روشهای رنگ آمیزی باکتریها (رنگ آمیزی گرم)

تهیه کننده : سهیلا عباسی

دانشگاه اصفهان

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

مقدمه

- این نوع رنگ آمیزی اولین بار توسط یک پزشکی دانمارکی به نام هانس کریستین گراهام در سال ۱۸۸۴ ابداع گردید و یکی از مهمترین رنگ آمیزی ها در میکروب شناسی است. این روش یک روش رنگ آمیزی افتراقی است که به واسطه آن می توان باکتری ها را به دو دسته اصلی گرم مثبت و گرم منفی تقسیم کنیم.
- این دسته بندی در تشخیص و شناسایی باکتریها بسیار مفید و کاربردی است و تقریبا همیشه اولین قدم برداشته شده توسط یک محقق در شناسایی یک باکتری می باشد. در این روش علاوه بر تمیز دادن دو گروه باکتریایی، مورفولوژی ، تعداد و نحوه قرار گرفتن (آرایش) آنها نیز قابل بررسی است.

- از طرفی چون اسپورها هم در این روش بصورت مناطق رنگ نگرفته مشاهده می شوند، می توان اطلاعاتی نیز درباره این ساختار داخلی کسب کرد. رنگ آمیزی گرم بر اساس تفاوت خصوصیات فیزیکی و شیمیایی دیواره سلولی باکتریها، این دو دسته را از هم افتراق می دهد.
- دیواره سلولی در باکتریهای گرم مثبت، از شبکه ضخیمی از پپتدو گلیکان (٪۵۰-٪۹۰ پوشش سلولی) تشکیل شده است که با رنگ کریستال ویوله **بنفش** می شود. در حالیکه باکتریهای گرم منفی لایه پپتیدوگلیکان نازکتری (٪۱۰ از پوشش سلولی) را دارا می باشند، در عوض به علت داشتن غشای خارجی حاوی لیپید بیشتری نسبت به گرم مثبت ها بوده و در آخر به رنگ **صورتی** – **قرمز** در می آیند.

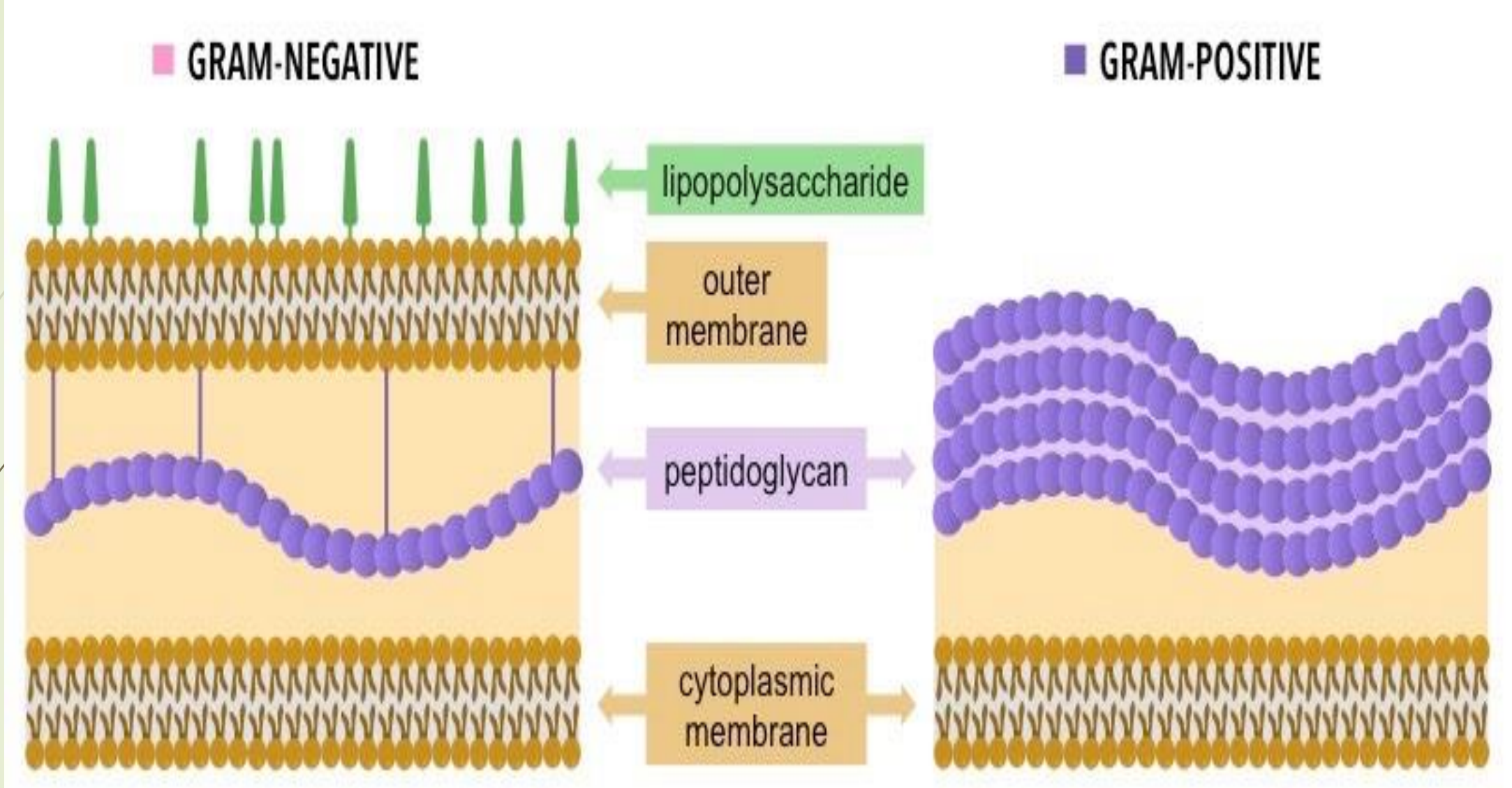
- کریستال ویوله (CV) در محلول آبی به صورت یونهای CV^{+} و Cl^{-} در می آید. این یونها به داخل دیواره سلولی و غشا سلولی هر دو دسته باکتری گرم مثبت و گرم منفی نفوذ می کند.
- یونهای CV^{+} با اجزای سلولی دارای بار منفی واکنش میدهد و سلولها را بنفش می کند.
- محلول لوگل یا یدین (I^{-}or I_3^{-}) به عنوان یک رنگ دندانه با یونهای CV^{+} واکنش داده و کمپلکس های بزرگی از کریستال ویوله و ید در لایه های داخلی و خارجی سلول ایجاد می کند.
- هنگامیکه یک ماده رنگبر مثل الکل یا استون اضافه می شود، چون الکل حلال چربی هاست، با حل شدن چربی های غشای لیپوپلی ساکاریدی، منافذ ریزی در دیواره سلول ایجاد می شود و لابه پپتیدوگلیکان نازک داخلی در معرض الکل قرار گرفته و کمپلکس ید-کریستال ویوله شسته می شود.

