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

آزمایشگاه میکروب پایه

رنگ آمیزی کپسول

تهیه کننده : سهیلا عباسی

مقدمه

- بسیاری از باکتریها ، چه گرم مثبت و چه گرم منفی، با لایه لزج خارجی حاوی پلی ساکارید احاطه می شوند که به آن مواد پلیمریک خارج سلولی (EPS) گویند.
- اگر ترکیب این لایه بصورت متراکم و دارای حدود مشخص و واضح باشیم و به سلول بطور محکمی متصل بوده و در اثر سوسپانسیون شدن در آب از سلول جدا نشود، همینطور ذرات مرکب چین را بخود راه ندهد، به آن کپسول گفته و اگر ماده مذکور متراکم نبوده ، بصورت سست متصل باشد و به راحتی دفرمه شده و مرکب چین را به خود راه دهند و بسیار سخت دیده شوند، لایه مخاطی یا slime layers نامیده می شوند.

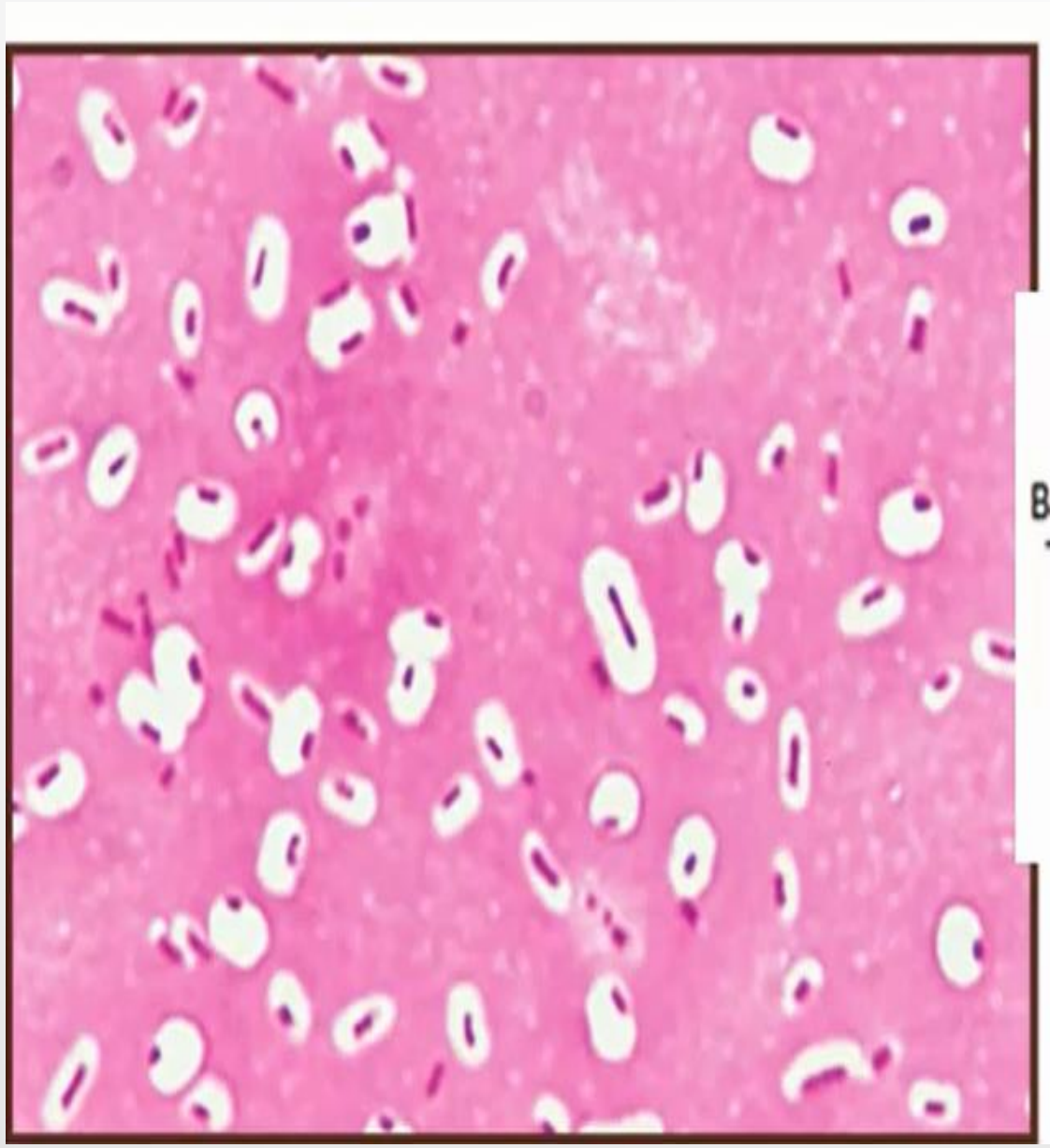
- ضخامت و چسبندگی کپسول در گونه ها یکسان نیست. اندازه کپسول به محیط کشت میکروبی بستگی دارد و همچنین باکتری های بیماری زا، در بین باکتری های تولید کننده کپسول، کپسول های بزرگتری دارند. جنس این کپسول از پلی ساکارید است که در آب محلول و غیر یونی است.
- **کاربرد کپسول در باکتری ها:** کپسول به عنوان یک سد اسمزی بین باکتری و محیط اطراف آن عمل می کند و در واقع نقش حفاظتی دارد. کپسول مانع از عمل بیگانه خواری گلبول های سفید می شود همچنین بعنوان مخزن ذخیره مواد غذایی یا دفع مواد زائد هم می تواند عمل کند.
- در تعدادی از باکتری های بیماری زا، وجود کپسول شدت بیماری زایی و عفونت زایی را افزایش می دهد وممکن است حتی این بیماری زایی به وجود کپسول بستگی داشته باشد. برای نمونه در استرپتوکوکوس پنومونیا اگر توانایی تولید کپسول در باکتری از بین برود این باکتری غیر بیماری زا می شود.

