روش های رنگ آمیزی باکتری ها

تهیه کننده : سهیلا عباسی

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی،

آزمایشگاه میکروبیولوژی

مقدمه

- گستره های میکروبی در زیر میکروسکوپ به شکل عادی با وضوح مشاهده نمی شوند.
- شفافیت و وضوح شکل را می توان با رنگ آمیزی افزایش داد. بنابراین رنگ آمیزی برای تمایز نمونه از زمینه دید به کار می رود.

مقدمه

- یکی از روشهای مطالعه سلول باکتریایی بصورت دقیق، رنگ آمیزی است. به منظور مشاهده بهتر و آسانتر باکتریها که شفاف، بیرنگ و غالبا متحرک هستند، ابتدا آنها را کشته و سپس بوسیله یک یا چند رنگی که نسبت به یک یا چند بخش سلول تمایل دارند، رنگ آمیزی می نمایند.
- از آنجایی که عمل رنگ آمیزی خود می تواند باعث مرگ باکتری گردد. این عمل می تواند باعث تغییر شکل باکتری و ایجاد تغییرات ثانویه شود.

- رنگهای مورد استفاده در رنگ آمیزی باکتریها اکثراً از موادی که در قطران ذغال سنگ موجود است ساخته می شوند و چون در سابق رنگ های تولیدی از مشتقات آنیلین بودند به نام رنگهای آنیلینیک معروف شدند. اما امروزه از مشتقات آنیلین کمتر استفاده می شود و رنگ های ذغال سنگی جای آن را گرفته است.

- این رنگها به دو گروه اسیدی و قلیایی تقسیم می شوند. رنگها را در تجارت بصورت نمک می سازند که وقتی در آب قرار می گیرند یونیزه می شود .

- **رنگها**
- رنگهای مورد استفاده در میکروب شناسی نمکهای مواد شیمیایی و دارای بار مثبت و یا منفی هستند. برای نمونه:

- متیلن بلو+کلرور → کلرور متیلن بلو

- هنگام رنگ آمیزی، این رنگ ها با مواد شیمیایی موجود در ساختمان میکروب ها پیوند تشکیل داده و باعث رنگ آمیزی آنهامی شوند. رنگها را به دو گروه تقسیم می کنند:

رنگ های بازی : دارای بارالکتریکی مثبت (کاتیونی) هستند و می توانند به ترکیبات سلولی مانند اسیدنوکلئیک و پروتئین ها که دارای بار منفی هستند جذب شوند و آنها را رنگ کنند. مهم ترین رنگ های بازی متیلن بلو، کریستال ویوله، سافرانین و مالاشیت گرین می باشند.

رنگهای اسیدی : دارای بار منفی (آنیونی) هستند بنابراین جذب ترکیبات سلولی با بار منفی نمی شوند و تنها برای رنگ آمیزی زمینه دید به کار می روند مانند رنگ نیگروزین.

رنگ های خنثی: بدون بار الکتریکی هستند و برای رنگ کردن بخش های بدون بار سلول مانند چربی ها استفاده می شوند
مانند رنگ سودان سیاه که در رنگ آمیزی دانه های چربی کاربرد دارند.

- یونی که رنگی است کروموفور اگر یون مثبتی باشد رنگ قلیایی و اگر یون منفی باشد، رنگ اسیدی است. سلول باکتری بطور کلی دارای خاصیت اسیدی و دارای بار منفی است که علت آن وجود اسیدهای ریبونوکلئیک فراوان در سیتوپلاسم و با وجود گروههای هیدروکسیل اسیدی در سطح سلول باکتری است.
- لذا رنگهای قلیایی که دارای بار مثبت هستند تمایل بیشتری برای باکتریها دارند و بیشتر در تکنیکهای رنگ آمیزی باکتریها شرکت دارند.

- در مقابل رنگهای اسیدی که دارای بار منفی هستند نسبت به بعضی از بخشهای بازی باکتری (بعضی اجزای سیتوپلاسمی) میل ترکیبی داشته و بیشتر برای رنگ آمیزی زمینه بکار می روند تا خود باکتری.
- مکانیسم رنگ آمیزی به عوامل فیزیکی (از قبیل نفوذپذیری و جذب انتخابی) و عوامل شیمیایی (خاصیت اسیدی و بازی ترکیبات شیمیایی سلول) بستگی دارد.
- رنگ های اسیدی مورد استفاده در آزمایشگاه عبارتند از : ائوزین ، فوشین اسیدی و ... رنگهای قلیایی زیر تقریبا تمام رنگهایی است که در تکنیکهای رنگ آمیزی باکتریها بکار می رود.

- **رنگ آمیزی اختصاصی:** در این رنگ آمیزی نیز از دو یا چند رنگ استفاده می شود و برای تشخیص اجزای خاص سلول باکتری ها مانند اسپور، تاژک وکپسول به کار می رود.

- مهم ترین کار پیش از رنگ آمیزی نمونه ها تهیه گسترش میکروبی مناسب از نمونه مورد نظر است. بسته به نوع رنگ آمیزی دو نوع گستره میکروبی باید تهیه شود. برای رنگ آمیزی سلول باکتری ها از گستره خشک و برای رنگ آمیزی زمینه از گستره مرطوب استفاده می شود.

انواع رنگ آمیزی

- **رنگ آمیزی ساده:** در این نوع رنگ آمیزی تنها از یک نوع رنگ استفاده می شود. رنگ بازی برای رنگ آمیزی سلول باکتری و رنگ اسیدی برای رنگ آمیزی زمینه به کار می روند.

- این نوع رنگ آمیزی برای تشخیص شکل، اندازه و ترتیب قرار گرفتن باکتری ها کنار هم به کار می رود مانند رنگ آمیزی ساده با متیلن بلو.

- **رنگ آمیزی مرکب:** در این نوع رنگ آمیزی از دو یا چند رنگ و در طی چندین مرحله استفاده می شود. مانند:
- رنگ آمیزی گرم که جهت تمایز باکتر یهای گرم مثبت از گرم منفی به کار می رود.

- **رنگ آمیزی منفی** : که در آن زمینه با استفاده از رنگهایی مثل نگروزین و مرکب چین رنگ می شود ، در حالی که باکتری بدون رنگ می ماند (این رنگها نمی توانند به داخل باکتری نفوذ نمایند. مزیت این روش این است که شکل میکروبها تغییر نمی کند (در اثر افزودن رنگ) و میکروبهای مورد مطالعه به اندازه طبیعی خود دیده می شوند.
- **رنگ امیزی افتراقی (انتخابی):** که نوعی رنگ آمیزی است که باکتریهای مختلف در برابر آن واکنش متفاوتی نشان می دهند و از این جهت می توان آن را برای تشخیص باکتریها یا قسمتهای مختلف باکتری بکار برد.

آزمایش مستقیم نمونه ها

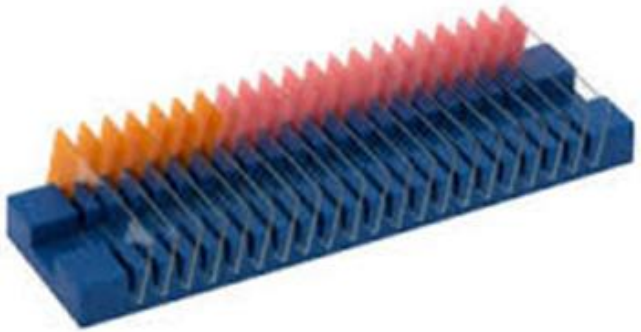
مشاهده مستقیم لام یکی از مهمترین و اصلی ترین مراحل تشخیص در آزمایشگاه باکتریولوژی است . در حالت کلی در آزمایشگاه در دو حالت لام تهیه میشود:

الف) تهیه لام از محیط کشت بعد از کشت باکتری و مشاهده کلنی ها: معمولا بعد از جداسازی باکتری ها در محیط کشت و رشد کلنی های خاص در محیط کشت، برای تشخیص نوع باکتری و تصمیم گیری برای ادامه مراحل ازمایش، باید لام تهیه شود و رنگ آمیزی گرم انجام گیرد.

ب) تهیه لام از نمونه بیماران فرستاده شده به آزمایشگاه قبل از کشت(نمونه مایع نخاع ، نمونه زخم و...): در برخی موارد خاص باید بعد از دریافت نمونه ها هر چه سریع تر از آنها لام مستقیم تهیه کرد

آزمایش مستقیم نمونه ها شامل تهیه لام و رنگ آمیزی می باشد .

