمونه مانند سمپلر، پی‌پت‌های اتوماتیک و نظایر آن‌ها وجود دارد که باید در آزمایشگاه‌ها و مراکز پزشکی مورد استفاده قرار گیرند. به خصوص استفاده از پی‌پت دهانی برای کشیدن مواد اسیدی، بازها و مواد سوزاننده خطرناک است.

**کشیدن سیگار:** کشیدن سیگار در محل کار ممنوع است، زیرا سیگار روشن یک منبع احتراق برای مواد قابل اشتعال است. دود سیگار یا پیپ در کاربرد بعضی از وسایل اشکالات فراوانی را به وجود می‌آورد. پراکنده شدن خاکستر سیگار روی وسایل الکترونیک و میکروسکوپ تأثیر بسیار سوئی دارد. برداشتن سیگار از روی میز کار و گذاشتن آن بر روی لب‌ها راهی برای آلوده شدن به میکروب‌ها و مواد سمی است.

**خوردن و آشامیدن:** خوردن و آشامیدن در منطقهٔ کار ممنوع است. نمونه‌های آزمایشی مانند خون، ادرار و مدفوع، خلط و غیره محتوی تعداد زیادی میکروب‌های بیماری‌زاست که بر روی میزهای آزمایشگاهی و یا در یخچال قرار داده می‌شوند. گذاشتن غذا و آشامیدنی در یخچالی که نمونه‌های آزمایشگاهی، مواد بیولوژیک و مواد شیمیایی در آن گذاشته می‌شود ممنوع است. **شست و شوی دست:** طی کار روزانه، دست‌ها باید به‌طور مرتب بعد از خارج کردن دستکش از دست، قبل از ترک آزمایشگاه و قبل از خوردن غذا شسته شوند.

**روپوش و لباس محافظ:** لباس معمول برای کارمندان آزمایشگاه روپوش یا کت سفیدی است که بر روی لباس معمولی پوشیده می‌شود. کفش باید راحت و با ته لاستیکی باشد و سطح پا را بپوشاند. در هنگام کار از پوشیدن کفش‌های جلو باز و یا سوراخ‌دار باید اجتناب شود. لباس‌های محافظ مانند ماسک، دستکش، عینک‌های محافظ و کفش‌های یک بار مصرف باید در اختیار کارکنان قرار گیرد تا در مواقع ضروری پوشیده شود.

**لنز چشمی:** بعضی از لنزها به خصوص نوع نرم آن جاذب انواع حلال‌ها هستند. در افرادی که از لنز استفاده می‌کنند پاشیده شدن مواد اسیدی و قلیایی و اسپری کردن بعضی از مواد ممکن است باعث بروز حوادث ناگواری شود. این افراد در صورت مواجه شدن با خطر تا بخواهند لنز را از چشم خود خارج کنند ممکن است به چشم آسیب برسد. بنابراین در آزمایشگاه به جای لنز بهتر است از عینک استفاده شود.

**راه خروج و کریدورها:** راه خروج و کریدورها نباید به هیچ وجه با وسایل مختلف مسدود شود. میزها، صندلی‌ها و سطل‌های زباله باید طوری قرار گیرند که سبب بسته شدن راه‌های خروجی نشوند. درب‌های آزمایشگاه و سایر بخش‌ها نباید مسدود و یا قفل باشند.

## هودهای ایمنی

هودهای ایمنی، مهم‌ترین وسیله در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی سطوح دوم و سوم<sup>۱</sup> است و تمامی فعالیت‌های میکروب‌شناسی و سایر آزمایش‌ها باید در داخل هودهای ایمنی انجام شوند. هود ایمنی به صورت یک سد محافظ اولیه در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی به کار رفته و برای حفاظت کارکنان از عفونت‌های اکتسابی طراحی شده است. این هودها در انتهای اتاق اصلی آزمایشگاه، که مکانی با کمترین رفت و آمد است، نصب می‌شوند تا اختلالی در جریان هوای هود ایجاد نشود. در هود، ذرات هوا هنگام ورود و خروج از داخل

۱- سطح یکم ایمنی زیستی - آزمایشگاه‌های اولیه (آزمایشگاه‌های تحقیقاتی و آموزش پایه)، سطح دوم ایمنی زیستی - آزمایشگاه‌های اولیه (آزمایشگاه‌های خدماتی اولیه

بهداشتی - خدمات تشخیصی، تحقیقاتی)، سطح سوم ایمنی زیستی - آزمایشگاه با محدودیت (آزمایشگاه‌های خدمات تشخیصی ویژه، تحقیقاتی)، سطح چهارم ایمنی زیستی - آزمایشگاه با بالاترین محدودیت (آزمایشگاه‌هایی که با عوامل خطرناک بیماری‌زا سروکار دارند).

فیلترهای هپا<sup>۱</sup> عبور می‌کنند. فیلترهای هپا از صفحاتی از جنس یاف بورو سیلیکات ساخته شده که برای بالابردن سطح تماس در آن‌ها، به طور پلیسه ماندی تاخوردده‌اند. این فیلترها می‌توانند ۹۵ درصد از ذرات با قطر  $\leq 3$  / میکرون را جذب کنند. براساس توصیه شرکت سازنده، فیلترهای مورد استفاده باید به طور منظم تعویض شوند. هود زیست ایمنی در سه دسته و کلاس I، II و III موجود است. زمانی که هودهای زیست ایمنی و تکنیک‌های استاندارد آزمایشگاه میکروب شناسی با هم به کار روند، هر یک از هودهای زیست ایمنی سطوح مختلفی از ایمنی را فراهم خواهند کرد.

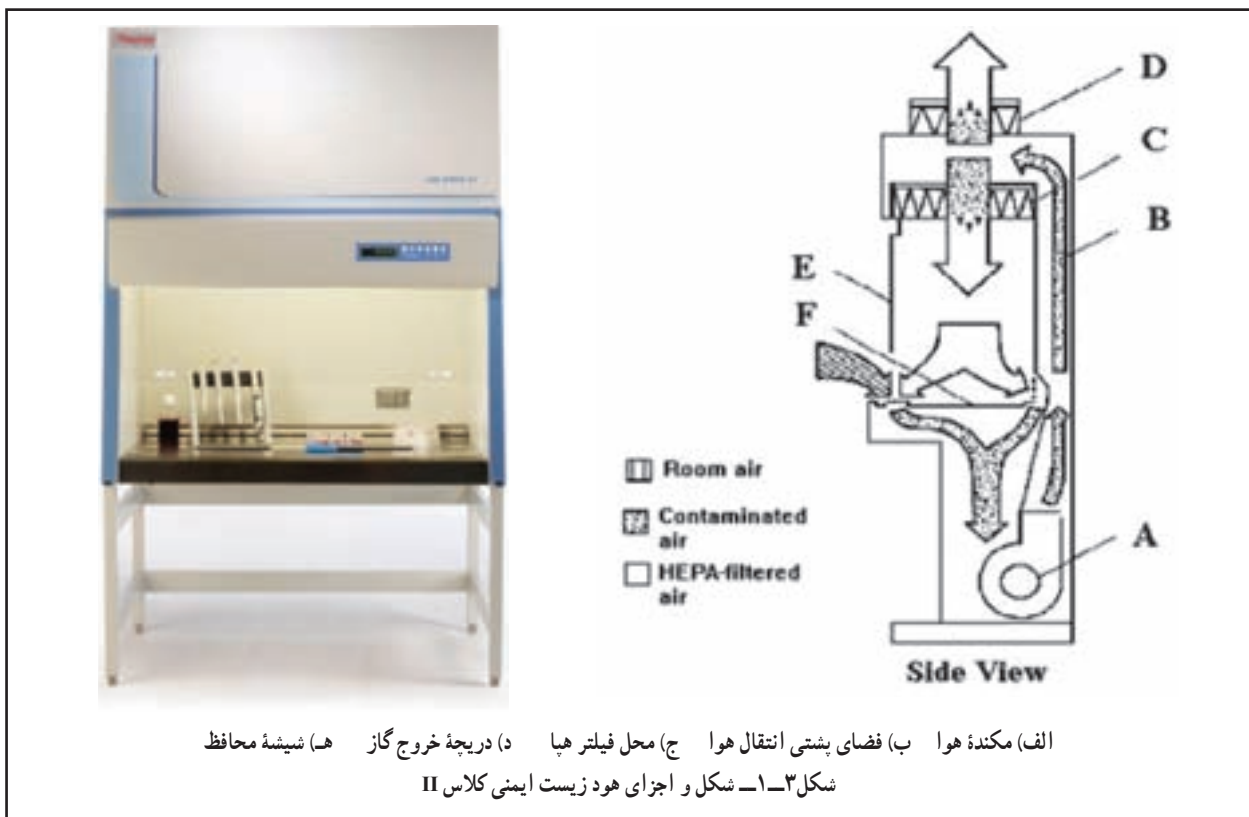
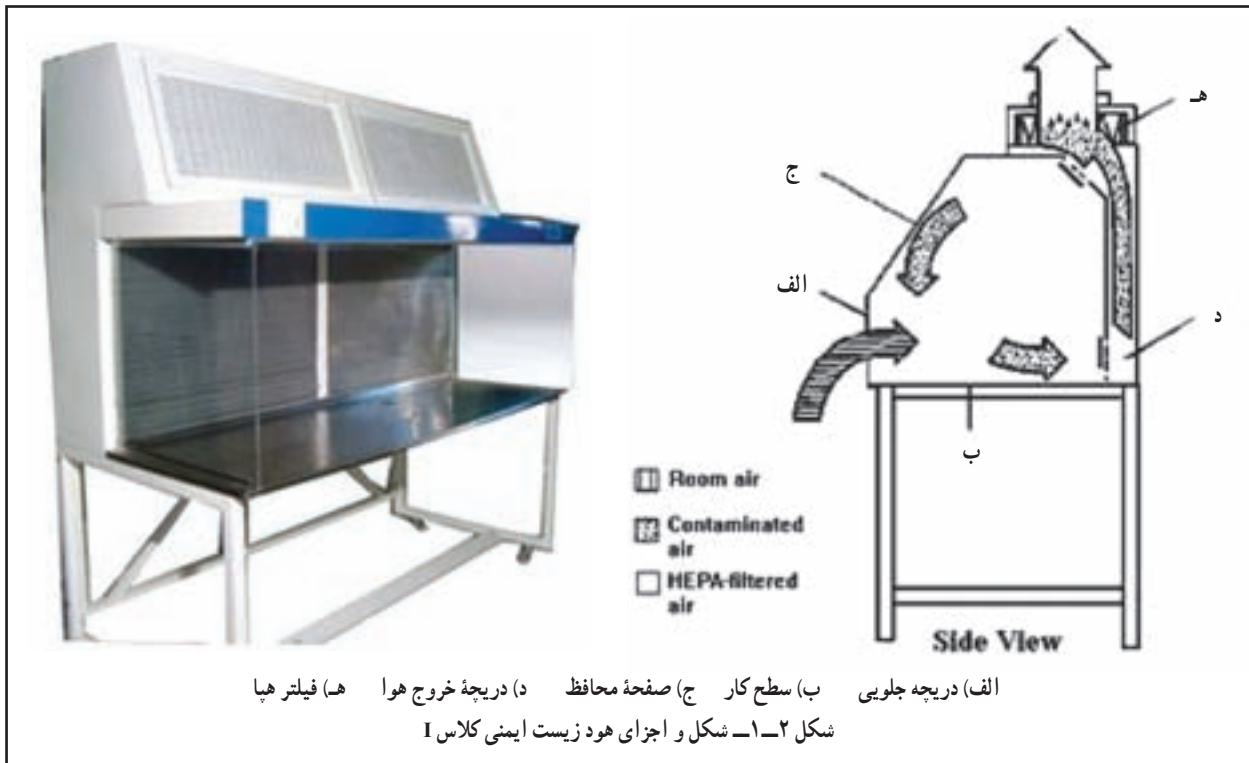
### نکات ضروری در کار با هودهای ایمنی