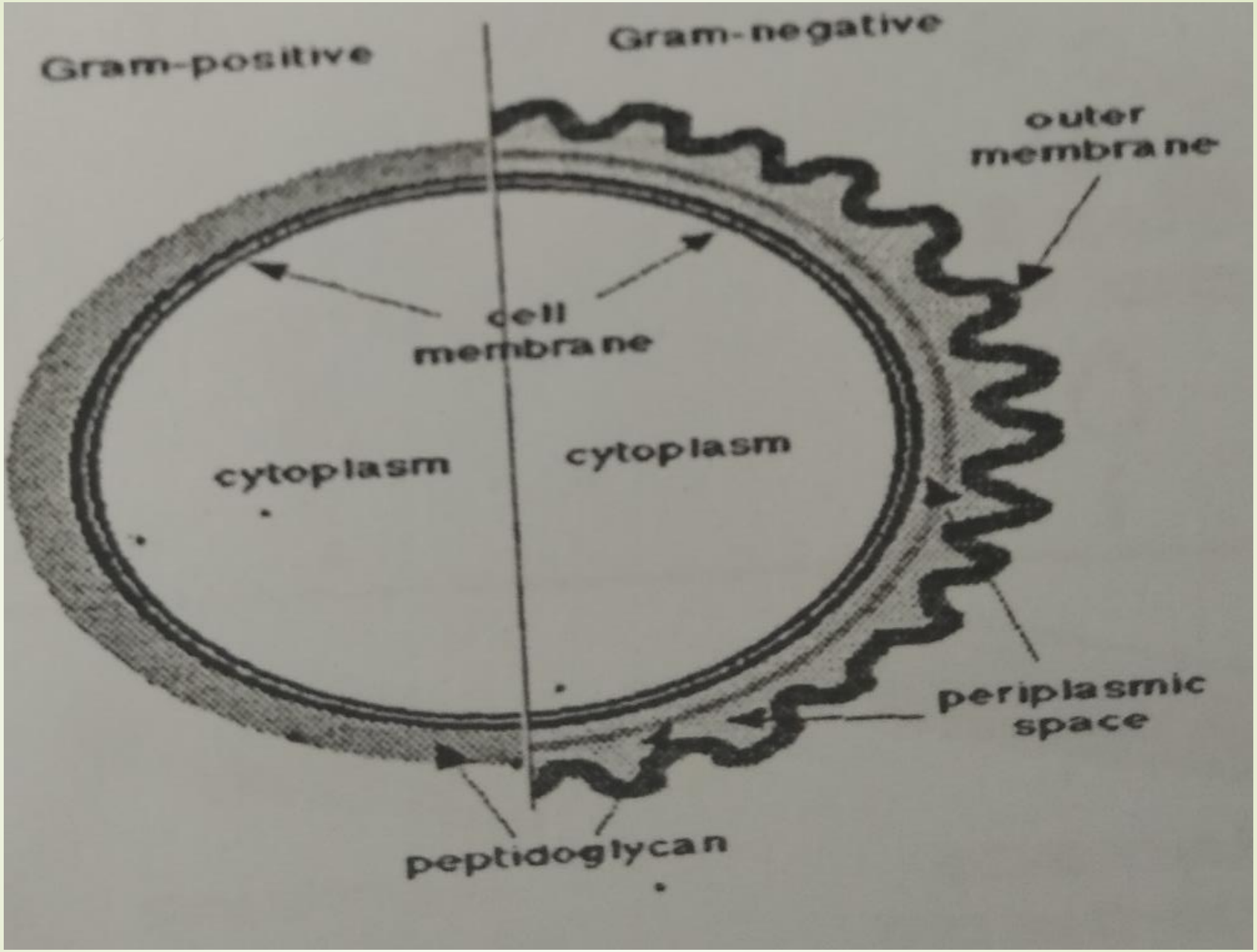
در مقابل، یک سلول گرم مثبت، با اتانل، دهیدراته شده و کمپلکس بزرگ ید - کریستال ویوله در لایه های متعدد پپتیدوگلیکان گیر می افتد و بدین ترتیب رنگ آن باقی می ماند.

