

تاریخچه میکروب‌شناسی

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

ورو (Verro)، اظهار داشت که بیماری به وسیله 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، به وسیله 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 "Zacharias Sansen" در سال ۱۶۰۹ میلادی، به طور اتفاقی کشف کرد. او با قرار دادن دو عدسی در یک لوله، به این اختراع نائل آمد.

آنتونی وان لون هوک (۱۷۲۳-۱۶۳۲ 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، به راحتی 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 در صورتی که عده‌ای عقیده داشتند آن‌ها خودبه‌خود تولید می‌شوند. تولید خودبه‌خودی بدین معنی است که حیات ممکن است از چیزهای غیرزنده حاصل شده باشد.

تجربیات پزشکی 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 (۱۸۵۴-۶۱) دانشمندی بود که هوا را از صافی کتانی گذراند. در این آزمایش نیز، آب گوشت عاری از میکروارگانیسم بود و شفاف باقی ماند، در صورتی که آب گوشت 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 لوئی پاستور (۱۸۲۲. م-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 $1/10^6$ میلی‌متر تا ۱ میلی‌متر وجود دارند. بیشتر این ذرات، شبیه اسپور کپک‌ها، کیست‌های پروتوزواها 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 بین بردن 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 سرد شدن 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 استریلیزه کردن^۱ گردید. امروزه ما، کشتن باکتری‌های داخل یا روی اشیا را استریل کردن می‌نامیم. پاستور دریافت که آب معمولی حتی پس از جوشاندن، دارای میکروارگانیسم‌های متعدد است. به همین دلیل، حرارت 12° درجه تحت فشار را ابداع نمود. بنابراین، وی موجبات استفاده از اتوکلاور را در آزمایشگاه پایه‌ریزی کرد. وی هم‌چنین روش استریل کردن وسایل شیشه‌ای را، با حرارت خشک 170° درجه سانتی‌گراد ابداع کرد. کارهای پاستور، در زمینه استریلیزه کردن، 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. در نتیجه، وی روش استریلیزه کردن با حرارت مکرر را پیشنهاد کرد که به تندالیزه کردن معروف شد و امروزه نیز کاربرد دارد.

پاستور هم چنین 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 بیماری‌های 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 به صورت سوسپانسیون درآورد. با این روش، عامل بیماری‌های بیماری‌زایی خود را از دست داد و پاستور با استفاده از آن واکسن هاری را تولید کرد.

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

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

در سال ۱۸۸۰م، لویی پاستور کشف کرد که هاری، یک بیماری عفونی ست و به وسیله عواملی غیر از باکتری‌ها ایجاد می‌شود.

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

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

در سال ۱۸۹۸م، Frosch و Luffler 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 ۱۹۱۵م، F.W.Twort متوجه شد که باکتری‌ها نیز به عفونت‌های ویروسی مبتلا می‌شوند.

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

در سال ۱۹۳۳م، M. Schlesinger موفق به جداسازی یک ویروس شد. (باکتریوفاز

(WLL

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

در سال ۱۹۳۹م، 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، A.Hershey و M.chase 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، J.Salk و A.Sabine اولین واکسن علیه فلج اطفال را کشف کردند.

در سال ۱۹۵۹ م، R.L. Sinshemore کشف کرد که باکتریوفاژ $\phi \times 174$ دارای DNA تک رشته‌ای است.

در سال ۱۹۶۴-۷ م، H. Temin و D.Baltimore سنتز RNA متکی به DNA را در ویروس رزسارکوم کشف کردند.

در سال ۱۹۷۳-۴ م، A.Sabine و F.Tam مدعی شدند که ممکن است ویروس هرپس سمپلکس در انسان، ایجاد سرطان کند.

در سال ۱۹۸۲-۳ م، Robert Koch میکوباکتریوم توپرکولوزیس عامل بیماری سل و ویبریوکلرا عامل بیماری وبا را کشف کرد.

آزمایشگاه میکروبیولوژی

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

- ۱- مقررات آزمایشگاه میکروبیولوژی را رعایت کند.
- ۲- وسایل و تجهیزات مورد استفاده در آزمایشگاه میکروبیولوژی را به کار

برد.

۱-۱- قوانین و مقررات کار در آزمایشگاه

۱-۱-۱- افراد برای ورود به آزمایشگاه باید از روپوش، دستکش و در صورت لزوم،

عینک، ماسک و کفش مناسب استفاده نمایند.