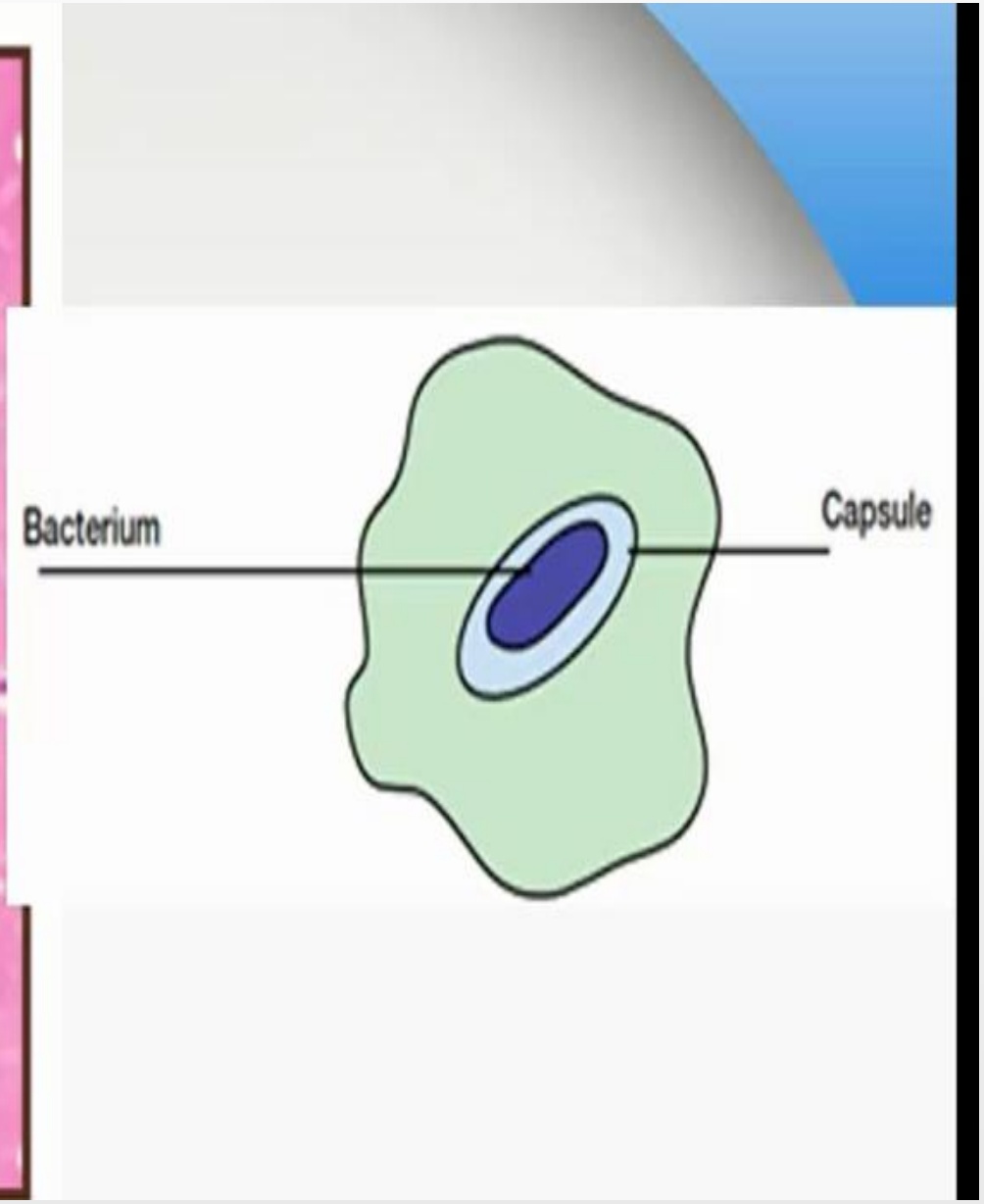
- جنس کپسول در اکثر موارد پلی ساکاریدی است اما می تواند حاوی پلی الکلهایا پلی آمینها هم باشد.
- مثلا کپسول در باکتریهایی مثل باسیلوس آنتراسیس ، باسیلوس مگاتریوم و باسیلوس سوبتیلیس پلی پپتیدی بوده و پلیمری از د-گلوتامیک اسید می باشد.
- از کپسول به عنوان عاملی برای تشخیص و طبقه بندی میکروبها استفاده می شود و مسئول ویژگیهای سرولوژی است.

- کلنی باکتریهای مولد کپسول بر روی محیطهای جامد حاوی قند، غالبا مرطوب، درخشان و لزج دیده می شود.
- ایجاد کپسول یک صفت ژنتیکی است ولی عوامل مختلفی نظیر ترکیب محیط کشت ، شرایط کشت و مرحله رشد باکتری، تشکیل و اندازه کپسول را تحت تاثیر قرار می دهند. سنتز مواد کپسولی بستگی به محیط دارد و برای یک سویه خاص از باکتری کپسول در همه زمانها لازم نمی باشد. وجود آن در محیط آزمایشگاهی ضروری نیست ولی برای زنده ماندن در محیط یا بیماریزایی در میزبان ، وجود آن حیاتی می باشد.
- در مورد باکتریهای بیماریزا، اگر میکروب را در نمونه های پاتولوژیک و هنگام خروج از بدن حیوان مورد آزمایش قرار دهیم کپسول بسیار مشخص تر است، ولی در اثر کشت های متوالی بر روی محیطهای مصنوعی، کم کم ناپدید میشود.
- در آزمایشگاه، محیطهای مخصوصی مثل لیتموس میلک و تریپتوز فسفات آگار برای حمایت از رشد باکتریهای کپسولدار استفاده می شود.

- این لایه های پلیمری خارج سلولی در چسبیدن میکرو ارگانیسمها به سطوح، در جلو گیری از شناسایی توسط سیستم ایمنی میزبان و فرار از آن، در نتیجه در بیماریزایی (بعنوان عامل ویرولانس، سلولها را از فاگوسیتوز و یا کشته شدن بواسطه کمپلمان محافظت می کنند) نقش دارند. بعلاوه بعلت جذب مقدار زیاد آب ، می توانند از باکتری در شرایط سخت محیطی محافظت کرده و نقشی در مقاومت در برابر تشنگی دارند.
- از آنجاییکه پلی ساکاریدهای کپسولی به شدت هیدراته هستند (حاوی بیش از ۹۵٪ آب). فیکس کردن با حرارت در رنگ آمیزی می تواند موجب به هم ریختن شکل و کوچک شدن آن شود.