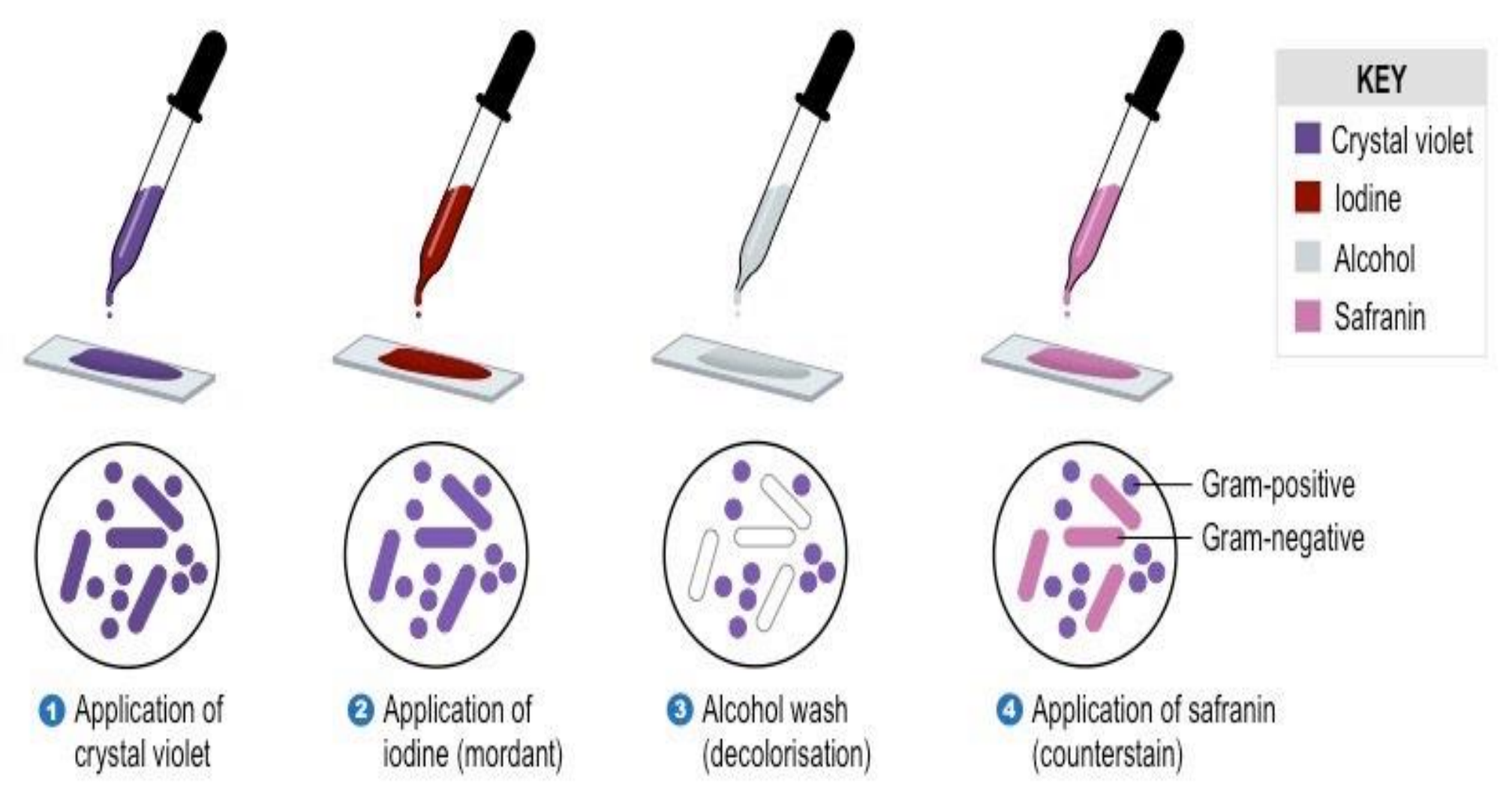
مرحله رنگبری بسیار مهم است و رعایت زمان مقرر در آن مهم می باشد. اگر این زمان کمی بیشتر از حد مقرر باشد، کریستال ویوله از هر دو دسته باکتری خارج شده و همه گرم منفی می شوند.

بعد از رنگبری، در مرحله آخر با یک رنگ با بار مثبت که اکثرا سافرانین می باشد، باکتریهای گرم منفی به رنگ قرمز در می آیند.

باید دانست که شرایط محیط (مانند pH ، مواد غذایی و سن باکتری) در خاصیت رنگ پذیری آنها موثر است. بعضی از باکتریهای گرم مثبت پس از چند روز رشد در محیط غذایی ، ممکن است بصورت گرم منفی در آیند.


GRAM-NEGATIVE
GRAM-POSITIVE
lipopolysaccharide
outer membrane
peptidoglycan
cytoplasmic membrane


Gram-positive
Gram-negative
outer membrane
cell membrane
cytoplasm
cytoplasm
periplasmic space
peptidoglycan


KEY
Crystal violet
Iodine
Alcohol
Safranin
Gram-positive
Gram-negative
1 Application of crystal violet
2 Application of iodine (mordant)
3 Alcohol wash (decolorisation)
4 Application of safranin (counterstain)

تفاوت باکتری گرم+ و گرم –

	مشخصات	گرم مثبت	گرم منفی
1	واکنش گرم	نگهداشتن رنگ کریستال ویوله، درآمدن به رنگ آبی یا بنفش	پذیرفتن رنگ سافرانین، درآمدن به رنگ صورتی یا قرمز
2	ضخامت دیواره ی سلولی	ضخیم (nm 80-20)	نازک (nm 10-8)
3	ترکیب شیمیایی دیواره سلولی	پپتیدوگلیکان، تیکوئیک اسید، لیپوتیکوئیک اسید	لیپو پلی ساکارید، لیپوپروتئین، پپتیدوگلیکان
4	لایه ی پپتیدوگلیکان	ضخیم (چند لایه ای)	نازک (تک لایه)
5	تیکوئیک اسید در دیواره سلولی	دارد	ندارد
6	لایه ی لیپو پلی ساکارید (لایه خارجی)	ندارد	دارد
7	محتوای لیپیدی	ندارد و یا به میزان کمتری از باکتری های گرم منفی دارد.	حاوی میزان بیشتری لیپید نسبت به باکتری های گرم مثبت می باشد (با توجه به حضور در غشای خارجی)

