تاریخچه میکروب‌شناسی

انسان‌ها همیشه تحت تأثیر بیماری‌هایی بوده‌اند که در جوامع بشری انتشار می‌یافتند. آنان معتقد بودند که بیماری‌ها، درنتیجه برخورد خدایان و فرشته‌ها با شیاطین به‌وجود می‌آیند. کسی نمی‌توانست علت و نحوه وقوع و انتشار بیماری‌ها را توضیح دهد.

ورو (Verro)، اظهار داشت که بیماری به‌وسیله ذرات مرطوب و نادیدنی موجود در هوا که از طریق چشم و یا دهان و بینی وارد بدن می‌شوند ایجاد می‌گردد. بنابراین، پیشینیان تصور می‌کرده‌اند که بیماری‌های واگیردار، به‌وسیله ذرات زنده نادیدنی، حادث می‌شوند ولی این موضوع تا هنگام اختراع میکروسکوپ، قطعیت پیدا نکرد.

اساس تلسکوپ و میکروسکوپ را نخستین بار یک عینک‌ساز آلمانی به نام ــ "Zacharias Sansen" در سال ۱۶۰۹ میلادی، به‌طور اتفاقی کشف کرد. او با قراردادن دو عدسی در یک لوله، به این اختراع نائل آمد.

آنتونی وان‌لون هوک (۱۷۲۳ــ۱۶۳۲.م) بزرگترین میکروسکوپ‌شناس بود که مشاهدات زیادی با میکروسکوپ داشت. او اولین کسی بود که اشکال گلبول‌های قرمز انسان و عوامل کوچک بیماری را نشان داد و آن‌ها را "animalcules" نامید. احتمالاً، اولین کسی که مدرک واقعی در مورد میکروارگانیسم‌های زنده عامل بیماری‌های واگیردار را عرضه کرد، باسی (Bassi) بود. او در سال ۱۸۳۶.م، انتقال قارچ عامل بیماری را از یک کرم بیمار به کرم دیگر مشاهده کرد. ولی، هنوز مردم به تولید خودبه‌خودی معتقد بودند. ایده اصلی تولید خودبه‌خودی، به‌راحتی قابل فهم است. اگر غذا مدتی در یک جا بماند، فاسد می‌شود. وقتی ماده غذایی فاسد شده زیر میکروسکوپ بررسی شود، میکروب‌های فراوانی یافت می‌گردد. پرسش اینجاست که این میکروب‌ها از کجا می‌آیند و چرا در غذای تازه یافت نمی‌شوند؟ بعضی معتقد بودند که آن‌ها از ذرات ریزی که در هوا موجود است وارد غذا می‌شوند درصورتی که عده‌ای عقیده داشتند آن‌ها خودبه‌خود تولید می‌شوند. تولید خودبه‌خودی بدین معنی است که حیات ممکن است از چیزهای غیرزنده حاصل شده باشد.

تجربیات پزشک ایتالیایی، فرانسسکوردی (۱۶۶۵. م) نظریه تولید خودبه‌خودی را رد کرد. وی، افسانه تولید خودبه‌خودی لارو از گوشت فاسد شده را از بین برد، او نشان داد که اگر گوشت، در داخل ظرفی که با گاز نازک پوشیده شده است گذاشته شود و از نفوذ تخم‌گذاری مگس‌ها در امان بماند، هیچ لاروی ظاهر نخواهد شد.