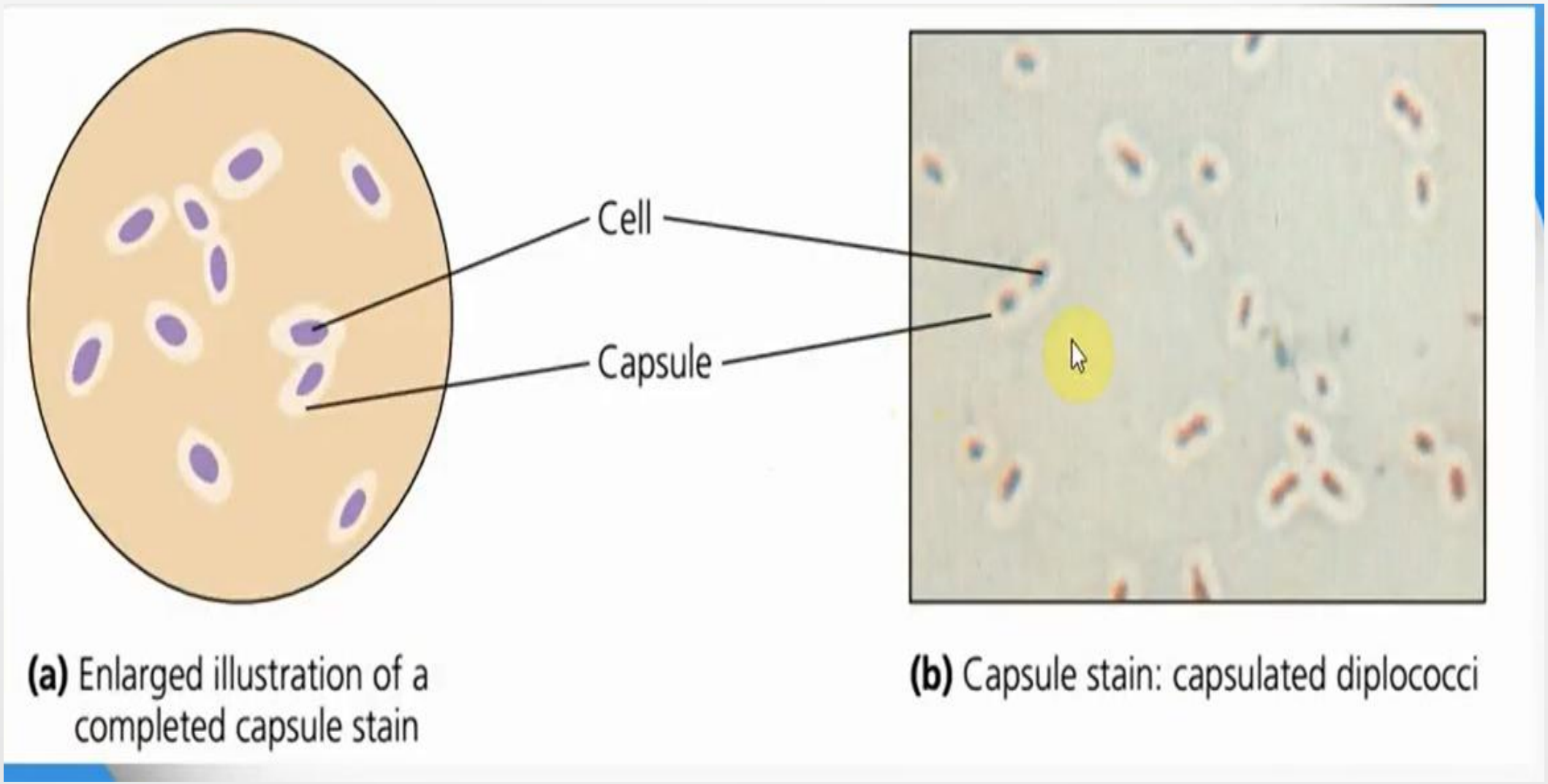
- در بعضی از روشها ، باکتریها در مجاورت آنتی بادیهایی بر ضد آنتی ژنهای کپسولی قرار می گیرند تا کپسول بزرگتر شده و راحت تر دیده شود.
- از آنجاییکه کپسولها فاقد بار هستند، بدلیل این طبیعت غیر یونی ، رنگهای ساده به آنها نمی چسبند و اکثر روشهای رنگ آمیزی کپسول ، باکتری و زمینه را رنگ می کند و کپسول بصورت هاله شفافی که باکتری را در بر گرفته است مشاهده می شود. یک روش خیلی ساده استفاده از مرکب چین یا نیگروزین است.
- این رنگها نمی توانند به لایه های کپسول نفوذ کند و بنابراین زمینه را رنگ کرده و اجازه قابل مشاهده شدن کپسول را می دهد (رنگ آمیزی منفی). کپسولها می توانند با روشهایی مثل میکروسکوپ الکترونی، میکروسکوپ فاز کنتراست و انواع مختلف تکنیکهای رنگ آمیزی که وجود دارند، مشاهده شوند.




