



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری های زیستی، آزمایشگاه میکروبیولوژی



# آزمایشگاه میکروب پایه رنگ آمیزی اسپور

## رنگ آمیزی اسپور

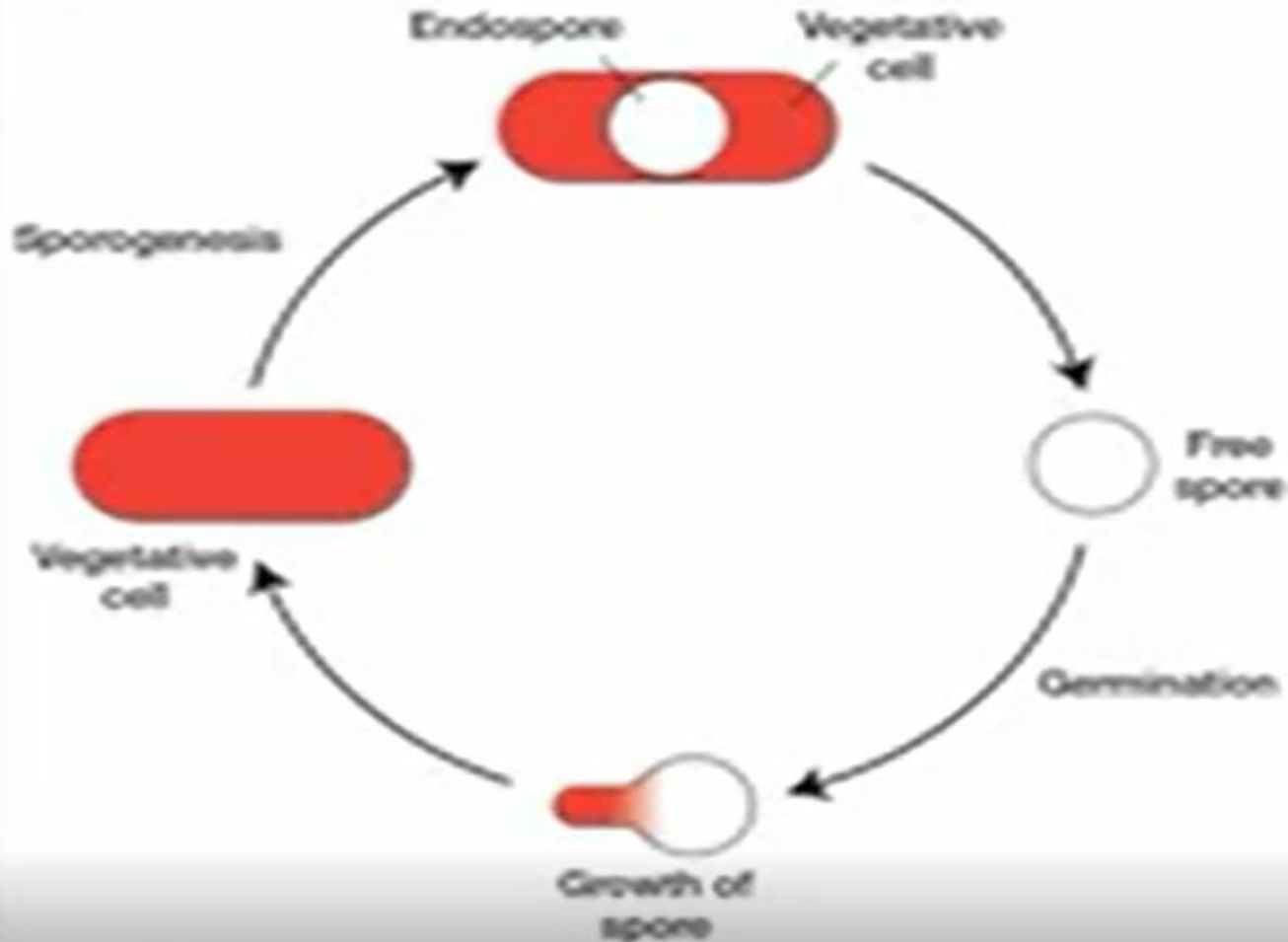
اسپور حالت مقاوم سلول باکتری است. بعضی از باکتری ها در شرایط نامساعد محیط، قابلیت تشکیل سلول مقاوم از سلول رویشی را دارند. این سلول مقاوم چون در درون سلول رویشی تشکیل می شود به آن اندوسپور گفته می شود هنگامیکه این فرم از سلول خارج می گردد به آن اسپور گفته می شود. اسپور زایی یک مرحله زایشی در چرخه سلول باکتری به حساب نمی آید بلکه یک مرحله استراحت (کمون) بوده که در آن متابولیسم سلول بسیار کند میشود. در صورت مساعد شدن شرایط محیطی، اسپور قادر است دوباره به فرم رویشی تبدیل شود. اسپور به دلیل داشتن پوششهای غیر قابل نفوذ در برابر شرایط نامساعد همچون خشکی، دمای نامناسب، نور، امواج رادیویی، مواد شیمیایی، انجماد و اشعه ها مقاوم می باشد. اسپور نسبت به عوامل فیزیکی و شیمیایی مقاوم است و به آسانی رنگ را به خود نمیگیرد. به همین دلیل برای رنگ آمیزی و نفوذ رنگ به داخل اسپور، به آن حرارت میدهند.