- **مواد و وسایل مورد نیاز**
- لام میکروسکوپی
- لوپ یا فیلدوپلاتین
- چراغ گازی
- تشتک رنگ آمیزی
- رنگ متیلن بلو
- ظرف های دارای محیط های کشت میکروبی از سه گونه باکتری اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس ائورئوس و باسیلوس سرئوس
- میکروسکوپ نوری معمولی



تهیه گستره خشک از نمونه میکروبی

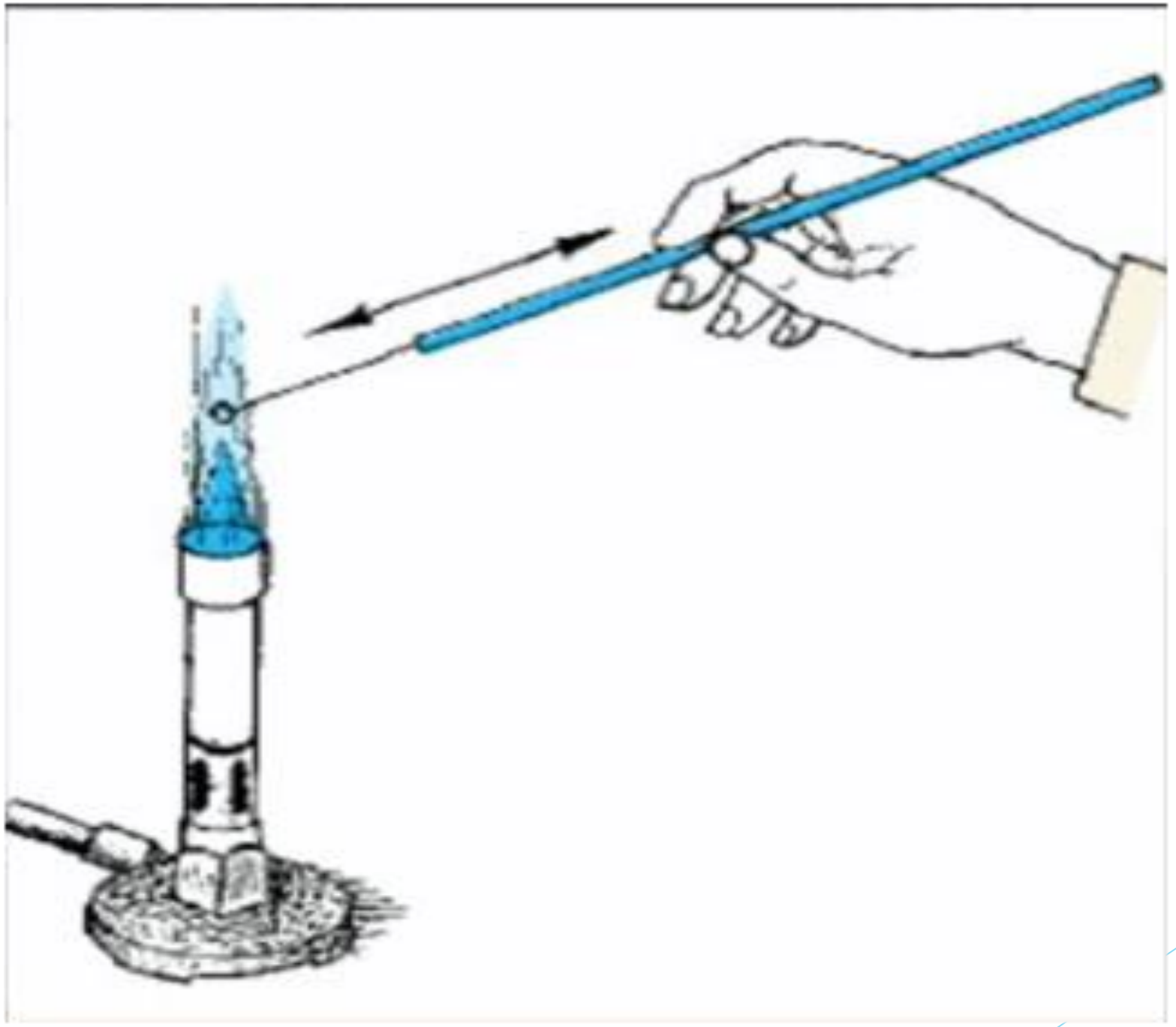
- یک قطره آب مقطر استریل در مرکز لام آزمایشگاهی قرار دهید.
- با استفاده از لوپ استریل از کلنی باکتری مورد نظر در محیط کشت میکروبی برداشت کرده و داخل آب مقطر به خوبی پخش کنید و به اندازه یک سکه گستره تهیه کنید.
- گستره تهیه شده را خشک کنید. برای خشک کردن گستره می توان آن را در دمای آزمایشگاه قرار داد و یا با استفاده از خشک کنها، خشک کرد.
- در مرحله آخر گستره خشک شده را ثابت کنید. برای این کار بهتر است لام را به پشت ۳ مرتبه به سرعت از روی شعله عبور داد.