Bacterium
Capsule

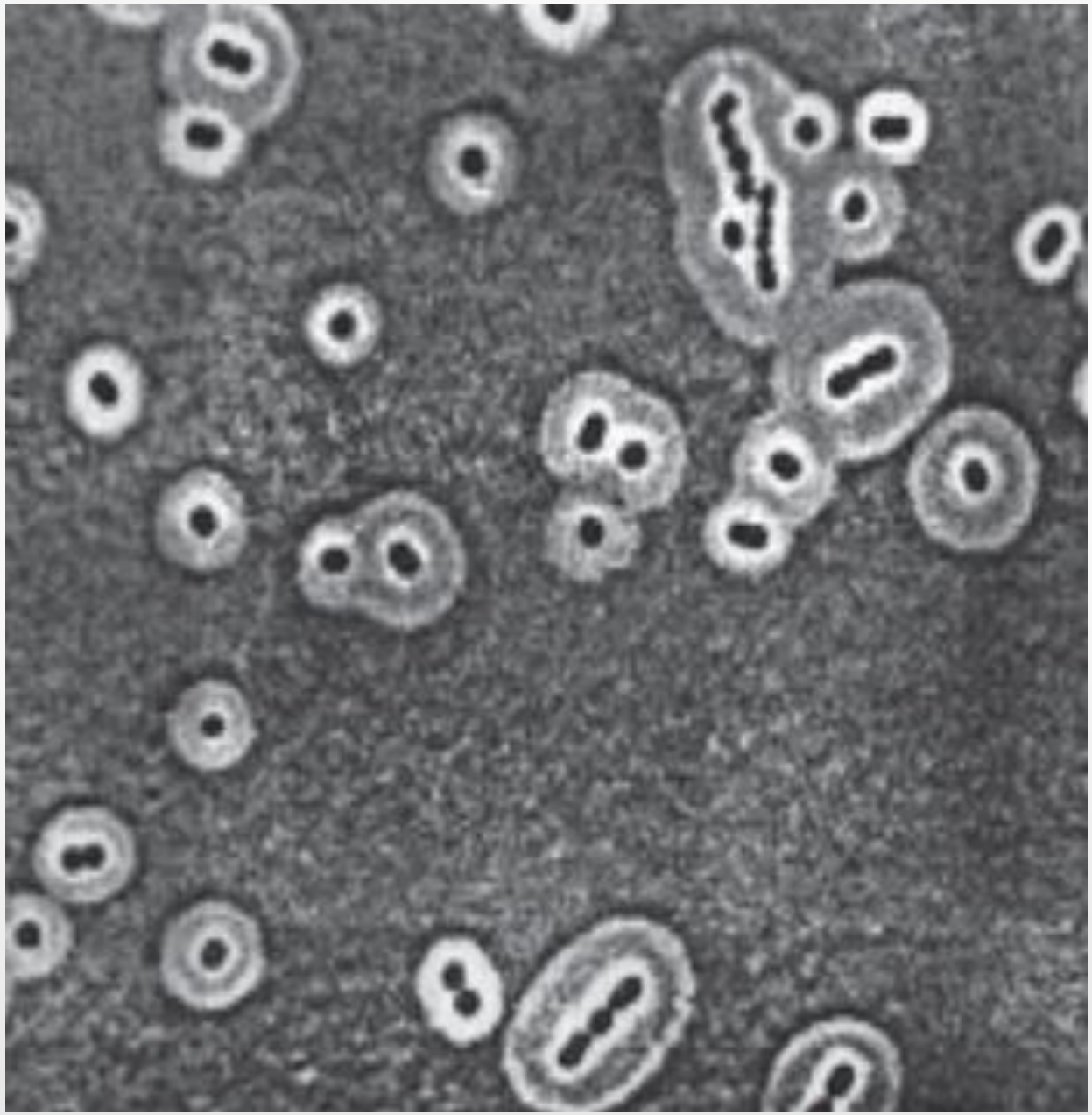
رنگ آمیزی کپسول

- رنگ آمیزی اختصاصی برای مشاهده کپسول باکتری ها به کار می رود.
- در عمل رنگ آمیزی شرط رنگ گیری یک سلول،یونی بودن آن است چون وقتی سلول حالت یونی داشته باشد هنگام رنگ آمیزی بین نواحی یونیزه سطح سلول و اجزای یونیزه مولکول های رنگ پیوند بوجود می آید. در نتیجه بین بارهای مخالف موجود در سطح سلول و مولکول های رنگ پیوند یونی تشکیل می شود و باکتری رنگ می گیرد.
- اما چون کپسول به علت غیر یونی بودن آن رنگ نمی گیرد و برای دیدن آن در زیر میکروسکوپ زمینه باکتری رنگ آمیزی می شود، امکان دیدن کپسول باکتری بصورت بی رنگ فراهم می شود.
- این روش را **رنگ آمیزی منفی** می نامند.


Cell
Capsule
(a) Enlarged illustration of a completed capsule stain
(b) Capsule stain: capsulated diplococci

رنگ آمیزی منفی

- در این رنگ آمیزی تعدادی سلول از کلنی باکتری مورد نظر برداشت شده و در رنگ نیگروزین یا مرکب چین روی لام مخلوط می شود و سپس با لام دیگری با زاویه ۴۵ درجه سانتی گراد روی لام اول قرار می گیرد از یک انتهای لام اول به سمت انتهای دیگر لام کشیده می شود. سپس لام اول را در مجاورت هوا خشک کرده و برای مرحله بعدی آماده می شود.
- در این روش رنگ آمیزی برای تثبیت گستره از گرما استفاده نمی شود. چون در اثر گرما، باکتری در داخل کپسول از شکل طبیعی خود خارج می شود.



روش های رنگ آمیزی کپسول

۱) روش رنگ‌آمیزی آنتونی
۲) روش هیس
۳) روش گراهام و ایوانز
۴) روش هوی و کریک پاتریک
۵) روش رنگ‌آمیزی مانوال

روش آنتونی

a) Flood the slide with crystal violet; let stand 4–7 minutes

(b) Rinse thoroughly with copper sulfate

(c) Blot dry with bibulous paper

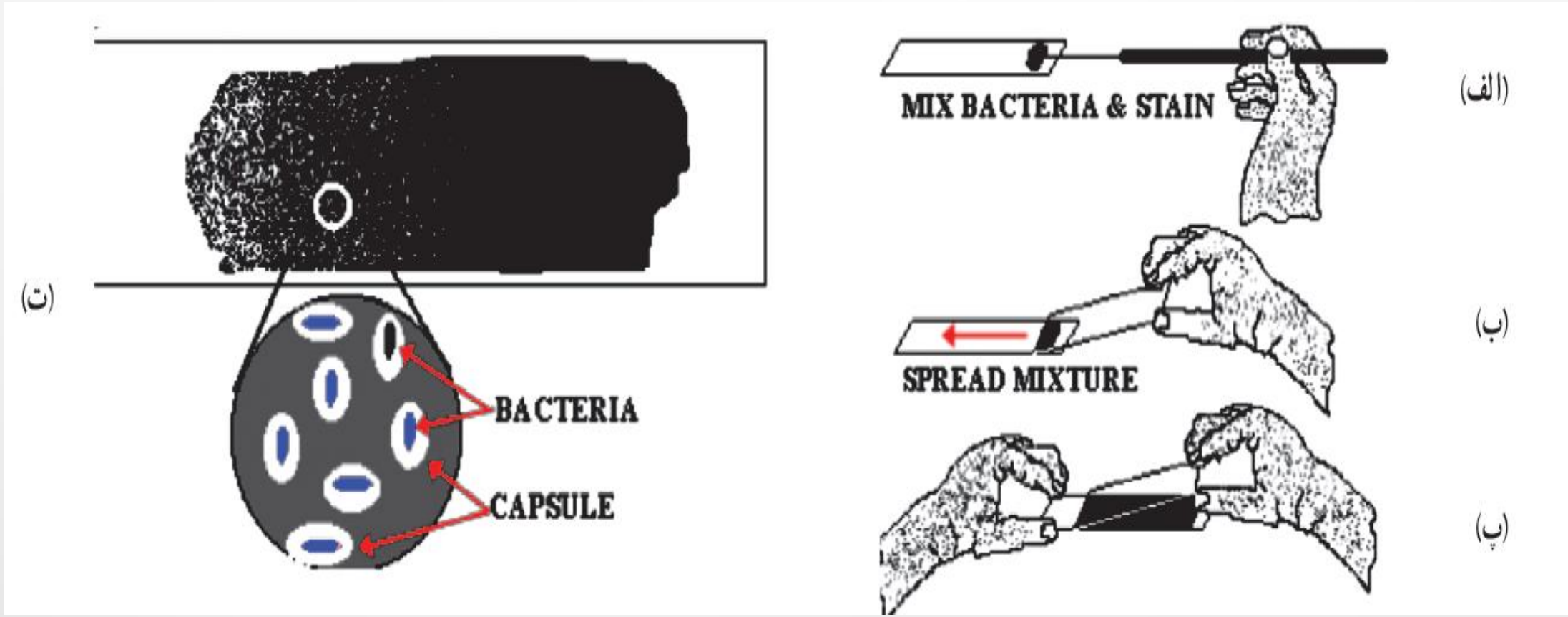
- رنگ اولیه، کریستال ویوله است
- سولفات مس عامل رنگ زدا است.