Dusch (۶۱ــ ۱۸۵۴) دانشمندی بود که هوا را از صافی کتانی گذراند. در این آزمایش نیز، آب گوشت عاری از میکروارگانیسم بود و شفاف باقی ماند، درصورتی که آب‌گوشت موجود در ظروف کنترل بدون صافی، کدر شده بود. به رغم آزمایش‌های دانشمندان نامبرده در مورد تولید خودبه‌خودی، همچنان بحث‌های زیادی در این زمینه مطرح بود. مخالف سرسخت این نظریه، شیمیدان فرانسوی لوئی‌پاستور (۱۸۲۲.م ــ ۱۸۹۵) بود. او، برای اولین بار، هوا را از صافی‌های کتانی گذراند. و این صافی‌ها را در الکل و اتر حل نمود و سپس، ذرات ته‌نشین شده را در زیر میکروسکوپ قرار داد. وی دریافت که در هوای معمولی، انواع ثابتی از ذرات جامد در اندازه‌های ۰/۰۱ میلی‌متر تا ۱ میلی‌متر وجود دارند. بیشتر این ذرات، شبیه اسپور کپک‌ها، کیست‌های پروتوزوآها و سلول‌های میکروبی مختلف دیگر بودند و نتیجه گرفت که میکروارگانیسم‌های یافت شده در مواد فاسد شده، از اجسام موجود در هوا نشأت می‌گیرند. او بر این باور بود که این اجسام ریز، روی تمام اشیا می‌نشینند، اگر این موضوع درست بود می‌باید با از بین‌بردن آن‌ها، مواد غذایی از فساد مصون می‌ماندند. پاستور، برای حذف این آلوده‌کننده‌ها، از حرارت استفاده کرد. وی، آب گوشت را در ظرف شیشه‌ای گردن باریک و خمیده که به «فلاسک پاستور» معروف است قرار داد. در چنین ظرفی، او توانست ماده فسادپذیر را بجوشاند. پس از سردشدن ظرف، هوای تازه می‌توانست وارد ظرف شود. ولی خمیدگی‌های گردن ظرف، اجازه نمی‌داد ذرات، باکتری‌ها و میکروارگانیسم‌های دیگر به داخل آب گوشت وارد شوند. همین آزمایش ساده، بحث‌های زیادی پیرامون نظریه تولید خودبه‌خودی برانگیخت و سعی در رد این نظریه، منجر به ابداع روش استریلیزه‌کردن[۱] گردید. امروزه ما، کشتن باکتری‌های داخل یا روی اشیا را استریل‌کردن می‌نامیم.

پاستور دریافت که آب معمولی حتی پس از جوشاندن، دارای میکروارگانیسم‌های متعدد است. به همین دلیل، حرارت ۱۲۰ درجه تحت فشار را ابداع نمود. بنابراین، وی موجبات استفاده از اتوکلاو را در آزمایشگاه پایه‌ریزی کرد. وی هم‌چنین روش استریل‌کردن وسایل شیشه‌ای را، با حرارت خشک ۱۷۰ درجه سانتی‌گراد ابداع کرد. کارهای پاستور، در زمینه استریلیزه‌کردن، از سوی افراد دیگر دنبال شد. از جمله آن‌ها، تندال (John Tyndall)۱۸۷۷. م، متوجه شد که باکتری‌های در حال رشد به‌آسانی با جوشاندن نابود می‌شوند، ولی باکتری‌هایی که در مرحله غیرفعال هستند نسبت به حرارت مقاومت دارند. درنتیجه، وی روش استریلیزه‌کردن با حرارت مکرر را پیشنهاد کرد که به تندالیزه‌کردن معروف شد و امروزه نیز کاربرد دارد.

۱ــ Sterilization

پاستور هم‌چنین متوجه شد گوسفندانی که در زمین‌های آلوده به لاشه احشام مبتلا به سیاه‌زخم چرا می‌کنند هنگام تزریق باسیل سیاه‌زخم، به این بیماری مبتلا نمی‌شوند حال آن که گوسفندان دیگر مبتلا شده، می‌میرند. او نتیجه گرفت که هنگام چرا، تعداد بسیار کمی از باکتری‌های لاشه گوسفند دفن شده، وارد بدن گوسفندان در حال چرا شده، ایمنی بدن آن‌ها را افزایش می‌دهد و باعث مقاومت آن‌ها در برابر بیماری سیاه‌زخم می‌شوند. با استفاده از این تجربه و با کاهش تعداد باکتری‌های بیماری‌زا در آزمایشگاه و تزریق آن‌ها به گوسفندان، وی توانست از مرگ و میر گوسفندان جلوگیری کند.

پاستور، مطالعات خود را بر روی پیشگیری از بیماری هاری متمرکز کرد و پی برد که عامل ایجادکننده هاری به مغز و نخاع حمله می‌کند. او نخاع خرگوش‌های تلف‌شده از این بیماری را در هوای خشک استریل به‌صورت سوسپانسیون درآورد. با این روش، عامل بیماری هاری بیماری‌زایی خود را از دست داد و پاستور با استفاده از آن واکسن هاری را تولید کرد.