باکتری‌های مهم از نظر پزشکی که با رنگ‌آمیزی گرم قابل مشاهده نیستند

	نام باکتری	علّت عدم مشاهده باکتری با روش گرم	روش رنگ‌آمیزی جایگزین
۱	**مایکوباکتریوم‌ها** شامل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس	وجود مقدار زیادی چربی در دیواره سلولی که از نفوذ رنگ جلوگیری می‌کند	رنگ‌آمیزی اسید فاست
۲	**تریونما پالیدوم**	نازکتر از آن است که دیده شود	میکروسکوپ زمینه تاریک یا آنتی‌بادی فلوئورسنت
۳	**مایکوپلاسما پنومونیه**	نبود دیواره سلولی	روشی وجود ندارد
۴	**لژیونلا پنومونیه**	عدم دریافت رنگ قرمز	طولانی نمودن مرحله افزودن سافرانین در رنگ‌آمیزی گرم
۵	**کلامیدیا** از جمله کلامیدیا تراکوماتیس	وجود ارگانیسم‌های درون سلولی، کوچکی سلول	
۶	**ریکتزیا**	وجود ارگانیسم‌های درون سلولی، کوچکی سلول	رنگ‌آمیزی گیمسا یا سایر رنگ‌آمیزی‌های بافتی

بنابراین توجه به نکات زیر در رنگ آمیزی گرم ضروری است:

- ۱) کشت باکتری حتما باید تازه و جوان باشد (کشت ۲۴-۱۸ ساعته).
- ۲) غلظت و زمان رنگبری با الکل دقیقا رعایت شود.
- ۳) از حرارت زیاد در حین عمل فیکس کردن بپرهیزید زیرا ممکن است دیواره سلولی آسیب دیده و باکتریهای گرم مثبت مثل گرم منفیها رنگ شوند.
- ۴) فروتی تهیه شده باید نسبتا نازک باشد.
- ۵) محلولهای رنگ آمیزی باید تازه و فاقد هر گونه رسوب باشند.
- ۶) جهت انجام صحیح آزمایش باید به طول زمان و کامل بودن شستشو بعد از کریستال ویوله و مقدار آب باقیمانده روی گسترش به هنگام اضافه کردن لوگول ، دقت نمود. برخی مواقع در اثر عدم رعایت زمان های لازم در رنگ آمیزی، ارگانیسم ها رنگ اصلی خود را کسب نکرده و باعث ایجاد اشتباه می شوند.

- جهت تشخیص باکتریهای گرم منفی از گرم مثبت می توانید به روش ذیل عمل کنید.

- یک قطره پتاس ۳ درصد را روی لام قرار دهید و با استفاده از لوپ کمی از کلنی باکتری را در قطره مذکور حل کنید و به آهستگی لوپ را از محلول خارج کنید. اگر مایع چسبنده بود. و تا ارتفاع ۲– ۰/۵سانتیمتر از سطح لام بلند شد، باکتری گرم منفی و در غیر اینصورت گرم مثبت است.

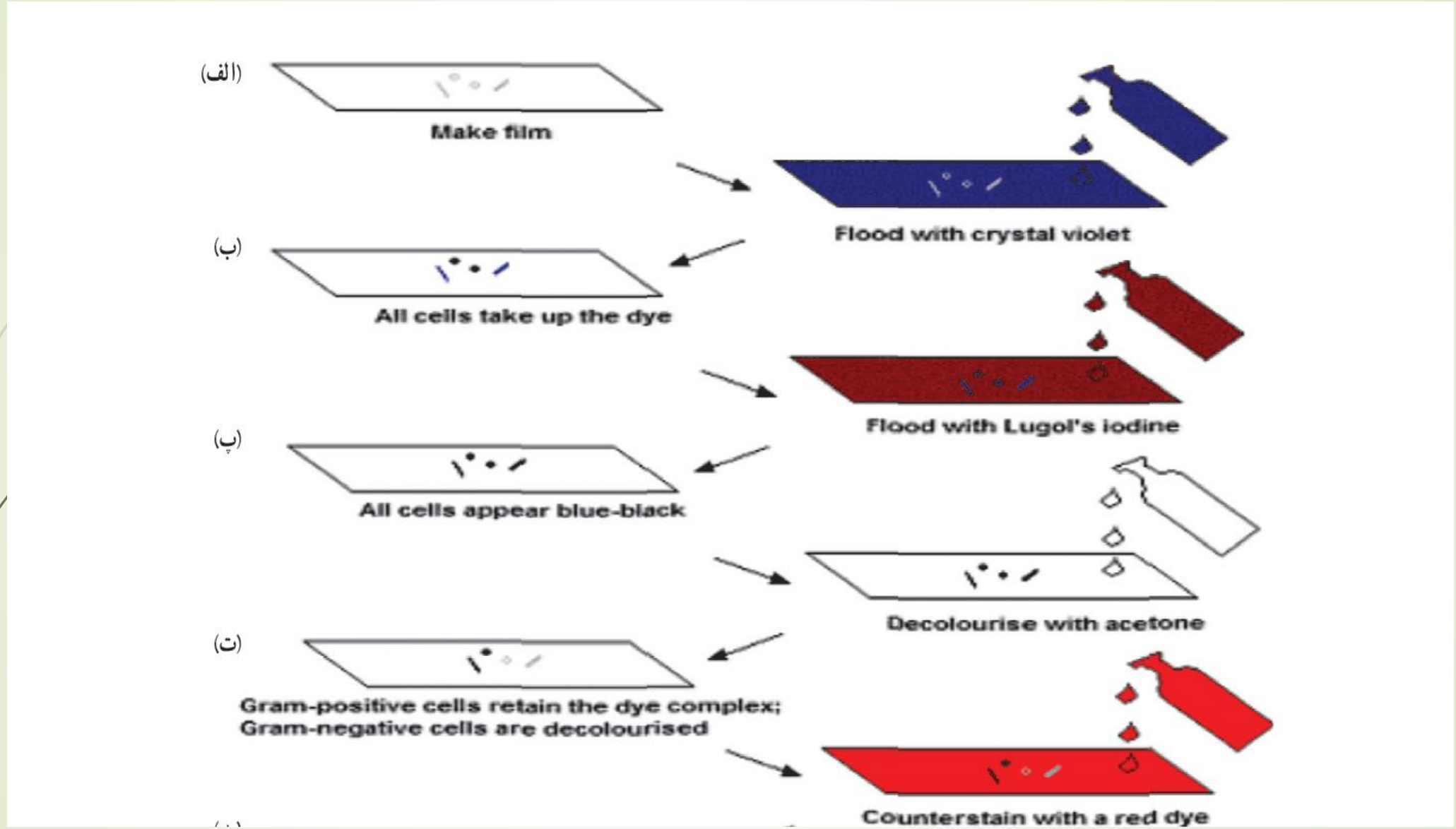
- از سوی دیگر کلنی باکتریهای گرم منفی در مواجهه با سوآپ آغشته بهL – analine4 – intransitive ، باعث زرد رنگ شدن سوآپ می شوند ولی باکتریهای گرم مثبت اینگونه نیستند.

