فصل ششم

رنگ‌آمیزی میکروارگانیسم‌ها

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

۱ــ گسترشی تهیه و آن را رنگ‌آمیزی نماید و باکتری‌ها را زیر میکروسکوپ مورد مشاهده قرار دهد.

۲ــ تئوری رنگ‌آمیزی و اهمیت آن را بیان نماید.

۳ــ یک نوع رنگ‌آمیزی ساده را انجام دهد.

۴ــ یک نوع رنگ‌آمیزی تشخیصی انجام دهد.

۶ــ رنگ‌آمیزی میکروارگانیسم‌ها

۱ــ۶ــ اهمیت رنگ‌آمیزی باکتری‌ها

مورفولوژی باکتری‌ها را به دوطریق می‌توان مورد بررسی قرار داد :

۱ ــ به وسیله‌ی مشاهده‌ی موجودات زنده و بدون رنگ‌آمیزی.

۲ ــ به وسیله‌ی مشاهده‌ی سلول‌های مرده و رنگ شده با مواد رنگی.

باکتری‌های زنده بی‌رنگ‌اند، و تضاد کافی با آبی که در آن معلق هستند ندارند و در نتیجه خوب دیده نمی‌شوند. رنگ‌آمیزی موجودات باعث می‌شود که بین آن‌ها و محیط اطرافشان تضاد رنگی حاصل شود و بدین طریق بهتر دیده بشوند. همینطور بعضی از رنگ‌هایی که بکار می‌روند، می‌توانند ساختمان‌های داخلی سلول را که به‌طور طبیعی غیرقابل رؤیت هستند، مشخص کنند. اگر چه باکتری‌ها با محیط اطرافشان اختلاف زیادی نشان نمی‌دهند، ولی از نظر شیمیایی از محیط خود متفاوت هستند. این اختلاف شیمیایی ما را در تشخیص باکتری‌ها به وسیله‌ی رنگ‌آمیزی توانا می‌سازد، زیرا رنگ یا ماده به‌طور معمول با سلول باکتری واکنش ایجاد می‌کند، در حالی که روی زمینه لام اثری

ندارد. بنابراین، مزایای اصلی رنگ‌آمیزی عبارت است از ۱ــ ایجاد تضاد بین میکروارگانیسم‌ها و زمینه‌ی آن‌ها، که در نتیجه باعث تمایز اشکال مختلف می‌شود. ۲ــ امکان بررسی ساختمان‌های داخلی سلول باکتری‌ها، مثل دیواره‌ی سلولی، واکوئول[1]، یا ضمائم هسته[2] را فراهم می‌نماید. ۳ــ به باکتری‌شناس امکان می‌دهد که از درشت‌نمایی بیشتر استفاده کند.

۲ــ۶ــ تئوری رنگ‌آمیزی

برای درک این‌که 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 متیلن‌بلو در حقیقت ملح کلرورمتیلن‌بلو می‌باشد که تجزیه آن به شرح ذیل است

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

قسمت رنگی این ماده در یون مثبت متیلن‌بلو قرار دارد. سلول باکتری‌ها هنگامی که در محیطی قرار بگیرد که دارای pH حدود خنثی باشد ــ که به طور معمول چنین است ــ، دارای بار الکتریکی منفی مختصری خواهند بود. سلول باکتری با بار الکتریکی منفی با یون متیلن‌بلو 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.

۳ــ۶ــ روش‌های رنگ‌آمیزی

امروزه تعداد زیادی مواد رنگی در اختیار باکتری‌شناسان است که به اشکال متفاوت در روش‌های رنگ‌آمیزی اصلی به‌کار می‌روند.

الف) رنگ‌آمیزی‌های ساده: شامل رنگ‌آمیزی با مواد رنگی قلیایی، مواد رنگی اسیدی و موادرنگی خنثی می‌باشد

۱ــ 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

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

۱ــ Vacuole ۲ــ Nuclearbodies

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

۳ــ 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) رنگ‌آمیزی‌های تشخیصی[۱]: شامل رنگ‌آمیزی گرم[۲] و رنگ‌آمیزی اسید فست[۳]

ــ طرز تهیّه و تثبیت باکتری‌ها برای رنگ‌آمیزی

پیش از رنگ‌آمیزی 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 رنگ‌آمیزی شسته شده، از بین خواهد رفت. روشی که در این آزمایش ذکر می‌شود، خیلی معمول است و به عنوان کار اولیه در بیشتر روش‌های رنگ‌آمیزی باکتری‌ها بکار می‌رود. در این آزمایش، از حرارت برای کشتن و چسباندن سلول‌ها به لام استفاده می‌شود.