۲-۱-۱-۱- روپوش و ساير وسايل، بايد به هنگام خروج از آزمایشگاه تعویض گردد و به هیچ وجه در موقع صرف غذا و ... مورد استفاده قرار نگیرد.

۳-۱-۱-۱- روپوش و ساير وسايل، در کمدهایی بیرون از آزمایشگاه نگهداری شود.

۴-۱-۱-۱- خوردن و آشامیدن در آزمایشگاه مجاز نیست و برچسبها نباید با آب دهان مرطوب شوند.

۵-۱-۱-۱- لوازم شخصی از قبیل کتاب، کاغذ و ... باید در کمدها قرار داده شوند و در آزمایشگاه از قلم و کاغذ مخصوص استفاده شود.

۶-۱-۱-۱- میزهای کار و سطوح مورد استفاده، مرتباً شسته و ضدعفونی شوند.

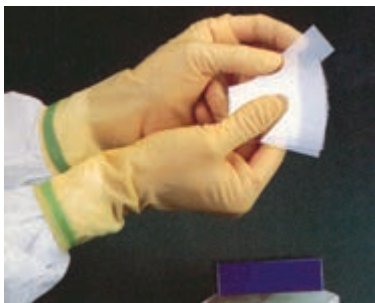
۷-۱-۱-۱- نمونه‌های وارد شده به آزمایشگاه، حاوی تعداد و انواع نامعینی از میکروارگانیسم‌ها هستند که می‌باید آنها را خطر بالقوه به حساب آورد. بنابراین بهتر است برای دریافت نمونه، محل جداگانه‌ای در نظر گرفته شود.

۸-۱-۱-۱- مواد شیمیایی مورد استفاده، ممکن است سمی و سرطان‌زا باشند از این رو، باید در کاربرد آنها نکات ایمنی را رعایت نمود.



۹-۱-۱-۱- 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 وسايل باید کاملاً محکم بسته شوند زیرا وجود یک روزنه بسیار ریز هم، باعث راه‌یابی هاگ‌ها به محیط آزمایشگاه خواهد شد.

۱۰-۱-۱-۱- 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 بشوید.



۱-۱-۱۱- مکیدن مایعات آلوده، با بیپیت به وسیله دهان ممنوع است برای این منظور، باید از پمپ یا سرنگ مخصوص استفاده کرد.



۱-۱-۱۲- وسایلی که تحت فشار کار می کنند (اتوکلاو) می باید مرتباً بازدید و درستی آن ها تأیید گردد.

۱-۱-۱۳- در محل خروج هوا، به وسیله هواکش های آزمایشگاه، صافی نصب شود.

۱-۱-۱۴- هنگام سترون کردن سوزن کشت در روی شعله باید توجه داشت که امکان انتشار میکروارگانیسم ها بر اثر حرارت شعله وجود دارد. از این رو، با حرکت دادن تدریجی سوزن از قسمت سرد به قسمت گرم آن باید از این پدیده جلوگیری کرد. (چنانچه از چراغ بنزن برقی استفاده
۷

شود چنین خطری وجود ندارد.)

۱۵-۱-۱- کلیه وسایل مورد استفاده، پس از انجام آزمایش می‌باید شسته و سترون شود.

۱۶-۱-۱- از ورود بی‌رویه و مکرر افراد به آزمایشگاه باید جلوگیری شود.