مواد و وسایل لازم:

- لوپ ، لام ، تشتک، آبفشان، پنبه ، میکروسکوپ، روغن ایمرسیون، شیشه های محتوی رنگ (کریستال ویوله، لو گل، اتانول ۹۶ درصد، سافرانین)، کشتهای میکروبی ۲۴ ساعته
- Escherichia coli
- Bacillus cereus
- Staphylococcus aureus

روش کار:

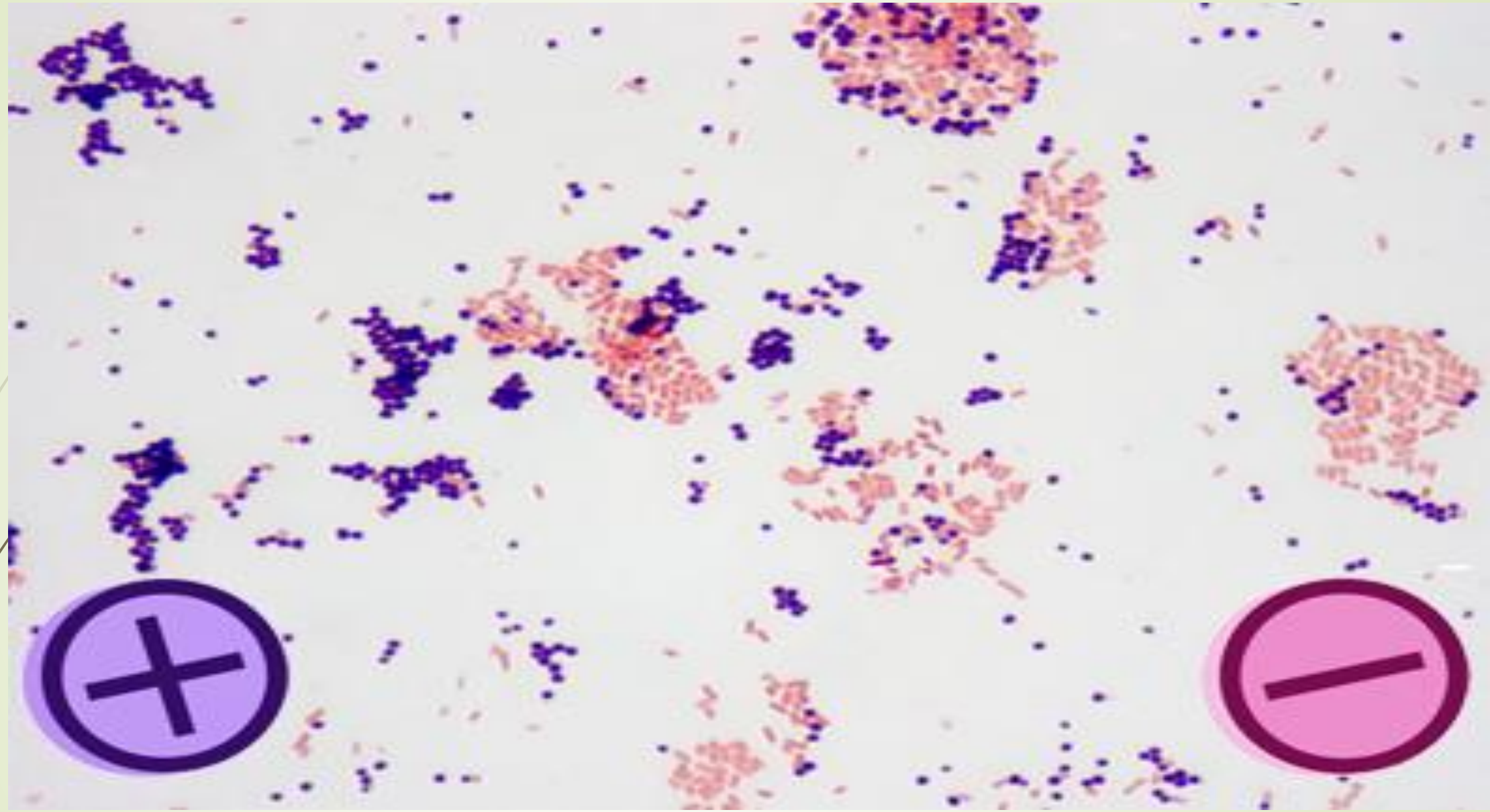
- ۱)یک فروتی نسبتا نازک از باکتری مورد نظر تهیه کنید.
- ۲) لام مورد نظر را روی میله های تشتک گذاشته و رنگ کریستال ویوله را به مدت یک دقیقه روی فروتی بریزید.
- ۳) رنگهای اضافی را کاملا با آب بشویید.
- ۴) به مقدار کافی از محلول لوگل روی فروتی ریخته و بگذارید یک دقیقه بماند.
- ۵) لام را با آب شستشو دهید.
- ۶) محلول رنگبر (اتانول ٪۹۵) را روی فروتی ریخته و بمدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه صبر کنید.
- ۷) الکل را بطور کامل با آب شستشو دهید
- ۸) رنگ سافرانین را روی فروتی ریخته و بگذارید یک دقیقه بماند.
- ۹) رنگها را با آب بشویید و لام را در هوا با بوسیله کاغذ خشک کن ، خشک نموده، سپس با میکروسکوپ مشاهده نمایید.


