

### رنگ آمیزی میکروارگانیسم ها

هدف های رفتاری: در پایان این فصل، فراگیر باید بتواند:

- ۱- گسترشی تهیه و آن را رنگ آمیزی نماید و باکتری ها را زیر میکروسکوپ مورد مشاهده قرار دهد.
- ۲- تئوری رنگ آمیزی و اهمیت آن را بیان نماید.
- ۳- یک نوع رنگ آمیزی ساده را انجام دهد.
- ۴- یک نوع رنگ آمیزی تشخیصی انجام دهد.

### ۶- رنگ آمیزی میکروارگانیسم ها

#### ۱-۶- اهمیت رنگ آمیزی باکتری ها

مورفولوژی باکتری ها را به دو طریق می توان مورد بررسی قرار داد:

- ۱- به وسیله ی مشاهده ی موجودات زنده و بدون رنگ آمیزی.
- ۲- به وسیله ی مشاهده ی سلول های مرده و رنگ شده با مواد رنگی.

باکتری های زنده بی رنگ اند، و تضاد کافی با آبی که در آن معلق هستند ندارند و در نتیجه خوب دیده نمی شوند. رنگ آمیزی موجودات باعث می شود که بین آن ها و محیط اطرافشان تضاد رنگی حاصل شود و بدین طریق بهتر دیده بشوند. همینطور بعضی از رنگ هایی که بکار می روند، می توانند ساختمان های داخلی سلول را که به طور طبیعی غیر قابل رؤیت هستند، مشخص کنند. اگر چه باکتری ها با محیط اطرافشان اختلاف زیادی نشان نمی دهند، ولی از نظر شیمیایی از محیط خود متفاوت هستند. این اختلاف شیمیایی ما را در تشخیص باکتری ها به وسیله ی رنگ آمیزی توانا می سازد، زیرا رنگ یا ماده به طور معمول با سلول باکتری واکنش ایجاد می کند، در حالی که روی زمینه لام اثری

ندارد. بنابراین، مزایای اصلی رنگ آمیزی عبارت است از ۱- ایجاد تضاد بین میکروارگانسیم‌ها و زمینه‌ی آن‌ها، که در نتیجه باعث تمایز اشکال مختلف می‌شود. ۲- امکان بررسی ساختمان‌های داخلی سلول باکتری‌ها، مثل دیواره‌ی سلولی، واکوئول<sup>۱</sup>، یا ضمائم هسته<sup>۲</sup> را فراهم می‌نماید. ۳- به باکتری‌شناس امکان می‌دهد که از درشت‌نمایی بیشتر استفاده کند.

## ۲-۶- تئوری رنگ آمیزی

برای درک این که یک ماده رنگی سلول باکتری‌ها را رنگ می‌کند، ابتدا باید بدانید که یک ماده‌ی رنگی چیست. مواد رنگی اغلب املاحی هستند که یکی از یون‌های آن‌ها رنگی است یک ملح یا نمک ترکیبی است که از یک یون با بار الکتریکی مثبت و یک یون با بار الکتریکی منفی تشکیل شده است ماده رنگی ساده متیلن بلو در حقیقت ملح کلرورمتیلن بلو می‌باشد که تجزیه آن به شرح ذیل است

$$\text{کلرور}^- + \text{متیلن بلو}^+ \rightarrow \text{کلرورمتیلن بلو}$$

قسمت رنگی این ماده در یون مثبت متیلن بلو قرار دارد. سلول باکتری‌ها هنگامی که در محیطی قرار بگیرد که دارای pH<sup>۱</sup> حدود خنثی باشد - که به طور معمول چنین است -، دارای بار الکتریکی منفی مختصری خواهند بود. سلول باکتری با بار الکتریکی منفی با یون متیلن بلو با بار الکتریکی مثبت ترکیب شده و در نتیجه سلول رنگ می‌شود. در حقیقت تفاوت بار الکتریکی است که باعث گرایش بین ماده رنگی و سلول باکتری می‌شود.

## ۳-۶- روش‌های رنگ آمیزی

امروزه تعداد زیادی مواد رنگی در اختیار باکتری‌شناسان است که به اشکال متفاوت در روش‌های رنگ آمیزی اصلی به کار می‌روند.

الف) رنگ آمیزی‌های ساده: شامل رنگ آمیزی با مواد رنگی قلیایی، مواد رنگی اسیدی و مواد رنگی خنثی می‌باشد

۱- رنگ‌های اسیدی: رنگ‌هایی هستند که قسمت رنگی آن‌ها (کروموفور) دارای بار منفی می‌باشد و با قسمت‌هایی از سلول که بار مثبت دارند مثل پروتئین‌ها ترکیب می‌شوند مثل اسید پیکریک و نیگروزین و فوشین اسیدی

۲- رنگ‌های قلیایی: قسمت رنگی (کروموفور) این گروه دارای بار مثبت می‌باشد و با

۱- Vacuole

۲- Nuclearbodies

قسمت‌هایی از سلول که بار منفی دارند مثل اسیدهای نوکلئیک ترکیب می‌شوند از این گروه می‌توان به کریستال یوله (بنفش)، متیلن بلو سافرانین و فوشین بازی اشاره کرد.

۳- رنگ‌های خنثی: رنگ‌هایی هستند که قسمت رنگی آن‌ها فاقد بار الکتریکی می‌باشد و با قسمت‌های بدون بار الکتریکی سلول مثل چربیها، ترکیب می‌شوند مثل سودان سیاه

(ب) رنگ آمیزی‌های تشخیصی<sup>۱</sup>: شامل رنگ آمیزی گرم<sup>۲</sup> و رنگ آمیزی اسید فست<sup>۳</sup>

### — طرز تهیه و تثبیت باکتری‌ها برای رنگ آمیزی

پیش از رنگ آمیزی باید باکتری‌هایی را که می‌خواهید مورد بررسی قرار دهید تثبیت کنید، یعنی آن‌ها را به لام شیشه‌ای که باید رنگ شود بچسبانید. اگر یک نمونه تثبیت نشده باشد لایه‌ی سلولی در حین عملیات مربوط به رنگ آمیزی شسته شده، از بین خواهد رفت. روشی که در این آزمایش ذکر می‌شود، خیلی معمول است و به عنوان کار اولیه در بیشتر روش‌های رنگ آمیزی باکتری‌ها بکار می‌رود. در این آزمایش، از حرارت برای کشتن و چسباندن سلول‌ها به لام استفاده می‌شود.

۱- با یک سوزن کشت حلقه‌ای، یک قطره کوچک از هر کدام از کشت‌های موردنظر را برداشته و روی لام‌های جداگانه تمیز قرار دهید لازم است لام‌ها تمیز باشد. روشی که برای تمیز کردن پیشنهاد می‌شود عبارتست از الف) یک قطره گزیلول (xylo) روی سطح لام قرار دهید. ب) به کمک کاغذ مخصوص عدسی یا پارچه آن را پاک کنید. ج) لام تمیز شده را از میان شعله چراغ عبور داده و بگذارید تا سرد شود. یا اگر نمونه از روی محیط جامد برداشته می‌شود، یک قطره کوچک آب روی لام گذاشته، آن را با یک تکه کوچک از کشت باکتری به‌طور کامل مخلوط کنید.