۱ــ با یک سوزن کشت حلقه‌ای، یک قطره کوچک از هرکدام 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 (xylol) 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.

۲ــ 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.

۳ــ 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.

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

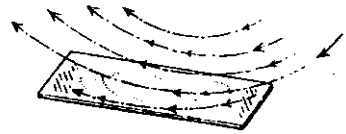
۵ــ هنگامی که لایه‌های میکروبی خشک شد، لام را سه بار از درون شعله گاز عبور دهید. به‌طوری که قسمت لایه‌ی میکروبی به طرف بالا باشد. توجه کنید که گرمای زیاد باعث تغییر شکل ساختمان طبیعی میکروارگانیسم‌های رنگ شده خواهد شد. اگر لام گرم شده را پشت دست قرار دهیم، باید گرمای آن حس شود ولی داغ و سوزنده نباشد.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

۱ــ Differential ۲ــ Gram stain ۳ــ Acid fast stain

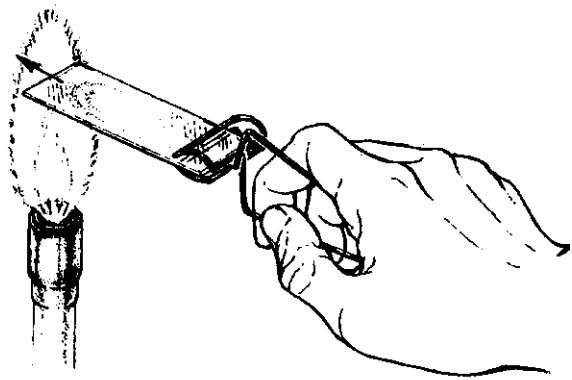
۱ــ یک قطره آب استریل بر روی لامل تمیز شده قرار دهید.

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

۳ــ قطره را با ضخامت کم در سطح لام پخش کنید.



۴ــ آن را در هوا خشک کنید.



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

شکل ۱ــ۶ــ تهیه گستره و تثبیت میکروارگانیسم ها 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.

۱ــ۳ــ۶ــ رنگ‌آمیزی‌های ساده

الف) رنگ‌آمیزی با رنگ‌های قلیایی: رنگ‌آمیزی با رنگ‌های قلیایی متیلن‌بلو، کریستال ویوله[۱] و کربول‌فوشین[۲] 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 وفنل 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 رنگ‌آمیزی:

۱ ــ لام‌هایی را که در قسمت اول آزمایش تثبیت کردید روی صفحه سیمی مخصوص رنگ‌آمیزی که روی ظرف مخصوص مایعات زائد است قرار دهید.

۲ــ هریک از لایه‌های میکروبی تثبیت شده را با تقریباً ۵ قطره از یکی از رنگ‌ها آغشته کرده، بگذارید تا با گذشت زمان رنگ‌آمیزی انجام شود، در مورد متیلن بلو، ۳۰ ثانیه، کریستال‌ویوله، ۱۰ ثانیه، و کربول فوشین ۵ ثانیه.

۳ــ نمونه‌های رنگ شده را با آب فشان شستشو دهید.

۴ــ لام‌ها را بین کاغذ آب‌خشک کن بدون وارد کردن فشار روی لامل یا در هوای بالای شعله خشک کنید.

۵ ــ 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،

۱ــ Crystal Violet ۲ــ Carbol fuchsin

سلول‌های اپی‌تلیال[1]، 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:

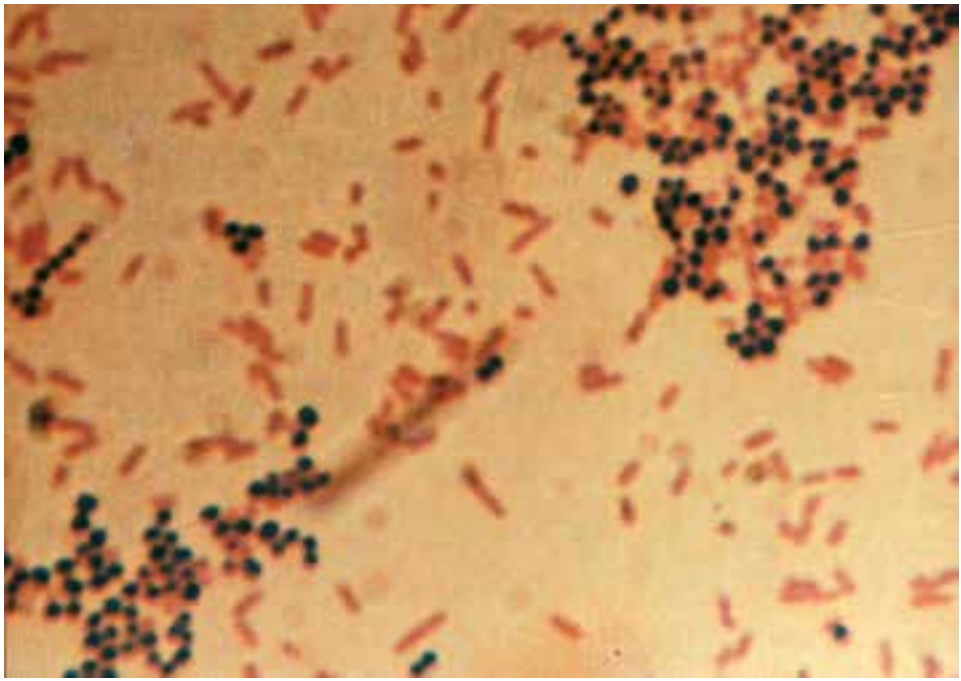
آیا می‌توانید بگویید که تمام باکتری‌های جداشده کشت خالص هستند؟