- هودهای ایمنی باید توسط شرکت‌های فروشنده معتبر، از نظر وضعیت مناسب سیستم و کارایی درست هود، تأیید شده باشد. این شرکت‌ها باید گواهی مهارت و خیرگی لازم از مؤسسات مرتبط داشته باشند.
- تمام هودهایی که برای محصولات و بافت‌های انسانی یا عوامل عفونی یا عوامل بالقوه عفونی استفاده می‌شوند، باید به طور سالانه از نظر صحت کارکرد تأیید شوند.
- هودهایی که برای مواد و عوامل غیرعفونی استفاده می‌شوند، حداقل باید هر دو سال یک بار از نظر صحت کارکرد تأیید شوند.
- تمامی آزمایش‌ها باید در داخل هود ایمنی انجام شود.
- قبل از شروع کار، باید هواکش هود مدتی کار کند.
- قبل از شروع کار، باید وسایل در کابین هود گذاشته شوند.
- حداقل فاصله بین کابین و شخص باید ۱۵ سانتی‌متر باشد.
- در پایان کار دست‌ها را نباید بی‌درنگ از کابین خارج کرد. بعد از اتمام کار، باید هود ایمنی به مدت چند دقیقه روشن بماند تا تمامی آلودگی‌های احتمالی موجود از کابین خارج شوند.
- قبل از خارج کردن وسایل از هود، باید سطوح خارجی آن‌ها با الکل ۷۰٪ یا مواد مناسب، ضدعفونی شوند.
- در صورت ریخته شدن مواد آلوده داخل هود، سطح آن باید با الکل ۷۰٪ یا مواد مناسب دیگر، ضدعفونی شود.
- هیچ وسیله‌ای نباید روی قسمت بالای هود گذاشته شود. فیلتر هپا ممکن است خراب شود و در تنظیم جریان هوا اختلال ایجاد کند.
- بعد از اتمام کار برای سترون کردن هود، باید لامپ (UV) حداقل مدت نیم ساعت روشن شود.
- قبل از تعویض فیلترهای هود ایمنی، باید داخل آن ضدعفونی شود.

**هودهای ایمنی کلاس I:** از هودهای ایمنی کلاس I، هم برای محافظت افراد و هم محیط آزمایشگاه استفاده می‌شود. اما برای محافظت مواد و محصولات از قبیل آنچه برای کارهای سترون کشت بافت استفاده می‌شود، مناسب نیست و برای کارکردن با عواملی که خطر کم یا متوسط دارند مناسب است. در هودهای ایمنی کلاس I، ذرات هوای اتاق آزمایشگاه وارد هود می‌شوند و از فیلترهای هپا عبور می‌کنند (شکل ۱-۲). سرعت حرکت هوای داخل هود حدود ۷/ تا ۱ متر بر ثانیه است. هوای فیلتر شده از ساختمان آزمایشگاه خارج می‌شود. گرچه این نوع هودها، موجب حفاظت کارکنان آزمایشگاهی می‌شوند ولی در حین کار از آلوده شدن نمونه‌ها و وسایل داخل هود جلوگیری نمی‌کنند.

**هودهای ایمنی کلاس II:** هودهای ایمنی کلاس II برای محافظت افراد، محیط، مواد و محصولات طراحی شده‌اند. تفاوت اصلی هودهای کلاس I و کلاس II، تصفیه جریان هوا توسط فیلترهای هپاست، که از قسمت جلویی سطح کار وارد هود کلاس II می‌شود. در هودهای ایمنی کلاس II، ذرات هوای اتاق آزمایشگاه وارد هود می‌شود، از داخل فیلتر هپا عبور می‌کند و داخل هود

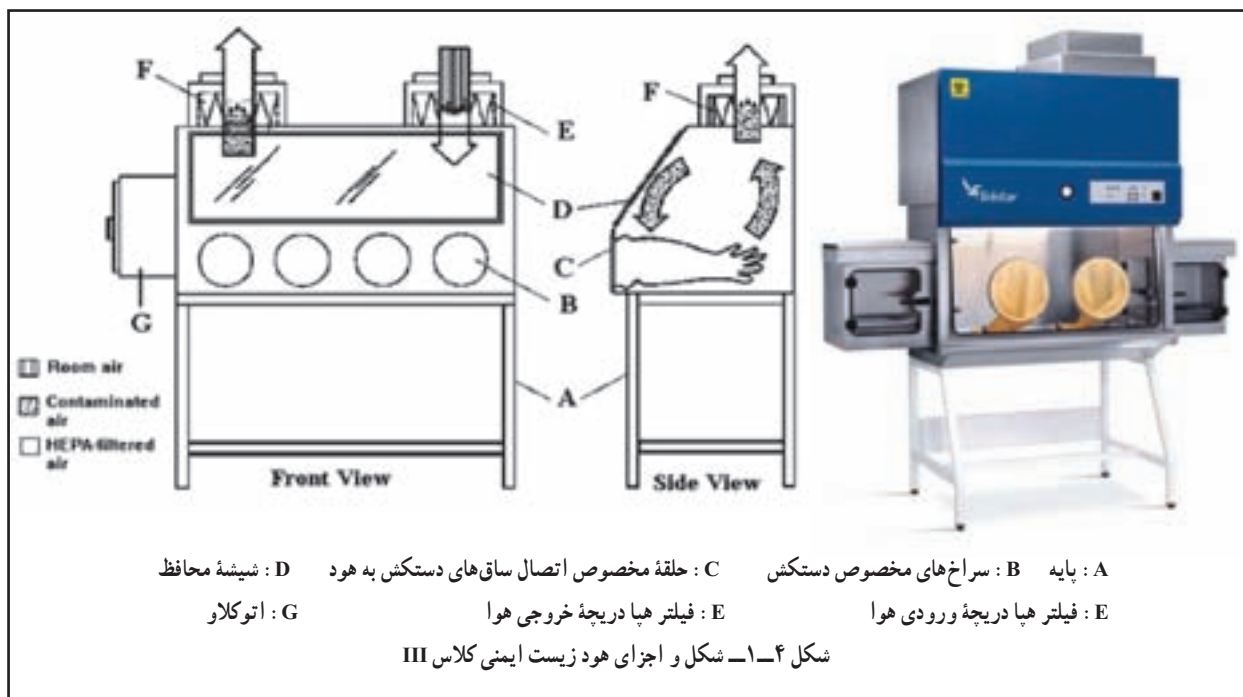
در چرخش است (شکل ۳-۱). در نتیجه این نوع هود، علاوه بر حفاظت از کارکنان آزمایشگاهی، امکان آلوده شدن نمونه‌ها و وسایل درون هود را به حداقل می‌رساند. حدود ۲۰ تا ۳۰ درصد از هوای تصفیه شده به خارج از ساختمان انتقال می‌یابد.