۲- قطره روی لام را گسترده و پخش کنید تا یک لایه‌ی نازک و یکنواخت تشکیل شود. توجه داشته باشید که اگر گستره کلفت باشد شمارش را دچار اشکال می‌کند.

۳- مقداری بزاق را در یک لوله آزمایش استریل جمع‌آوری کنید. به کمک یک حلقه استریل یک حلقه از آن را روی لام تمیز قرار داده، آن را گسترده کنید، تا یک لایه نازک را تشکیل بدهد.

۴- لام‌ها را در هوا و یا با نگهداشتن در قسمت بالای شعله گاز خشک کنید.

۵- هنگامی که لایه‌های میکروبی خشک شد، لام را سه بار از درون شعله گاز عبور دهید. به‌طوری که قسمت لایه‌ی میکروبی به طرف بالا باشد. توجه کنید که گرمای زیاد باعث تغییر شکل ساختمان طبیعی میکروارگانیسم‌های رنگ شده خواهد شد. اگر لام گرم شده را پشت دست قرار دهیم، باید گرمای آن حس شود ولی داغ و سوزنده نباشد. منظور از تثبیت عبارتست از کشتن میکروارگانیسم‌ها،

۱- Differential

۲- Gram stain

۳- Acid fast stain

۱- یک قطره آب استریل بر روی لامل تمیز شده قرار دهید.



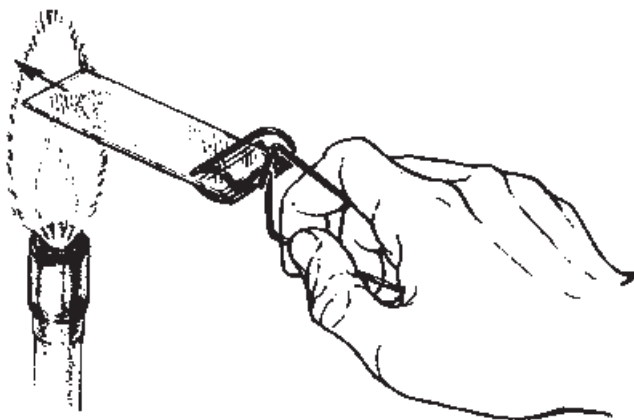
۲- یک قطره از کشت میکروبی را به آن اضافه کنید.



۳- قطره را با ضخامت کم در سطح لام بخش کنید.



۴- آن را در هوا خشک کنید.



۵- آن را با سه بار گذراندن از روی شعله تثبیت کنید.

شکل ۱-۶- تهیه گسترده و تثبیت میکروارگانیسم‌ها برای رنگ آمیزی

انعقاد پروتوپلاسم سلول‌ها، و همین‌طور که گفته شد، چسباندن آن‌ها به لام. یک عامل تثبیت کننده مناسب، ساختمان‌های سلول را به همان شکل و موقعیت ویژه خود بدون اینکه ایجاد تغییرات (ساختمان‌هایی که در سلول زنده وجود ندارد) بکند حفظ می‌نماید. به‌طور معمول برای تثبیت از روش گرم کردن ملایم استفاده می‌شود، ولی از عوامل الکل و مواد شیمیایی دیگر هم می‌توان استفاده کرد.

### ۱-۳-۶- رنگ آمیزی‌های ساده

**الف) رنگ آمیزی با رنگ‌های قلیایی:** رنگ آمیزی با رنگ‌های قلیایی متیلن بلو، کریستال ویوله<sup>۱</sup> و کربول فوشین<sup>۲</sup> حدود ۳۰ تا ۶۰ ثانیه وقت لازم دارد. کریستال ویوله دارای قدرت واکنش بیشتر است و به‌طور معمول برای رنگ کردن احتیاج به حدود ۱۰ ثانیه وقت دارد. کربول فوشین که مخلوطی از فوشین و فنل است رنگ قویتری می‌باشد و به‌طور معمول ۵ ثانیه وقت لازم دارد. قدرت واکنش کربول فوشین آنقدر بالاست که ممکن است به دلیل زیاد رنگ کردن مشکلاتی ایجاد کند، به‌ویژه در نمونه‌هایی که حاوی مقدار زیادی مواد و عناصر آلی باشند.

### ب) مراحل رنگ آمیزی:

- ۱- لام‌هایی را که در قسمت اول آزمایش تثبیت کردید روی صفحه سیمی مخصوص رنگ آمیزی که روی ظرف مخصوص مایعات زائد است قرار دهید.
- ۲- هریک از لایه‌های میکروبی تثبیت شده را با تقریباً ۵ قطره از یکی از رنگ‌ها آغشته کرده، بگذارید تا با گذشت زمان رنگ آمیزی انجام شود، در مورد متیلن بلو، ۳۰ ثانیه، کریستال ویوله، ۱۰ ثانیه، و کربول فوشین ۵ ثانیه.
- ۳- نمونه‌های رنگ شده را با آب فشان شستشو دهید.
- ۴- لام‌ها را بین کاغذ آب‌خشک کن بدون وارد کردن فشار روی لامل یا در هوای بالای شعله خشک کنید.

۵- نمونه‌های رنگ شده را زیر میکروسکوپ گذاشته و با عدسی روغنی ایمرسیون مشاهده کرده، از یک میدان میکروسکوپی خوب، اشکال میکروبی را رسم کنید. اگر گسترش‌های میکروبی کلفت تهیه کرده باشید، در این مرحله مشخص خواهد شد. در لایه‌های میکروبی کلفت توده‌ای از مواد رنگ شده دیده می‌شود که ممکن است در آن تعدادی هم سلول جدا و منفرد وجود داشته باشد. تفاوت‌های مشخص مربوط به اندازه‌ی سلول‌ها، شکل و ترتیب آن‌ها را به دقت مورد ملاحظه قرار دهید. در بزاق رنگ شده انواع زیاد و گوناگونی سلول دیده می‌شود. چندین نوع باکتری و قارچ،

۱- Crystal Violet

۲- Carbol fuchsin

سلول‌های اپی‌تلیال<sup>۱</sup>، ذرات بزاقی، و گلبول‌های سفید خون، بیشتر بار الکتریکی یک باکتری (یا یک پروتئین) مربوط به اسیدی بودن محیط است اگر اسیدیته کاهش پیدا کند (بالا رفتن pH) بار الکتریکی منفی سلول افزایش یافته، و در نتیجه گرایش آن به رنگ‌های قلیایی قویتر می‌شود. در مورد رنگ‌های اسیدی، عکس این مطلب صادق است. بنابراین رنگ‌های قلیایی در pH‌های پایین و رنگ‌های اسیدی در pH‌های بالا دارای قدرت رنگ‌آمیزی ضعیفی هستند.