۱-۲- وسایل و تجهیزات آزمایشگاه میکروبیولوژی

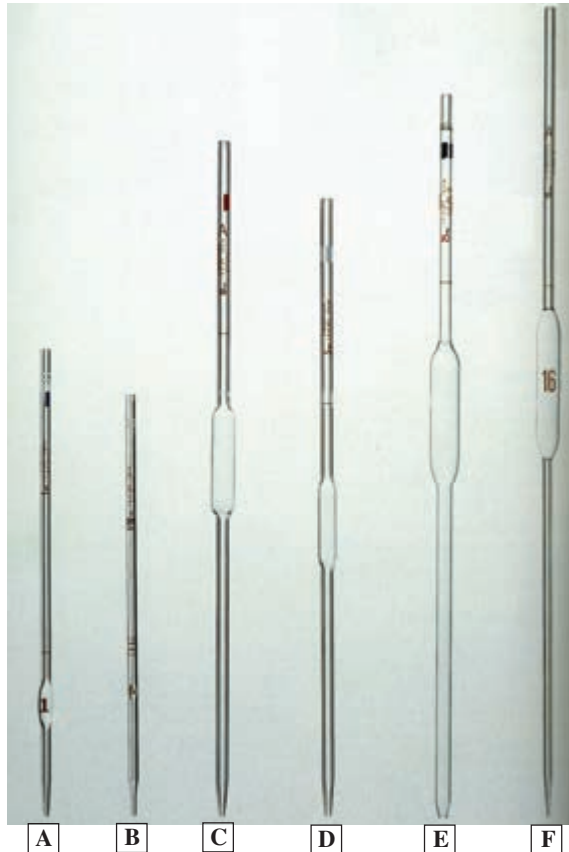
۱-۲-۱- پیپت: پیپت‌های معمولی از جنس پلاستیک یا شیشه تهیه شده‌اند که دارای

دیواره مستقیم و نوک گرد هستند. حجم برداشت مایعات با آن‌ها، متغیر و معمولاً از یک تا ۵ سانتی‌متر

مکعب است در حجم‌های بالا، برای جلوگیری از افزایش بیش از حد طول پیپت، حبابی در وسط

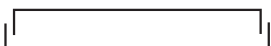
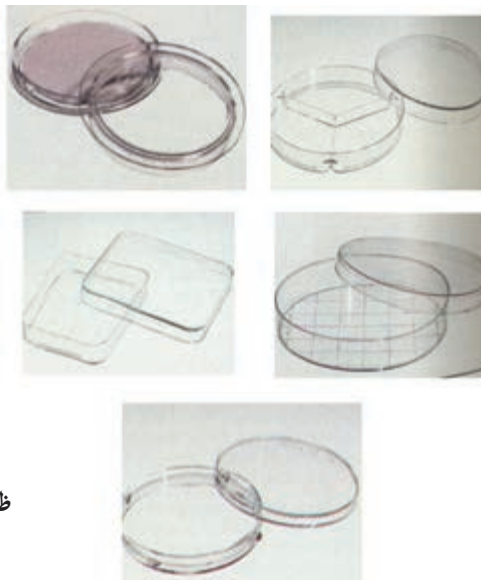
پیپت ایجاد می‌کنند که پیپت حبابدار نامیده می‌شود. جای نگهداری پیپت‌ها باید از جنس آلومینیم یا

فولاد ضدزنگ باشد البته نوع پلاستیکی آن نیز در بازار وجود دارد.



شکل ۱-۱- انواع پیپت

۱-۲-۲- پتری دیش: 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 پتری دیش از شیشه یا پلاستیک مناسب ساخته می‌شوند.



ظرف پتری زمانی که حاوی میکروب و محیط کشت می‌باشد.

۱-۲-۳- گرم‌خانه (آون): گرم‌خانه‌ها به خوبی عایق بندی می‌شوند و مجهز به سیستم‌های پخش حرارت و گردش هوا هستند. مقدار رطوبت داخل آن‌ها به گونه‌ای است که سبب تجمع قطرات آب بر روی ظروف نمی‌شود و از طرف دیگر، این مقدار رطوبت نباید به قدری کم باشد که ظروف حاوی آگار در مدت ۴۸ ساعت بیش از ۱۵ درصد از رطوبت خود را از دست بدهد.





شکل ۱-۲- گرم‌خانه (آون)

گرم‌خانه باید در مکانی با درجه حرارت 27°C - 16°C قرار گیرد.
۱-۲-۴- دستگاه پرگنه شمار یا کلنی کانتر: برای شمارش تعداد پرگنه‌ها (کلنی‌ها) در محیط کشت، معمولاً از این دستگاه استفاده می‌شود.



شکل ۱-۳- دو نوع پرگنه شمار

۱-۲-۵- حمام آب (بن‌ماری): در اندازه‌های مختلف، برای نگهداری محیط‌های ذوب‌شده در $44^{\circ}\text{C} - 46^{\circ}\text{C}$ به کار می‌رود. در مواقعی که از آن استفاده نمی‌شود، در آن باید بسته باشد.



شکل ۱-۴- بن‌ماری

۱-۲-۶- تکان‌دهنده مکانیکی: برای تکان دادن و یکنواخت کردن مایعات به کار

می‌روند.