(الف)
Make film
Flood with crystal violet
(ب)
All cells take up the dye
Flood with Lugol's iodine
(پ)
All cells appear blue-black
Decolourise with acetone
(ت)
Gram-positive cells retain the dye complex;
Gram-negative cells are decolourised
Counterstain with a red dye

- سپس اسلایدهای آماده شده را ابتدا با لنز ۱۰ تنظیم نموده ، سپس با استفاده از لنز ۱۰۰ و روغن ایمرسیون (روغن سدر) زیر میکروسکوپ مشاهده نمایید.

- پس از پایان کار روغن را با استفاده از کاغذ عدسی پاک کن تمیز نمایید تا روغن روی عدسی نماند و سپس لام شیشه ای را نیز درون محلول ضد عفونی کننده بیندازید.

- هدف از انجام این آزمایش یادگیری رنگ آمیزی گرم و تمایز بین باکتریهای گرم مثبت و منفی ، همچنین بررسی آرایش و ترتیب قرار گرفتن آنهاست.



تهیه معرفهای رنگی در رنگ آمیزی گرم

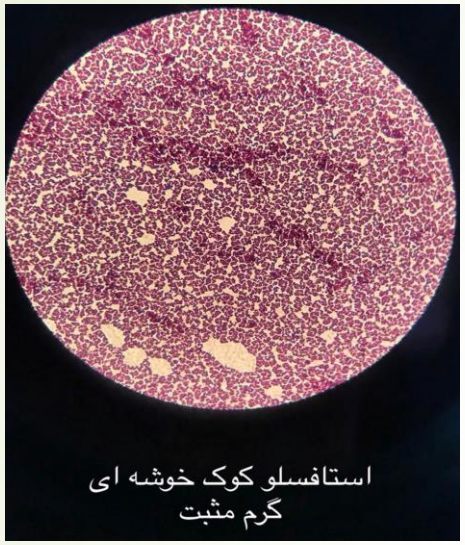
- تهیه رنگ کریستال ویوله در رنگ آمیزی گرم : ۲ گرم کریستال ویوله را در ۲۰ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد حل کنید. ۰/۸گرم اکسالات آمونیوم را در ۸۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید. دو محلول فوق را با یکدیگر مخلوط کرده و بعد از ۲۴ ساعت آنرا صاف کنید.

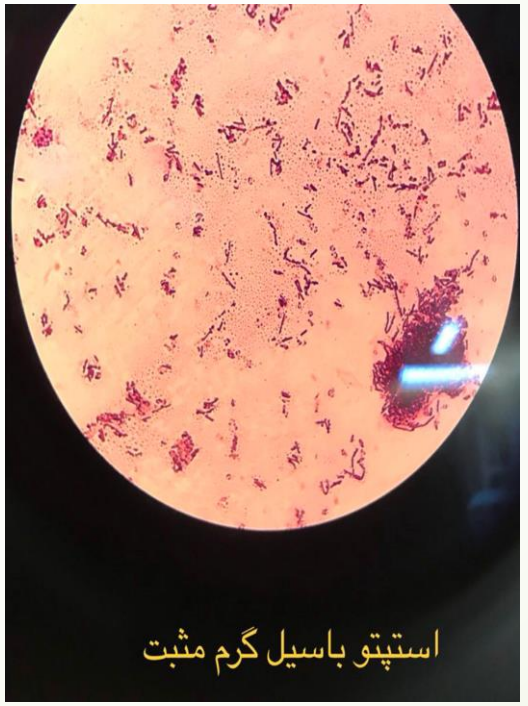
- محلول ید (لوگل): ۲ گرم یدور پتاسیم را با یک گرم ید پودر شده مخلوط کرده و در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید.

- تهیه محلول سافرانین: ۰/۲۵گرم سافرانین را در ۱۰ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد حل کنید و مجموع آنها را با کمک آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر برسانید.