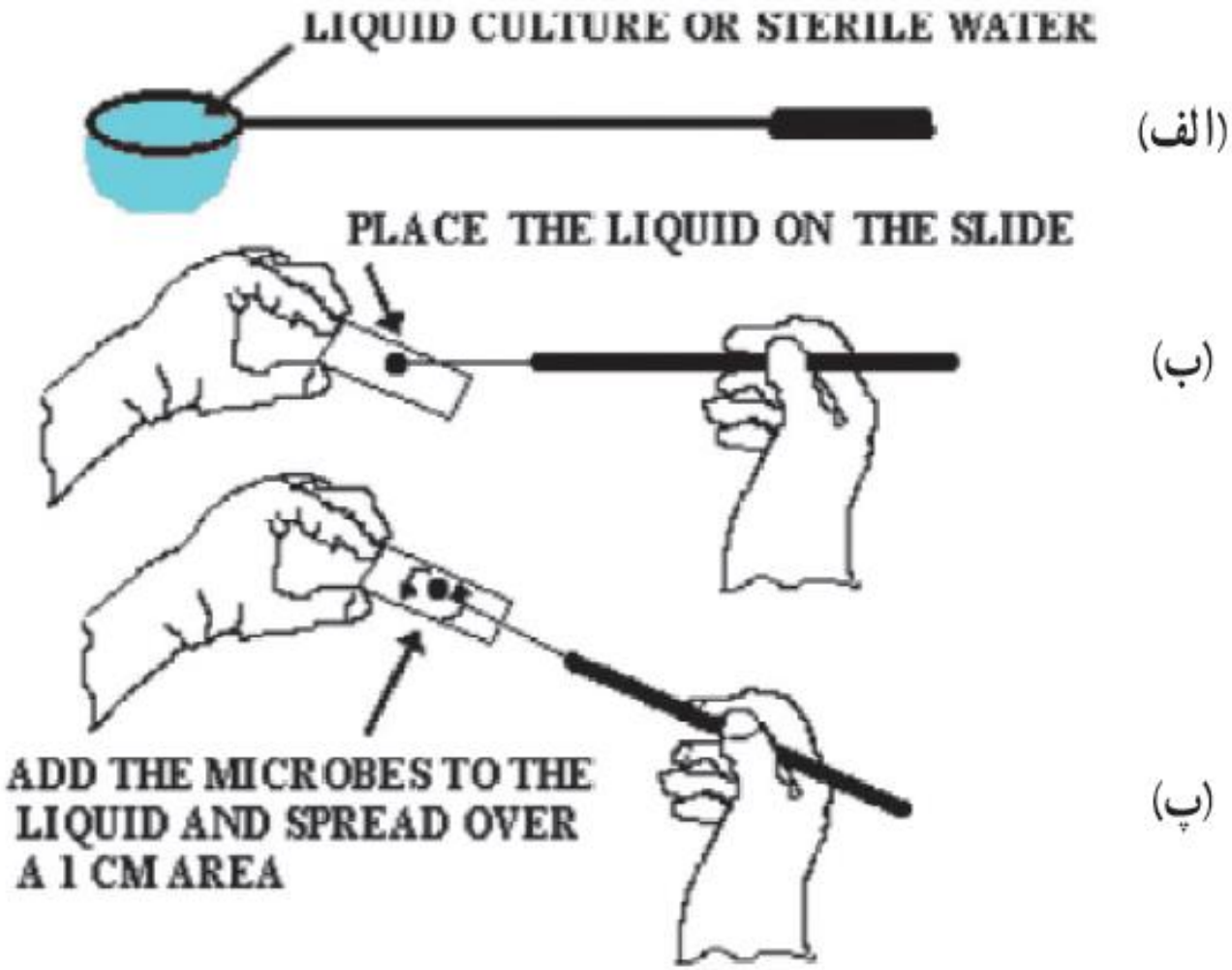
تهیه اسمیر یا گسترش

برای استفاده از روش های رنگ آمیزی برای دیدن باکتریها، اولین مرحله تهیه اسمیر(smear) یا فروتی یا گسترش است.هنگام تهیه لام باید قبل از هر کاری شماره نمونه را بر روی لام درج کنیم. قبل از رنگ آمیزی باید باکتریها به صورت یک لایه نازک بر روی لام قرار گیرند .برای تهیه لام از سرم فیزیولوژی استفاده می شود. از آب مقطر برای تهیه لام استفاده نمی شود زیرا آب مقطر فشار اسمزی را تغییر داده و باعث لیز شدن (شکستن و ترکیدن) باکتری ها می شود. ابتدا یک قطره سرم فیزیولوژی روی لام قرار داده و سپس با فیلدوپلاتین کمی از کلنی را برداشته و در سرم فیزیولوژی روی لام حل میکنند. سپس لام را در هوای آزمایشگاه خشک کنید. لازم است که تناسب بین مقدار نمونه ای که از کلنی برداشته میشود و مقدار سرم فیزیولوژی حفظ شود.

اگر تعداد باکتریها نباید خیلی زیاد باشد به دلیل جمعیت زیاد باکتریها ،نور به خوبی از آنها عبور نمیکند و مطالعه آنها مشکل خواهد بود. در این حالت ، لام پس از رنگ آمیزی گرم بسیار تیره و کدر بوده و بررسی عوامل باکتریایی را با مشکل روبه رو می سازد. اما اگر میزان کلنی کم باشد لام تهیه شده رقیق خواهد بود و در پیدا کردن عوامل باکتریایی در زیر میکروسکوپ دچار مشکل خواهیم شد .لام تهیه شده نباید وسیع باشد به عبارت دیگر اسمیر تهیه شده بهتر است در وسط لام و به میزان مناسب تهیه شود.

قبل از تهیه لام باید به نوع محیط کشت توجه کرد. برای نمونه؛ در محیط کشت بلاد اگار هیچ وقت باکتری گرم مثبت و گرم منفی قابل تشخیص از یکدیگر نبوده و هر دو در این محیط رشد می کنند. اما در محیط SS همیشه کلنی های گرم منفی رشد می کنند .





AIR DRY OR HEAT GENTLY. WHEN DRY BRIEFLY HEAT FIX THE CELLS TO THE SLIDE

فیکس کردن لام

پس از مخلوط کردن کلنی و سرم فیزیولوژی بر روی سطح لام و ایجاد یک اسمیر هموژن، باید اسمیر تهیه شده کاملا خشک شود وپس از آن ، نمونه لام تهیه شده را به دلایل زیر فیکس یا ثابت کنیم :

۱ - باکتری ها کشته می شوند و در این صورت احتمال آلودگی تکنسین از بین می رود.

۲ - باکتری ها بر روی سطح لام تثبیت شده و به سطح لام می چسبند.

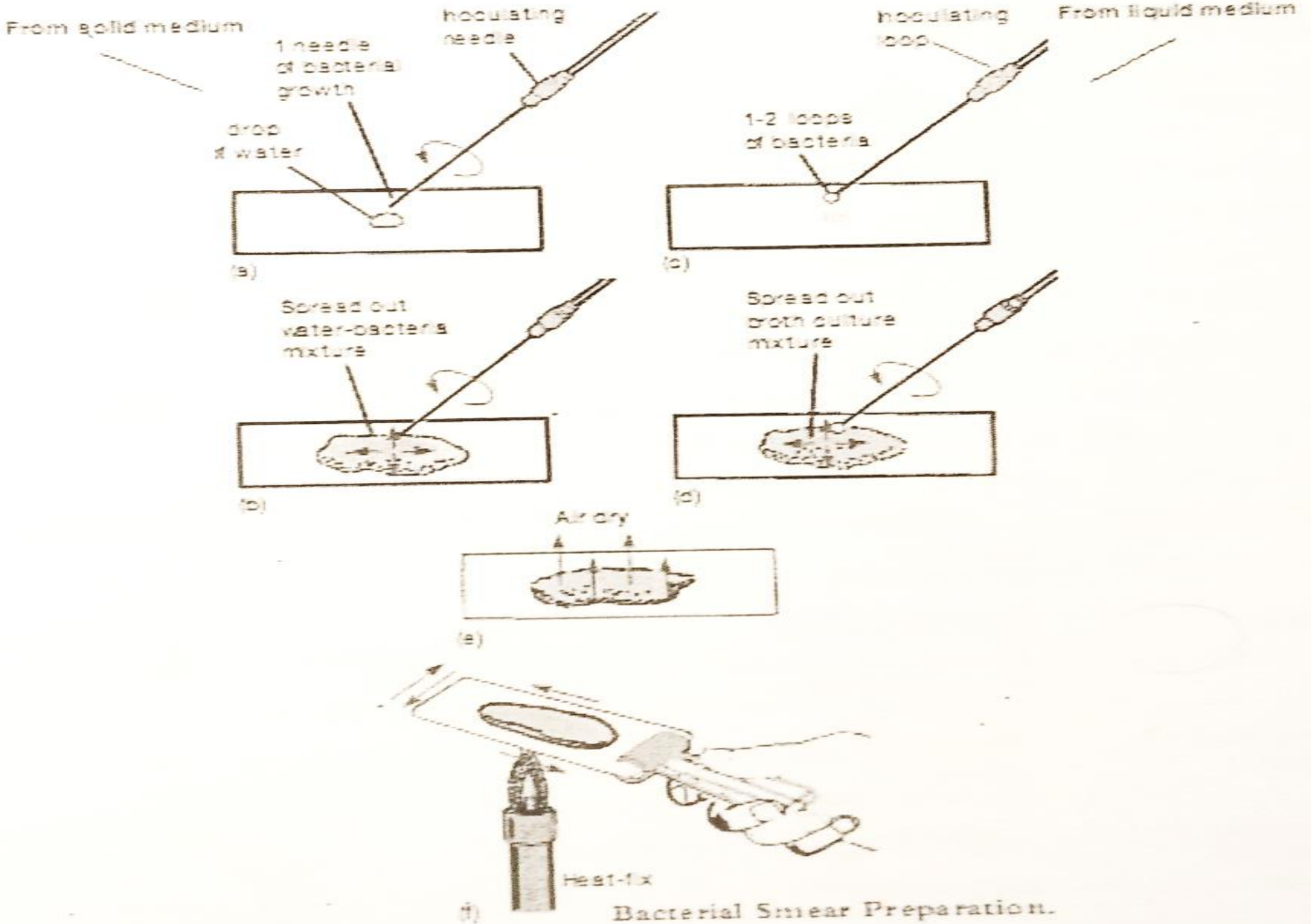
۳ - طی عمل فیکساسیون باکتری ها کشته شده و رنگ پذیر می شوند.

برای فیکس کردن لام ها در آزمایشگاه می توان از حرارت (دمای 60- 45 درجه سانتیگراد) و یا الکل (متانول) استفاده کرد. معمولا در ازمایشگاه لام را با پنس گرفته و یک تا دوبار سریع از روی شعله عبور میدهند بطوریکه سطح لام کمی گرم شود ولی نه در حدی که دست را بسوزاند.

ثابت کردن نمونه یا تثبیت (fixation)

- این عمل به این دلیل انجام میشود که سلولهای میکروبی کشته شده ، به سطح لام بچسبند و با شستشوی بعدی پاک نشده و تغییر شکل ندهند. برای این منظور، روشهای مختلفی به کار می رود :

- ثابت کردن با حرارت : لام را چند بار از حرارت شعله عبور می دهند. به حدی که لام دست را نسوزاند. باید دقت کرد که لام زیاد حرارت نبیند در غیر اینصورت شکل باکتری ها تغییر می کند (حرارت باعث تقلیل پروتئینها و آنزیمها شده و بدین ترتیب از تخریب سلول باکتری و اتولیز آن جلوگیری می شود.) عمل ثابت کردن همچنین باعث تشدید چیدن باکتریها به سطح می شود
- ثابت کردن با الکل و حرارت: روی لام چند قطره الکل ریخته و آن را مشتعل کرده، به سرعت خاموش می کند.
- ثابت کردن با الکل متبلیک (متانول ٪۹۵): روی لام خشک شده چند قطره الکل ریخته و حداقل ۱ دقیقه صبر می کنند تا لام خشک شود این عمل در مورد رنگ آمیزی گیمسا انجام می شود.
- حال فروتی ما آماده است و قبل از رنگ آمیزی باید کاملا خنک شود. افزودن رنگ روی لام داغ باعث رسوب رنگ وی لام شده و ایجاد اشتباه در نتایج می شود.