▶ اسپور (اندوسپور) شکل مقاوم باکتری ها است که در دو جنس مهم باسیلوس و کلستریدیوم در شرایط نامساعد محیطی مانند کمبود مواد غذایی، خشکی و گرمای زیاد تشکیل می شود و باکتری را قادر می سازد مدت طولانی بتواند این شرایط را تحمل کند.

▶ تبدیل سلول رویشی به اسپور را اسپورزایی می گویند. اگر شرایط برای باکتری دوباره مساعد شود اسپور تبدیل به سلول رویشی می گردد که به این عمل جوانه زدن گفته می شود.

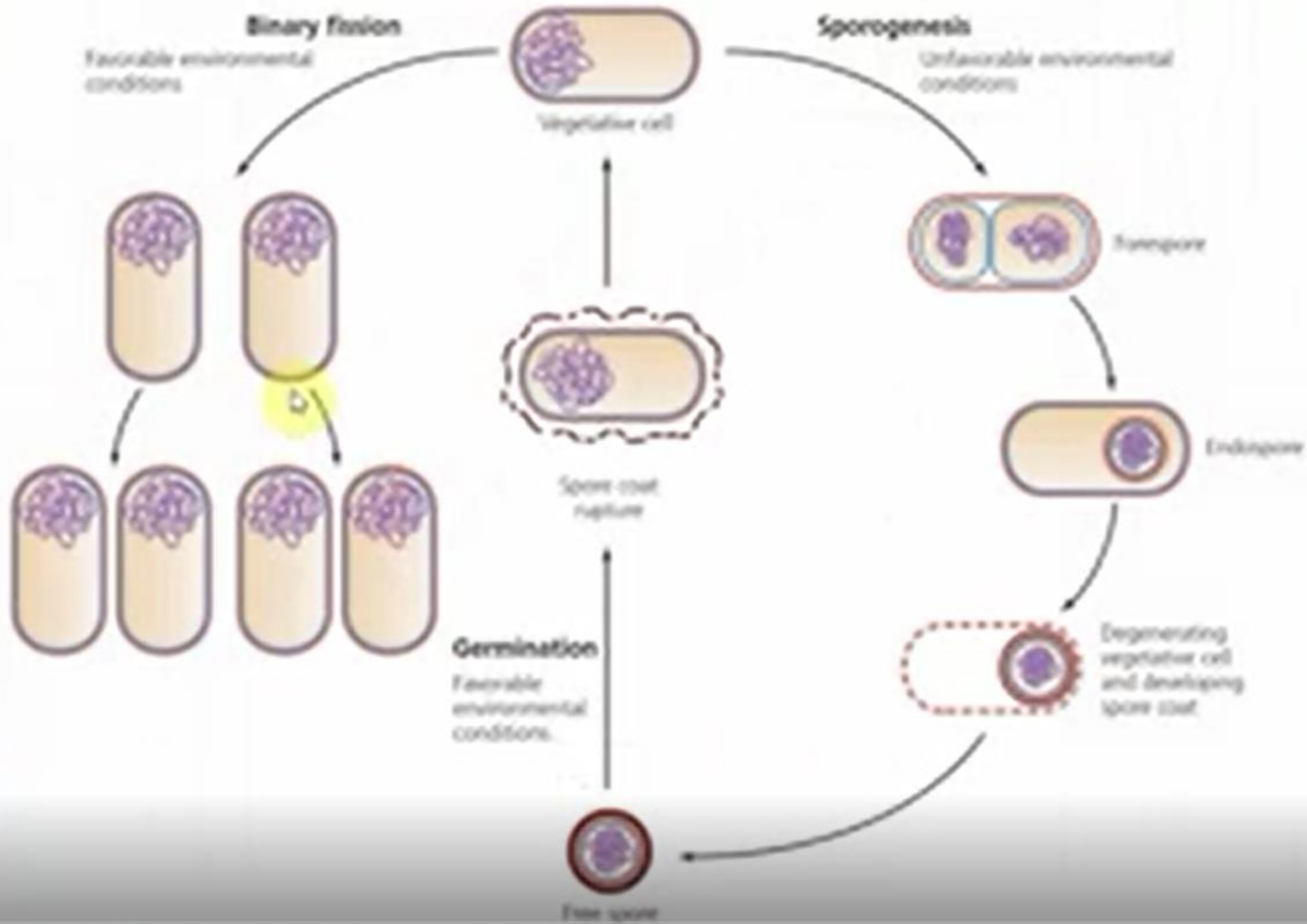
# Endospore Stain

Figure 10.1 The Life Cycle of Endospore-Forming Bacteria.



▶ اسپور ممکن است کروی یا بیضوی باشد. در برخی از موارد قطر آن از قطر باکتری بزرگتر بوده و باعث برجستگی در باکتری می شود. گاهی نیز قطر اسپور برابر با کوچکتر از باکتری است.

▶ باکتری‌هایی که قادر به تولید اسپورانند، بیشتر متعلق به باکتری‌های گرم مثبت هستند. از جمله باسیلوس ها و کلستریدیومها و اسپوروسارسینا. ریکتریای عامل تب Q که باسیل گرم منفی است نیز قادر به تولید اسپور می باشد.



لایه های متعددی در اسپور وجود دارد که باعث مقاومت آن می شود که به ترتیب از داخل به خارج عبارتند از :