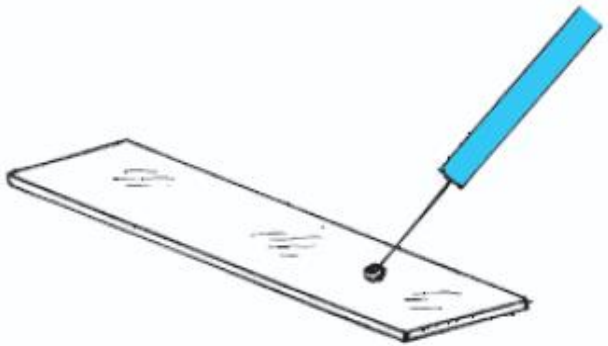
مواد و وسایل مورد نیاز

- لام ۲عدد
- لوپ (فیلدوپلاتین)
- مرکب چینی
- رنگ متیلن بلو
- میکروسکوپ نوری معمولی
- محیط کشت باکتری کپسول دار مانند استرپتوکوکوس پنومونیا

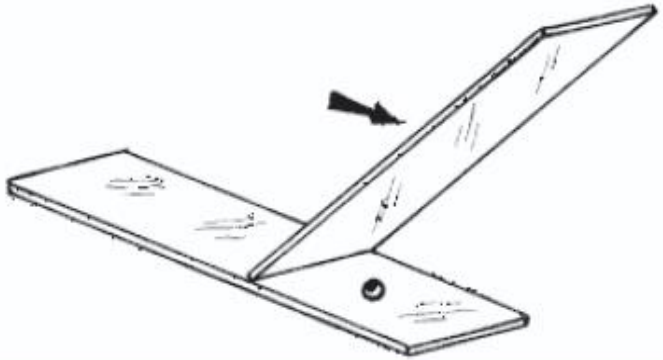
روش کار

- روی یک لام تمیز مقداری رنگ مرکب چین بریزید و با لوپ (نوک آنس) مقدار کمی از کشت باکتری به آن اضافه و مخلوط
- کنید تا سوسپانسیون به آرامی و به طور یکنواخت پخش شود.
- مانند روش رنگ آمیزی منفی گسترش تهیه شده را در هوا خشک کنید.
- **یادآوری:** هیچ گاه نباید کاغذ خشک کن را روی لام کشید.
- سطح گستره را با متیلن بلو به مدت ۳ دقیقه بپوشانید. رنگ اضافی را خالی کرده با آب مقطر شستشو دهید.
- لام را خشک کرده و با میکروسکوپ نوری و عدسی ۱۰۰ x نمونه را مشاهده نمایید.
- **نکته :** هنگام مخلوط کردن کشت با رنگ، آن را به آرام بهم بزنید تا آرایش باکتری ها بهم نخورد.

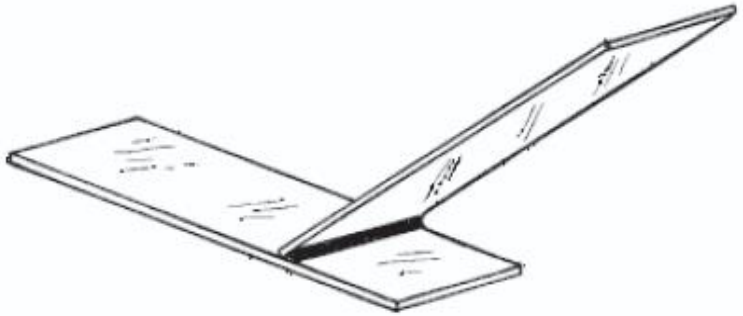

(ت)
BACTERIA
CAPSULE
MIX BACTERIA & STAIN
(الف)
SPREAD MIXTURE
(ب)
(پ)



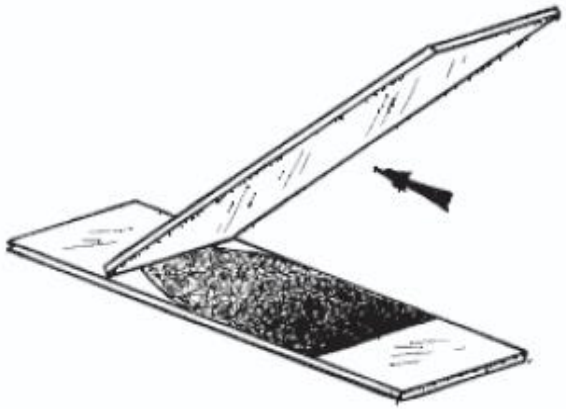
1 Organisms are dispersed into a small drop of nigrosine or India ink. Drop should not exceed 1/8" diameter and should be near one end of the slide.



2 Spreader slide is moved toward drop of suspension until it contacts the drop causing the liquid to be spread along its spreading edge.