از کشفیات دیگر علم میکروب‌شناسی، می‌توان به موارد زیر اشاره کرد :

در سال ۱۷۹۶.م، برای اولین بار ادوارد جنر از واکسن استفاده کرد.

در سال ۱۸۸۰.م، لویی پاستور کشف کرد که هاری، یک بیماری عفونی‌ست و به‌وسیله عواملی غیر از باکتری‌ها ایجاد می‌شود.

در سال ۱۸۸۶.م، Adolf Meyer ثابت کرد که بیماری موزائیک تنباکو، یک بیماری عفونی‌ست و به وسیلهٔ عاملی غیر از باکتری ایجاد می‌شود.

در سال ۱۸۹۲.م، دیمتری ایوانووسکی نشان داد که بیماری موزائیک تنباکو دارای عامل ریزی‌ست که از صافی‌های مانع عبور باکتری می‌گذرد.

در سال ۱۸۹۸.م، Luffler و Frosch بیماری پا و دهان گاو را به عامل صافی‌پذیر نسبت دادند که در محیط‌های کشت معمولی قابل کشت نبود. این اولین بیماری ویروسی حیوانی بود که تشخیص داده شد.

در سال ۱۹۱۵.م، F.W.Twort متوجه شد که باکتری‌ها نیز به عفونت‌های ویروسی مبتلا می‌شوند.

در سال ۱۹۱۶.م، d,Herelle متوجه نتیجه ذکرشده، گردید و برای ویروس‌های آلوده‌کننده باکتری نام «باکتریوفاژ» را برگزید.

در سال ۱۹۳۳.م، M. Schlesinger موفق به جداسازی یک ویروس شد. (باکتریوفاژ WLL)

در سال ۱۹۳۵.م، Wendell M. Stanley ویروس موزائیک تنباکو را ایزوله، خالص و کریستالیزه کرد.

در سال ۱۹۳۹.م، M. Delbruck، جهش‌زایی در ویروس‌ها را کشف کرد.

در سال ۱۹۴۹.م، J. Enders برای اولین بار یک ویروس (ویروس پولیو) را در محیط کشت بافتی کشت داد.

در سال ۱۹۵۲.م، M.chase و A.Hershey دریافتند که اطلاعات ژنتیکی را اسید نوکلئیک حمل می‌کند و هنگام عفونت، تنها اسید نوکلئیک ویروس، به سلول میزبان نفوذ می‌کند.

در سال ۱۹۵۷.م، A.Sabine و J.Salk اولین واکسن علیه فلج اطفال را کشف کردند.

در سال ۱۹۵۹.م، R.L. Sinshemore کشف کرد که باکتریوفاژ ∅×174 دارای DNA تک‌رشته‌ای‌ست.

در سال ۷ـ۱۹۶۴.م، D.Baltimore و H. Temin سنتز RNA متکی به DNA را در ویروس رزسارکوم کشف کردند.

در سال ۴ـ۱۹۷۳.م، F.Tam و A.Sabine مدعی شدند که ممکن است ویروس هرپس سمپلکس در انسان، ایجاد سرطان کند.

در سال ۳ـ۱۹۸۲.م، Robert Koch میکروباکتریوم توبرکولوزیس عامل بیماری سل و ویبریوکلرا عامل بیماری وبا را کشف کرد.

فصل اول

آزمایشگاه میکروبیولوژی

هدف‌های رفتاری: در پایان این فصل، فراگیر باید بتواند :

۱ــ مقررات آزمایشگاه میکروبیولوژی را رعایت کند.

۲ــ وسایل و تجهیزات مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب‌شناسی را به‌کار برد.

۱ــ۱ــ قوانین و مقررات کار در آزمایشگاه

۱ــ۱ــ۱ــ افراد برای ورود به آزمایشگاه باید از روپوش، دستکش و در صورت لزوم، عینک، ماسک و کفش مناسب استفاده نمایند.

۲ــ۱ــ۱ــ روپوش و سایر وسایل، باید به هنگام خروج از آزمایشگاه تعویض گردد و به هیچ‌وجه در موقع صرف غذا و ... مورد استفاده قرار نگیرد.

۳ــ۱ــ۱ــ روپوش و سایر وسایل، در کمدهایی بیرون از آزمایشگاه نگهداری شود.