## فکر کنید و پاسخ دهید:

آیا می‌توانید بگویید که تمام باکتری‌های جدا شده کشت خالص هستند؟

۲-۳-۶- روش‌های رنگ‌آمیزی تشخیصی<sup>۲</sup>: اساس رنگ‌آمیزی‌های ساده بر این حقیقت بنا شده است که سلول باکتری‌ها از نظر شیمیایی از محیط اطرافشان متفاوت است و بنابراین می‌توانند پس از رنگ‌آمیزی از محیط خود متمایز شوند. خود میکروارگانیسم‌ها هم دارای اختلافات شیمیایی و فیزیکی هستند و بدین طریق در مقابل یک روش رنگ‌آمیزی معین واکنش‌های متفاوتی نشان می‌دهند. این اصلی است که براساس آن رنگ‌آمیزی‌های تشخیصی بنا شده است. بنابراین رنگ‌آمیزی تشخیصی روشی است که با آن انواع باکتری‌ها را می‌توانیم مشخص کنیم.

**الف) رنگ‌آمیزی گرم<sup>۳</sup>:** رنگ‌آمیزی گرم که بیشتر از روش دیگری در باکتریولوژی به کار می‌رود رنگ‌آمیزی تشخیصی است. با به کار بردن این روش می‌توان باکتری‌ها را به دو گروه تقسیم کرد: گرم مثبت و گرم منفی.

تصور می‌شود که این تمایز رنگی مربوط به اختلاف لایه‌ی سطحی یا دیواره‌ی سلولی این دو نوع می‌باشد. به‌طور کلی میکروارگانیسم‌های گرم مثبت و گرم منفی در مقابل بسیاری از عوامل فیزیکی و شیمیایی واکنش‌های مختلفی نشان می‌دهند. در رنگ‌آمیزی گرم چهار محلول مختلف مورد نیاز است. یک رنگ قلیایی، یک دندان<sup>۴</sup> یک عامل رنگ‌بر<sup>۵</sup> و یک رنگ دوم. درباره رنگ قلیایی بحث شده است. دندان ماده‌ای است که گرایش یا جذب ماده رنگی را به سلول افزایش می‌دهد، یعنی به شکلی، تثبیت رنگ را در روی سلول تسهیل می‌کند. اسیدها، قلیایی‌ها، املاح معدنی و ید را می‌توان به عنوان دندان مثال زد. سلولی که روی آن ریخته شده دندان بیشتر و بهتر رنگ می‌شود.

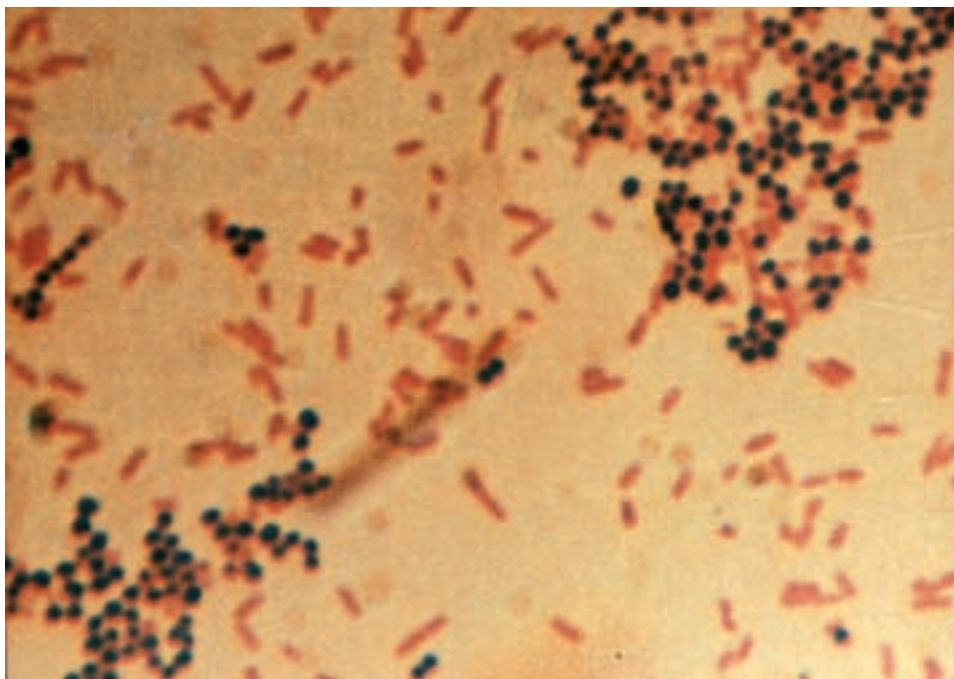
۱- Epithelial

۲- Differential Staining

۳- Gram Stain

۴- Mordant

۵- Decolorizing Agent



شکل ۲-۶- رنگ آمیزی گرم. باکتری های گرم مثبت به رنگ بنفش یا ارغوانی و باکتری های گرم منفی به رنگ صورتی

همین طور بعد از به کار بردن دنداننه شستن و از بین بردن رنگ دشوارتر است. عامل رنگ بر، همان طور که از اسمش معلوم است، ماده ای است که رنگ را از یک سلول رنگ شده خارج می کند. بعضی از سلول های رنگ شده راحتتر از سلول های دیگر بی رنگ می شوند. در رنگ آمیزی گرم و در سایر روش های رنگ آمیزی تشخیصی از این تفاوت در میزان بی رنگ شدن استفاده کرده، انواع مختلف باکتری ها را از یکدیگر متمایز می کنیم. رنگ دوم، یک ماده رنگی قلیایی است که از نظر رنگ با ماده رنگی اولیه متفاوت است. منظور از به کارگیری رنگ دوم عبارتست از رنگ کردن سلول های بی رنگ شده به وسیله رنگی که با رنگ اولیه متفاوت است. میکرو ارگانسیم هایی که رنگ اولیه خود را از دست نداده اند رنگ قلیایی اولیه را نگه می دارند و آن هایی که رنگ خود را از دست داده اند رنگ دوم را جذب می کنند. رنگ آمیزی گرم در مرحله اول عبارتست از رنگ شدن سلول ها با یک رنگ قلیایی. این عمل با مجاور کردن سلول های رنگ شده با یک دنداننه مثل ید، دنبال می شود. سپس سلول ها را با یک ماده رنگ بر مثل الکل مجاور می کنند. سلول هایی که بعد از رنگ بری، رنگ قلیایی خود را حفظ کنند گرم مثبت خوانده می شوند و آن هایی که بی رنگ شده اند گرم منفی هستند که

می‌توانند با رنگ دوم که از رنگ اول متفاوت است دوباره رنگ شوند.

### روش کار:

۱- گستره مخلوط باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را تهیه کنید. این گستره‌ها را به کمک حرارت تثبیت کنید.

۲- گستره‌ها را به مدت ۳۰ ثانیه با کریستال ویوله رنگ کنید.

۳- گستره‌ها را با آب فشان بشوید.

۴- به گستره‌ی آماده شده ید اضافه کنید، بگذارید تا ۳۰ ثانیه مانده و اثر کند.

۵- گستره‌ها را با آب فشان بشوید.

۶- گستره‌ها را به وسیله‌ی الکل ۹۵٪ بی‌رنگ کنید. برای بی‌رنگ کردن یک گسترش نازک ۱۰ تا ۲۰ ثانیه کافی است، بعد از گذشت زمان مناسب، قطرات الکی که از لام خارج می‌شود بی‌رنگ خواهد بود.