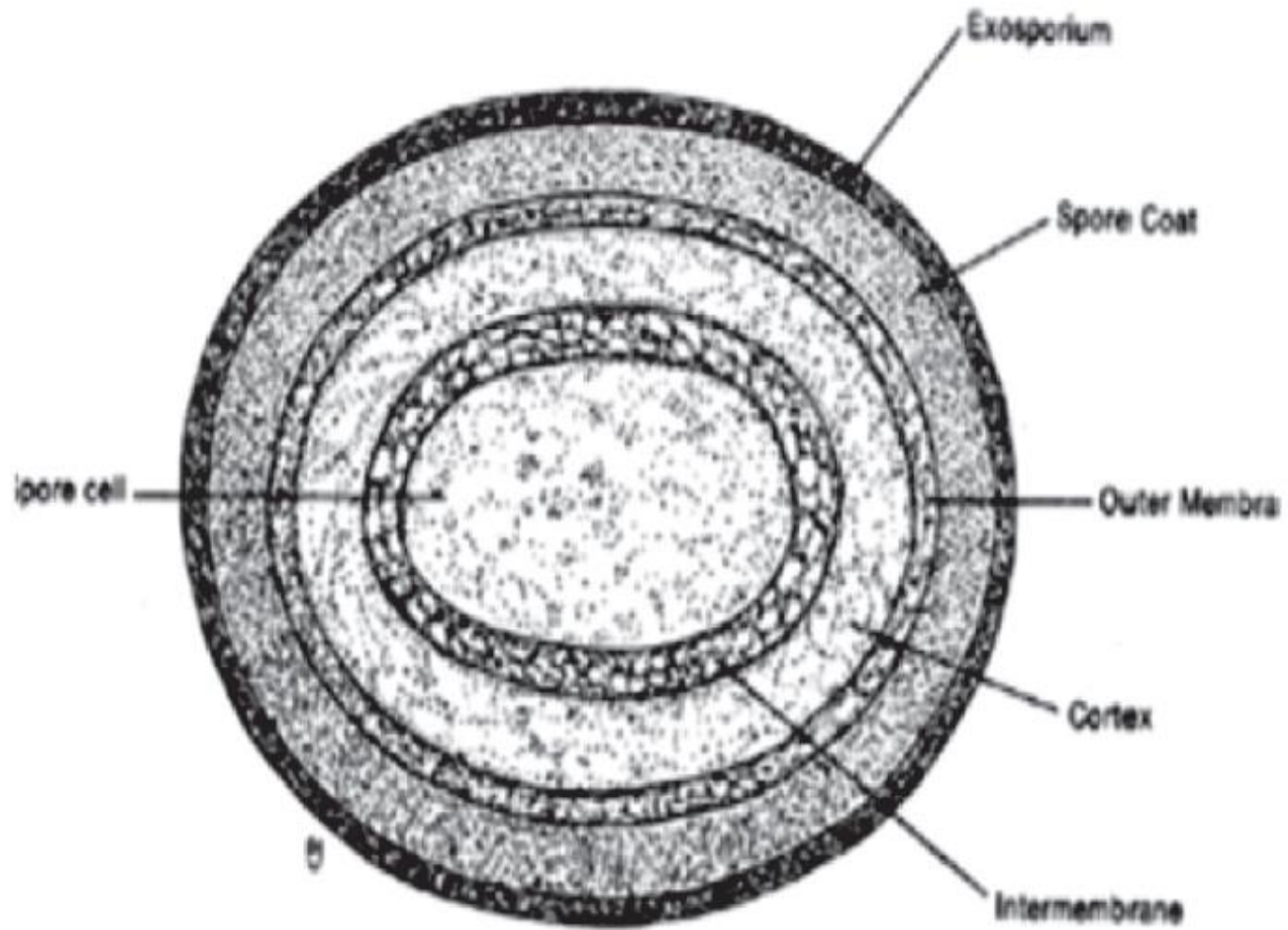
▶ core که حاوی مواد ژنتیکی و سایر مواد سیتوپلاسمی است.

▶ دیواره (core wall)، مانند دیواره باکتریها است که هنگام جوانه زدن منشاء دیواره سلولی باکتری خواهد بود.

▶ کورتکس (cortex)، نوعی پپتیدوگلیکان است.