۴ــ۱ــ۱ــ خوردن و آشامیدن در آزمایشگاه مجاز نیست و برچسب‌ها نباید با آب دهان مرطوب شوند.

۵ــ۱ــ۱ــ لوازم شخصی از قبیل کتاب، کاغذ و ... باید در کمدها قرار داده شوند و در آزمایشگاه از قلم و کاغذ مخصوص استفاده شود.

۶ــ۱ــ۱ــ میزهای کار و سطوح مورد استفاده، مرتباً شسته و ضدعفونی شوند.

۷ــ۱ــ۱ــ نمونه‌های وارد شده به آزمایشگاه، حاوی تعداد و انواع نامعینی از میکروارگانیسم‌ها هستند که می‌باید آن‌ها را خطر بالقوه به حساب آورد. بنابراین بهتر است برای دریافت نمونه، محل جداگانه‌ای در نظر گرفته شود.

۸ــ۱ــ۱ــ مواد شیمیایی مورد استفاده، ممکن است سمی و سرطان‌زا باشد از این رو، باید در کاربرد آن‌ها نکات ایمنی را رعایت نمود.

۹ــ۱ــ۱ــ چنانچه، انجام آزمایشی باعث انتشار هاگ قارچ‌ها در محیط می‌گردد این آزمایش باید در محفظه بسته انجام گیرد. زیرا هاگ قارچ‌ها سبب بروز اختلال تنفسی در انسان و سایر حیوانات آزمایشگاهی می‌گردد. این گونه وسایل باید کاملاً محکم بسته شوند زیرا وجود یک روزنه بسیار ریز هم، باعث راه‌یابی هاگ‌ها به محیط آزمایشگاه خواهد شد.

۱۰ــ۱ــ۱ــ برخی از میکروارگانیسم‌ها می‌توانند از راه پوست نفوذ کنند، بنابراین حتماً از دستکش استفاده کنید و پس از اتمام آزمایش، دست‌ها را با محلول‌های ضدعفونی‌کننده به دقت بشویید.

۱۱ــ۱ــ۱ــ مکیدن مایعات آلوده، با پیپت به‌وسیله دهان ممنوع است برای این منظور، باید از پمپ یا سرنگ مخصوص استفاده کرد.

۱۲ــ۱ــ۱ــ وسایلی که تحت فشار کار می‌کنند (اتوکلاو) می‌باید مرتباً بازدید و درستی آن‌ها تأیید گردد.

۱۳ــ۱ــ۱ــ در محل خروج هوا، به‌وسیله هواکش‌های آزمایشگاه، صافی نصب شود.

۱۴ــ۱ــ۱ــ هنگام سترون‌کردن سوزن کشت در روی شعله باید توجه داشت که امکان انتشارمیکروارگانیسم‌ها بر اثر حرارت شعله وجود دارد. از این‌رو، با حرکت‌دادن تدریجی سوزن از قسمت سرد به قسمت گرم آن باید از این پدیده جلوگیری کرد. (چنانچه از چراغ بنزن برقی استفاده

شود چنین خطری وجود ندارد.)

۱۵ــ۱ــ۱ــ کلیه وسایل مورد استفاده، پس از انجام آزمایش می‌باید شسته و سترون شود.

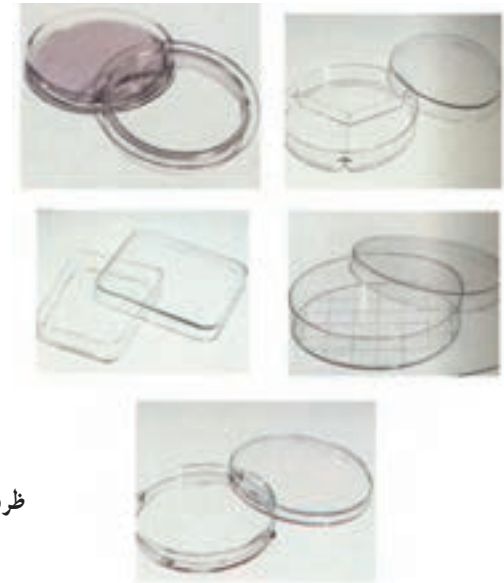
۱۶ــ۱ــ۱ــ از ورود بی‌رویه و مکرر افراد به آزمایشگاه باید جلوگیری شود.