۷- گستره‌ها را با آب فشان بشوید.

۸- گستره‌ها را با فوشین یا سافرانین به مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه رنگ کنید.

۹- گستره‌ها را با آب فشان شسته و خشک کنید.

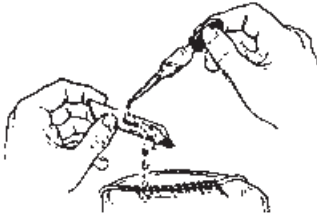
۱۰- روی هر یک از گستره‌ها یک قطره روغن سدر<sup>۱</sup> بریزید و آن را با عدسی با بزرگنمایی ۱۰۰ مشاهده کنید.

شکل میکروب‌ها را رسم کنید. در هر مرحله از این روش چه اتفاقی حادث می‌شود؟ اگر بعد از هر مرحله، سلول‌های گرم مثبت و گرم منفی را بررسی کنیم، می‌توانیم نتایجی را که در جدول ۱-۶ خلاصه شده است ملاحظه کنیم. برای بحث درباره اساس تمایز بین باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، همین‌طور برای شناختن فرضیاتی که مکانیسم واکنش گرم را تشریح می‌کنند، به یک کتاب درسی یا مقاله‌ای درباره سیتولوژی میکروبی مراجعه کنید.

### روش کار:

گستره‌ای مخلوط از باکتری‌های گرم مثبت و منفی تهیه کرده، آن را فیکس نموده و برابر شکل رنگ‌آمیزی آن را کامل کنید.

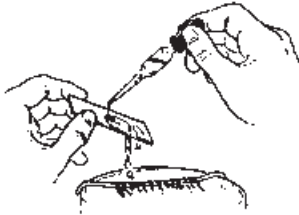




۲- آن را با آب بشویید.



۱- گستره را با کریستال ویوله به مدت حدود ۳۰ ثانیه رنگ کنید.



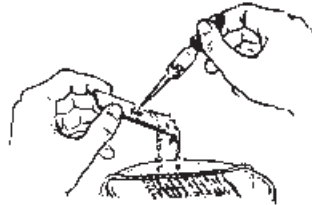
۴- آن را با آب بشویید.



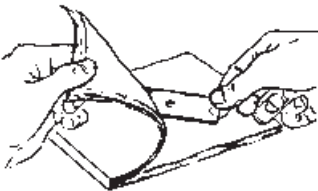
۳- گستره را با محلول ید گرم به مدت حدود ۳۰ ثانیه بیوشانید.



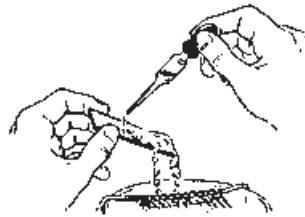
۶- گستره را با رنگ متفاوت سافرانین به مدت حدود ۲۰ ثانیه رنگ کنید.



۵- گستره را به مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه با الکل ۹۵٪ بی‌رنگ کنید.



۸- گستره را خشک کنید.



۷- آن را با آب بشویید.

شکل ۳-۶- مراحل رنگ آمیزی گرم

جدول ۱-۶- مراحل رنگ آمیزی گرم

نتایج حاصل		روش کار	مرحله
گرم منفی	گرم مثبت		
به رنگ بنفش ارغوانی	به رنگ بنفش ارغوانی	کریستال یوله به مدت ۳۰ ثانیه	رنگ اولیه
رنگ بنفش ارغوانی باقیمانده بی رنگ می شود.	رنگ بنفش ارغوانی باقیمانده رنگ بنفش ارغوانی باقیمانده	ید به مدت ۳۰ ثانیه الکل اتیلیک ۹۵٪ به مدت ۱۰ تا ۳۰ ثانیه	دندان رنگ بری
به رنگ سرخ	رنگ بنفش ارغوانی باقیمانده	سافرانین به مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه	رنگ دوم

فکر کنید و پاسخ دهید:

- ۱- آیا می توان رنگ اولیه و رنگ دوم را تغییر داد؟
- ۲- اگر ید را با سایر عوامل اکسیدکننده عوض کنید چه تغییراتی حاصل خواهد شد؟
- ۳- آیا الکل های دیگر نیز به خوبی الکل اتیلیک می توانند به عنوان عوامل رنگ بر به کار روند؟
- ۴- اثر pH روی واکنش گرم چیست؟

ب) رنگ آمیزی اسید فست<sup>۱</sup>: رنگ آمیزی اسید فست، رنگ آمیزی تشخیصی است که میزان و درجه مقاومت سلول های رنگ شده را در برابر رنگ بری اسیدها تعیین می کند. خاصیت مقاومت در برابر اسیدها در بعضی مایکوباکتریوم ها<sup>۲</sup> و اکتینومیسیت ها<sup>۳</sup> بستگی به مقدار زیادی لیپید دارد که در آنها موجود است. برای رنگ آمیزی این باکتری ها حرارت و رنگی که دارای گرایش قوی به سلول این باکتری ها دارد مورد نیاز است. این باکتری ها، بعد از یک بار رنگ شدن، به دشواری ممکن است بی رنگ شوند. در این روش از کربول فوشین گرم برای رنگ آمیزی، و از محلول اسید - الکل به عنوان عامل بی رنگ کننده استفاده و بعد هم رنگ آمیزی دوم سلول باکتری ها عملی می شود. باکتری های اسید فست، کندتر از سایر میکروارگانیسم ها، در برابر اسید - الکل بی رنگ شده، بعد از رنگ آمیزی دوم، رنگ اولیه

۱- Acid fast stain

۲- Mycobacterium

۳- Actinomycete

خود را حفظ می‌کنند. این رنگ‌آمیزی در درجه اول برای تشخیص و بررسی بیماری‌هایی که به وسیله‌ی میکروب‌های اسید فست، مثل سل و جذام تولید می‌شود، مورد استفاده قرار می‌گیرد. همین‌طور این روش به عنوان یک رنگ‌آمیزی تشخیصی، در مورد تعدادی از میکروبیهای ساپروفیت<sup>۱</sup> و بی‌آزار اسید فست هم بکار می‌رود.