۲ ــ۳ــ۶ــ روش‌های رنگ‌آمیزی تشخیصی[2] : 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 بدین‌طریق 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[3]: رنگ‌آمیزی گرم که بیشتر از هر روش دیگری در باکتریولوژی به‌کار می‌رود رنگ‌آمیزی تشخیصی است. با به‌کار 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 میکرو ارگانیسم‌های 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 دندانه[4] یک عامل رنگ‌بر[5] و یک رنگ دوم. درباره رنگ قلیایی بحث شده است. دندانه 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، املاح‌معدنی و ید را می‌توان به عنوان دندانه مثال زد. سلولی که روی آن ریخته شده دندانه بیشتر و بهتر رنگ می‌شود.

۱ــ Epithelial
۲ــ Differential Staining
۳ــ Gram Stain
۴ــ Mordant
۵ ــ Decolorizing Agent



شکل ۲ــ۶ــ رنگ‌آمیزی گرم. باکتری‌های گرم مثبت به رنگ بنفش یا ارغوانی و باکتری‌های گرم منفی به رنگ صورتی

همین‌طور بعد از به‌کاربردن دندانه شستن و از بین بردن رنگ دشوارتر است. عامل رنگ‌بر، همان‌طور که از اسمش معلوم است، ماده‌ای است که رنگ را از یک سلول رنگ شده خارج می‌کند. بعضی از سلول‌های رنگ‌شده راحتتر از سلول‌های دیگر بی‌رنگ می‌شوند. در رنگ‌آمیزی گرم و در سایر روش‌های رنگ‌آمیزی تشخیصی از این تفاوت در میزان بی‌رنگ شدن استفاده کرده، انواع مختلف باکتری‌ها را از یکدیگر متمایز می‌کنیم. رنگ دوم، یک ماده رنگی قلیایی است که از نظر رنگ با ماده رنگی اولیه متفاوت است. منظور از به‌کارگیری رنگ دوم عبارتست از رنگ کردن سلول‌های بی‌رنگ شده به وسیله‌ی رنگی که با رنگ اولیه متفاوت است. میکرو ارگانیسم‌هایی که رنگ اولیه خود را از دست نداده‌اند رنگ قلیایی اولیه را نگه می‌دارند و آن‌هایی که رنگ خود را از دست داده‌اند رنگ دوم را جذب می‌کنند. رنگ‌آمیزی گرم در مرحله اول عبارتست از رنگ شدن سلول‌ها با یک رنگ قلیایی. این عمل با مجاور کردن سلول‌های رنگ شده با یک دندانه مثل ید، دنبال می‌شود. سپس سلول‌ها را با یک ماده رنگ‌بر مثل الکل مجاور می‌کنند. سلول‌هایی که بعد از رنگ‌بری، رنگ قلیایی خود را حفظ کنند گرم مثبت خوانده می‌شوند و آن‌هایی که بی‌رنگ شده‌اند گرم منفی هستند که

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

روش کار:

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

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

۳ــ گستره‌ها را با آب فشان بشویید.

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

۵ــ گستره‌ها را با آب فشان بشویید.

۶ــ 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 الکلی که از لام خارج می‌شود بی‌رنگ خواهد بود.

۷ ــ گستره‌ها را با آب فشان بشویید.

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

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

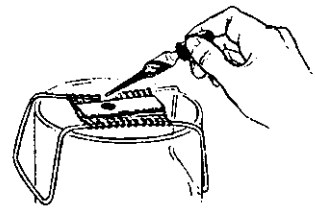
۱۰ ــ روی هر یک از گستره‌ها یک قطره روغن سدر[1] بریزید و آن را با عدسی با بزرگنمایی ۱۰۰ مشاهده کنید.