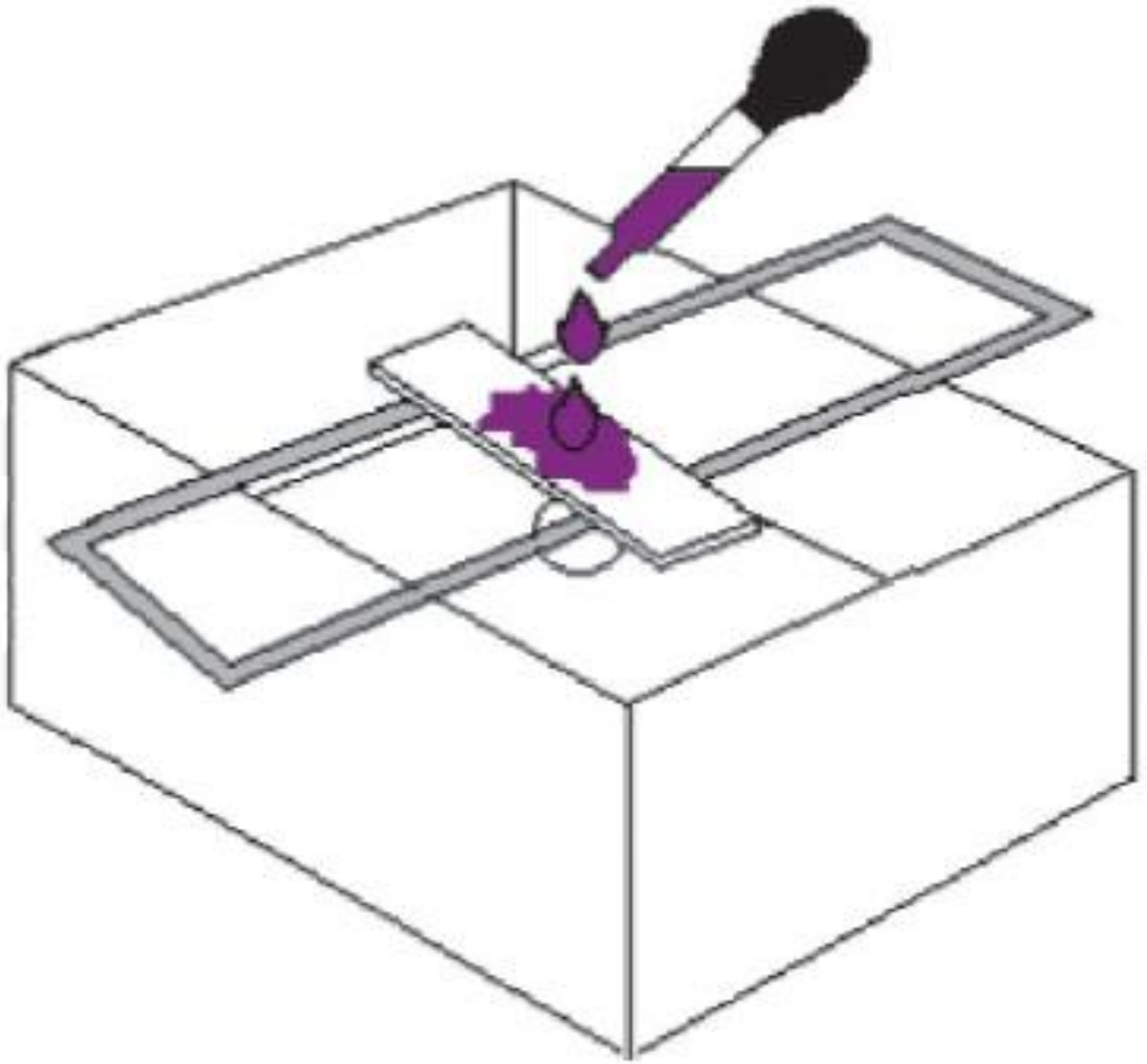


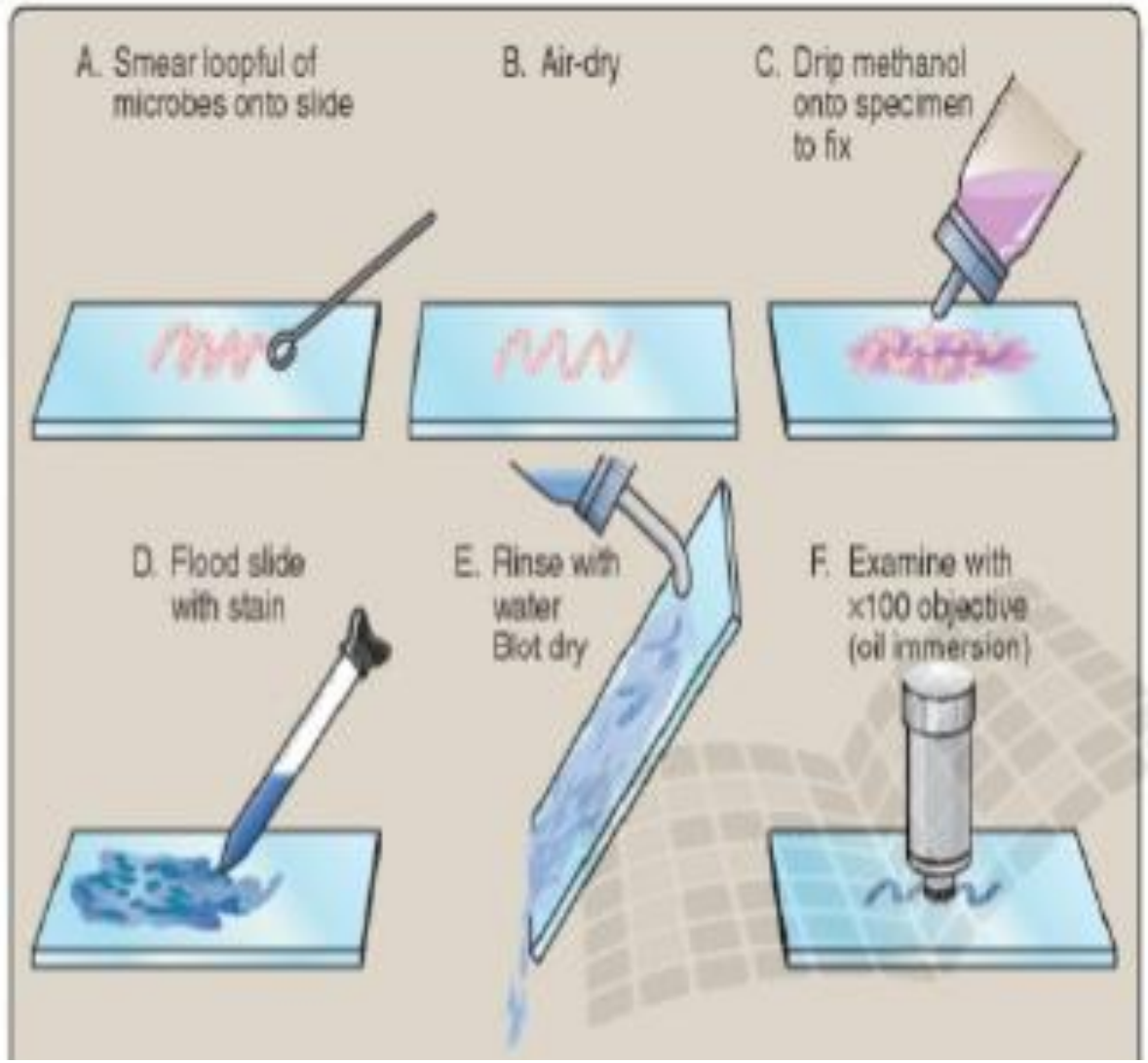
Bacterial Smear Preparation.

Methylene
Blue

- رنگهای آبی: بلو دو متیلن، بلو دو تولوئیدن.
- رنگهای قرمز: فوشین، سافرانین، قرمز خنثی.
- رنگهای بنفش: کریستال ویوله ، تیونین ویوله.
- رنگهای سبز: سبز درخشان ، سبز متیل ، مالاشبت سبز.