۲ــ۱ــ وسایل و تجهیزات آزمایشگاه میکروبیولوژی

۱ــ۲ــ۱ــ پیپت: پیپت‌های معمولی از جنس پلاستیک یا شیشه تهیه شده‌اند که دارای دیواره مستقیم و نوک گرد هستند. حجم برداشت مایعات با آن‌ها، متغیر و معمولاً از یک تا ۵۰ سانتی‌متر مکعب است در حجم‌های بالا، برای جلوگیری از افزایش بیش از حد طول پیپت، حبابی در وسط پیپت ایجاد می‌کنند که پیپت حبابدار نامیده می‌شود. جای نگهداری پیپت‌ها باید از جنس آلومینیم یا فولاد ضدزنگ باشد البته نوع پلاستیکی آن نیز در بازار وجود دارد.

شکل ۱ــ۱ــ انواع پیپت

۲ــ۲ــ۱ــ پتری‌دیش: این ظروف، دارای حداقل ۸۵ میلی‌متر قطر داخلی و ۱۲ میلی‌متر ارتفاع هستند. سطوح داخلی و خارجی آن می‌باید کاملاً صاف و فاقد حباب باشد. ظروف پتری‌دیش از شیشه یا پلاستیک مناسب ساخته می‌شوند.



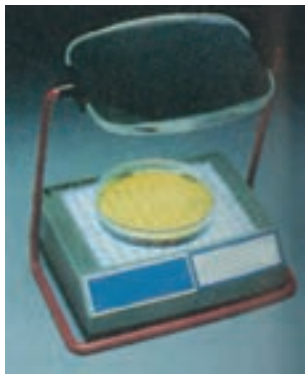
ظرف پتری زمانی که حاوی میکروب و محیط کشت می‌باشد.

۳ــ۲ــ۱ــ گرم‌خانه (آون): گرم‌خانه‌ها به‌خوبی عایق‌بندی می‌شوند و مجهز به سیستم‌های پخش حرارت و گردش هوا هستند. مقدار رطوبت داخل آن‌ها به گونه‌ای‌ست که سبب تجمع قطرات آب بر روی ظروف نمی‌شود و از طرف دیگر، این مقدار رطوبت نباید به‌قدری کم باشد که ظروف حاوی آگار در مدت ۴۸ ساعت بیش از ۱۵ درصد از رطوبت خود را از دست بدهد.

شکل ۲ــ۱ــ گرم‌خانه (آون)

گرم‌خانه باید در مکانی با درجه حرارت ۲۷°C–۱۶°C قرار گیرد.

۴ــ۲ــ۱ــ دستگاه پرگنه شمار یا کلنی کانتر: برای شمارش تعداد پرگنه‌ها (کلنی‌ها) در محیط کشت، معمولاً از این دستگاه استفاده می‌شود.



شکل ۳ــ۱ــ دو نوع پرگنه‌شمار

۵ــ۲ــ۱ــ حمام آب (بن‌ماری): در اندازه‌های مختلف، برای نگهداری محیط‌های ذوب‌شده در $46^{\circ}C$ ــ $44^{\circ}C$ به‌کار می‌رود. در مواقعی که از آن استفاده نمی‌شود، در آن باید بسته باشد.

شکل ۴ــ۱ــ بن‌ماری

۶ــ۲ــ۱ــ تکان‌دهنده مکانیکی: برای تکان‌دادن و یکنواخت‌کردن مایعات به‌کار می‌روند.