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 ۱ــ۶ 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.

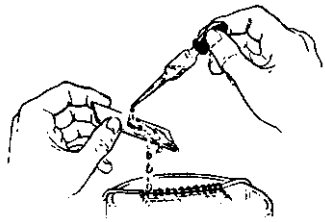
روش کار:

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

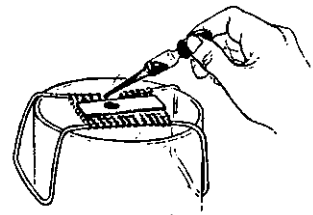
۱ــ Immersion Oil



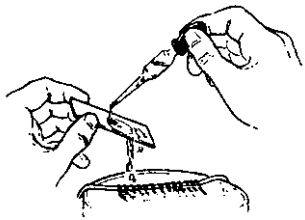
۱ــ گستره را با کریستال ویوله به مدت حدود ۳۰ ثانیه رنگ کنید.



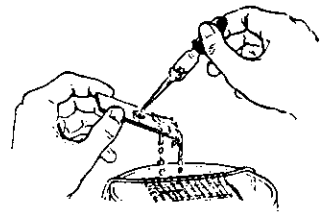
۲ــ آن را با آب بشویید.



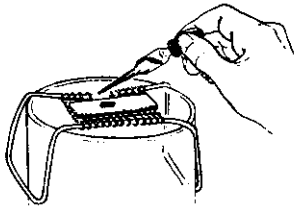
۳ــ گستره را با محلول ید گرم به مدت حدود ۳۰ ثانیه بپوشانید.



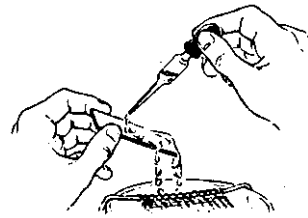
۴ــ آن را با آب بشویید.



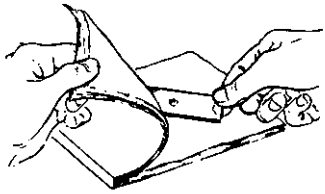
۵ــ گستره را به مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه با الکل ۹۵٪ بی‌رنگ کنید.



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



۷ــ آن را با آب بشویید.



۸ــ گستره را خشک کنید.

شکل ۳ــ۶ــ مراحل رنگ‌آمیزی گرم

جدول ۱ــ۶ــ مراحل رنگ‌آمیزی گرم

مرحله	روش کار	نتایج حاصل	
		گرم مثبت	گرم منفی
رنگ اولیه	کریستال ویوله به‌مدت ۳۰ ثانیه	به رنگ بنفش ارغوانی	به رنگ بنفش ارغوانی
دندانه	ید به‌مدت ۳۰ثانیه	رنگ بنفش‌ارغوانی باقیمانده	رنگ‌بنفش ارغوانی باقیمانده
رنگ‌بری	الکل اتیلیک ۹۵٪ به‌مدت ۱۰تا۳۰ ثانیه	رنگ بنفش ارغوانی باقیمانده	بی‌رنگ می‌شود.
رنگ دوم	سافرانین به مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه	رنگ بنفش ارغوانی باقیمانده	به رنگ سرخ

فکر کنید و پاسخ دهید:

۱ــ آیا می‌توان رنگ اولیه و رنگ دوم را تغییر داد؟

۲ــ اگر ید را با سایر عوامل اکسیدکننده عوض کنید چه تغییراتی حاصل خواهد شد؟

۳ ــ آیا الکل‌های دیگر نیز به خوبی الکل اتیلیک می‌توانند به عنوان عوامل رنگ‌بر به‌کار روند؟

۴ــ اثر pH روی واکنش گرم چیست؟

ب) رنگ‌آمیزی اسید فست[1] : رنگ‌آمیزی اسید فست، رنگ‌آمیزی تشخیصی است که میزان و درجه مقاومت سلول‌های رنگ شده را در برابر رنگ‌بری اسیدها تعیین می‌کند. خاصیت مقاومت در برابر اسیدها در بعضی مایکوباکتریوم‌ها[2] و اکتینومیست‌ها[3] بستگی به مقدار زیادی لیپید دارد که در آن‌ها موجود است. برای رنگ‌آمیزی این باکتری‌ها حرارت و رنگی که دارای گرایش قوی به سلول این باکتری‌ها دارد مورد نیاز است. این باکتری‌ها، بعد از یک‌بار رنگ شدن، به دشواری ممکن است بی‌رنگ شوند. در این روش از کربول فوشین گرم برای رنگ‌آمیزی، و از محلول اسید ــ الکل به‌عنوان عامل بی‌رنگ کننده استفاده و بعد هم رنگ‌آمیزی دوم سلول باکتری‌ها عملی می‌شود. باکتری‌های اسید فست، کندتر از سایر میکروارگانیسم‌ها، در برابر اسید ــ الکل بی‌رنگ شده، بعد از رنگ‌آمیزی دوم، رنگ اولیه