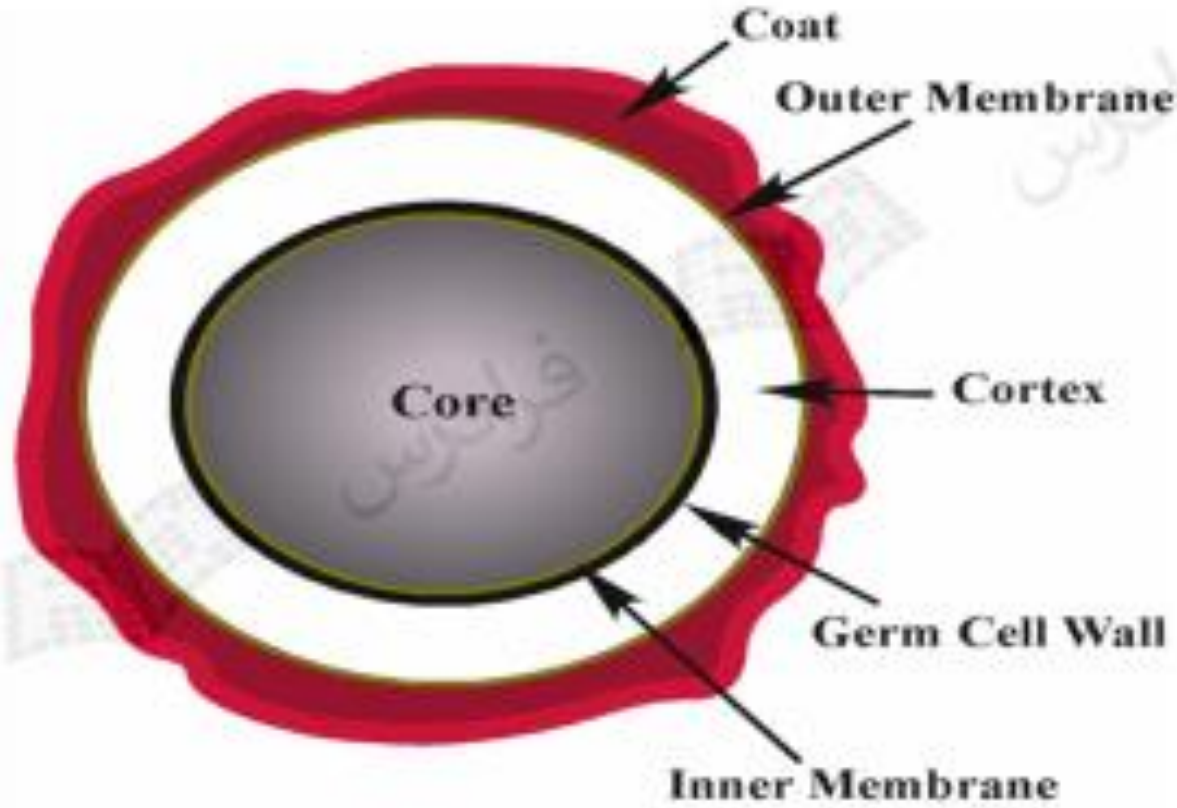
▶ spore coats ، متشکل از لایه های پروتئینی مخصوص اسپور است

▶ و بالاخره exosporium، که خارجی ترین لایه بوده و از یک پوشش پروتئینی نازک تشکیل شده است





## ساختمان اسپور



▶ تفاوت بین اندوسپور و سلول رویشی وجود این لایه ها ، همچنین وجود یک ماده شیمیایی به نام دیپیکولینیک اسید که در core وجود دارد و وجود مقدار بسیار زیادی یونهای کلسیم است که با ماده ذکر شده کمپلکس تشکیل داده که این کمپلکس در core حدود ۱۰٪ وزن خشک اندوسپور را تشکیل میدهد و وظیفه آن کاهش دسترسی به آب در داخل اندوسپور و در نتیجه کمک به دهیدراته کردن آن و از طرفی پایدار کردن DNA در برابر دنا توره شدن در برابر گرماست.

▶ دهیدراته شدن، خود سبب غیر فعال ماندن آنزیمها و مقاومت در برابر حرارت ، مواد شیمیایی و غیره می شود

▶ وجود لایه های مزبور مانع نفوذ رنگ به اسپور می شود و بدین ترتیب با روشهای معمول قابل رنگ آمیزی نبوده و از حرارت برای راندن رنگ به داخل اندوسپور استفاده می شود. زمانی که اندوسپور رنگ گرفت به راحتی رنگ را از دست نمی دهد. در این راستا، روشهای خاصی ابداع شده است .