شکل ۱-۵- دو نوع تکان‌دهنده



شکل ۱-۶- تکان‌دهنده مخصوص ارلن

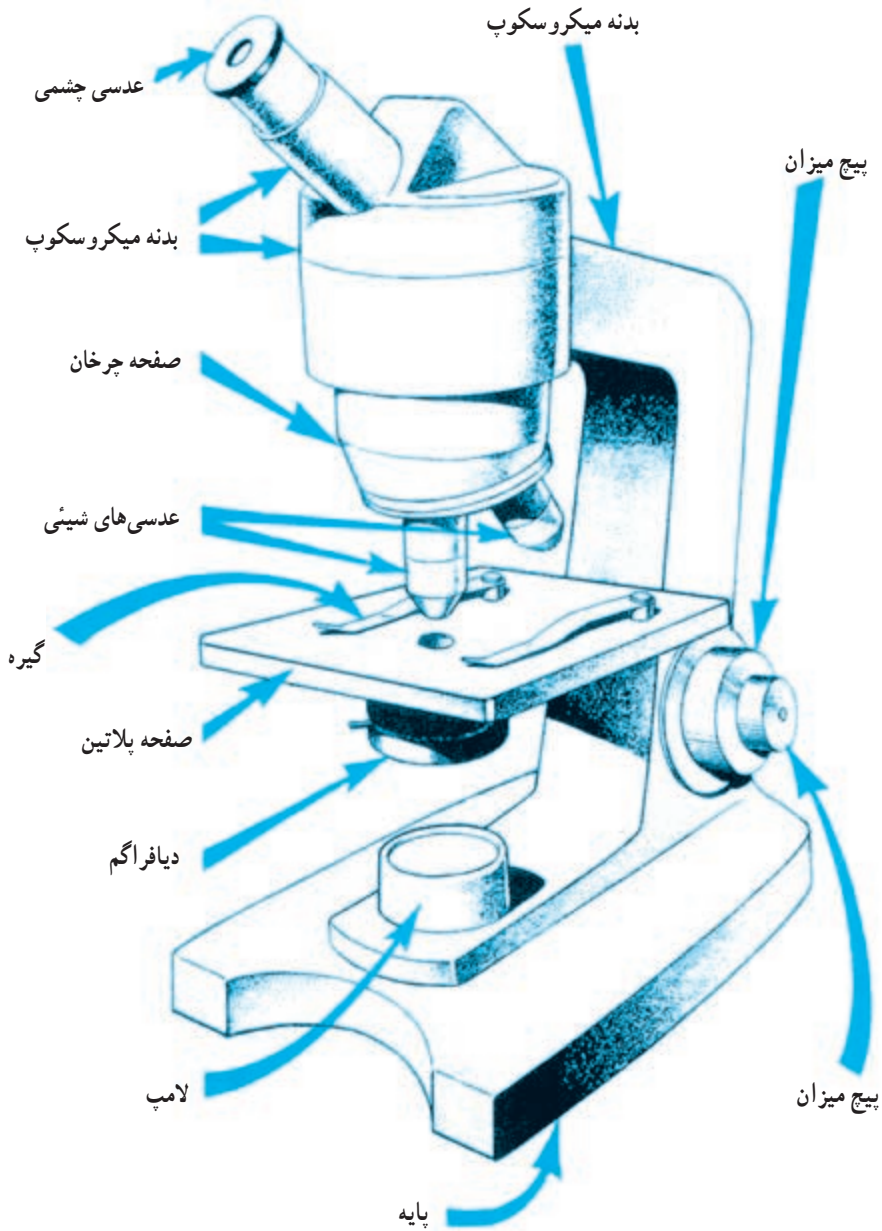


شکل ۷-۱- دو نوع همزن مغناطیسی

۷-۲-۱- میکروسکوپ: یکی از مهم‌ترین وسایل در آزمایشگاه میکروبیولوژی است که از عدسی‌های چشمی و شیئی با بزرگنمایی‌های مختلف تشکیل شده است.