۱ــ Acid fast stain ۲ــ Mycobacterium ۳ــ 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 میکروبهای ساپروفیت[1] و بی‌آزار اسید فست هم بکار می‌رود.

روش کار:

۱ــ یک گستره میکروبی شامل مخلوطی از کشت‌های مایکوباکتریوم و اشریشیا تهیه کنید.

۲ــ گستره را در هوا خشک کرده، با حرارت تثبیت کنید.

۳ــ 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.

۴ــ 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 بپوشانید. توجه کنید که درحین رنگ‌آمیزی، نگذارید گستره خشک شود. از زیاد شدن ماده رنگی روی گستره جلوگیری کنید.

۵ــ نمونه را با آب بشویید.

۶ــ نمونه را با اسیدالکل (الکل اتیلیک ۹۵٪ حاوی اسیدنیتریک ۲/۵٪) به مدت ۱۰ تا ۳۰ ثانیه بی‌رنگ کنید.

۷ــ نمونه را با آب بشویید.

۸ــ رنگ‌آمیزی دوم را با متیلن‌بلو به مدت ۳۰ ثانیه انجام دهید. (بدون حرارت)

۹ــ نمونه را با آب شسته، با کاغذ خشک‌کن بدون وارد کردن فشار خشک کنید.

۱۰ــ 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 میکروبها به رنگ آبی خواهند بود.

۱ــ Saprophyte

۳ــ۳ــ۶ــ رنگ‌آمیزی ساختمان‌های سلولی: برای به دست آوردن تضادی که در دیدن ساختمان‌های مختلف سلول باکتری‌ها به وسیله‌ی میکروسکوپ نوری ضروری است، باید روش‌های رنگ‌آمیزی مخصوصی را به کار برد این آزمایش بعضی از رنگ‌آمیزی‌های ساختمانی را نشان می‌دهد.

روش کار:

الف) رنگ‌آمیزی اندوسپور[۱]: انواع جنس باسیلوس[۲] و کلستریدیوم‌ها[۳] در برابر عوامل نامساعد تبدیل به شکل اندوسپور خوانده می‌شود. اندوسپور برخلاف سلول جوان به‌وجودآورنده‌ی 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 رنگ‌آمیزی مقاومت نشان می‌دهد و بعد از یک‌بار 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 ۴ــ۶ نمایش داده شده است. دو روش رنگ‌آمیزی در این‌جا ذکر می‌شود :

۱ــ *روش دورنر*[۴]*:* 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 رنگ‌آمیزی با این روش، اندوسپورها به رنگ قرمز و قسمت‌های جوان سلول‌ها به‌صورت بی‌رنگ در یک زمینه‌ی تیره دیده می‌شوند. مراحل رنگ‌آمیزی به شرح زیر است :

۱ــ ۵ قطره آب استریل در دو لوله‌ی آزمایش ریخته، در این دو لوله دو سوسپانسیون غلیظ از باسیلوس سرئوس[۵] و کلستریدیوم اسپوروژنس[۶] بسازید.

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

۳ــ رنگ‌آمیزی را به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش انجام دهید.

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

۲ــ *روش شافر و فولتون*[۷]*:* در روش رنگ‌آمیزی شافر و فولتون از رنگ گرم سبزمالاشیت[۸] به‌عنوان 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.

۱ــ Endospore ۲ــ Bacillus ۳ــ Clostridium ۴ــ Dorner

۵ــ Bacillus cereus ۶ــ Cl.Sporogenes ۷ــ Schaeffer and fulton ۸ــ Malachite green

شکل ۴ــ۶

ــ روش رنگ‌آمیزی با رنگ سبزمالاشیت:

۱ــ گستره باسیلوس سرئوس یا کلستریدیوم اسپوروژنس را تهیّه کرده، گستره‌ها را در هوا خشک کنید و آن‌ها را با حرارت تثبیت نمایید.

۲ــ لام‌ها را روی پایه‌ی مخصوص رنگ‌آمیزی که روی ظرف آب جوش قرار دارد بگذارید.

۳ــ 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.