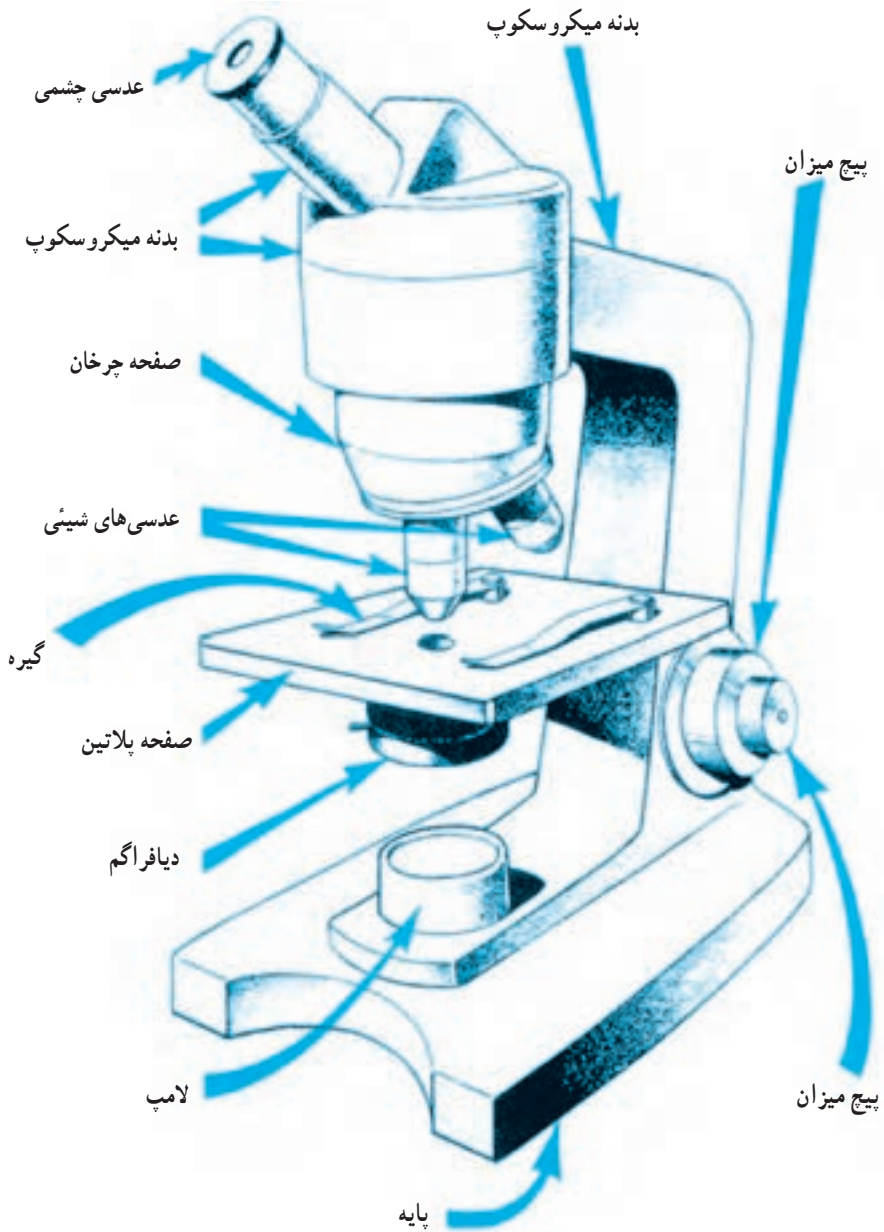
شکل ۵ــ۱ــ دو نوع تکان‌دهنده

شکل ۶ــ۱ــ تکان‌دهنده مخصوص ارلن

شکل ۷ــ۱ــ دو نوع همزن مغناطیسی

۷ــ۲ــ۱ــ میکروسکوپ: یکی از مهم‌ترین وسایل در آزمایشگاه میکروبیولوژی‌ست که از عدسی‌های چشمی و شیئی با بزرگنمایی‌های مختلف تشکیل شده است.