شکل ۸-۱- میکروسکوپ دوچشمی و یک چشمی



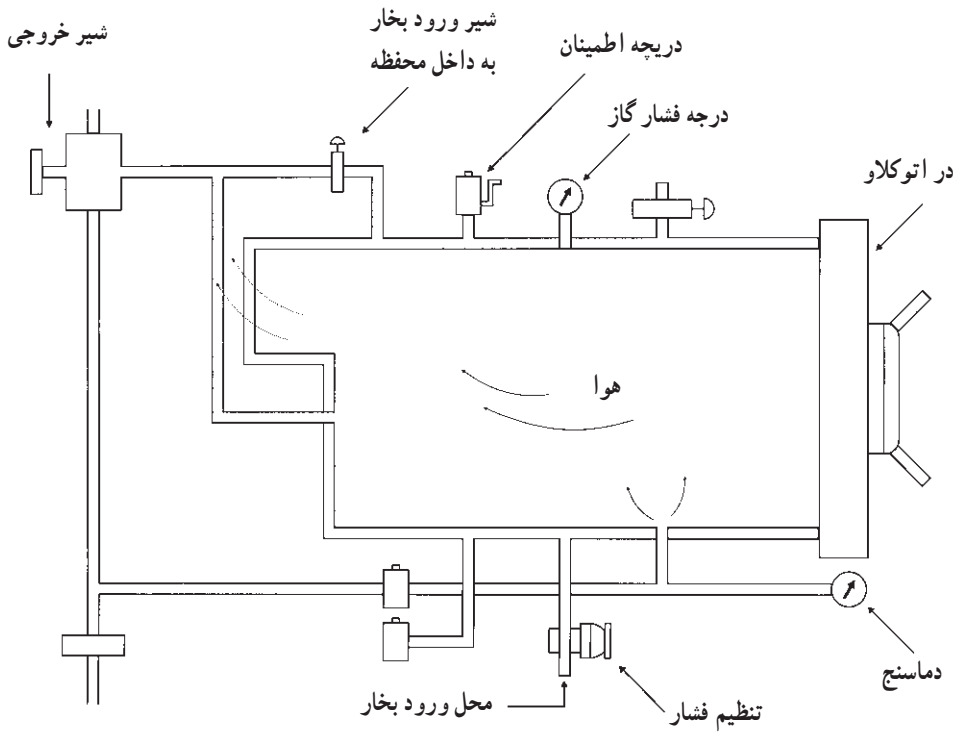
شکل ۹-۱

۸-۲-۱- اتوکلاو: اتوکلاوها بر اساس حرارت مرطوب ساخته شده اند و برای استریل کردن مواد و لوازم مختلف، به کار می روند.

در استفاده از اتوکلاو باید به موارد زیر توجه شود:

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

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



شکل ۱۰-۱- ساختمان یک اتوکلاو



شکل ۱۱-۱- دو نمونه اتوکلاو

حرارت خشک

حرارت خشک، روشی است که کمتر از حرارت مرطوب بر اسپوره‌های مقاوم باکتریایی مؤثر است. برای از بین بردن اسپوره‌ها، ممکن است به حرارتی در حدود 140° درجه سانتی‌گراد نیاز باشد. شعله: سیم‌ها، آنس، لوپ و سرفورسپس‌ها با گرفتن در روی شعله چراغ الکلی استریل می‌شوند البته تا گداخته شدن، آن‌ها را باید روی شعله نگه داشت.

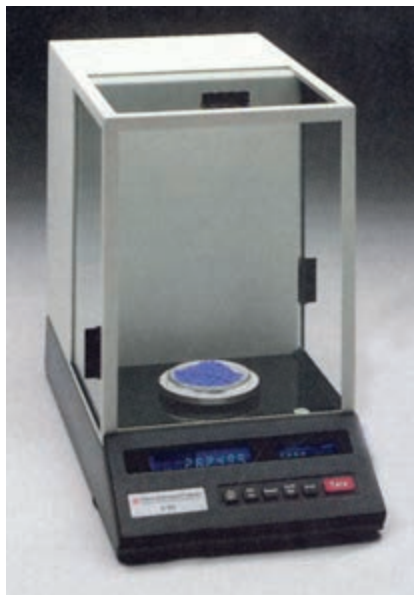
۹-۲-۱- استریل‌کننده‌های با هوای داغ (آون‌ها): حرارت خشک، باید بتواند در بین مواد و لوازم نهاده شده در آون بچرخد. بنابراین لازم است مقدار و تعداد لوازم داخل آن کم باشد تا جا برای گردش هوا وجود داشته باشد. بنابراین، وجود پنکه برای جلوگیری از تغییرات دما ضروری است. در آون‌هایی که پنکه ندارند زمان برای دمای مشخص می‌باید دوبرابر شود.