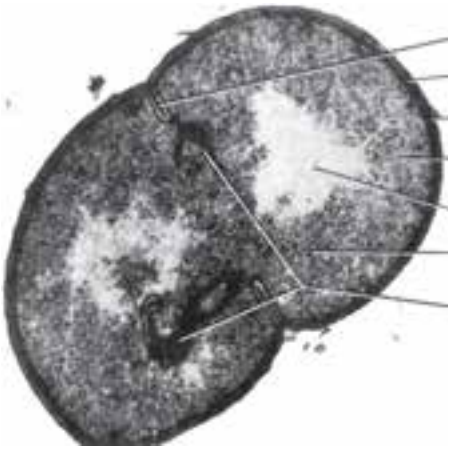
۴ــ گستره‌ها را بآرامی با آب بشویید.

۵ــ رنگ‌آمیزی را به مدت ۳۰ ثانیه با سافرانین به عنوان رنگ دوم انجام دهید.

۶ــ گستره‌ها را با آب شسته، با خشک‌کن خشک کنید.

۷ــ گستره‌ها را با عدسی شیئی روغنی ایمرسیون مشاهده کرده، شکل آن‌ها را بکشید.

برای دیدن اندوسپور بدون رنگ‌آمیزی می‌توان از میکروسکوپ فازکنتراست استفاده کرد که در



شکل ۶ــ۶

شکل ۵ــ۶ــ بخار دادن به لام در حین رنگ‌آمیزی 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 اسپوروژنس را زیر آن مشاهده کنید. (شکل ۵ــ۶ حرارت دادن لام را در حین رنگ‌آمیزی اسپورباکتری‌ها نشان می‌دهد.)

برای مطالعه

ب) رنگ‌آمیزی دیواره‌ی سلولی[1]: به دلیل نازکی و مقاومت در برابر رنگ‌آمیزی، 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 ۶ــ۶ نمایش داده شده است. به

۱ــ 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 ستیل‌پیریدینیوم کلراید[1] دیواره‌ی سلولی دارای بار

شکل ۷ــ۶ــ 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[2] به رنگ قرمز و سیتوپلاسم با رنگ متیلن‌بلو[3]

۱ــ Cetyl Pyridinium chloride ۲ــ Congo ۳ــ Methylene blue

به رنگ آبی رنگ‌آمیزی می‌شوند.

ج) رنگ‌آمیزی تاژک[1]: ابعاد تاژک باکتری‌ها کمتر از حد بزرگ‌نمایی میکروسکوپ نوری است. بنابراین تا قبل از استفاده از میکروسکوپ الکترونی، رؤیت مستقیم این ساختمان‌ها غیرممکن بود، ولی به هرحال با روش‌های رنگ‌آمیزی مخصوص یعنی با پوشاندن سطح تاژک‌ها با یک دندانه (رسوب دادن نمک‌های مختلف) و بدین‌طریق افزایش ابعاد قابل رؤیت آن‌ها، می‌توان تاژک‌ها را در حدود درشت‌نمایی میکروسکوپ نوری قرار داد.

آزمایش: رنگ‌آمیزی تاژک باکتری‌ها

مواد مورد نیاز:

۱ــ کشت ۲۴ ــ ۱۸ ساعته باسیلوس‌سابتیلیس[2] در محیط کشت نوترینت آگار که به صورت شیب‌دار کشت داده شده است.

۲ــ الکل اتیلیک ۹۵٪

۳ــ رنگ تاژک‌لیفسون (Liefson's) محلول A، B و C

۴ــ محلول متیلن‌بلو

۵ ــ لوله‌های آزمایش استریل

۶ــ محلول تمیزکننده‌ی بی‌کرومات

۷ــ لوله‌های دارای آب مقطر استریل

روش کار:

۱ــ ابتدا به مدت یک هفته لام‌های مورد استفاده برای رنگ‌آمیزی تاژک را در محلول تمیزکننده‌ی بی‌کرومات قرار داده، بعد از طی مدت مذکور آن‌ها را با الکل ۹۵٪ شست‌وشو دهید و بگذارید خشک شود. (بدون پاک کردن)

سعی کنید در برداشتن لام‌های مزبور از محلول تمیزکننده، کناره‌های آن‌ها را بگیرید تا از آلوده و کثیف شدن سطح لام‌ها جلوگیری شود.

۲ــ مدت چند ثانیه لام را روی شعله‌ی چراغ‌الکلی به جلو و عقب حرکت دهید.

۳ــ بگذارید لام‌ها در هوای آزمایشگاه سرد شوند.