شکل ۸ــ۱ــ میکروسکوپ دوچشمی و یک چشمی



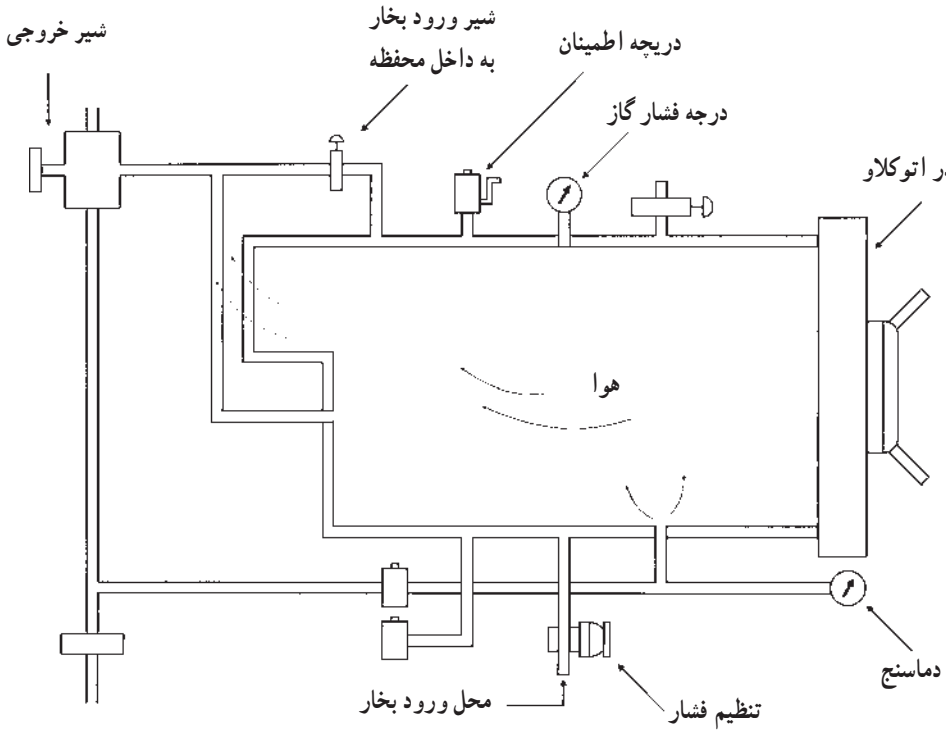
شکل ۹ــ۱

۸ــ۲ــ۱ــ اتوکلاو: اتوکلاوها براساس حرارت مرطوب ساخته شده‌اند و برای استریل کردن مواد و لوازم مختلف، به‌کار می‌روند.

در استفاده از اتوکلاو باید به موارد زیر توجه شود :

۱ــ امکان نفوذ بخار به داخل مواد و لوازم گذاشته شده در اتوکلاو باید وجود داشته باشد.

۲ــ هوای داخل اتوکلاو باید تخلیه گردد و محفظه آن با بخار آب پر شود. بنابراین، گذاشتن وسایل پیچیده شده در ورق آلومینیمی، در داخل اتوکلاو توصیه نمی‌شود.



شکل ۱۰ــ۱ــ ساختمان یک اتوکلاو

شکل ۱۱ــ۱ــ دو نمونه اتوکلاو

حرارت خشک

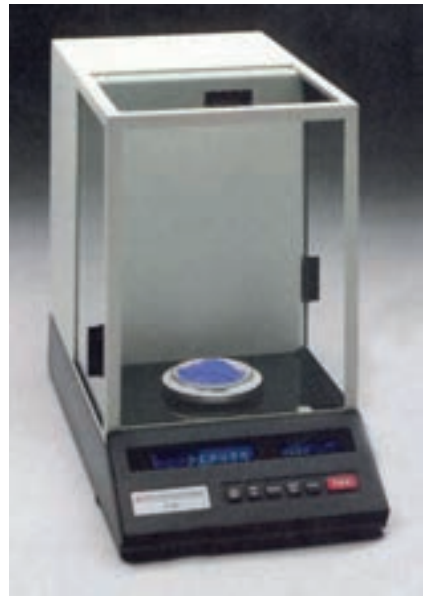
حرارت خشک، روشی است که کمتر از حرارت مرطوب بر اسپورهای مقاوم باکتریایی مؤثر است. برای از بین‌بردن اسپورها، ممکن است به حرارتی در حدود ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد نیاز باشد.

شعله: سیم‌ها، آنس، لوپ و سرفورسپس‌ها با گرفتن در روی شعله چراغ الکلی استریل می‌شوند البته تا گداخته‌شدن، آن‌ها را باید روی شعله نگه داشت.

۹ــ۲ــ۱ــ استریل‌کننده‌های با هوای داغ (آون‌ها): حرارت خشک، باید بتواند در بین مواد و لوازم نهاده شده در آون بچرخد. بنابراین لازم است مقدار و تعداد لوازم داخل آن کم باشد تا جا برای گردش هوا وجود داشته باشد. بنابراین، وجود پنکه برای جلوگیری از تغییرات دما ضروری‌ست. در آون‌هایی که پنکه ندارند زمان برای دمای مشخص می‌باید دوبرابر شود.