3 Once the spreader slide contacts the drop on the bottom slide, the suspension will spread out along the spreading edge as shown.



4 Spreader slide is pushed to the left, dragging the suspension over the bottom slide. After the slide has air-dried, it may be examined under oil immersion.

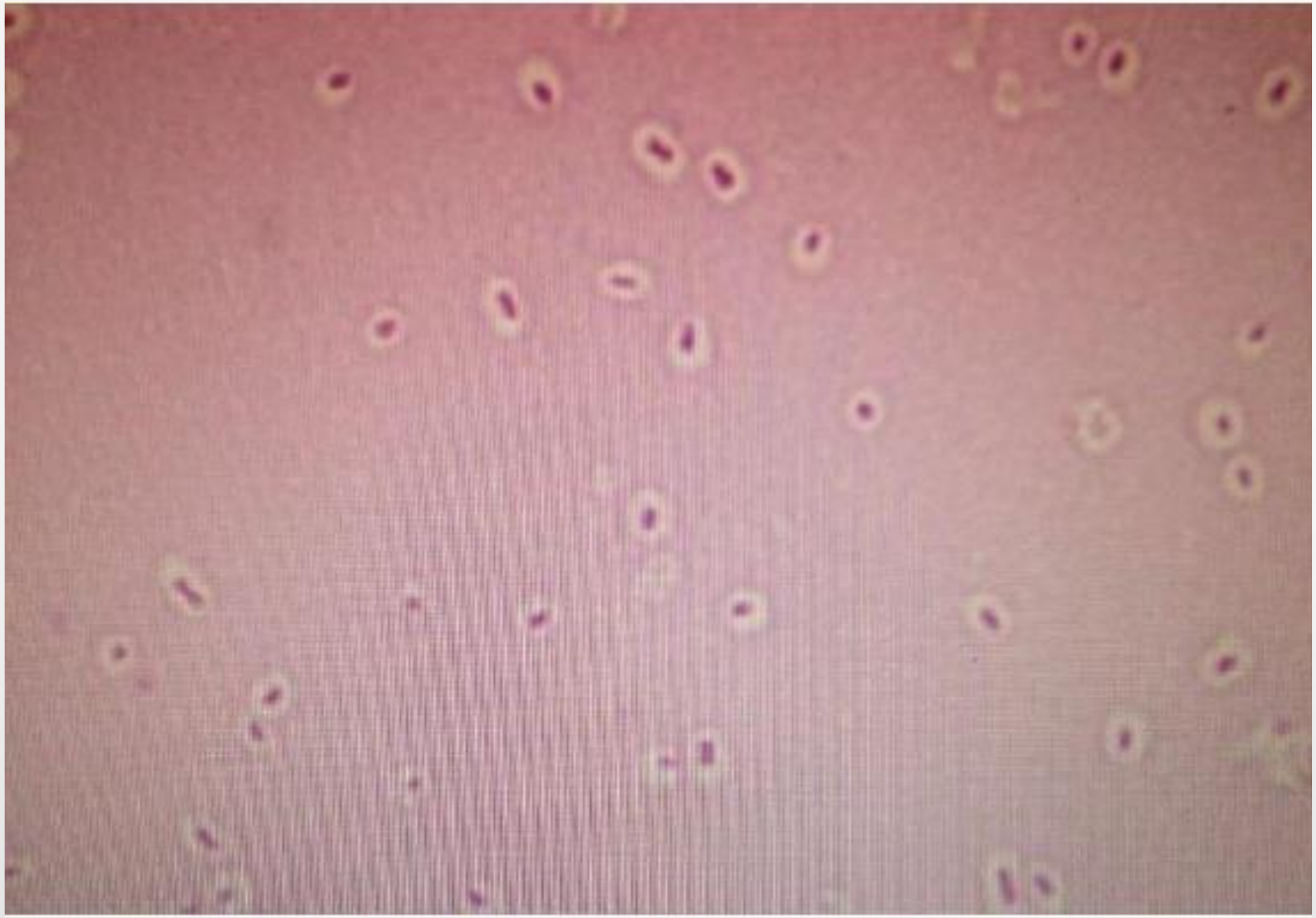


FIG. 4. Encapsulated *Bacillus* sp. stained using Maneval's capsule staining metho
around the rod-shaped bacterium.