۴ــ درب لوله دارای کشت باکتری باسیلوس سابتیلیس را باز نموده، ۳ــ۲

۱ــ Flagellum ۲ــ Bacillus subtilis

میلی‌لیتر آب مقطر استریل روی سطح شیب‌دار محیط بریزید و بعد از بستن درب لوله بآرامی آن را تکان دهید.

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

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

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

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

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

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

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

۱۲ــ تاژکها را به رنگ قرمز و سلول باکتری را به رنگ آبی خواهید دید.

د) رنگ‌آمیزی کپسول[1]: خیلی از باکتری‌ها به وسیله‌ی یک لایه‌ی صمغی با ضخامتهای مختلف احاطه شده‌اند که به نام کپسول خوانده شده، نسبت به سلول با شدّت کمتری رنگ‌آمیزی 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 مچاله و منقبض شدن سلول‌ها، اشتباه شوند، بنابراین برای نشان دادن کپسول‌ها مهم‌ترین روش رنگ‌آمیزی، روش رنگ‌آمیزی منفی است که مراحل آن در شکل ۲ــ۶ 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.

۱ــ Capsul

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:

۱ــ کشت شیب‌دار ۴۸ساعته باکتری کلبسیلا نمونیا[1]

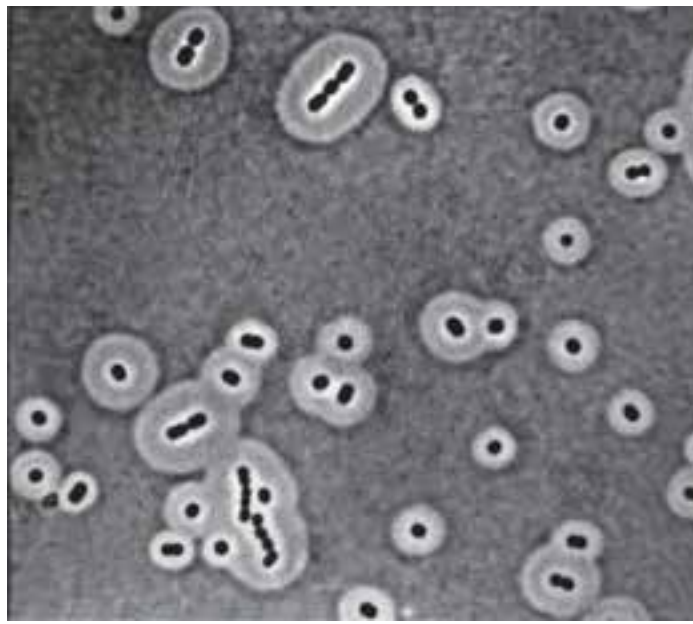
۲ــ محلول یک درصد کریستال ویوله

۳ــ محلول ۲۰٪ سولفات مس

روش کار:

۱ــ از پرگنه‌کلبسیلانمونیا روی یک لام تمیز گستره تهیه نموده، بگذارید در هوای آزمایشگاه خشک شود.

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



شکل ۸ــ۶ــ کپسولهای رنگ شده در زیر میکروسکوپ معمولی

۱ــ Klebsiela pneumonia

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

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

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

۴ــ۳ــ۶ ــ رنگ‌آمیزی مواد ذخیره‌ای سلول باکتری: سلول میکروب‌ها، در مراحل مختلف رشد خود دارای مواد ته‌نشین یا گرانول‌هایی[۱] 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 یُد به رنگ قرمز مایل به قهوه‌ای درمی‌آید. منابع لیپیدی هم که مهم‌ترین آن‌ها اسید پلی‌ــ بتا ــ هیدروکسی بوتیریک[۲] است، در خیلی از باکتری‌ها وجود دارد. اگرچه این مواد را نمی‌توان با رنگ‌های معمولی به سهولت رنگ‌آمیزی کرد، ولی می‌توان آن‌ها را با رنگ‌های محلول در چربی نشان داد، که احتمالاً بدین‌طریق یک لایه‌ی لیپیدی اطراف این منابع رنگ می‌شوند. یکی از بهترین انواع این رنگ‌ها سودان‌سیاه‌ب[۳] می‌باشد. بعضی از منابع ذخیره‌ای باکتری‌ها را اغلب به نام ولوتین[۴] می‌خوانند که با رنگ‌های قلیایی به‌شدت رنگ‌آمیزی می‌شود. این مواد گرانول‌های پلی‌متا ــ فسفاتی[۵] هستند. (تصویر گرانول‌های ذخیره‌ای که به کمک میکروسکوپ الکترونی تهیه شده در شکل ۹ــ۶ به نمایش گذاشته شده است.)