در هنگام کار با هود ایمنی کلاس II باید قسمت‌های مشبک جلو و عقب هود کاملاً آزاد باشند و با وسایل اضافی و در هم برهم مسدود نشود، زیرا این کار سبب اختلال یا قطع جریان هوا می‌شود و می‌تواند برای افراد، محیط و مواد و محصولات خطرناک باشد. از انجام حرکات شدید و ناگهانی در داخل و خارج هود اجتناب کنید. استفاده از شعله گاز در هود ایمنی ممنوع است، گرما سبب اختلال در جریان هوا می‌شود و شعله می‌تواند به فیلتر هپا آسیب برساند. همچنین گاز فضا را پرمی‌کند و بازگشت مجدد هوای فیلتر شده به هود عملاً کم می‌شود.

**هود ایمنی کلاس III** : این هودها در موقع کار با عوامل فوق‌العاده خطرناک زیستی و زمانی، که ایجاد محدودیت مطلق مورد نیاز است، استفاده می‌شود. این هود طوری طراحی شده است که بالاترین سطح محافظت را برای پرسنل، محیط کار و مواد تأمین می‌کند. فیلتر هپا اساسی‌ترین قسمت این هود ایمنی است (شکل ۴-۱) و ۹۹/۹۷ درصد تمام ذراتی را که اندازه آن‌ها  $0.3$  میکرون باشد جدا می‌کند. در مورد ذراتی که اندازه آن‌ها از  $0.3$  میکرون بیشتر باشد کارایی فیلتر به مراتب بیشتر است. به منظور هدایت جریان هوا در فیلتر، صفحات فیلترهای هپا توسط تیغه‌هایی از جنس آلومینیوم از همدیگر جدا شده‌اند.



## مواد شیمیایی خطرناک در آزمایشگاه

در آزمایشگاه مواد شیمیایی به سه حالت جامد، گاز یا مایع موجود است. هر کدام از حالات فوق بر فیزیولوژی موجود زنده آثار مختلفی دارند.

● مواد شیمیایی به حالت گازی دارای بخار و یا ذرات معلق هستند که از راه تنفس وارد ریه‌ها می‌شوند و آثار فیزیولوژیک خود را به صورت زیر ظاهر می‌کنند:

۱- مواد التهاب‌آور و محرک، مانند آمونیاک و اسید هیدروکلریک؛

۲- مواد خفگی‌آور ساده، مانند دی‌اکسید کربن و اسید سیانیدریک؛

۳- مواد بیهوش کننده و مخدر، مانند اتانول، دیاتیل اتر؛

۴- سموم سیستمیک، مانند متانول، فنل ها، بنزن و کربن دی سولفید؛

۵- ذرات معلق مانند آزیست و سیلیس.

• مواد شیمیایی مایع نیز فیزیولوژی موجود زنده را به آشکال زیر تحت تأثیر قرار می دهند :

۱- حلال های آلی نظیر استن، کلروفرم، سیکلو هگزان، دی اتیل اتر، دی متیل سولفوکسید، اتیل الکل، هگزان، متانول، تولوئن، متیلن کلراید و غیره که علاوه بر اشتعال پذیری آثار مسموم کننده دارند. برخی نیز خاصیت سرطان زایی و ناباورکنندگی را نشان می دهند.

۲- معرف های معدنی و محلول مانند اسید سولفوریک، اسید هیدروکلریک، آمونیاک، آب اکسیژنه و غیره ترکیباتی هستند که همگی سوزاننده و برخی خورنده اند و هر یک اثر فیزیولوژیکی متفاوتی دارند.

• مواد شیمیایی جامد نیز می توانند باعث مسمومیت یا آثار دیگر شوند.

## واکنش گرما

اکثر حلال ها دارای حد مجاز مواجهه شغلی هستند و صدمات شیمیایی ایجاد می کنند. صدمات شیمیایی ممکن است داخلی یا خارجی باشد. صدمات خارجی شامل مواجهه پوستی با مواد خورنده یا سوزش آور و صدمات داخلی شامل تأثیرات سمی یا خورنده مواد جذب شده توسط بدن است. حلال های مورد استفاده در آزمایشگاه به چند گروه الکل ها، ترکیبات کلردار و هیدروکربن ها تقسیم می شوند. مواجهه با این گروه از ترکیبات، دارای تأثیرات بهداشتی متفاوتی است. الکل ها عموماً دارای تأثیر سمی درونی و قابلیت تحریک مخاط و خواب آلودگی هستند. هیدروکربن های کلردار باعث رخوت و بی هوشی می شوند و به سیستم اعصاب مرکزی و کبد آسیب وارد می کنند. هیدروکربن ها پس از مواجهه طولانی با پوست، تحریک پوستی ایجاد می کنند.

واکنش گرماهای آلی به چهار گروه دسته بندی می شوند: اسیدها، ترکیبات هالوژنه، معرف ها و شناساگرها و حشره کش ها. بسیاری از اسیدهای معدنی و آلی حد مجاز مواجهه شغلی دارند. این حدود آستانه مجاز، نشان دهنده بیشترین غلظت هوایی است که کارکنان می توانند با آن مواجه شوند. بخار این اسیدها شدیداً برای چشم و سیستم تنفسی تحریک کننده است. اسیدهای مایع یا جامد سریعاً می توانند باعث سوختگی شدید پوست و چشم شوند. زمانی که اسیدها برای افزایش میزان حل شدن مواد آلی گرم می شوند خطر بیشتری دارند، چون واکنش آن ها بر روی پوست بسیار سریع تر است. شناسایی خطرات احتمالی مواد شیمیایی، کارکنان آزمایشگاه ها را آگاه می کند که هنگام استفاده از آن ها برای حفظ سلامتی خود و جلوگیری از بروز خطرات احتمالی نهایت مراقبت لازم را بنمایند. بنابراین، به اختصار به بعضی از مواد شیمیایی که ممکن است خطراً فرین باشند پرداخته می شود:

• استالدئید (استیک الدئید): سوزش شدید موضعی، سوختن شدید، استنشاق طولانی آن مانند مواد مخدر اثر می گذارد.

• استونیتریل (متیل سیانید): در صورتی که بلعیده شود ممکن است کشنده باشد. از طریق پوست ممکن است جذب شود و در صورت تماس با اسیدها ممکن است گازهای سمی تولید کند.

• بنزن (بنزول): سرطان زاست و ایجاد اریتم و سوختگی می کند. در اثر تماس با پوست، جذب می شود و در صورت استفاده طولانی ممکن است به کم خونی شدید منجر شود.

• بنزین کلرید (کلرو تولوئن): شدیداً برای پوست، چشم و مخاط سوزش آور است. از طریق تماس با پوست جذب می شود

و مقدار فراوان آن سبب اختلال در سیستم اعصاب مرکزی می شود.