- رنگهای قهوه ای : قهوه ای بیسمارک

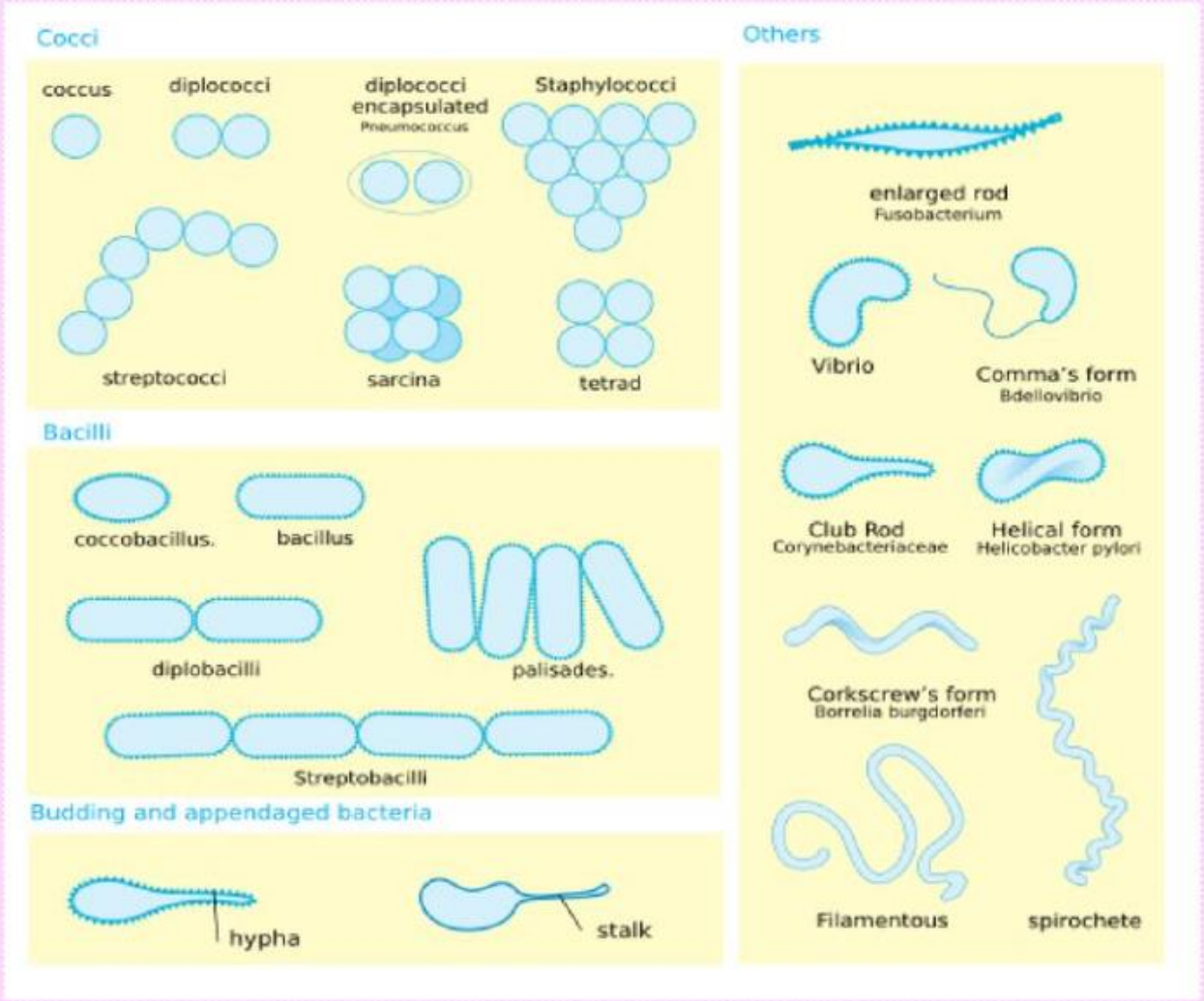



A. Smear loopful of microbes onto slide
B. Air-dry
C. Drip methanol onto specimen to fix
D. Flood slide with stain
E. Rinse with water Blot dry
F. Examine with ×100 objective (oil immersion)

- در رنگ آمیزی ساده دیواره باکتری ها رنگ می گیرد و می توان از این رو به اشکال مختلف طبقه بندی کرد. باکتری ها از نظر شکل ظاهری به سه گروه تقسیم میشوند :
- **باسیلی یا استوانه ای شکل**؛ این باکتری ها میله ای شکل بوده و بسته به نوع آن ها بسیار مختلف و در اندازه های گوناگون می باشند. مارپیچی؛ این باکتری ها مارپیچی شکل می باشند و اندازه آن ها متفاوت است.
- **کوکسی یا کروی شکل**؛ این باکتری ها کاملا گرد یا بیضی شکل هستند و به طور متوسط اندازه آن ها ۰/۵تا ۱ میکرون است.
- اکثر باکتری ها با تقسیم دو تایی و تشکیل دو سلول جدا از هم که فیزیولوژی مستقل دارند، تولید مثل می کنند ، ولی گاهی این سلول ها پس از تقسیم از هم جدا نمی شوند و بدین نحو با مجتمع شدن، آرایش ویژه ای می یابند .

- باکتری هایی که در یک سطح تقسیم می شوند تشکیل زنجیره های کوتاه یا بلند می دهند چنانچه تقسیم سلولی در جهات مختلف انجام شود اشکال خوشه ای شکل ، مکعبی شکل و... بدست می آید به عنوان مثال می توان به موارد زیر اشاره کرد :
- **استافیلوکوک؛** این باکتری ها به صورت خوشه ای (تجمعی) در کنار یکدیگر قرار می گیرند.
- **استرپتوکوک؛** این باکتری ها به صورت زنجیرهای شکل در کنار یکدیگر قرار می گیرند.
- **دیپلوکوک؛** این باکتری ها به طور عمده به شکل دوتایی در کنار یکدیگر قرار می گیرند.
- **سارسینا؛** این باکتریها به صورت ۸ تایی و حتی بیشتر از این تعداد به صورت مکعبی مشاهده می شوند.
- البته بعضی از باکتری ها حالت بین گرد و میله ای را دارند که به این باکتری ها کوکوباسیل می گویند.