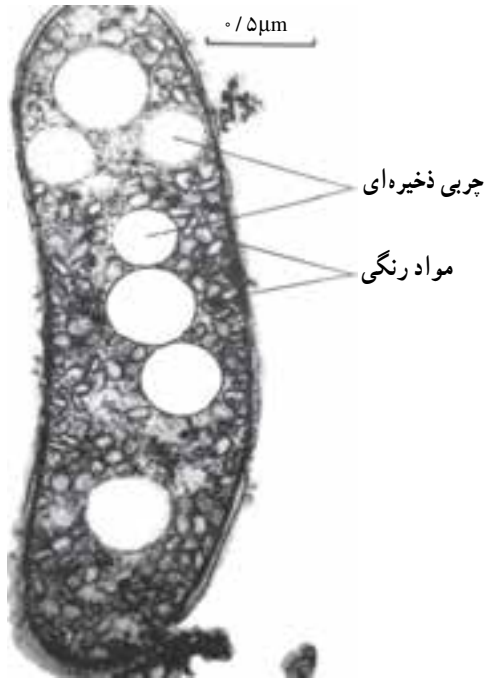
روش کار: (گلیکوژن)

۱ــ با به‌کار بردن سیم مخصوص تلقیح مقداری سلول مخمر ساکارومیسس سرویسیه[۶] 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.

۲ــ یک قطره یُد لوگل اضافه کرده، آن‌ها را به‌آرامی در روی لام مخلوط کنید.

۱ــ Granule ۲ــ poly Beta hydroxybutyric acid ۳ــ Sudan black - B

۴ــ Volutin ۵ــ Polymetapho sphate ۶ــ Saccharomyces cerevisiae



شکل ۹ــ۶ــ تصویر میکروسکوپ الکترونی اندوسپور

۳ــ 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 ید آن را اسیدی کنید، بعضی از باکتری‌ها، مخصوصاً گروهی از باکتری‌های بی‌هوازی اسپوردار، حاوی کربوهیدرات ذخیره‌ای دیگری به نام یوژن[۱] یا گرانولوز[۲] هستند که با یُد به رنگ آبی درمی‌آید. اسید پلی ــ بتا ــ هیدروکسی بوتیریک.

۱ــ تعدادی سلول باسیلوس مگاتریوم[۳] را به یک قطره‌ی آب که در روی یک لام تمیز قرار دارد انتقال داده، مخلوط کنید.

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

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

۱ــ Iogen ۲ــ Granulose ۳ــ Bucillus megaterium

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

ولوتین

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

۲ــ یک قطره محلول آبی اسیدی شده متیلن‌بلو اضافه کنید.

۳ــ 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[1] آن‌ها باشد. موادی که دارای نقطه‌ی ایزوالکتریک خیلی اسیدی هستند با یک رنگ قلیایی اسیدی شده (pH = ۲ – ۳) رنگ‌آمیزی می‌شوند. بنابراین، ولوتین که از مواد اسیدی تشکیل شده با یک رنگ قلیایی حتی در کمتر از pH ۴ هم‌رنگ می‌شود. ولوتین یک پلی‌فسفات است که ظاهراً در سنتز اسیدهای نوکلئیک و در تأمین انرژی سلول‌ها وارد عمل می‌شود.

۱ــ Isoelecterie Point

خودآزمایی

۱ــ اثر تغییردادن رنگ اول و دوم چیست؟ همین‌طور با حذف حرارت چه تغییری حاصل خواهد شد؟

۲ــ آیا میکروارگانیسم‌های اسید فست گرم مثبت و یا گرم منفی هستند؟

۳ــ مزایای رنگ‌آمیزی باکتری‌ها چیست؟

۴ــ انواع روش‌های رنگ‌آمیزی باکتری‌ها و رنگ‌های مورد استفاده در آن‌ها را بنویسید.

۵ــ منظور از تثبیت باکتری‌ها قبل از رنگ‌آمیزی چیست؟ از چه عواملی برای آن استفاده می‌شود؟

۶ــ روش تثبیت باکتری‌ها را بنویسید.

۷ــ رنگ‌های قلیایی و اسیدی هریک چگونه باعث رنگ‌آمیزی باکتری‌ها می‌شوند؟

۸ــ اساس رنگ‌آمیزی‌های تشخیصی چیست؟

۹ــ به‌طور خلاصه رنگ‌آمیزی گرم را شرح دهید.

۱۰ــ از رنگ‌آمیزی اسید فست به چه منظورهایی استفاده می‌شود؟

۱۱ــ برای رنگ‌آمیزی اندوسپور باکتری‌ها از چه روش‌ها و رنگ‌هایی می‌توان استفاده کرد؟