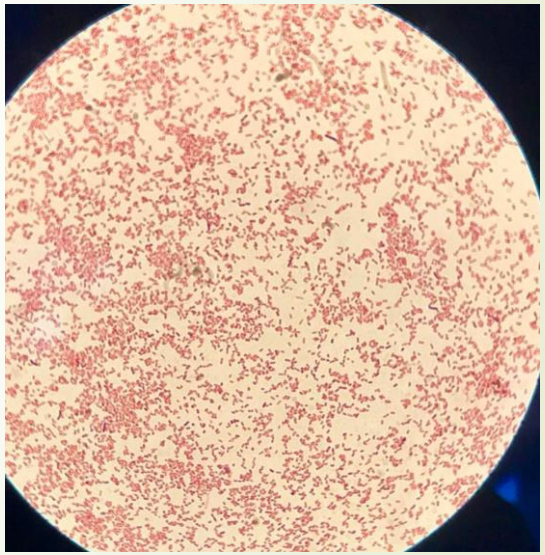
نتیجه

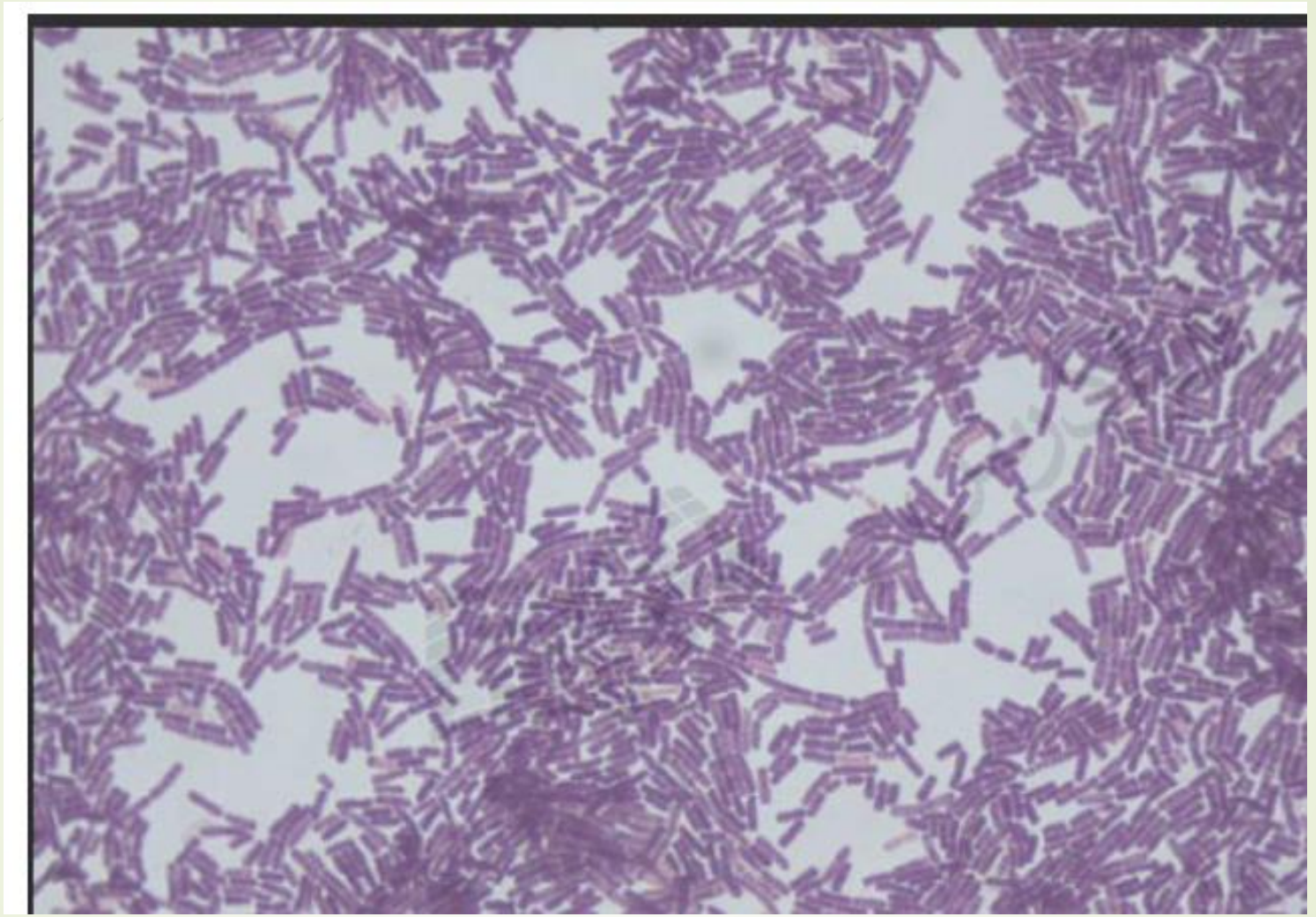
- باکتری ها گرم+ بنفش رنگ و با کتری های گرم - قرمز رنگ است.