### روش کار:

- ۱- یک گستره میکروبی شامل مخلوطی از کشت‌های مایکوباکتریوم و اشریشیا تهیه کنید.
  - ۲- گستره را در هوا خشک کرده، با حرارت تثبیت کنید.
  - ۳- در حدود ۱/۵ سانتیمتر آب در یک ظرف کوچک ریخته، آن را بجوش آورید، یک صفحه سیمی روی لبه ظرف قرار داده، لام میکروبی را روی این صفحه بگذارید.
  - ۴- گستره را به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه با کربول فوشین رنگ کنید، بدین شکل که ابتدا یک تکه کوچک کاغذ خشک‌کن یا پارچه حوله‌ای روی گستره گذاشته، آن را با ماده‌ی رنگی بیوشانید. توجه کنید که درحین رنگ‌آمیزی، نگذارید گستره خشک شود. از زیاد شدن ماده رنگی روی گستره جلوگیری کنید.
  - ۵- نمونه را با آب بشویید.
  - ۶- نمونه را با اسیدالکل (الکل اتیلیک ۹۵٪ حاوی اسیدنیتریک ۲/۵٪) به مدت ۱۰ تا ۳۰ ثانیه بی‌رنگ کنید.
  - ۷- نمونه را با آب بشویید.
  - ۸- رنگ‌آمیزی دوم را با متیلن‌بلو به مدت ۳۰ ثانیه انجام دهید. (بدون حرارت)
  - ۹- نمونه را با آب شسته، با کاغذ خشک‌کن بدون وارد کردن فشار خشک کنید.
  - ۱۰- نمونه را با عدسی روغنی ایمرسیون ملاحظه کرده، اشکال میکروبی را رسم کنید.
- با بکار بردن روش رنگ‌آمیزی اسید فست، خلط یک بیمار مسلول را که در اتوکلاو قرار داده‌اید (به وسیله‌ی بخار و زیر فشار استریل شده است) رنگ‌آمیزی کنید. برای تهیه‌ی گستره میکروبی، خلط را در بین دو لام گذاشته و با فشار، یک لایه‌ی نازک میکروبی ایجاد کنید. بعد از رنگ‌آمیزی، به جستجوی میکروب‌های اسید فست بپردازید دقت کنید که از نظر ظاهر چه اختلافی بین آن‌ها و سایر میکروارگانیسم‌های خلط وجود دارد. میکروارگانیسم‌های اسید فست، با اسیدالکل بی‌رنگ نمی‌شوند و به رنگ قرمز دیده می‌شوند. سایر میکروبیها به رنگ آبی خواهند بود.

<sup>۱</sup>- Saprophyte

۳-۳-۶- رنگ آمیزی ساختمان‌های سلولی: برای به دست آوردن تضادی که در دیدن ساختمان‌های مختلف سلول باکتری‌ها به وسیله‌ی میکروسکوپ نوری ضروری است، باید روش‌های رنگ آمیزی مخصوصی را به کار برد این آزمایش بعضی از رنگ آمیزی‌های ساختمانی را نشان می‌دهد.

### روش کار:

الف) رنگ آمیزی اندوسپور<sup>۱</sup>: انواع جنس باسیلوس<sup>۲</sup> و کلستریدیوم<sup>۳</sup>ها<sup>۴</sup> در برابر عوامل نامساعد تبدیل به شکل اندوسپور خوانده می‌شود. اندوسپور برخلاف سلول جوان به وجودآورنده‌ی آن، دارای جسم بسیار مقاومی است و می‌تواند، به مدتی طولانی، حتی در محیطی که به دلیل درجه حرارت بالا یا مواد شیمیایی سمی نامساعد شده است، زنده بماند. اندوسپور در برابر رنگ آمیزی مقاومت نشان می‌دهد و بعد از یک بار رنگ شدن هم به سختی رنگ خود را از دست داده، یا رنگ زمینه را می‌پذیرد. از این خاصیت برای نمایش میکروسکوپی اندوسپورها استفاده شده است. در شرایط معمولی اندوسپور باکتری‌ها با میکروسکوپ الکترونی قابل مشاهده است که تصویر آن در شکل ۴-۶ نمایش داده شده است. دو روش رنگ آمیزی در این جا ذکر می‌شود:

۱- روش دورنر<sup>۴</sup>: در روش دورنر، از کربول فوشین گرم برای نفوذ به اندوسپور مقاوم استفاده می‌شود. نیگروزین هم به عنوان عامل بی‌رنگ کننده و هم به عنوان رنگ منفی گستره بکار می‌رود. بعد از رنگ آمیزی با این روش، اندوسپورها به رنگ قرمز و قسمت‌های جوان سلول‌ها به صورت بی‌رنگ در یک زمینه‌ی تیره دیده می‌شوند. مراحل رنگ آمیزی به شرح زیر است:

۱- ۵ قطره آب استریل در دو لوله‌ی آزمایش ریخته، در این دو لوله دو سوسپانسیون غلیظ از باسیلوس سرئوس<sup>۵</sup> و کلستریدیوم اسپوروژنس<sup>۶</sup> بسازید.

۲- به دو سوسپانسیون میکروبی به مقدار مساوی کربول فوشین بیفزایید.

۳- رنگ آمیزی را به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش انجام دهید.

۴- نمونه‌ها را با عدسی شیئی ایمرسیون مشاهده کرده، شکل آن‌ها را بکشید.

۲- روش شافر و فولتون<sup>۷</sup>: در روش رنگ آمیزی شافر و فولتون از رنگ گرم سبزمالاشیت<sup>۸</sup>

به عنوان رنگ قوی که بعد از شستشو از اندوسپور جدا نمی‌شود و از سافرانین به عنوان رنگ دوم استفاده می‌شود. بنابراین اندوسپور به رنگ سبز درمی‌آید ولی بقیه سلول‌ها (یا سلول بدون اندوسپور) به رنگ قرمز کمرنگ خواهند بود.