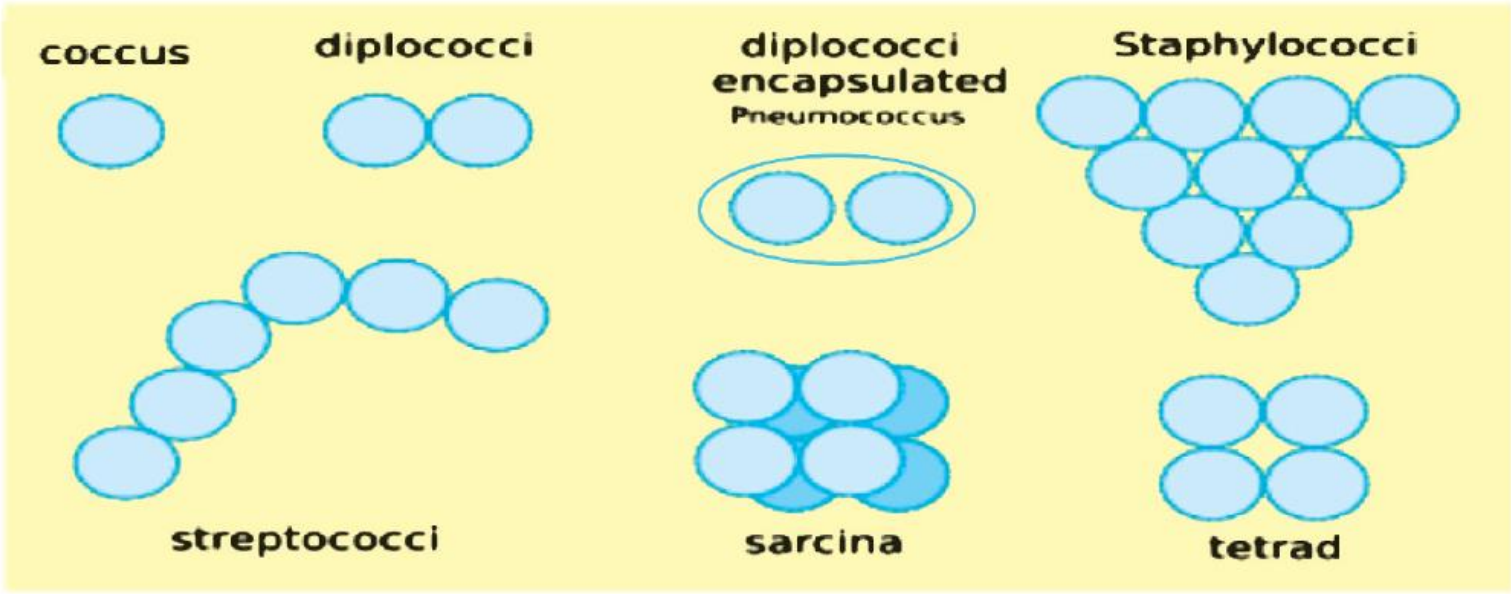
- اشکال مختلف باکتریها

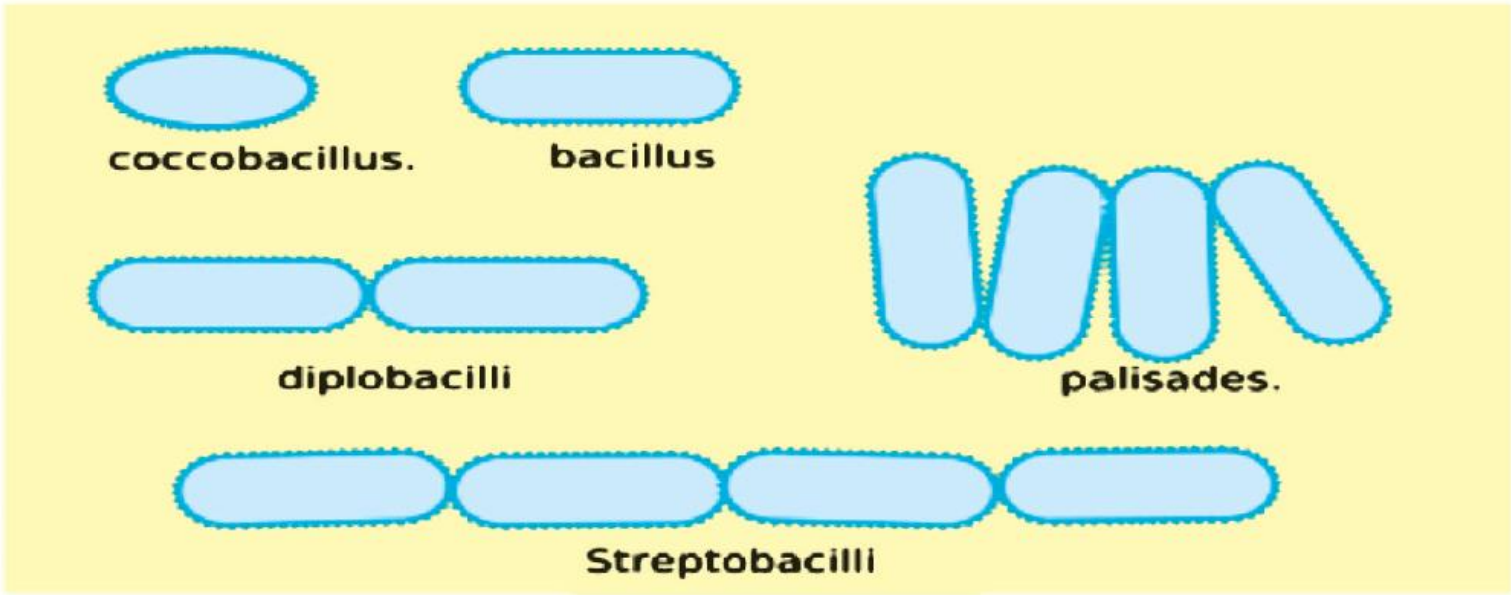


کوکسي

باسيل

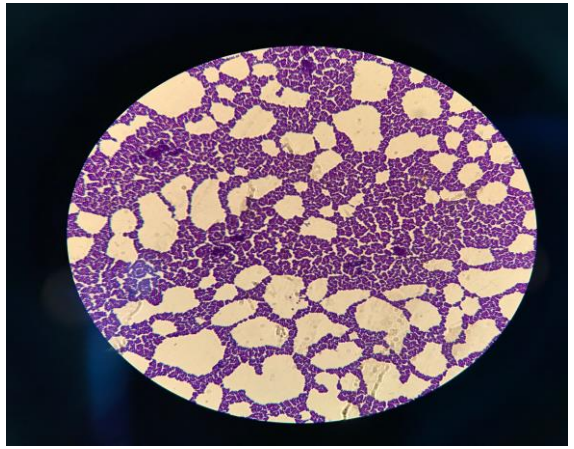
اسپريل

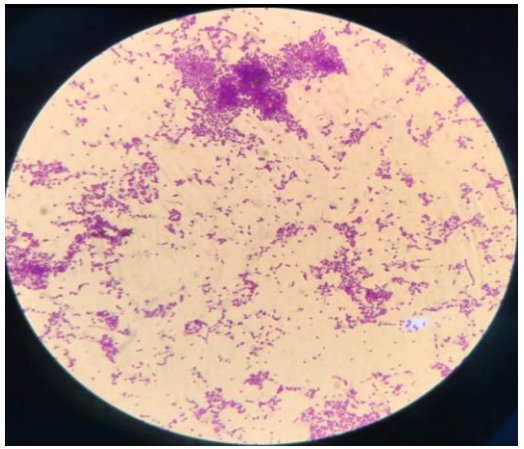

coccus
diplococci
diplococci
encapsulated
Pneumococcus
Staphylococci
streptococci
sarcina
tetrad