- کلروفرم (تری کلرومتان): ممکن است سرطان‌زا باشد. بر روی قرنیه ایجاد سوزش می‌کند. تنفس طولانی مدت آن ممکن است سیستم قلبی و تنفسی را دچار اختلال کند و به مرگ منتهی شود.
- دی متیل سولفات (متیل سولفات): سرطان‌زاست. تماس از راه پوست یا مخاط با ماده مایع یا بخار آن حتی برای مدت کوتاه سبب سوزش شدید و تورم می‌شود. در صورت تماس طولانی‌تر سبب ناراحتی کرونر و احتقان ریوی می‌گردد و ممکن است بین سه تا چهار روز به مرگ منجر شود.
- دی متیل سولفو اکسید (د.ا.م.اس.او): بر روی پوست اثر می‌گذارد و سبب سوزش آن می‌شود. می‌توان آن را جزو مواد اثر گذارنده بر روی جنین طبقه‌بندی کرد.
- ۱-۴ دی اکساید (دی اتیلن اکسید): سرطان‌زاست و از طریق تماس با پوست جذب می‌شود. در اثر برخورد حاد سبب سوزش چشم و دستگاه تنفسی می‌گردد و برخورد مداوم سبب ناراحتی‌هایی در کبد و کلیه می‌شود.
- اپی کلروهیدرین (۱- کلرو ۲-۳ اپوکسی پروپان): در مسمومیت مزمن می‌تواند سبب ضایعات کلیوی گردد و در مسمومیت حاد ممکن است به علت فلج تنفسی، به مرگ منجر شود.
- اتیل استات (استیک اتر): از طریق پوست جذب می‌شود. بر روی سطح مخاط‌ها به‌ویژه مخاط لثه، چشم و راه‌های تنفسی اثر می‌گذارد. تأثیر مکرر آن موجب ناراحتی‌های کوئزوکنیوت و تاری قرنیه می‌شود.
- اتیلن دی کلرید (۲ و ۱ دی کلرواتان): اثر شدید سوزش در محل تماس باقی می‌گذارد. مسمومیت مزمن در طی چند ماه ممکن است اشتها را کاهش دهد و موجب استفراغ و دل به هم خوردگی شود.
- فرمالین (محلول فرمالدئید): سوزش شدید موضعی می‌دهد و اگر بلعیده شود موجب استفراغ شدید و اسهال می‌شود.
- فنل (کربولیک اسید): در اثر تماس این ماده با پوست، محل آسیب دیده، سفید، چین خورده و نرم می‌شود و سوزش شدیدی احساس می‌گردد. ممکن است در فاصله سی دقیقه، به دلیل اثر روی سلسله اعصاب مرکزی، به مرگ بینجامد.
- تری متیل آمین: سوزاننده قوی موضعی است و تنفس بخار آن به شدت خطرناک است.

### معرفی علائم هشدار دهنده بر روی مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایشگاه

مواد شیمیایی‌ای که در آزمایشگاه نگهداری می‌شوند باید دارای برچسب علائم باشند (شکل ۵-۱). برخی از این علائم هشداردهنده عبارت‌اند از:

- EX (Explosive): قابل انفجار، در جایی غیر از انبار مواد نگهداری شود.
- O (Oxidizing – Fire Promoting): اکسید کننده – قابل اشتعال، تماس با مواد قابل اشتعال به حداقل برسد.
- T (Toxic): سمی.
- T+ (Very Toxic): بسیار سمی، تماس با بدن به هر شکلی محدود شود (رعایت حداکثر موارد ایمنی).
- Xn (Harmful): مضر، نباید با دست تماس پیدا کند.
- F4 (Exteremch Namable): به شدت قابل اشتعال، در دمای زیر صفر نگهداری شود.
- F (Highly Namable): نگهداری در دمای زیر ۲۱°C
- C (Corrosive): خورنده، از تماس با کلیه سطوح بدن جلوگیری شود.
- Xi (Irritant): کم خطرترین.



شکل ۵-۱- برخی علائم هشدار دهنده روی برچسب مواد شیمیایی

## اتوکلاو

اتوکلاو<sup>۱</sup> دستگاهی است که به وسیله آن وسایل آزمایشگاهی، محیط‌های کشت و محلول‌ها و مواد مصرفی آلوده با استفاده از حرارت مرطوب سترون می‌شوند. این دستگاه در سال ۱۸۷۹ توسط چارلز جامبرلند<sup>۲</sup> اختراع شد. برتری اتوکلاو نسبت به سایر دستگاه‌های حرارتی استفاده از بخار آب است که امکان سترون کردن لوازم دارای قسمت‌های پلاستیکی را فراهم می‌کند. اگرچه اتوکلاو بهترین وسیله برای سترون سازی است، اما طولانی شدن مرحله گرمایی کیفیت مواد مغذی را در محیط‌های کشت پیچیده، که حاوی قندها، مواد معدنی و فلزی هستند، کاهش می‌دهد. بنابراین برای چرخه سترون سازی باید از زمان‌های کوتاه‌تر و دماهای بالاتر استفاده کرد تا علاوه بر آنکه آسیب کمتری به محیط کشت وارد می‌شود، برای ارگانسیم‌ها کشنده‌تر باشد. اتوکلاو قادر است بخار آب اشباع شده را در فشار ۱۵ پوند با حرارت ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد تولید کند. بخار ایجاد شده موجب تخریب ساختمان میکروب‌ها و اسپور آن‌ها می‌شود. چرخه سترون‌سازی شامل مراحل زیر است:

- مرحله ۱: زمان بالا رفتن دما در محفظه اتوکلاو ( $121^{\circ}\text{C}$  -  $2^{\circ}$ );
- مرحله ۲: زمان نفوذ گرما به داخل ظرف محیط کشت ( $121^{\circ}\text{C}$  -  $<100$ );
- مرحله ۳: زمان نگه‌داری در دمای مقرر ( $121^{\circ}\text{C}$  -  $121$ );
- مرحله ۴: زمان پایین آمدن دمای محفظه ( $121$  -  $8^{\circ}\text{C}$ ).

این دستگاه طوری تنظیم شده است که بعد از رسیدن به این فشار بخار و درجه حرارت، بلافاصله وارد مرحله سترون کردن می‌شود و مدت ۱۵ دقیقه به همان حالت باقی می‌ماند. دستگاه دارای یک شیر اطمینان است که به صورت خودکار بخار اضافی موجود در مخزن را حین کار به بیرون هدایت می‌کند تا شرایط ثابت بماند. قبل از شروع، شیر خروج هوا باز گذاشته می‌شود تا هوای داخل دستگاه تخلیه شود و بخار آب تمام سطوح و منافذ را بپوشاند. در این حالت عمل سترون کردن به طور کامل انجام می‌شود. پس از خاموش کردن اتوکلاو و خارج شدن بخار آب از شیر خروجی می‌توان درب دستگاه را باز کرد. بعد از آن که فشار اتاقک اتوکلاو به صفر و دمای آن به حدود  $6^{\circ}\text{C}$  رسید کنار درب اتوکلاو بایستید و آن را باز کنید. منتظر بمانید تا ظروف کمی خنک شوند، سپس آن‌ها را با دستکش مقاوم به حرارت، حمل کنید.

## نکات ضروری کار با دستگاه اتوکلاو

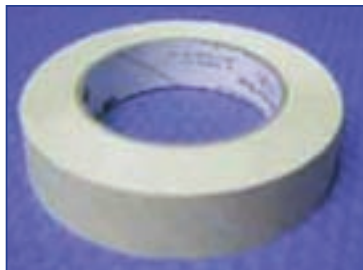
- بهتر است جهت جلوگیری از تشکیل رسوب در دستگاه اتوکلاو، از آب مقطر استفاده نمایید.
- سطح آب درون دستگاه نباید از انتهای پایین دیگ بالاتر رود.
- پیچ‌های درب را باید کاملاً محکم بست. برای این منظور باید پیچ‌های روبه‌روی هم بسته شود تا درب دستگاه به‌طور یک‌نواخت محکم گردد و بخار آب از آن خارج نشود.
- استفاده از دماهای بیشتر از میزان لازم و مدت زمان طولانی‌تر تفاوتی در نتیجه حاصل ندارد.
- ظروف دارای محلول را نباید پر کرد و حداقل بخشی از ظروف باید خالی باشد.
- درب ظروف، مخصوصاً آن‌هایی را که حاوی محلول‌اند کاملاً نبندید، بلکه مقداری آن را شل کنید تا بخار آب ایجاد شده از آن خارج شود.
- هنگام روشن بودن دستگاه، به بارگذاری یا خارج نمودن وسایل و مواد، اقدام نکنید.
- هنگام روشن بودن دستگاه و اتصال آن به پریز، اتوکلاو را تمیز نکنید.
- پیچ‌های محکم کننده درب را در هنگام کار دستگاه دستکاری نکنید.
- پس از اتمام زمان لازم، برای بازکردن درب دستگاه به صورت زیر عمل کنید :
- منبع حرارت را خاموش و دریچه خروج بخار را آهسته باز کنید تا فشار داخل دستگاه به صفر برسد و پس از آن درب دستگاه را باز نمایید.