۱- Endospore

۲- Bacillus

۳- Clostridium

۴- Dorner

۵- Bacillus cereus

۶- Cl.Sporogenes

۷- Schaeffer and fulton

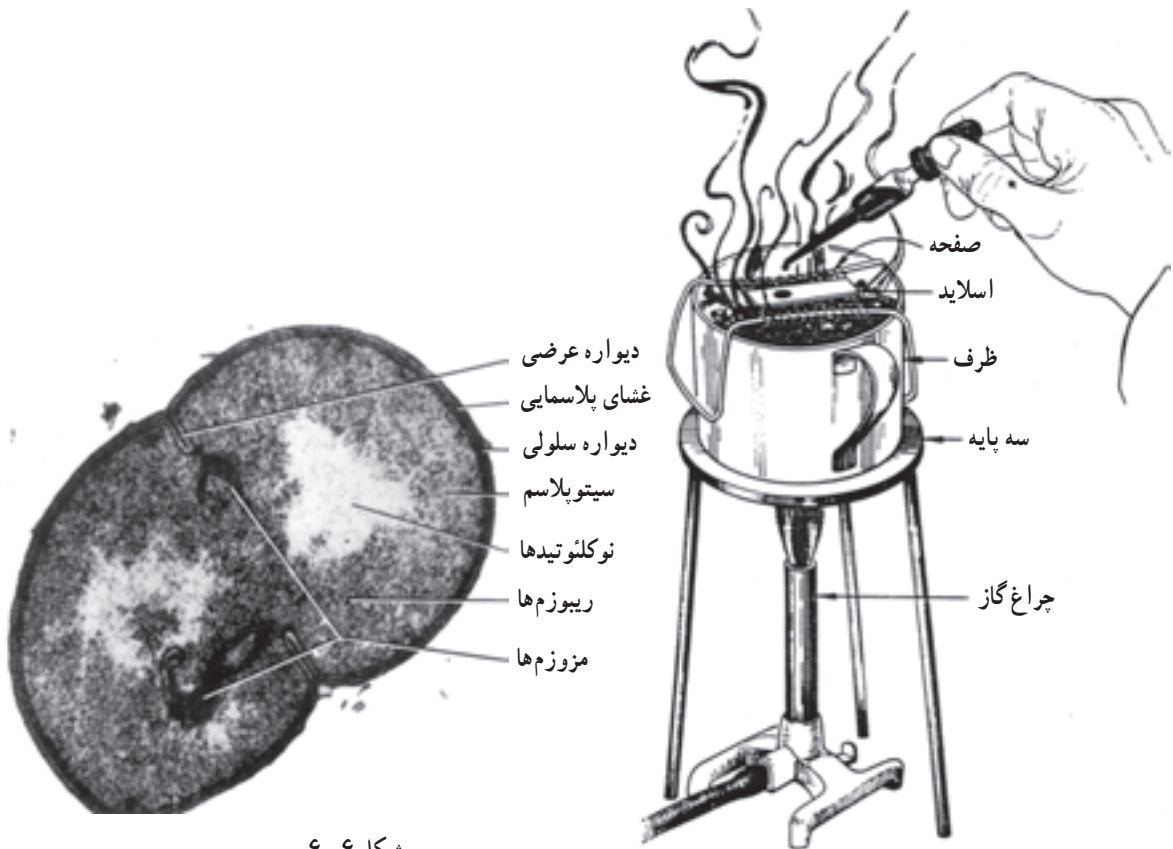
۸- Malachite green



شکل ۴-۶

— روش رنگ آمیزی با رنگ سبزمالاشیت:

- ۱- گستره باسیلوس سرئوس یا کلستریدیوم اسپوروزنس را تهیه کرده، گستره‌ها را در هوا خشک کنید و آن‌ها را با حرارت تثبیت نمایید.
  - ۲- لام‌ها را روی پایه‌ی مخصوص رنگ آمیزی که روی ظرف آب جوش قرار دارد بگذارید.
  - ۳- گستره‌ها را با قطعات کوچک کاغذ خشک‌کن پوشانده، و با سبزمالاشیت آغشته کنید تا به صورت اشباع درآمده (محلول آبی ۵٪) و حرارت دادن را به مدت ۵ دقیقه ادامه دهید.
  - ۴- گستره‌ها را با آرمی با آب بشوید.
  - ۵- رنگ آمیزی را به مدت ۳۰ ثانیه با سافرانین به عنوان رنگ دوم انجام دهید.
  - ۶- گستره‌ها را با آب شسته، با خشک‌کن خشک کنید.
  - ۷- گستره‌ها را با عدسی شیئی روغنی ایمرسیون مشاهده کرده، شکل آن‌ها را بکشید.
- برای دیدن اندوسپور بدون رنگ آمیزی می‌توان از میکروسکوپ فازکنتراست استفاده کرد که در



شکل ۶-۶

شکل ۶-۵- بخار دادن به لام در حین رنگ آمیزی اسپور باکتری‌ها

این مورد اندوسپور به صورت یک ساختمان سفید کلفت در داخل سلول دیده می‌شود. اگر میکروسکوپ فاز کنتراست در دسترس باشد، اندوسپورهای کشت باسیلوس سرئوس و کلستریدیوم اسپوروزنس را زیر آن مشاهده کنید. (شکل ۶-۵ حرارت دادن لام را در حین رنگ آمیزی اسپورباکتری‌ها نشان می‌دهد.)

### برای مطالعه

ب) رنگ آمیزی دیواره‌ی سلولی<sup>۱</sup>: به دلیل نازکی و مقاومت در برابر رنگ آمیزی، دیواره‌ی سلولی سخت باکتری‌های حقیقی را به‌طور طبیعی به سختی می‌توان از بقیه قسمت‌های سلول تشخیص داد اما این قسمت با میکروسکوپ الکترونی به راحتی قابل مشاهده است که تصویر آن در شکل ۶-۶ نمایش داده شده است. به

<sup>۱</sup> Cellwall

هرحال، با به کار بردن بعضی دندانه‌ها امکان رنگ‌آمیزی و دیدن این ساختمان امکان‌پذیر است. برای مثال، با مجاور کردن دیواره‌ی سلولی با یک عامل کاتیون سطحی، می‌توان آن را، دارای بار الکتریکی مثبت کرد، که بعد این ساختمان می‌تواند با یک رنگ اسیدی رنگ‌آمیزی شود، سیتوپلاسم بار الکتریکی منفی خود را حفظ کرده، می‌تواند به وسیله‌ی یک رنگ قلیایی متضاد رنگ‌آمیزی شود. نمونه‌ای را که برای نشان دادن رنگ‌آمیزی دیواره‌ی سلولی برایتان تهیه شده است به وسیله‌ی عدسی شیئی روغنی ایمرسیون میکروسکوپ نوری خود مشاهده کنید. توجه کنید که برای دیدن این رنگ‌آمیزی نورپردازی دقیق ضروری است.

برای این آزمایش با استعمال ستیل پیریدینیوم کلراید<sup>۱</sup> دیواره‌ی سلولی دارای بار



شکل ۶-۷- تاژک باکتری‌ها که با رنگ‌آمیزی مشخص گردیده است.

الکتریکی مثبت شده است، که این ماده در آب به صورت کاتیون ستیل پیریدینیوم با بار الکتریکی مثبت و یون کلرور با بار الکتریکی منفی تجزیه شده است. در نتیجه جذب کاتیون ستیل پیریدینیوم، سطح، یا دیواره، سلول باکتری دارای بار الکتریکی مثبت شده است. سپس دیواره با رنگ اسیدی کنگو<sup>۲</sup> به رنگ قرمز و سیتوپلاسم با رنگ متیلن بلو<sup>۳</sup>

۱- Cetyl Pyridinium chloride

۲- Congo

۳- Methylene blue

به رنگ آبی رنگ آمیزی می شوند.

ج) رنگ آمیزی تاژک<sup>۱</sup>: ابعاد تاژک باکتری ها کمتر از حد بزرگ نمایی میکروسکوپ نوری است. بنابراین تا قبل از استفاده از میکروسکوپ الکترونی، رؤیت مستقیم این ساختمان ها غیر ممکن بود، ولی به هر حال با روش های رنگ آمیزی مخصوص یعنی با پوشاندن سطح تاژک ها با یک دندان (رسوب دادن نمک های مختلف) و بدین طریق افزایش ابعاد قابل رؤیت آن ها، می توان تاژک ها را در حدود درشت نمایی میکروسکوپ نوری قرار داد.

### آزمایش: رنگ آمیزی تاژک باکتری ها

#### مواد مورد نیاز:

- ۱- کشت ۲۴ - ۱۸ ساعته باسیلوس سابتیلیس<sup>۲</sup> در محیط کشت نوترینت آگار که به صورت شیب دار کشت داده شده است.
  - ۲- الکل اتیلیک ۹۵٪
  - ۳- رنگ تاژک لیفسون (Liefson's) محلول A، B و C
  - ۴- محلول متیلن بلو
  - ۵- لوله های آزمایش استریل
  - ۶- محلول تمیزکننده ی بی کرومات
  - ۷- لوله های دارای آب مقطر استریل
- روش کار:

- ۱- ابتدا به مدت یک هفته لام های مورد استفاده برای رنگ آمیزی تاژک را در محلول تمیزکننده ی بی کرومات قرار داده، بعد از طی مدت مذکور آن ها را با الکل ۹۵٪ شست و شو دهید و بگذارید خشک شود. (بدون پاک کردن)
- سعی کنید در برداشتن لام های مزبور از محلول تمیزکننده، کناره های آن ها را بگیرید تا از آلوده و کثیف شدن سطح لام ها جلوگیری شود.
- ۲- مدت چند ثانیه لام را روی شعله ی چراغ الکلی به جلو و عقب حرکت دهید.
- ۳- بگذارید لام ها در هوای آزمایشگاه سرد شوند.
- ۴- درب لوله دارای کشت باکتری باسیلوس سابتیلیس را باز نموده، ۲-۳

<sup>۱</sup>- Flagellum

<sup>۲</sup>- Bacillus subtilis



میلی لیتر آب مقطر استریل روی سطح شیب دار محیط بریزید و بعد از بستن درب لوله بآرامی آن را تکان دهید.