coccobacillus.
bacillus
diplobacilli
palisades.
Streptobacilli

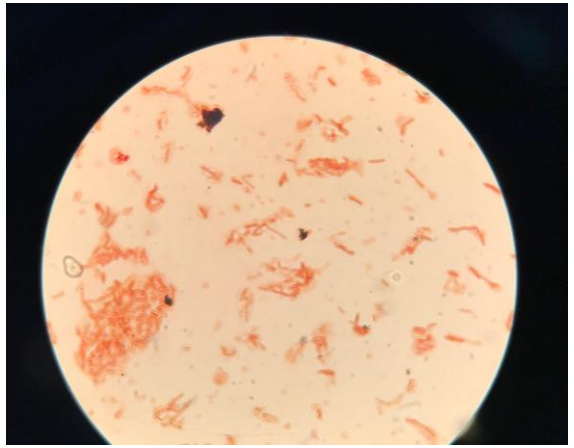
نتیجه

استافیلوکوکوس

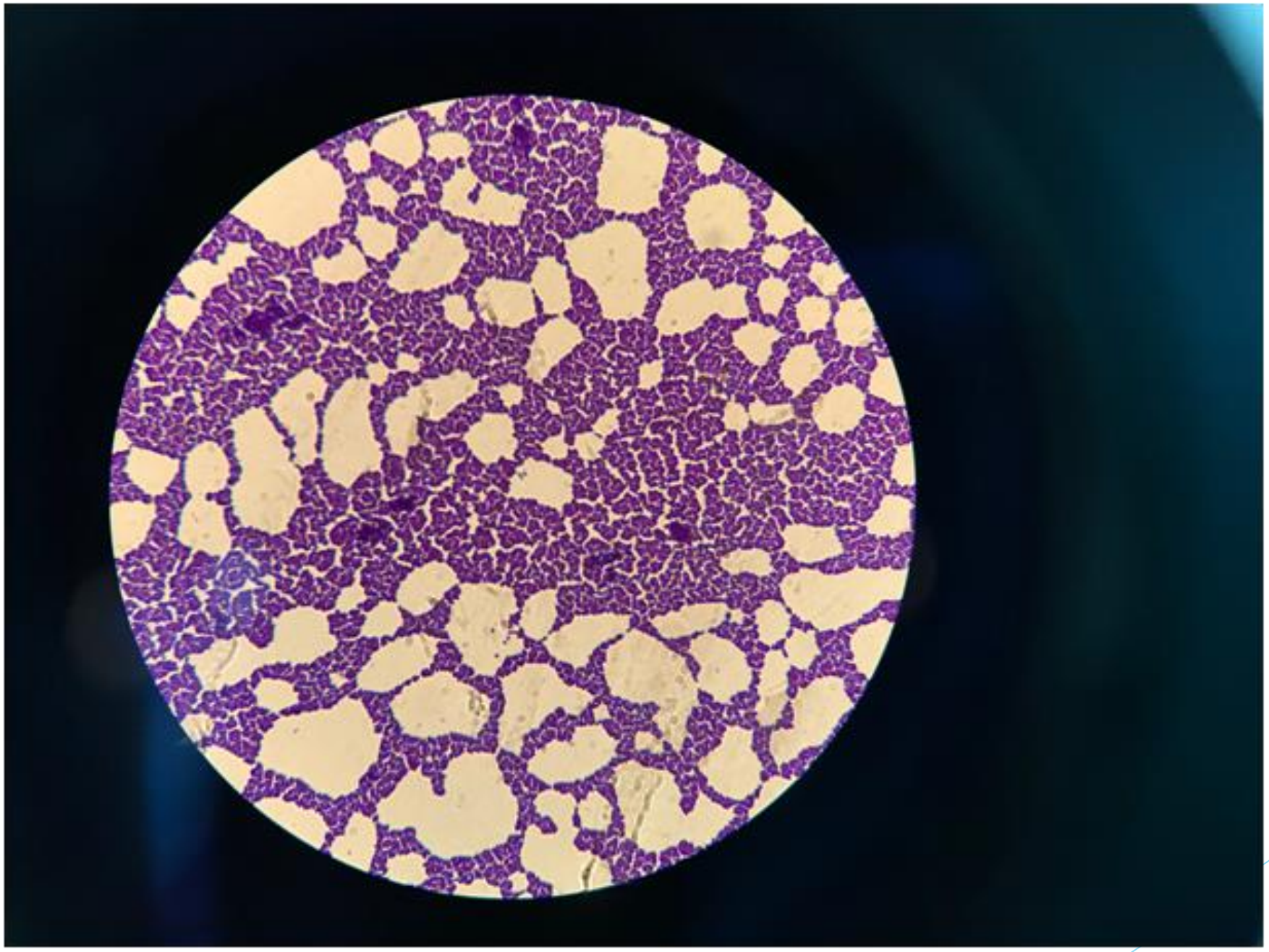


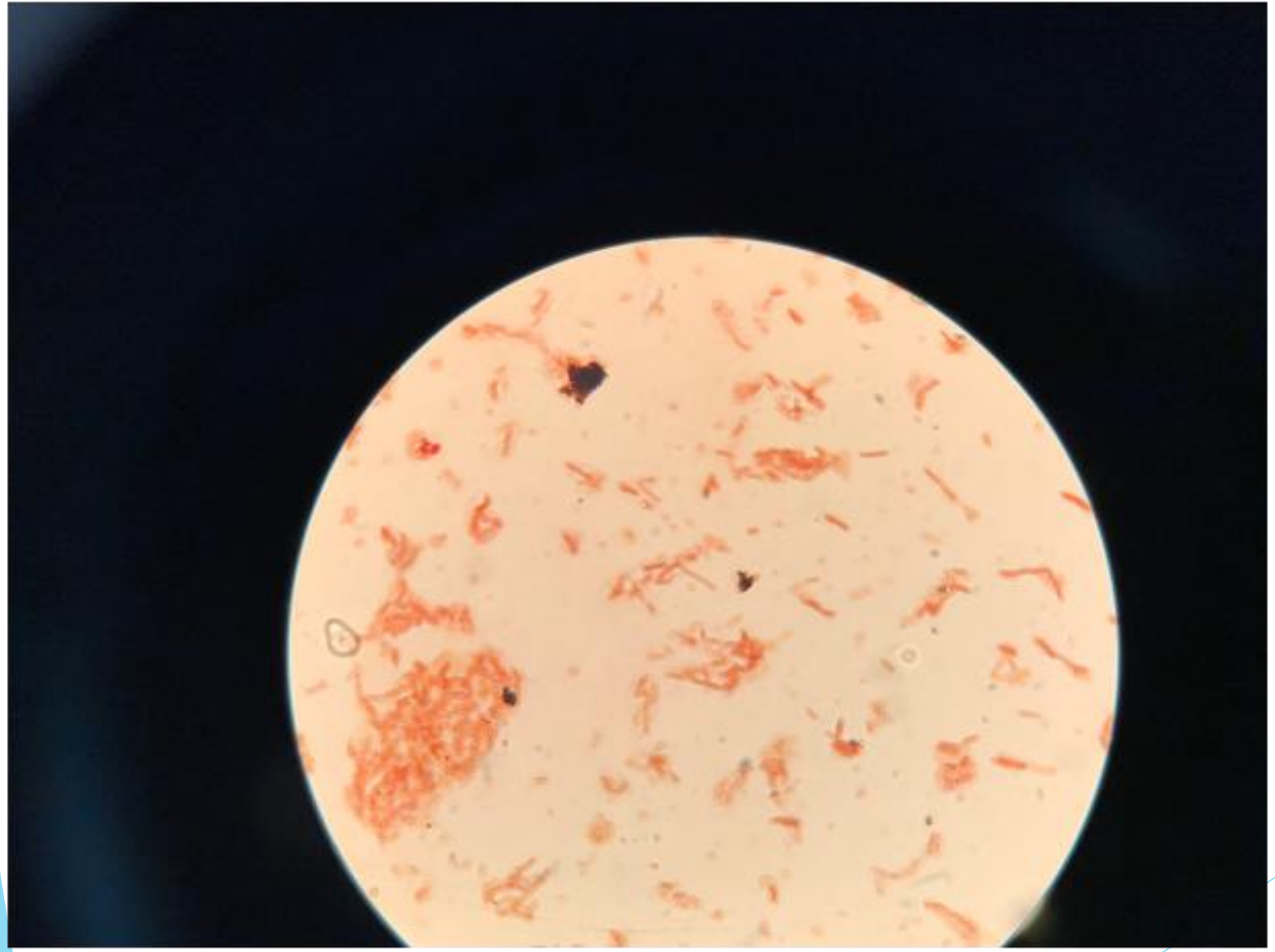


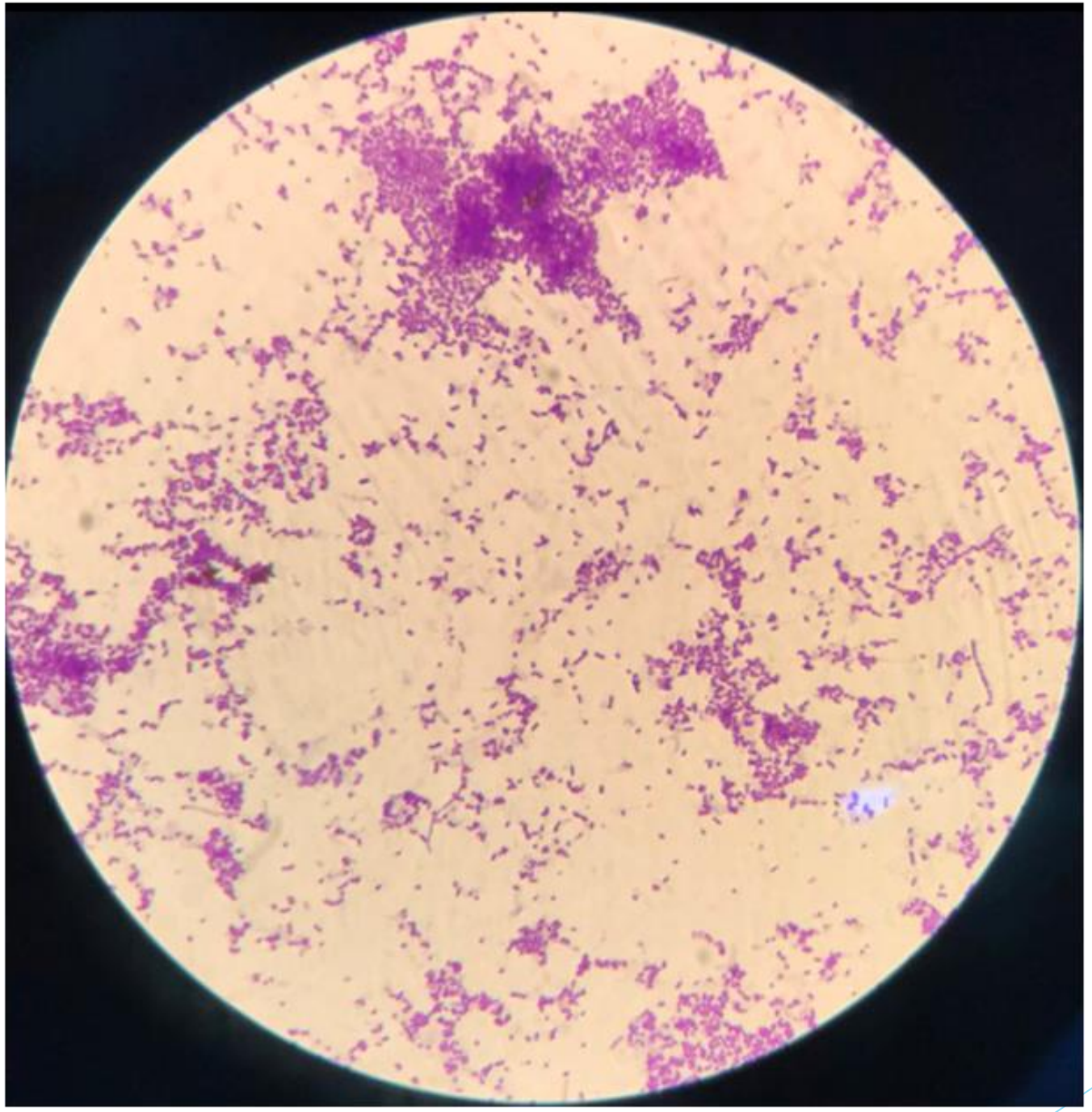
کوکوباسیل

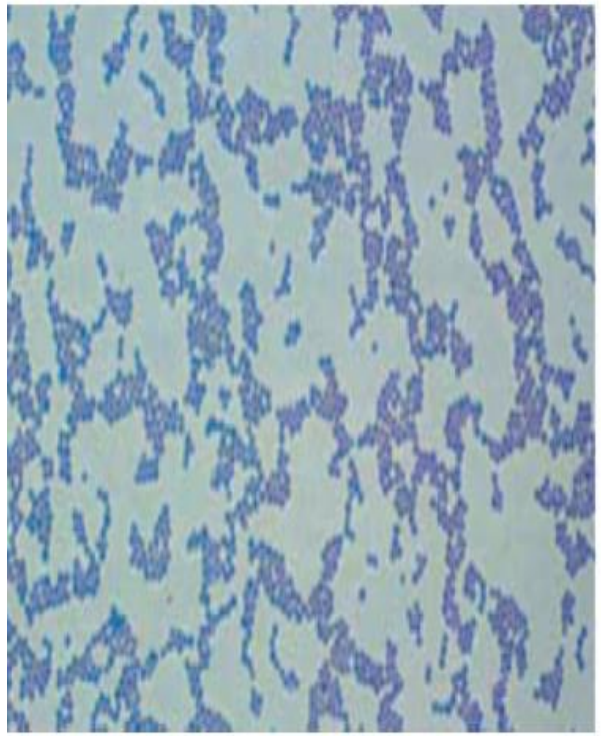


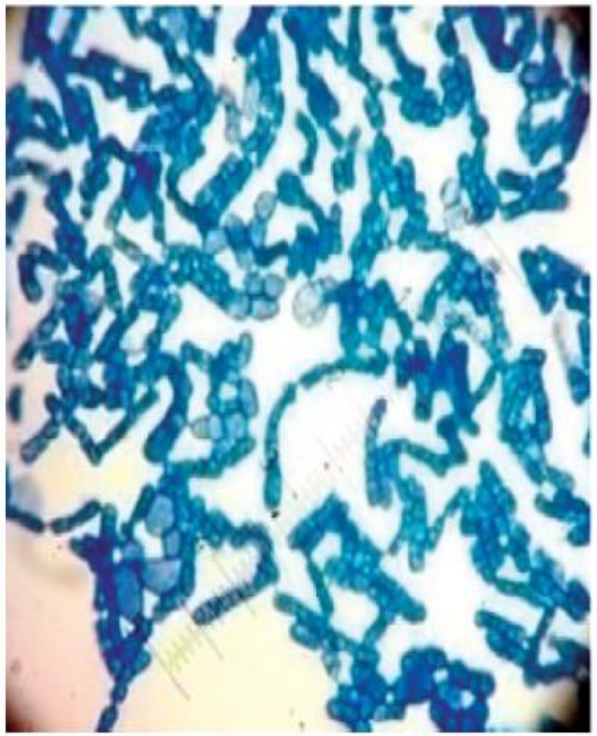
باسیل











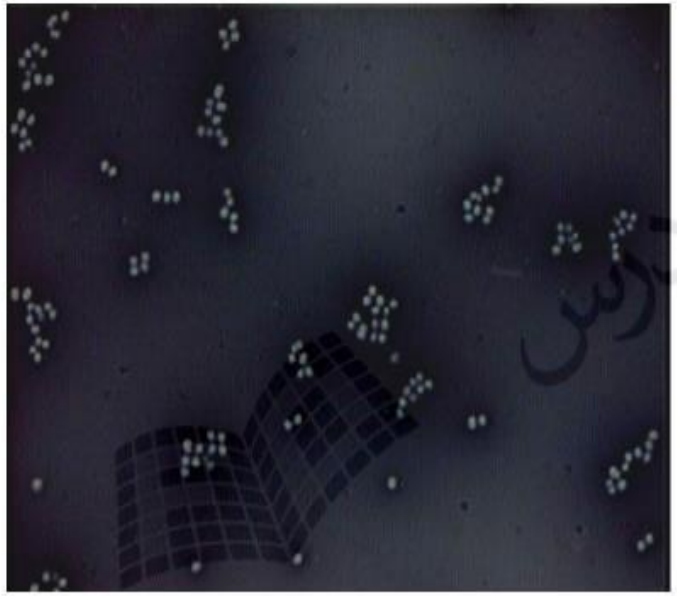
E Coli

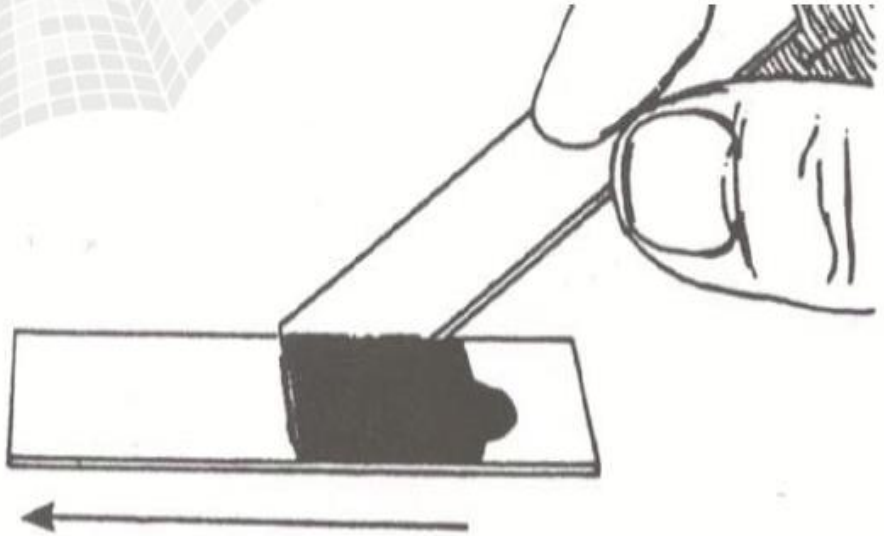
رنگ‌آمیزی منفی

- یک روش ساده برای شناسایی میکروارگانیسم‌ها می‌باشد، در این روش رنگ قادر به نفوذ در سلول نمی‌باشد در نتیجه محیط رنگی و سلول به رنگ شفاف دیده می‌شود. توسط نیگروزین رنگ‌آمیزی انجام می‌شود.
- رنگی که قادر به نفوذ به درون سلول نباشد را رنگ منفی می‌گویند.
- روش انجام آزمایش: یک قطره کوچک نگروزین را در لبه نزدیک یک لام تمیز ریخته، یک لوپ از باکتری را به آن اضافه اما پخش نمی‌کنیم، یک لام تمیز دیگر بداشته و با کمک آن رنگ را به سمت لبه دیگر لام پخش می‌کنیم، بدین ترتیب یه گسترش نازک تهیه کرده، بعد از خشک شدن با عدسی ۱۰۰ (روغن ایمرسیون) مشاهده می‌کنیم.

رنگ‌آمیزی منفی

Negative Stain





- پرسشها :

۱-چگونه pH در رنگ آمیزی باکتری ها اثر می گذارد؟

۲- رنگ آمیزی ساده چه چیزهایی قابل بررسی است ؟

۳- اساس مکانیسم رنگ آمیزی چیست؟

- نکته ایمنی : از تماس رنگها با پوست جلوگیری نمایید . بهتر است از دستکش با گیره استفاده شود. زیرا رنگها می توانند برای ما آسیب زننده باشند.

با سپاس فراوان از توجه شما