## کنترل کیفیت اتوکلاو

برای کنترل کیفیت اتوکلاو از آزمایش شیمیایی و آزمایش بیولوژیک استفاده می‌شود. برای آزمایش شیمیایی از نوارهای اتوکلاو استفاده می‌شود. این نوارها وقتی به دمای معینی رسیدند تغییر رنگ می‌دهند. مانند نوار کاغذی TST که سه عامل زمان، بخار و دما را کنترل می‌کند و از زرد به بنفش تغییر رنگ می‌دهد، یا نوارهای سیاه در زمینه سفید که در دمای ۱۲۱ درجه نوارهای سیاه از بین می‌روند. می‌توان از برجسب ثبت سترونی<sup>۱</sup> نیز استفاده کرد که علاوه بر سنجش سترونی، امکان ثبت تاریخ، نام کاربر و نام محیط کشت بر روی آن وجود دارد. برای آزمایش بیولوژیک از ویال حاوی اسپور باسیلوس استئاروترموفیلوس<sup>۲</sup> با شماره شناسایی ATCC 7953<sup>۳</sup> استفاده می‌شود (شکل ۱-۶). اگر اتوکلاو به دمای مورد نظر نرسیده باشد با قراردادن ویال این باکتری در گرمخانه، اسپورهای آن جوانه خواهند زد. متابولیسم اسپورها، pH محیط را تغییر می‌دهند و باعث تغییر رنگ محیط خواهند شد.



(ب)



(الف)

الف) برجسب ثبت سترونی

ب) ویال‌های حاوی اسپور باسیلوس استئاروترموفیلوس زمانی که دمای اتوکلاو به حد مورد نظر نرسیده باشد از زرد به بنفش تغییر رنگ می‌دهد.

شکل ۱-۶

## آون



شکل ۷-۱- نمونه‌ای از آون آزمایشگاهی

فور یا آون برای سترون کردن موادی که کاملاً تحت نفوذ بخار قرار نمی‌گیرند، اما می‌توانند دمای بالای موردنیاز مثل  $18^{\circ}\text{C}$  -  $16^{\circ}\text{C}$  را به مدت سه ساعت تحمل کنند به کار می‌رود. درجه حرارت داخل آون توسط یک دماسنج به تنظیم کننده حرارت متصل است که دما را نشان می‌دهد. آون به‌ویژه برای ظروف شیشه‌ای مثل لوله آزمایش، پتری دیش، پی‌پت و نیز برای وسایل فلزی مثل پنس، اسکالپل و قیچی به کار می‌رود (شکل ۷-۱).

## نکات ضروری کار با دستگاه آون

- برای بسته‌بندی این وسایل می‌توان از فویل آلومینیومی یا کاغذ کرافت و سر بطری‌های پنبه‌ای استفاده کرد.
- حدود ۲ سانتی‌متر از انتهای فوقانی پی‌پت‌ها را با پنبه غیرجاذب ببندید و آن‌ها را در ظرف فلزی استوانه‌ای شکل قرار دهید، سپس درب آن را ببندید.
- درپوش لوله‌های آزمایش را با کاغذ آلومینیومی بپوشانید و آن‌ها را به‌طور عمودی در جا لوله‌ای قرار دهید. درپوش، لبه لوله را طی مدت ذخیره‌سازی از آلودگی از طریق هوا حفظ می‌کند.
- در صورتی می‌توان بطری‌های دریچ‌دار را در آون سترون کرد که درپوش و آستری آن‌ها از موادی مثل فلز، پلی پروپیلن یا لاستیک سیلیکون ساخته شده باشد تا در دمای سترون سازی از شکل طبیعی خارج نشود.
- پودر، روغن، چربی و گریس را در ظرف شیشه‌ای یا فلزی و در اندازه‌های کوچک، که از وزن  $10^{\circ}$  گرم یا عمق ۱ سانتی‌متر تجاوز نکند، سترون نمایید.
- قبل از قراردادن ظروف شیشه‌ای در آون، از خشک بودن آن‌ها مطمئن شوید. مواد را به گونه‌ای در آون قرار دهید که هوای داغ در اطراف و مابین آن‌ها در جریان باشد.
- زمان نگهداری سترون سازی از زمانی آغاز می‌شود که اتاقک به دمای انتخابی برسد.
- به دلیل عایق بودن دستگاه، چند ساعت طول می‌کشد تا اشیای داخل آن خنک شوند. درب آون را باز نکنید تا اتاقک، ظروف و مواد داخل آن تا دمای حدود  $6^{\circ}\text{C}$  خنک شوند. اگر به‌طور ناگهانی هوای سرد وارد دستگاه شود ممکن است ظروف شیشه‌ای ترک بخورند.

## کنترل کیفیت آون

برای کنترل کیفیت آون از آزمایش شیمیایی و آزمایش بیولوژیک استفاده می‌شود. برای آزمایش شیمیایی از ویال شیشه‌ای

Browne و مشاهده تغییر رنگ از قرمز به سبز استفاده می‌شود. برای آزمایش بیولوژیک از نوار کاغذی حاوی اسپور باسیلوس سوبتیلیس<sup>۱</sup> با کد شناسایی ATCC 9372 استفاده می‌شود.

### اتویا اینکوباتور (گرم‌خانه)

دستگاهی است که گرمای لازم را برای رشد باکتری‌ها، بعد از مرحله کشت، فراهم می‌کند (شکل ۸-۱). برخی اینکوباتورها جهت تأمین هوای مورد نیاز، برای رشد بهینه میکروب‌ها در محیط‌های کشت مایع به سیستم تکان دهنده<sup>۲</sup> مجهز هستند (شکل ۹-۱) و برخی نیز برای رشد باکتری‌های خاص و به ویژه کشت سلول دارای سیستم تأمین  $CO_2$  هستند (شکل ۱۰-۱).



شکل ۸-۱- نمونه‌ای از گرم‌خانه ساده آزمایشگاهی



شکل ۱۰-۱- نمونه‌ای از گرم‌خانه مجهز به سیستم تأمین گاز دی‌اکسید کربن



شکل ۹-۱- نمونه‌ای از گرم‌خانه رومیزی مجهز به سیستم تکان دهنده

۱- Bacillus subtilis

۲- Shaker

## نکات ضروری کار با اینکوباتور

- اینکوباتور تا حد امکان باید در نزدیکی هودهای کشت سلولی یا هودهای میکروبی قرار داده شوند.
- اینکوباتور را بر روی سطحی صاف و در حالت تعادل قرار دهید.
- از قرار دادن اینکوباتور در جای مرطوب و خیلی گرم، که محل مناسبی برای رشد باکتری هاست، خودداری کنید. هنگامی که درجه حرارت اینکوباتور بر روی ۳۷ تنظیم می شود درجه حرارت محیطی نباید از ۳۲ درجه بیشتر باشد.
- اینکوباتور را در نزدیک درهای اصلی یا جریانات هوایی و هواکش ها قرار ندهید.
- بعد از مشخص کردن مکان اینکوباتور باید تمام محل های اتصال گاز و آب در دستگاه را کنترل کنید.
- هنگامی که سیلندر متصل است از کار کردن با سیفون سیلندر خودداری کنید.
- از گذاشتن مواد فزّار یا قابل اشتعال (اتر، بنزین، الکل، پروپان) در اینکوباتور خودداری کنید.
- از آب تقطیر شده یا خالص برای پر کردن محفظه آب جهت ایجاد رطوبت استفاده کنید و سطح آب در محل ذخیره همیشه کنترل شود. استفاده از مقادیر کم سولفات مس و یا ساولون برای جلوگیری از رشد قارچ ها و کپک ها در آب داخل اینکوباتور مناسب است.
- ظروف کشت سلول یا پلیت های باکتری ها را با فاصله از یکدیگر قرار دهید تا جریان هوا به خوبی صورت گیرد. اگر فاصله این ظروف کم باشد تعدیل دما و گاز CO<sub>2</sub> بین آن ها به خوبی صورت نمی گیرد.
- همیشه مراقب باشید که درب داخلی اینکوباتور خوب بسته شده است.
- برای تمیز کردن دستگاه از ریختن آب روی آن خودداری کنید.
- هنگامی که می خواهید اینکوباتور را تمیز کنید از برس زبر، اسید، بنزین یا تینر استفاده نکنید، این عمل باعث از بین رفتن رنگ دستگاه و صدمه به پوشش آن می شود. همچنین قسمت های پلاستیکی ممکن است دچار تغییر شکل گردند. هیچ وقت در قسمت های پلاستیکی از مواد شیمیایی فزّار مانند بنزین استفاده نکنید. مواد دترژنت بهترین انتخاب برای شست و شوی دستگاه اند.
- برای تمیز کردن داخل دستگاه از محلول سدیم کلراید یا محلول های هالوژن دار، محلول های قلیایی یا اسیدی قوی استفاده نکنید زیرا باعث خوردگی دیواره دستگاه می شود.
- برای جلوگیری از آلودگی در اینکوباتورها، قفسه ها و دیواره دستگاه همواره باید خشک باشد. در اثر باز ماندن درب دستگاه به مدت طولانی رطوبت موجود در اینکوباتور به صورت قطرات آب درمی آید و این قطرات روی قفسه و دیواره ها باعث رشد باکتری ها و قارچ ها می شود. در این موارد آب موجود را کاملاً خشک کنید و محل را به خوبی ضد عفونی نمایید، به خصوص اگر مقداری از محیط کشت روی قفسه یا داخل اینکوباتور ریخته شده باشد.
- در صورت مشاهده آلودگی در ظروف کشت، بلافاصله تمام آن ها را خارج کنید و داخل اینکوباتور را با الکل ۷۰٪ به خوبی ضد عفونی نمایید. قفسه ها را نیز می توانید در داخل فور یا آون قرار دهید تا استرون شوند.