۵- با پیت استریل یک قطره از سطح بالای محلول (جایی که باکتری‌های متحرک فراوان هستند) برداشته، در یک طرف لام نزدیک یک لبه‌ی آن قرار دهید.

۶- با کمی شیب دادن به لام، اجازه دهید مواد قطره‌قطره به سمت دیگر لام جریان یابد. (تأحدی که در سطح لام پخش شود)

۷- بدون آن که با حرارت گسترش را ثابت کنید، بگذارید تا در هوای اتاق خشک شود.

۸- محلول‌های A، B و C لیفسون را به مقدار مساوی (هرکدام ۲ میلی‌لیتر) با یکدیگر مخلوط نموده، به وسیله‌ی پیت استریل، یک قطره از مخلوط فوق را روی سطح گسترش قرار دهید و بگذارید به مدت ۱۰ دقیقه باقی بماند.

۹- بعد از گذشت مدت مزبور، بدون آن که رنگ‌های اضافه را دور بریزید، لام را زیر جریان ملایم آب معمولی گرفته، شست‌وشو دهید.

۱۰- رنگ متیلن‌بلو (۱ درصد) را افزوده، بگذارید یک دقیقه باقی بماند.

۱۱- لام را زیر جریان ملایم آب معمولی شست‌وشو داده، بگذارید تا در هوای آزمایشگاه خشک شود و سپس مورد مشاهده‌ی میکروسکوپی قرار دهید.

۱۲- تازکها را به رنگ قرمز و سلول باکتری را به رنگ آبی خواهید دید.

د) رنگ آمیزی کپسول<sup>۱</sup>: خیلی از باکتری‌ها به وسیله‌ی یک لایه‌ی صمغی با ضخامت‌های مختلف احاطه شده‌اند که به نام کپسول خوانده شده، نسبت به سلول با شدت کمتری رنگ آمیزی می‌شوند چون اغلب اوقات کپسول‌ها به صورت یک محوطه‌ی رنگ نشده در اطراف سلول‌های رنگ شده ظاهر می‌شوند، بنابراین می‌توانند با مواد خارجی رنگ نشده مثل محوطه خالی حاصل از مجاله و منقبض شدن سلول‌ها، اشتباه شوند، بنابراین برای نشان دادن کپسول‌ها مهم‌ترین روش رنگ آمیزی، روش رنگ آمیزی منفی است که مراحل آن در شکل ۲-۶ مشخص شده است. با کمک رنگ‌های منفی، نظیر نیگروزین، می‌توانید نمونه‌هایی را برای مشخص کردن کپسول باکتری‌ها تهیه نمایید و با بکار بردن عدسی شیئی روغنی ایمرسیون میکروسکوپ نوری مشاهده کنید.

گاهی ممکن است کپسول‌ها با مواد روشن اطراف سلول باکتری اشتباه شوند. چنان‌که سطح روشن اطراف سلول‌ها ممکن است نشان دهنده‌ی کپسول نباشد ولی صرفاً رنگ‌آمیزی غیرصحیح و یا کم‌رنگ موجب چنین اشتباهی می‌شوند. به این جهت کپسول‌ها باید به طریقی رنگ شوند که به خوبی از سلول باکتری تمیز داده شوند.

روش رنگ‌آمیزی کپسول باکتری‌ها:

مواد و لوازم مورد نیاز:

۱- کشت شیب‌دار ۴۸ ساعته باکتری کلبسیلا نمونیا<sup>۱</sup>

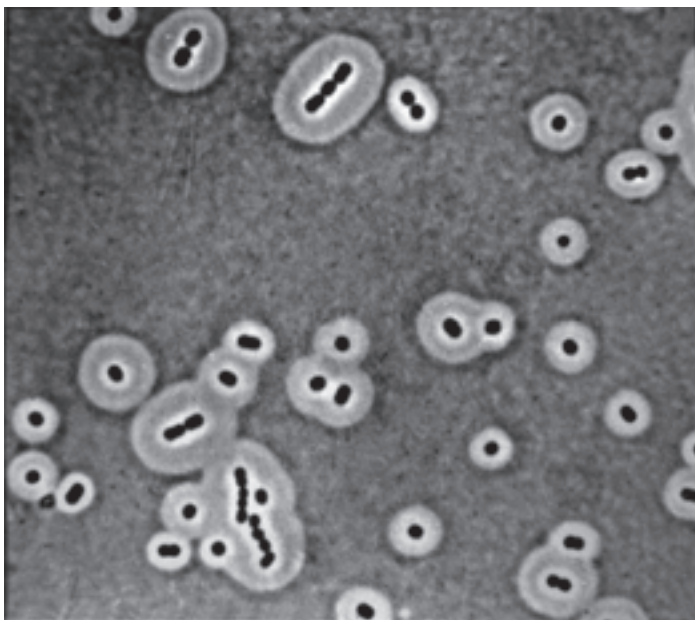
۲- محلول یک درصد کریستال ویوله

۳- محلول ۲۰٪ سولفات مس

روش کار:

۱- از پرگنه کلبسیلا نمونیا روی یک لام تمیز گستره تهیه نموده، بگذارید در هوای آزمایشگاه خشک شود.

۲- از حرارت دادن لام برای ثابت نمودن گستره خودداری نمایید.



شکل ۸-۶- کپسولهای رنگ شده در زیر میکروسکوپ معمولی

<sup>۱</sup>- Klebsiella pneumonia

۳- از محلول کریستال ویوله مقداری روی گستره ریخته، بگذارید مدت دو دقیقه باقی بماند.

۴- لام را با محلول ۲۰٪ سولفات مس شستشو داده، بگذارید در هوای آزمایشگاه خشک شود.

۵- لام را مورد مشاهده‌ی میکروسکوپی قرار دهید. سلول باکتری به رنگ آبی تیره و کپسول به رنگ آبی بنفش دیده می‌شود.