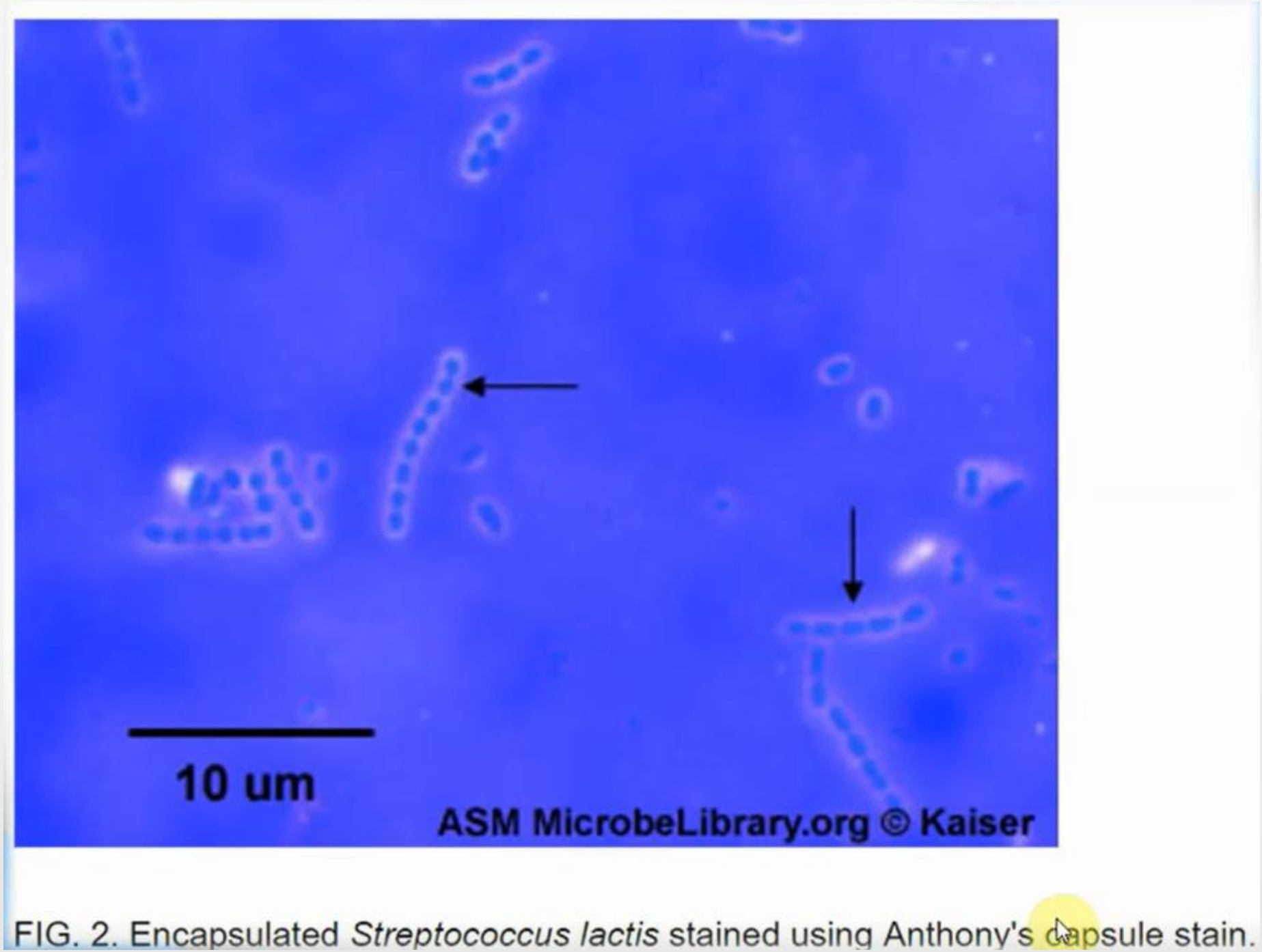


FIG. 2. Encapsulated *Streptococcus lactis* stained using Anthony's capsule stain.

رنگ آمیزی به روش هیس
مواد و وسایل لازم :

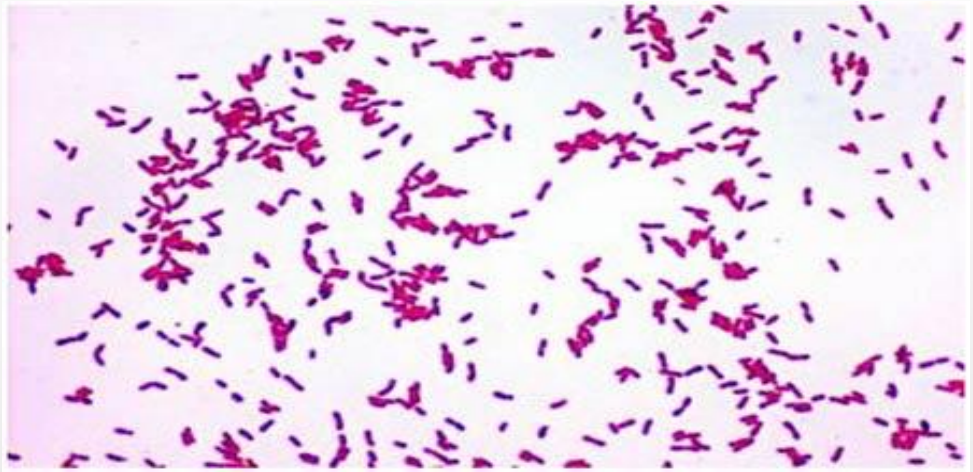
- کریستال ویوله ۰/۱٪
- سولفات مس ۲۰٪،
- سرم انسان یا خرگوش
- کشت ۲۴ساعته باکتری روی اسکیم میلک
- لوپ
- پی‌پت پاستور
- لام
- تشتک
- پنبه الکلی