# رنگ آمیزی اسپور

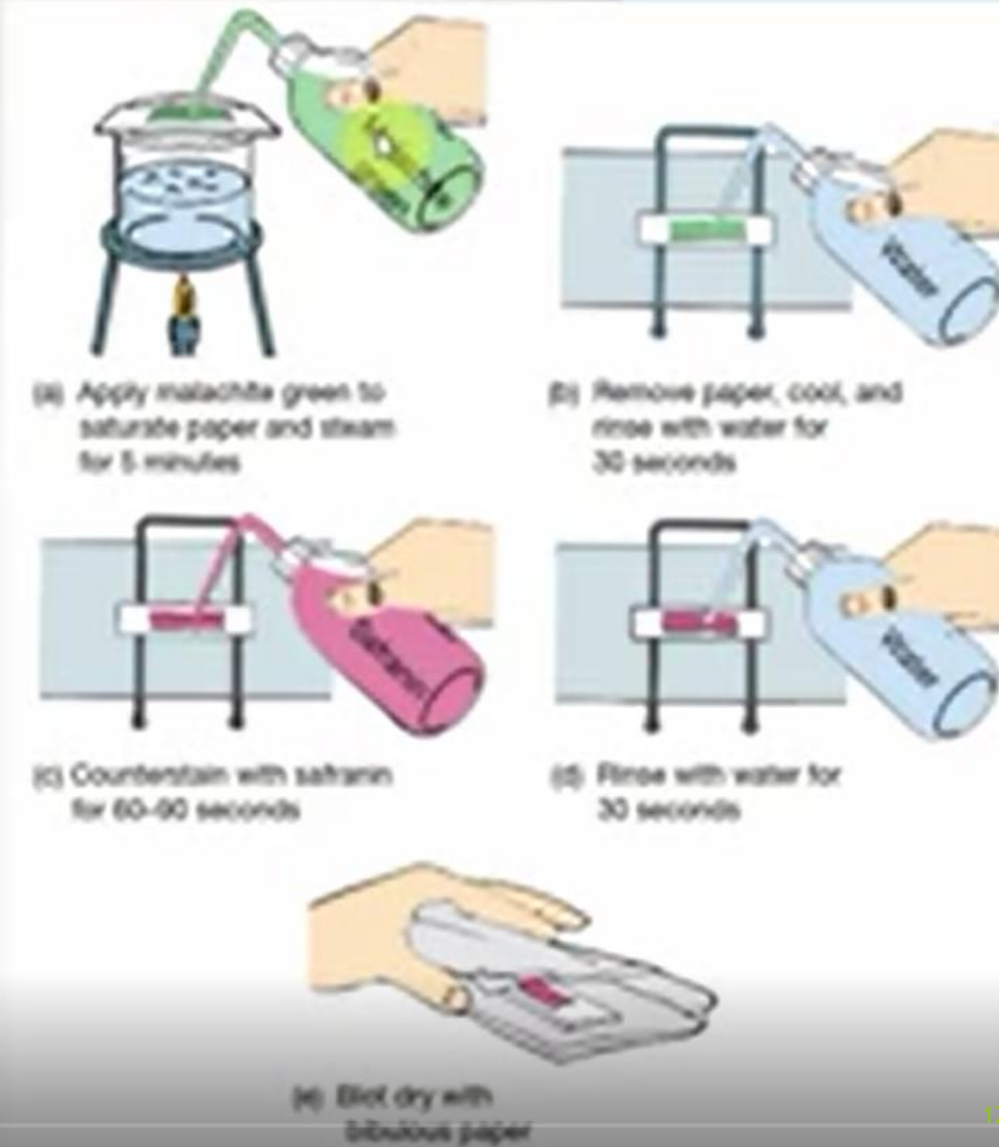
- ▶ رنگ آمیزی اسپور یک نوع رنگ آمیزی ویژه است که برای مشاهده اسپور باکتری ها به کار می رود.
- ▶ در بین باکتری ها دو جنس باسیلوس وکلستریدیوم، اسپوردار هستند.