۴-۳-۶- رنگ آمیزی مواد ذخیره‌ای سلول باکتری: سلول میکروب‌ها، در مراحل مختلف رشد خود دارای مواد ته‌نشین یا گرانول‌هایی<sup>۱</sup> هستند که اغلب تصور می‌شود مواد ذخیره‌ای سلول باشند. یک منبع ساکاریدی که اغلب در سلول مخمرها و بعضی از سلول باکتری‌ها یافت می‌شود گلیکوژن است. به نظر می‌آید که این ماده شبیه کربوهیدرات ذخیره‌ای سلول حیوانات باشد، زیرا با ید به رنگ قرمز مایل به قهوه‌ای درمی‌آید. منابع لیپیدی هم که مهم‌ترین آن‌ها اسید پلی-بتا-هیدروکسی بوتیریک<sup>۲</sup> است، در خیلی از باکتری‌ها وجود دارد. اگرچه این مواد را نمی‌توان با رنگ‌های معمولی به سهولت رنگ آمیزی کرد، ولی می‌توان آن‌ها را با رنگ‌های محلول در چربی نشان داد، که احتمالاً بدین طریق یک لایه‌ی لیپیدی اطراف این منابع رنگ می‌شوند. یکی از بهترین انواع این رنگ‌ها سودان سیاه<sup>۳</sup> می‌باشد. بعضی از منابع ذخیره‌ای باکتری‌ها را اغلب به نام ولوتین<sup>۴</sup> می‌خوانند که با رنگ‌های قلیایی به شدت رنگ آمیزی می‌شود. این مواد گرانول‌های پلی‌متا-فسفات<sup>۵</sup> هستند. (تصویر گرانول‌های ذخیره‌ای که به کمک میکروسکوپ الکترونی تهیه شده در شکل ۹-۶ به نمایش گذاشته شده است.)

### روش کار: (گلیکوژن)

۱- با به کار بردن سیم مخصوص تلقیح مقداری سلول مخمر ساکارومیسس سروسیسه<sup>۶</sup> را به یک قطره آب که روی یک لام تمیز قرار دارد انتقال داده، بآرامی آن را در آب مخلوط کنید تا یک سوسپانسیون حاصل شود.

۲- یک قطره ید لوگل اضافه کرده، آن‌ها را به آرامی در روی لام مخلوط کنید.

۱- Granule

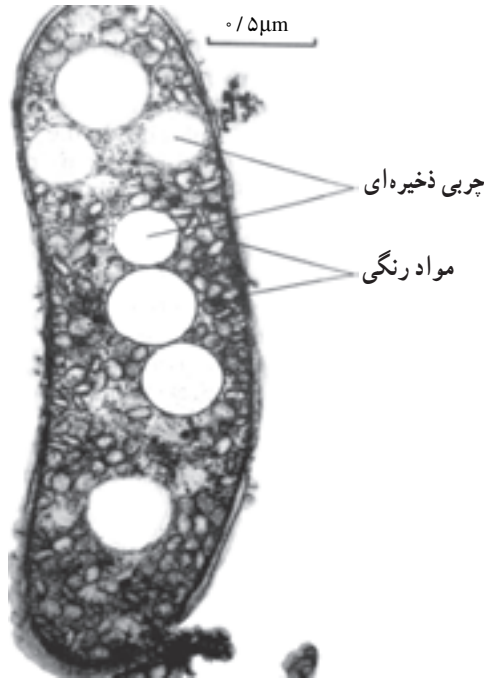
۲- poly Beta hydroxybutyric acid

۳- Sudan black - B

۴- Volutin

۵- Polymetaphosphate

۶- Saccharomyces cerevisiae



شکل ۹-۶- تصویر میکروسکوپ الکترونی اندوسپور

۳- یک لامل روی نمونه گذاشته، آن را با عدسی شیئی روغنی ایمرسیون مشاهده کنید.

برای این آزمایش، محیط کشت باید اسیدی باشد. اگر کشت قلیایی است، قبل از افزودن پد آن را اسیدی کنید، بعضی از باکتری‌ها، مخصوصاً گروهی از باکتری‌های بی‌هوازی اسپوردار، حاوی کربوهیدرات ذخیره‌ای دیگری به نام یوژن<sup>۱</sup> یا گرانولوز<sup>۲</sup> هستند که با پد به رنگ آبی درمی‌آید. اسید پلی - بتا - هیدروکسی بوتیریک.

۱- تعدادی سلول باسیلوس مگاتریوم<sup>۳</sup> را به یک قطره‌ی آب که در روی یک لام تمیز قرار دارد انتقال داده، مخلوط کنید.

۲- یک قطره محلول سودان سیاه ب اضافه کرده، مخلوط کنید.

۳- یک لامل روی نمونه‌ی حاصل گذاشته، آن را با عدسی شیئی روغنی ایمرسیون مشاهده کنید.

۱- Iogen

۲- Granulose

۳- *Bacillus megaterium*

**یادداشت:** چون سلول‌ها باستثنای جدار اطراف پلی - بتا - هیدروکسی بوتیریک بی‌رنگ هستند، از این‌رو برای افزایش تضاد، مقدار نور را کاهش دهید.

### ولوتین

۱- گستره‌ای از باسیلوس سرئوس تهیه کنید. بگذارید تا خشک شده، آن را با حرارت تثبیت کنید.

۲- یک قطره محلول آبی اسیدی شده متیلن بلو اضافه کنید.

۳- روی نمونه حاصل یک لامل گذاشته، آن را با عدسی شیئی روغنی ایمرسیون مشاهده کنید.

بیشتر محتویات سلولی، مثل پروتئین‌ها، با رنگ‌های قلیایی فقط هنگامی رنگ می‌شوند که pH محیط اطرافشان بالاتر از نقطه‌ی ایزوالکتریک<sup>۱</sup> آن‌ها باشد. موادی که دارای نقطه‌ی ایزوالکتریک خیلی اسیدی هستند با یک رنگ قلیایی اسیدی شده ( $pH = 2-3$ ) رنگ‌آمیزی می‌شوند. بنابراین، ولوتین که از مواد اسیدی تشکیل شده با یک رنگ قلیایی حتی در کمتر از  $pH 4$  هم‌رنگ می‌شود. ولوتین یک پلی‌فسفات است که ظاهراً در سنتز اسیدهای نوکلئیک و در تأمین انرژی سلول‌ها وارد عمل می‌شود.

## خودآزمایی

۱- اثر تغییر دادن رنگ اول و دوم چیست؟ همین طور با حذف حرارت چه تغییری حاصل

خواهد شد؟

۲- آیا میکروارگانسیم‌های اسید فست گرم مثبت و یا گرم منفی هستند؟

۳- مزایای رنگ آمیزی باکتری‌ها چیست؟

۴- انواع روش‌های رنگ آمیزی باکتری‌ها و رنگ‌های مورد استفاده در آن‌ها را بنویسید.

۵- منظور از تثبیت باکتری‌ها قبل از رنگ آمیزی چیست؟ از چه عواملی برای آن استفاده

می‌شود؟

۶- روش تثبیت باکتری‌ها را بنویسید.

۷- رنگ‌های قلیایی و اسیدی هر یک چگونه باعث رنگ آمیزی باکتری‌ها می‌شوند؟

۸- اساس رنگ آمیزی‌های تشخیصی چیست؟

۹- به طور خلاصه رنگ آمیزی گرم را شرح دهید.

۱۰- از رنگ آمیزی اسید فست به چه منظورهایی استفاده می‌شود؟

۱۱- برای رنگ آمیزی اندوسپور باکتری‌ها از چه روش‌ها و رنگ‌هایی می‌توان استفاده کرد؟