## بن ماری یا حمام آبی

- بن ماری وسیله ای است که به وسیله آب محتوی آن می توان حرارت معینی را ثابت نگه داشت. درجه حرارت تا ۱۰۰ درجه قابل تنظیم است. در این حالت به آن بن ماری جوش می گویند. از این دستگاه می توان به منظور گرم خانه گذاری محیط های کشت مایع و ذوب کردن محیط های کشت استفاده کرد.

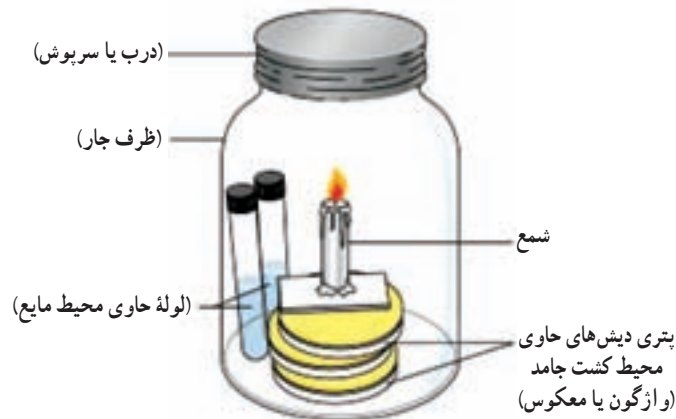


## نکات ضروری کار با بن ماری

- محفظه بن ماری باید همیشه حاوی مقدار کافی آب مقطر تمیز باشد. بنابراین، قبل از روشن کردن آن لازم است از کافی بودن حجم آب اطمینان حاصل کنید. خصوصاً زمانی که می‌خواهید دستگاه را شبانه یا برای مدت طولانی روی دمای بالای روشن تنظیم کنید. بدیهی است کم شدن آب آن باعث بروز آسیب در دستگاه و آتش سوزی خواهد شد.
- برای پر کردن بن ماری، از آب یک بار تقطیر استفاده نمایید. مراقب باشید که نمونه مورد آزمایش شده درون آب نریزد. در صورت مشاهده آلودگی در آب بن ماری، بلافاصله آب آن را به طور کامل تخلیه و پس از شست و شوی محفظه، آن را از آب مقطر ایمنی پر نمایید.
- در صورت استفاده بلند مدت، خصوصاً در دماهای بالا، درب محفظه را بسته نگه‌دارید تا از تغییر بیش از حد، فشار آمدن به دستگاه و کثیف شدن احتمالی آن جلوگیری شود.
- اگر می‌خواهید از سرد کننده استفاده کنید، لازم است بن ماری را روی دمای مورد نظر تنظیم و آن را روشن نمایید. توجه داشته باشید که هنگام قرار دادن سر ماریج در آب، دمای آب بالاتر از دمای آزمایشگاه نباشد.
- از بن ماری‌های دقیق برای دماهای بالاتر از ۵۵ درجه سانتی‌گراد استفاده نکنید.

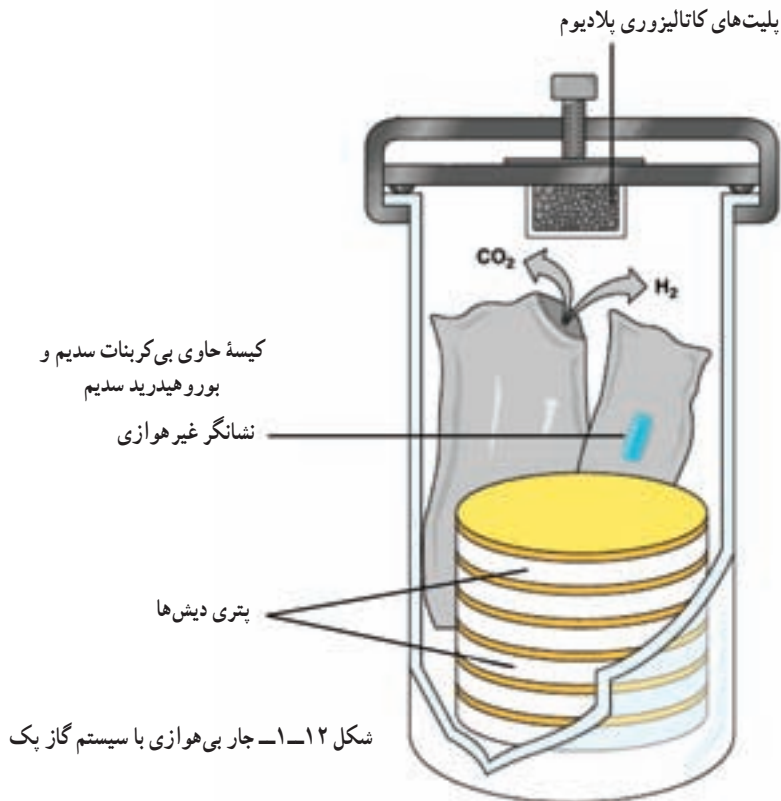
## جار بی‌هوازی

باکتری‌های بی‌هوازی اجباری باکتری‌های هستند که فقط در شرایط فاقد مولکول اکسیژن قادر به رشدند. می‌توان، بسته به میزان حساسیت این گروه به اکسیژن، از روش‌های متفاوت برای تأمین شرایط مورد نیاز رشد آن‌ها استفاده کرد. طریقه کشت باکتری‌های بی‌هوازی در آزمایشگاه به این ترتیب است که بعد از انتخاب محیط کشت مناسب جهت کشت باکتری مورد نظر، پلیت یا لوله کشت را در وسیله‌ای به نام جار بی‌هوازی قرار می‌دهند تا این وسیله شرایط یک محیط بی‌هوازی را برای باکتری ایجاد نماید. در واقع جار وسیله‌ای استوانه‌ای شکل و بزرگ و حاوی درب مخصوص است که برای کشت میکروب‌های بی‌هوازی در شرایط خلأ از آن استفاده می‌شود (شکل ۱۱-۱). در جار پلیت‌های حاوی محیط کشت جامد به صورت وارونه قرار داده شده است و هوای موجود با روشن کردن شمع، با مخلوطی از گازهای نیتروژن، هیدروژن و دی‌اکسید کربن جای‌گزین می‌شود.



شکل ۱۱-۱- جار بی‌هوازی ساده

همچنین می‌توان از گاز پک مخصوص بی‌هوازی برای تولید شرایط در صورت نبودن اکسیژن استفاده کرد (شکل ۱۲-۱).  
 در این سیستم از یک جار بی‌رنگ پلاستیکی با درپوش محکم استفاده می‌شود. عملکرد گاز پک به این صورت است که مواد داخل گاز پک طی واکنش با آب، اکسیژن محیط داخل جار را مصرف می‌کند و با حذف اکسیژن محیط، شرایط بی‌هوازی برای رشد باکتری فراهم می‌شود. گاز پک باعث تولید هیدروژن و دی‌اکسید کربن می‌شود. هیدروژن در حضور دانه‌های پالادیوم<sup>۱</sup> (در نقش کاتالیزور) موجود در درب جار، ترکیب می‌گردد و به صورت قطرات آب در جداره ظرف ظاهر می‌شود. تولید قطرات آب در جداره جار نشانگر عملکرد خوب کاتالیزور و حذف اکسیژن است.



شکل ۱۲-۱- جار بی‌هوازی با سیستم گاز پک

برای تأیید ایجاد شرایط بی‌هوازی می‌توان از نوارهای معرف‌های شیمیایی نیز استفاده کرد. رایج‌ترین معرف شیمیایی متیلن بلو<sup>۲</sup> است که در صورت بودن اکسیژن به رنگ آبی ظاهر می‌گردد و در صورت نبودن اکسیژن احیا و بی‌رنگ می‌شود.

## سانتریفوژ

سانتریفوژ<sup>۳</sup> یا دستگاه مرکز گریز دستگاهی است که در آن با استفاده از نیروی گریز از مرکز در سرعت بالا مواد را از یکدیگر جدا می‌کنند. در این دستگاه، محفظه‌ای که مواد جداشدنی در آن قرار دارد، معمولاً به کمک یک موتور به سرعت حول یک محور می‌چرخد (شکل ۱۳-۱).