شکل ۱۲-۱- سانتریفوژ



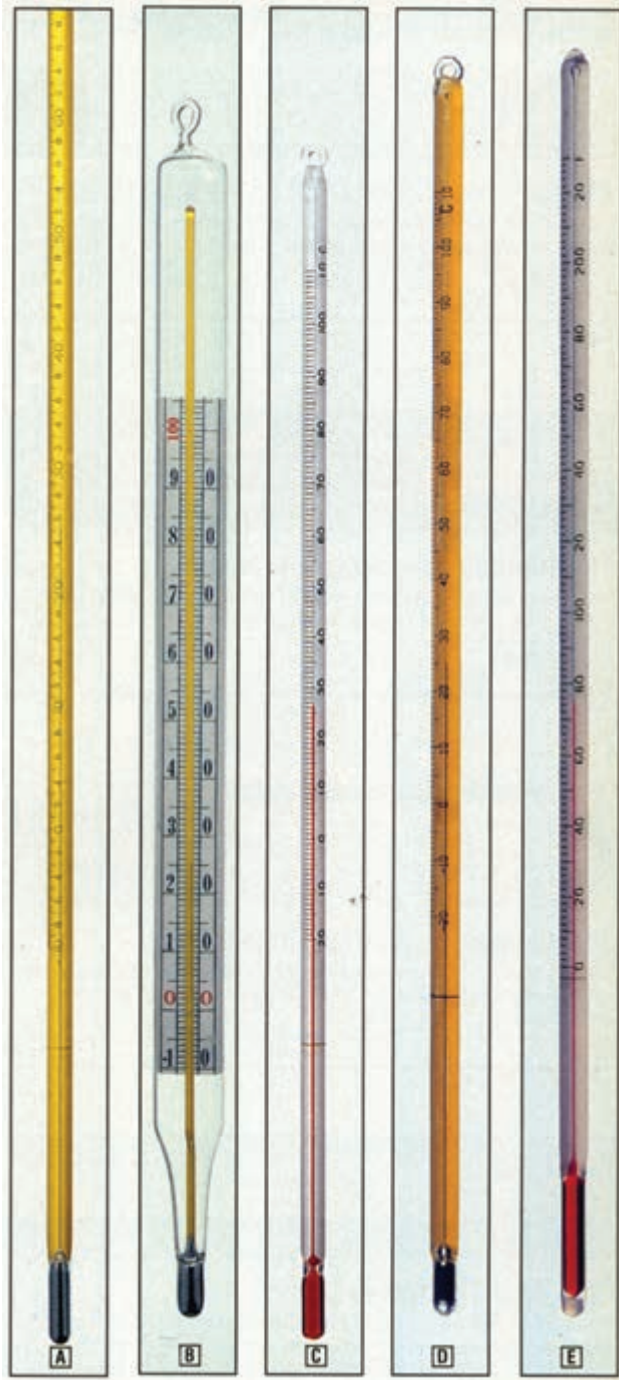
شکل ۱۳-۱- سانتریفوژ



شکل ۱۴-۱ سه نوع ترازوی آزمایشگاهی



شکل ۱۵-۱ یک نمونه اینکوباتور



شکل ۱۶-۱. چند نمونه از دماسنج‌های آزمایشگاهی



شکل ۱۷-۱- یک نمونه از چراغ گازی آزمایشگاه



شکل ۱۸-۱- دو نمونه کرونومتر



شکل ۱۹-۱- دو نمونه دسیکاتور

خودآزمایی

- ۱- نکات ایمنی را که قبل از ورود به آزمایشگاه بایستی رعایت کنیم نام ببرید.
- ۲- از نظر شما دلیل ممنوعیت خوردن و آشامیدن در آزمایشگاه میکروبیولوژی چیست؟
- ۳- چرا بایستی پس از هر آزمایش علاوه بر وسایل مورد استفاده میزهای کار را نیز ضدعفونی

کرد؟

- ۴- کاربرد هریک از دستگاه‌های زیر را شرح دهید.
گرم‌خانه (آون)، اتوکلاو، تکان‌دهنده مکانیکی.
-