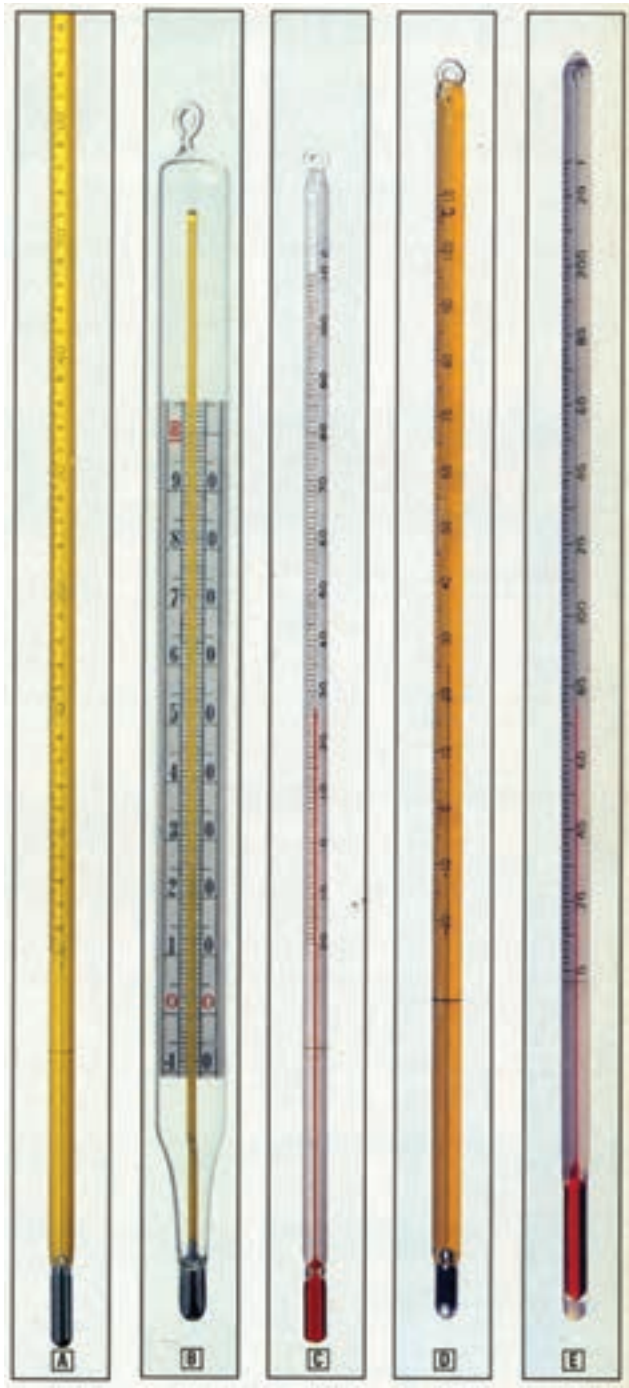
شکل ۱۲ــ۱ــ سانتریفوژ

شکل ۱۳ــ۱ــ سانتریفوژ



شکل ۱۴ــ۱ــ سه نوع ترازوی آزمایشگاهی

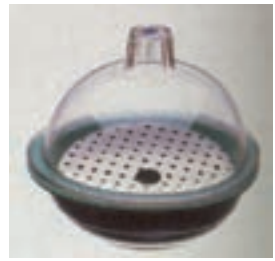
شکل ۱۵ــ۱ــ یک نمونه اینکوباتور



شکل ۱۶ــ۱ــ چند نمونه از دماسنج‌های آزمایشگاهی

شکل ۱۷ــ۱ــ یک نمونه از چراغ گازی آزمایشگاه

شکل ۱۸ــ۱ــ دو نمونه کرونومتر



شکل ۱۹ــ۱ــ دو نمونه دسیکاتور

خودآزمایی

۱ــ نکات ایمنی را که قبل از ورود به آزمایشگاه بایستی رعایت کنیم نام ببرید.

۲ــ از نظر شما دلیل ممنوعیت خوردن و آشامیدن در آزمایشگاه میکروبیولوژی چیست؟

۳ــ چرا بایستی پس از هر آزمایش علاوه‌بر وسایل مورد استفاده میزهای کار را نیز ضدعفونی کرد؟

۴ــ کاربرد هریک از دستگاه‌های زیر را شرح دهید.

گرم‌خانه (آون)، اتوکلاو، تکان‌دهنده مکانیکی.