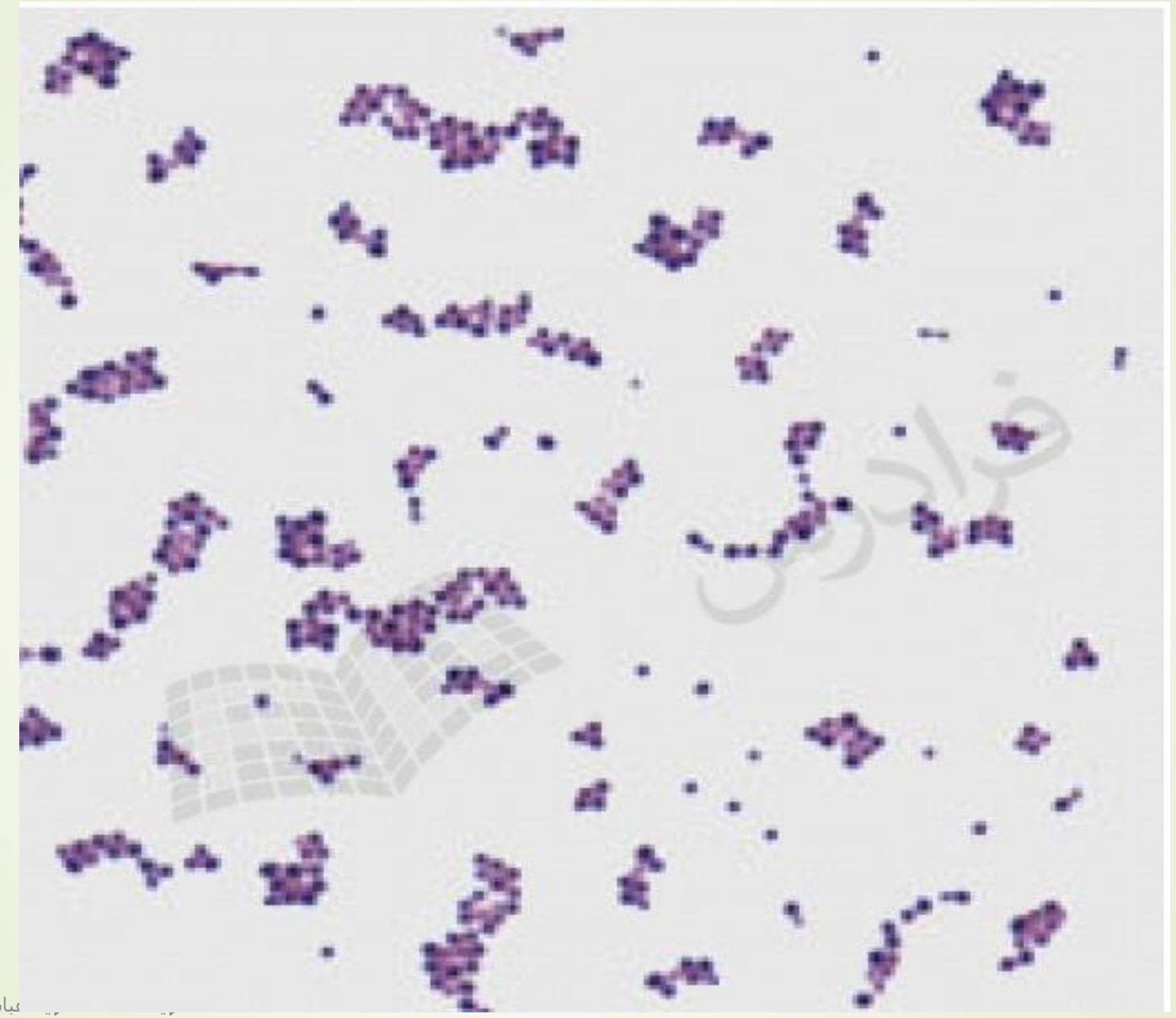


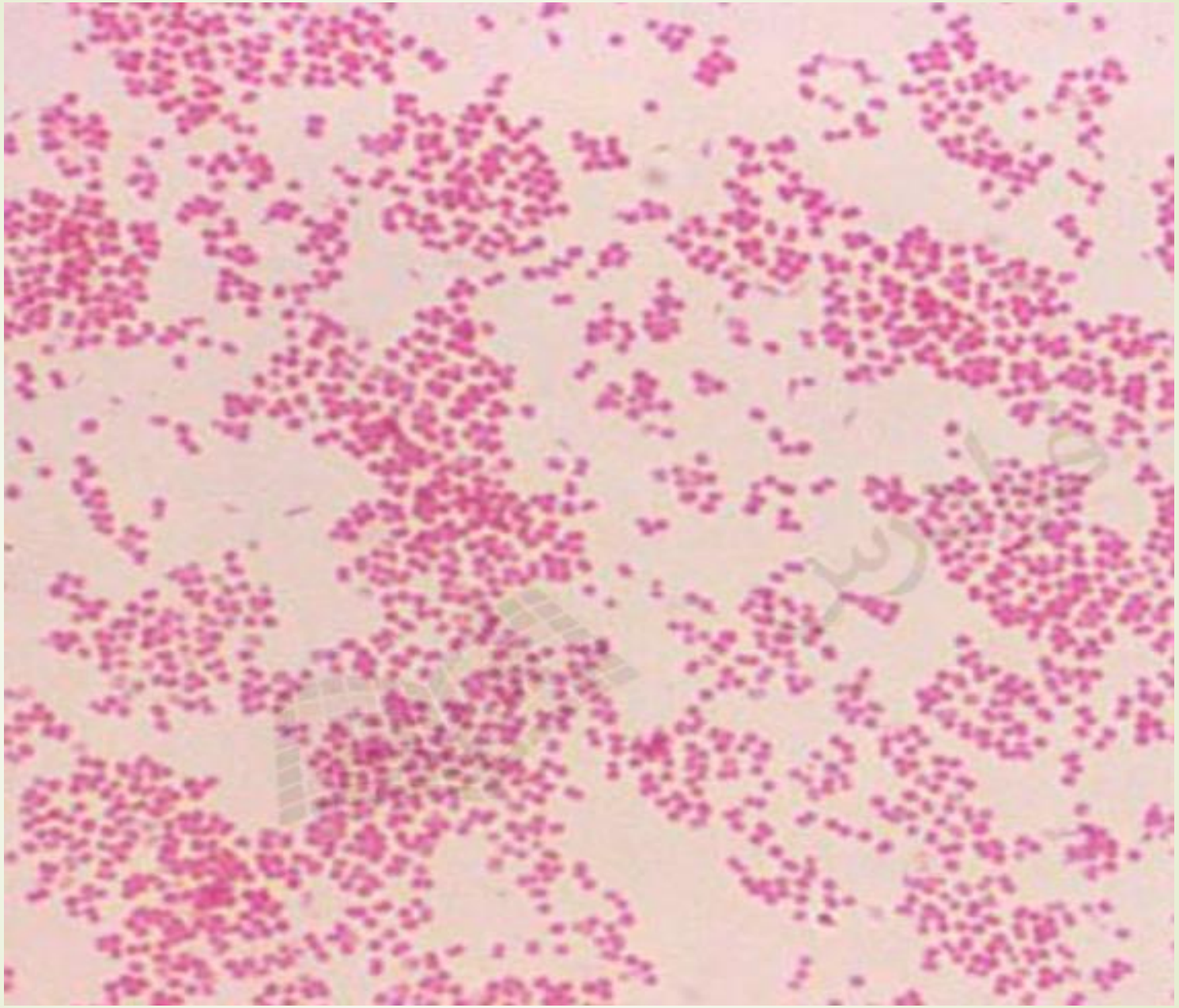


- کوکوباسیل گرم منفی









پرسشها :

1. تصور کنید یک نمونه از کشت خالص یک باکتری را رنگ آمیزی گرم نموده ایم و سپس زیر میکروسکوپ در میدان دید کوکسی ها به دو رنگ بنفش و قرمز دیده می شوند چه نتیجه ای می گیرید؟
2. عوامل موثر در ایجاد جواب کاذب در رنگ آمیزی گرم را بگویید؟(هر چند مورد که به ذهن شما می رسد)

نکته ایمنی :

- از تماس رنگ‌ها با پوست جلوگیری نمایید. بهتر است از دستکش یا گیره استفاده شود. زیرا رنگ‌ها موتاژن بوده و می‌تواند برای ما آسیب زننده‌باشند.

تهیه کننده : سهیلا عباسی