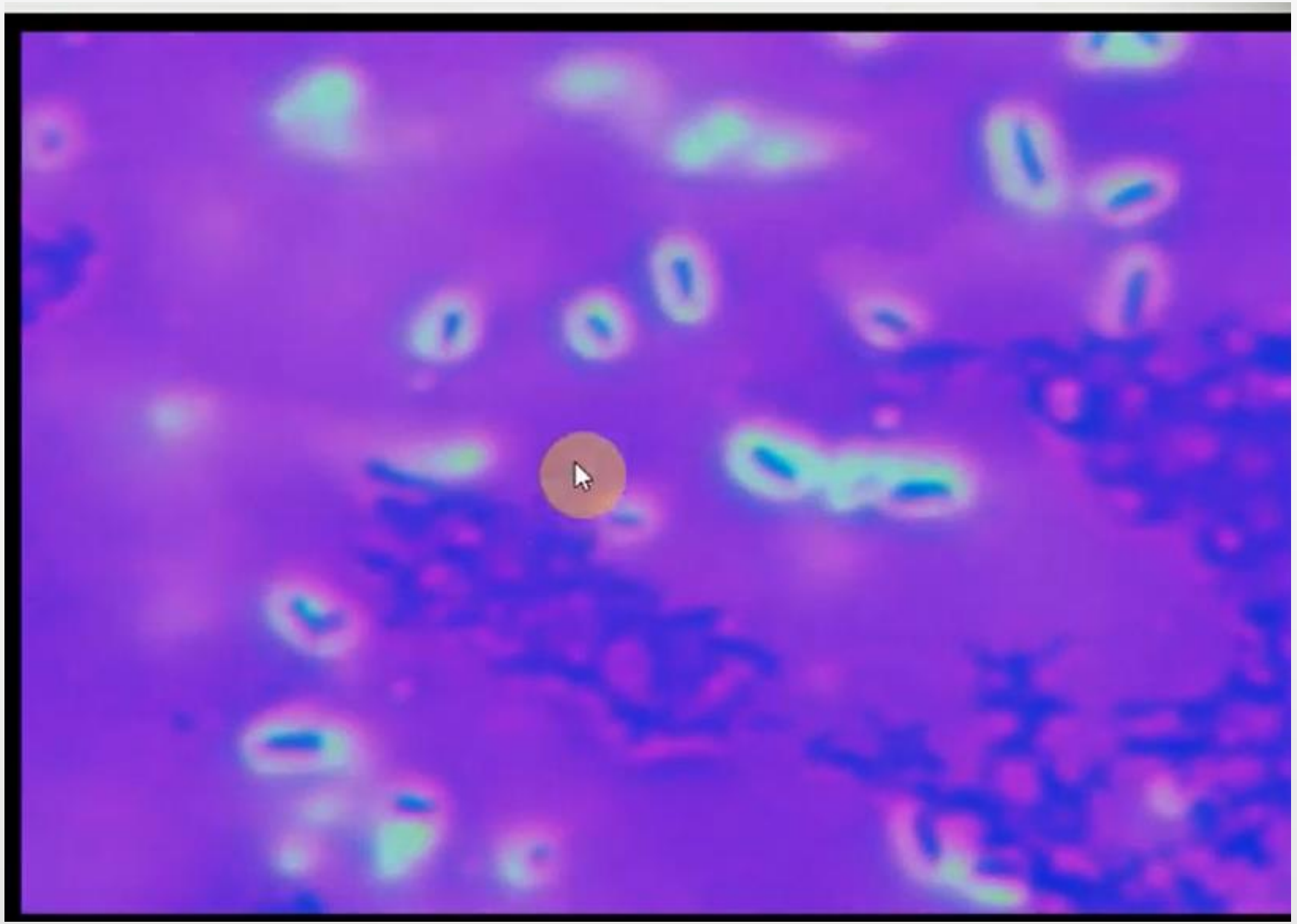
روش کار

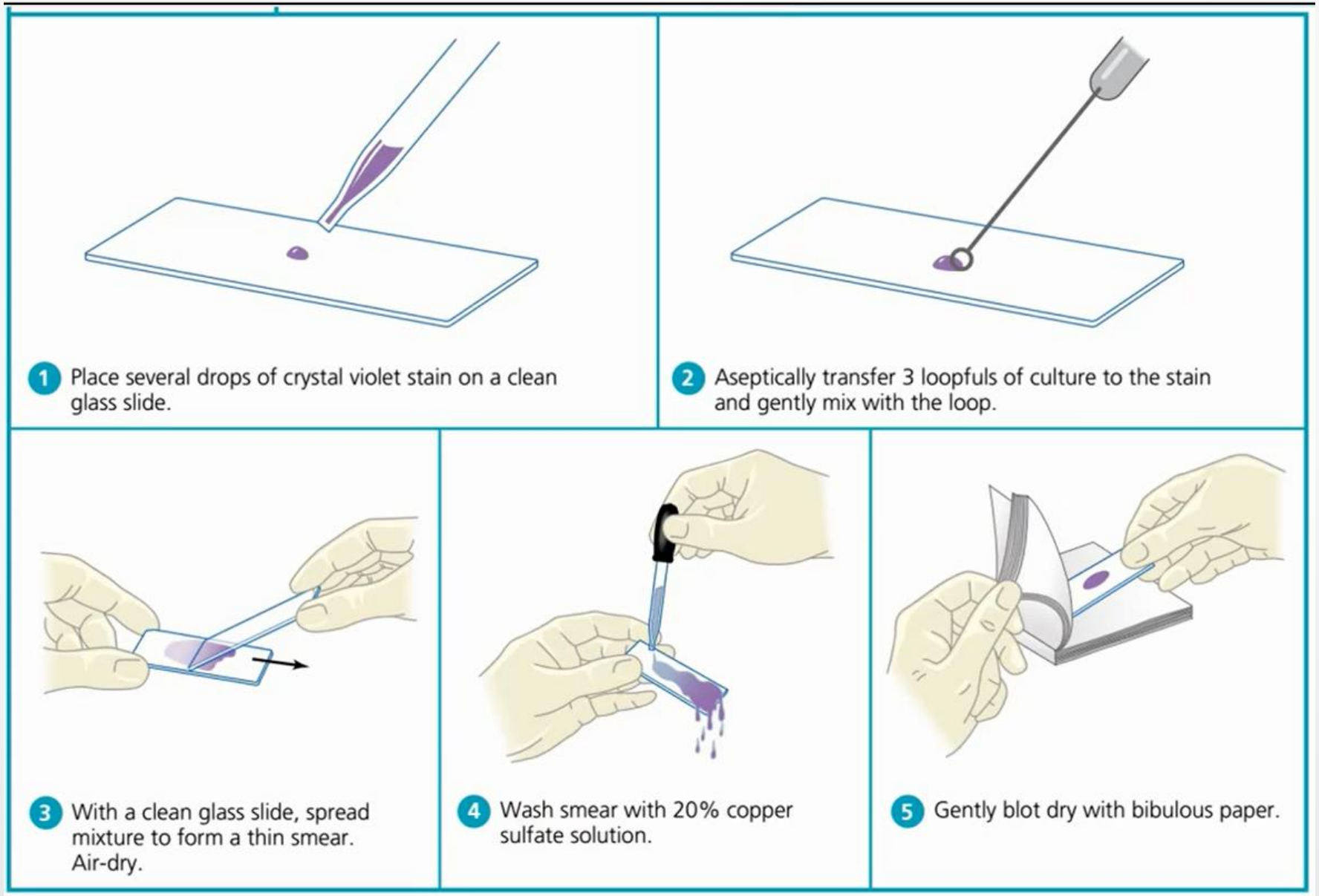
- ۱- با استفاده از لوپ استریل یک کلنی از باکتری ها را برداشته و روی یک قطره از سرم انسان (که به دلیل ویسکوزیته بالاتر نسبت به آب از حل شدن کپسول جلوگیری می کند) واقع در لام تشکیل سوسپانسیون دهید.
- ۲- لام را خشک و سپس با شعله ی ملایم و سریع فیکس کنید تا سرم دناتوره نشود
- ۳- لام را روی تشتک قرار دهید یک پنبه الکلی را با پنس نگه داشته و آتش بزنید و زیر لام بگیرید و روی فروتی به مدت ۱ دقیقه کریستال ویوله بریزید تا رنگ توسط حرارت به درو باکتری نفوذ کند
- ۴- با سولفات مس ۲۰٪ لام را شست شو دهید وصبر کنید تا خشک شود ۵- لام را با ابتدا با عدسی ۱۰ و سپس با عدسی ۱۰۰ و روغن امرسیون مشاهده کنید

نتیجه

- – کپسول به صورت هاله ای به رنگ آبی روشن در اطراف باکتری ها که به رنگ بنفش هستند قابل مشاهده است.







igure 11.5 **Capsule staining procedure**

fppt.com

با تشکر از حسن توجه شما