# رنگ آمیزی شفر - فولتون

یکی از متداولترین شیوه‌های رنگ آمیزی اندوسپور، رنگ آمیزی شفر - فولتون یا Wirtz-Conklin است

	Spore producer	Spore nonproducer
Cells and spores prior to staining are transparent.		
After staining with Malachite green, cells and spores are green. Heat is used to force the stain into spores, if present.		
Decolorization with water removes stain from cells, but not spores.		
Safranin is used to counterstain cells.		

**3-105** THE SCHAEFER-FULSON SPORE STAIN • Upon completion, spores are green, and vegetative and spore mother cells are red.



# مواد و وسایل مورد نیاز

- ▶ ▶ لام
- ▶ ▶ ارلن کوچک
- ▶ ▶ چراغ گازی
- ▶ ▶ رنگ مالاشیت گرین
- ▶ ▶ رنگ سافرانین
- ▶ ▶ محیط کشت باسیلوس سرئوس

1

3

## روش رنگ آمیزی اسپور

1- ابتدا یک گسترش از باکتری روی لام تهیه کنید و آن را فیکس نمایید.

2- سطح لام را با محلول مالاویت گرین ۵٪ (سبز) پوشانده و لام را به مدت 3 تا 5 دقیقه حرارت می دهند تا بخار متساعد شود اما رنگ نجوشد.

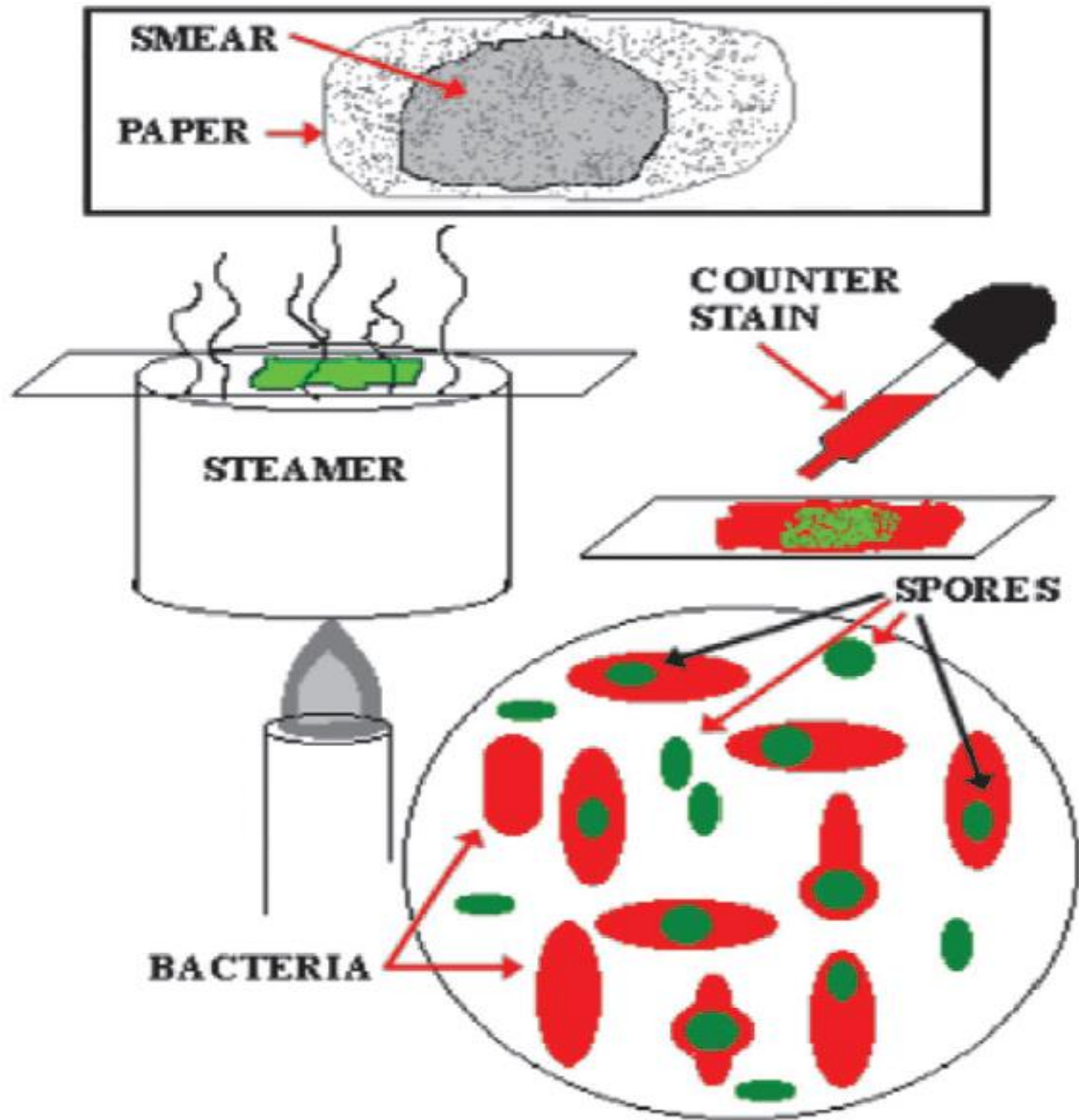
3- لام را سرد کنید بعد با آب شستشو دهید.