شکل ۱۳-۱- نمونه‌ای از سانتریفوژ رومیزی آزمایشگاهی

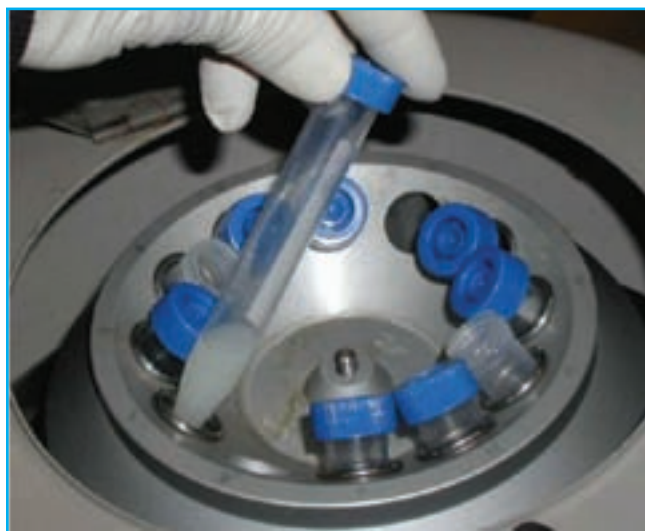
۱- Palladium

۲- Methylene blue

۳- Centrifuge

اساس کار سانتریفوژ این است که هرگاه جسمی با سرعت معینی حول یک مرکز با محور دوران کند، نیرویی در جسم متحرک و در جهت عمود بر مسیر دوران و به سمت خارج از مرکز ایجاد می‌گردد که به نیروی فراگریز یا نیروی گریز از مرکز موسوم است. مقدار آن از رابطه  $F=MRW^2$  که در آن شعاع دوران،  $M$  جرم جسم،  $V$  سرعت خطی و  $W$  سرعت زاویه‌ای است به دست می‌آید. محور دوران ممکن است به سه حال قائم، افقی یا مایل باشد.

معمولاً دستگاه سانتریفوژ را برای جدا کردن ذرات جامد از یک مایع یا تقسیم مخلوط مایعات به اجزای مختلف آن به کار می‌گیرند. مخلوط را درون لوله‌ای قرار می‌دهند، به طوری که با چرخش دستگاه، مخلوط به سمت خارج از مرکز حرکت می‌کند و حالت افقی قرار می‌گیرد (شکل ۱۴-۱). در این حالت، نیروی گریز از مرکز می‌خواهد که مخلوط را برخلاف مرکز سانتریفوژ براند و از این نقطه دور کند و ذرات یا مایع سنگین‌تر بیش‌تر به سمت بیرون (یا ته مخلوط) رانده می‌شود. وقتی سانتریفوژ از حرکت باز می‌ایستد، مواد به همین حالت غیر مخلوط می‌ماند. خون و سایر نمونه‌های بیولوژیکی را معمولاً به وسیله دستگاه سانتریفوژ جدا می‌کنند.



شکل ۱۴-۱- قرار دادن لوله‌های محتوی مواد مورد آزمایش در سانتریفوژ

## نکات ضروری هنگام کار با سانتریفوژ

- رعایت نکات ضروری و عمومی، هنگام کار با دستگاه سانتریفوژ با مراجعه به دستورالعمل مربوط به آن؛
  - بازدید و بررسی مختصر، قبل از شروع به کار با سانتریفوژ (شکسته نبودن بوکت‌ها و...)
  - مساوی بودن حجم مایع در لوله‌های سانتریفوژ، به منظور برقراری تعادل؛
  - کنترل شدن صداها و لرزش‌های غیرعادی، در ابتدای حرکت؛
  - تمیز کردن و ضدعفونی کردن سطوح داخلی سانتریفوژ با یک ماده مناسب، بعد از اتمام کار. (در صورت ریختن نمونه آلوده، باید قبل از به کارگیری، مجدداً ضدعفونی انجام شود)؛
  - برای جلوگیری از تولید آئروسول، در مورد ترکیبات آلوده‌ای که راه سرایت آن‌ها از طریق ذرات ریز معلق در هواست، اقدامات ایمنی زیر لازم است:
- الف) بوکت سانتریفوژ کاملاً محکم باشد؛

ب) برای لوله‌های سانتیفوژ از درب پیچ‌دار استفاده شود و موقع کار، درب لوله کاملاً بسته باشد؛

ج) درب سانتیفوژ، بلافاصله بعد از اتمام کار باز نشود؛

د) برای پیش‌گیری از انتشار آئروسول در فضای اتاق درب لوله‌های سانتیفوژ در زیر هود زیست ایمنی مناسب باز شود.

• گزارش کردن سریع موضوع، در صورت ریختن مواد خطرناک زیستی و ضد عفونی و نظافت آن، به روشی که برای تمیز کردن مواد خطرناک زیستی بیان شده است.

## میکروسکوپ

چون اکثر میکروب‌ها کوچک‌اند و با چشم غیر مسلح قابل رؤیت نیستند، برای مطالعه آن‌ها از ابزار خاصی به نام میکروسکوپ استفاده می‌شود. میکروسکوپ از نظر لغوی از دو بخش میکرو به معنی کوچک و سکوپ به معنی رؤیت (مشاهده) تشکیل شده است. میکروسکوپ انواع مختلفی دارد از جمله نوری، فاز متضاد، تداخلی، زمینه تاریک، پلاریزان و الکترونی.

**میکروسکوپ نوری:** میکروسکوپ‌های نوری معمولی که در تحقیقات بیولوژیکی و پزشکی به کار می‌روند، دو گروه هستند. یک گروه دارای چشمه نوری مجزا از میکروسکوپ، و گروه دوم آن‌هایی که دارای چشمه نوری تعبیه شده در میکروسکوپ‌اند (شکل ۱۵-۱). میکروسکوپ‌های معمولی مدرن مورد استفاده از نوع دوم است و تقریباً ساخت نوع اول و استفاده از آن منسوخ شده است.

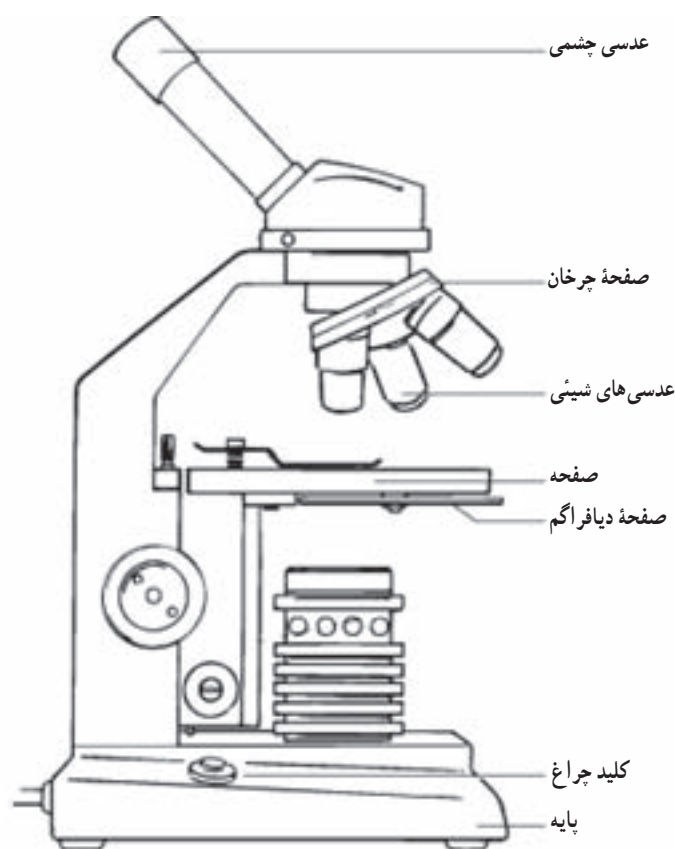
اجزای اصلی میکروسکوپ نوری (شکل ۱۶-۱) عبارت‌اند از:

**پایه<sup>۱</sup>:** که از دو بخش تشکیل شده است. یک بخش پایینی که بر روی میز محل مطالعه قرار می‌گیرد و دیگری ستون که اجزای مختلف میکروسکوپ به آن متصل می‌شود.

**لوله<sup>۲</sup> میکروسکوپ:** شامل دو گروه عدسی چشمی و شیئی است. در میکروسکوپ‌های معمولی چهار عدسی شیئی بر روی صفحه چرخان نصب شده که سه عدسی اول در حالت خشک و عدسی بعدی در حالت ایمرسیون روغنی مورد استفاده قرار می‌گیرند. وظیفه عدسی شیئی تهیه تصویر بزرگ شده از جسم مورد نظر است. وظایفی که عدسی چشمی بر عهده دارد عبارت است از: بزرگ‌سازی تصویر معکوس حاصله از عدسی شیئی، تشکیل تصویر مجازی از تصویر حاصله به وسیله عدسی شیئی، اندازه‌گیری و سنجش اجزای واقع در تصویر.



شکل ۱۵-۱- نمونه‌ای از میکروسکوپ نوری دو چشمی



شکل ۱۶-۱- اجزای اصلی میکروسکوپ نوری

**چشمی<sup>۱</sup>**: دو نوع معمول آن‌ها یکی چشمی هویگنس<sup>۱</sup> و دیگری چشمی رامزدن<sup>۲</sup> است. چشمی هویگنس که به چشمی منفی معروف است دارای بزرگ‌نمایی ۱۰ و ۵ است. این چشمی از دو عدسی تشکیل شده که یک طرف هر کدام مسطح و طرف دیگر محدب است و بین این دو عدسی دیافراگم قرار می‌گیرد. سطح محدب هر دو عدسی به طرف پایین است. عدسی پایین پرتوهای رسیده از عدسی شیئی را جمع آوری و در محل دیافراگم یا در نزدیکی آن متمرکز می‌کند. عدسی چشمی این تصویر را بزرگ می‌کند و به صورت یک تصویر مجازی بزرگ شده به چشم مشاهده‌گر انتقال می‌دهد. کار دیافراگم کنترل شدت نور و کاهش خیره‌کنندگی نور رسیده به چشم بیننده است. اشکال عمده چشمی هویگنس محدود بودن میدان دید و تأمین نکردن راحتی کافی برای چشم است. چشمی رامزدن که به چشمی مثبت معروف است با دقت خوبی انحرافات عدسی‌ها را تصحیح می‌کند.

**چشمه مصنوعی نوری<sup>۳</sup>**: این میکروسکوپ برای وضوح تصویر است. لامپ‌های مورد استفاده در میکروسکوپ‌ها عبارت‌اند از: لامپ هالوژن، جیوه، تنگستن و گزنون که با ولتاژ کم کار می‌کند.

**کند/نسور<sup>۴</sup>**: به مجموعه عدسی‌های متمرکز کننده نور می‌گویند که وظیفه آن متمرکزسازی نور بر روی نمونه است. بیشتر اشیایی که زیر میکروسکوپ مشاهده می‌شوند نسبت به نور شفاف هستند. اجزای آن‌ها تنها وقتی قابل مشاهده است که نسبت به زمینه دارای وضوح<sup>۵</sup> (وضوح در شدت یا در رنگ) باشند.

۱- Objective

۲- Huygenian

۳- Ramsden

۴- Condenser

۵- Contrast

برخی از میکروسکوپ‌ها به دوربین هستند (شکل ۱۷-۱) که امکان مطالعه دقیق‌تر و نیز ثبت آن در رایانه را فراهم می‌سازد.



شکل ۱۷-۱- نمونه‌ای از میکروسکوپ مجهز به دوربین

**میکروسکوپ الکترونی:** یکی از تجهیزات بزرگ علمی میکروسکوپ الکترونی است (شکل ۱۸-۱). دستگاه ساده‌ای از این میکروسکوپ برای اولین بار در سال ۱۹۴۰ میلادی ساخته شد و به وسیله آن زیست‌شناسان توانستند اجزای بیشتری از یک سلول را مشاهده کنند. بعد از جنگ جهانی میکروسکوپ الکترونی توسط چارلز اتلی<sup>۱</sup> و همکارانش تکمیل شد. میکروسکوپ الکترونی براساس قوانین نوری کار می‌کند و مانند تمام میکروسکوپ‌ها از دو عدسی شیئی و چشمی تشکیل شده است. ولی در این دستگاه به جای نور از شار الکترون (پرتوهای الکترونی) پراثرژی استفاده می‌شود.

از آنجایی که طول موج تابش الکترون بسیار کوتاه‌تر است تصاویر به دست آمده، نسبت به میکروسکوپ‌های نوری، دارای بزرگ‌نمایی بیشتری هستند. حد تفکیک (R) به طول موج نوری بستگی دارد که به نمونه می‌تابد. در حقیقت بین این دو، رابطه مستقیمی وجود دارد. یعنی هر قدر طول موج تابشی کوچک‌تر باشد، R نیز کوچک‌تر و قدرت جداسازی بیشتر است. حد تفکیک با میکروسکوپ الکترونی برای ملکول‌های تخلیص شده زیستی، حدود  $1/10^8$  نانومتر و برای سلول‌ها ۲ نانومتر است که دست کم  $10^5$  برابر قوی‌تر از بهترین میکروسکوپ‌های نوری است. میکروسکوپ الکترونی با قدرت تفکیک بالا حتی می‌تواند در دل دانه‌ای بسیار کوچک با قطری در حد میکرومتر نفوذ کند و عناصر تشکیل دهنده آن را نشان دهد.

در این دستگاه، الکترون پراثرژی از یک منبع الکترون خارج می‌شود و تحت شتاب می‌گیرد. بنابراین نور حاصل در مسیر خود از روزنه‌های تعبیه شده در یک فلز و یا از لنزهای مغناطیسی عبور می‌کند. برای تفکیک دو نقطه نزدیک‌تر از  $250^\circ$  آنگستروم باید از میکروسکوپ الکترونی استفاده کرد، زیرا طول موج الکترون از طول موج نور کمتر است. میکروسکوپ الکترونی شعاع الکترون را از داخل مقطع بسیار نازکی عبور می‌دهد. چون تراکم مواد در تمام قسمت‌های نمونه مورد مطالعه یکسان نیست، میزان الکترونی که از قسمت‌های مختلف عبور می‌کند متفاوت است. در نتیجه تصویری از قسمت‌های تاریک و روشن آن به دست می‌آید. میکروسکوپ الکترونی دارای یک قسمت لوله‌ای شکل است که الکترون می‌تواند آزادانه از آن عبور کند. در قسمت بالای لوله یک قطب منفی

الکتريکی به شکل رشته سيم نازک وجود دارد که جنس آن از تنگستن است. اين قسمت آن قدر حرارت داده می شود تا بتواند از خود الکترون آزاد کند. اين عمل با ايجاد اختلاف پتانسيل از ۲۰۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰ ولت بين کاتد و آند صورت می گيرد. در نتيجه یک شعاع الکترونی به سوی پايين قسمت لوله ای شکل شتاب داده می شود. به اين سيستم، تفنگ الکترونی می گویند. در طول لوله عدسی های همگرا اندازه و روشنایی شعاع الکترونی را قبل از برخورد با نمونه مورد مطالعه کنترل می کنند. مقطع مورد بررسی روی یک صفحه مشبک دایره شکلی قرار داده می شود. شعاع الکترونی پس از عبور از مقطع و قبل از اين که به حد بزرگ نمایی نهایي برسد، از میان عدسی های شیئی عبور می کند و تنظيم می شود. سپس توسط عدسی های بر روی صفحه زیر میکروسکوپ منعکس می شود. چگالی بزرگ نمایی بیشتر میکروسکوپ ها از ۵۰ تا ۸۰۰۰۰۰ برابر است. صفحه زیر میکروسکوپ که از مواد فسفردار پوشانیده شده است در مقابل پرتو الکترون از خود نور تولید می کند. در زیر اين صفحه یک دوربین عکاسی قرار دارد که از تصویر روی صحنه عکس می گيرد.



شکل ۱۸-۱- میکروسکوپ الکترونی



## ۱- نکات ایمنی را که قبل از ورود به آزمایشگاه باید

رعایت کنیم، نام ببرید.

استفاده از روپوش سفید آزمایشگاه، دستکش و در صورت لزوم عینک، ماسک و کفش ضروری است. لباس‌های خود را روی جا لباسی قرار دهید و از گذاشتن آن روی میز آزمایشگاه خودداری کنید.

## ۲- از نظر شما دلیل ممنوعیت خوردن و آشامیدن در

آزمایشگاه میکروبیولوژی چیست؟

به علت آلودگی‌ای که در آزمایشگاه وجود دارد، امکان سرایت آلودگی از طریق خوردن و آشامیدن وجود دارد. ضمناً ممکن است مواد خوراکی سبب ایجاد آلودگی در محیط آزمایشگاه نیز بشود.

## ۳- چرا بایستی پس از هر آزمایش، علاوه بر وسایل مورد

استفاده، میزهای کار را نیز ضد عفونی کرد؟

امکان آلوده شدن سطوح به وسیله میکروارگانیسم‌ها وجود دارد.

## ۴- کاربرد هر یک از دستگاه‌های زیر را شرح دهید.

گرم‌خانه (آون)، اتوکلاو، تکان دهنده مکانیکی

**اتوکلاو:** دستگاهی است که از آن جهت سترون کردن محیط‌های

کشت و محلول‌های مقاوم به حرارت استفاده می‌شود.

**تکان دهنده مکانیکی:** برای یک نواخت کردن محتوای ظروف

مناسب است و کارش شکستن مجموعه‌های میکروبی در لوله ارلن است. برای این منظور دستگاه باید در جهت پایین و بالا حداقل به مدت هفت ثانیه کار کند.

**آون:** دستگاهی است که از آن جهت سترون نمودن وسایل،

ابزارها و ظروف مقاوم در برابر حرارت استفاده می‌شود.