4- رنگ سافرانین (قرمز) را به گسترش اضافه کرده و بگذارید ۳۰ ثانیه روی آن بماند.

5- رنگ را خالی کرده و لام را بشوئید.

6- خشک شدن لام و مشاهده در زیر میکروسکوپ

در این روش رنگ آمیزی اسپورها به رنگ سبز و فرم های دیگر سلول باکتری به رنگ قرمز دیده خواهند شد.



## نکته ها

- ▶ [?] اسپور شکل مقاوم باکتری ها است و نسبت به رنگ ها نفوذ ناپذیر است بنابراین باید از بخار آب جوش برای نفوذ پذیری اسپور و رنگ شدن آن استفاده کرد.
- ▶ [?] هنگامیکه زیر لام، بخار آب جوش جمع شد روی سطح گستره را با رنگ مالاشیت گرین به مدت ۵ دقیقه بپوشانید.

## یادآوری:

- ▶ الف) بخارات مالاشیت گرین سمی است، بنابراین هنگامی که رنگ روی لام در حال بخار کردن است باید دهان و بینی را دور نگه داشت و از استنشاق بخارات پرهیز نمود.
- ▶ ب) رنگ روی لام نباید در مدت ۵ دقیقه لازم برای رنگ شدن اسپور خشک شود. برای این کار زمانی که رنگ در حال خشک شدن بود دوباره رنگ مالاشیت گرین روی گستره ریخته شود.
- ▶ ج) هنگام ریختن رنگ روی گستره دقت شود که رنگ روی میز کار و لوازم ریخته نشود.





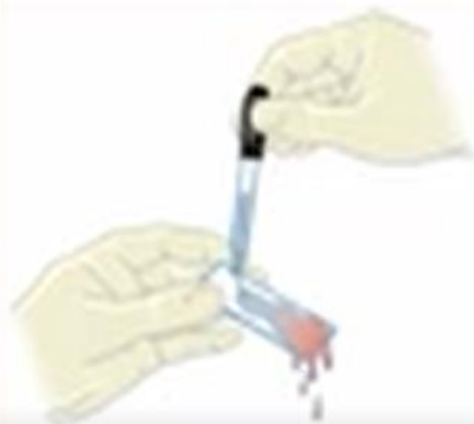
1 Fix the smears with malachite green and steam over a beaker of water placed on a hot plate.



2 Cool and wash off stain with tap water. The water also serves as the decolorizing agent.



3 Counterstain with safranin for 30 seconds.

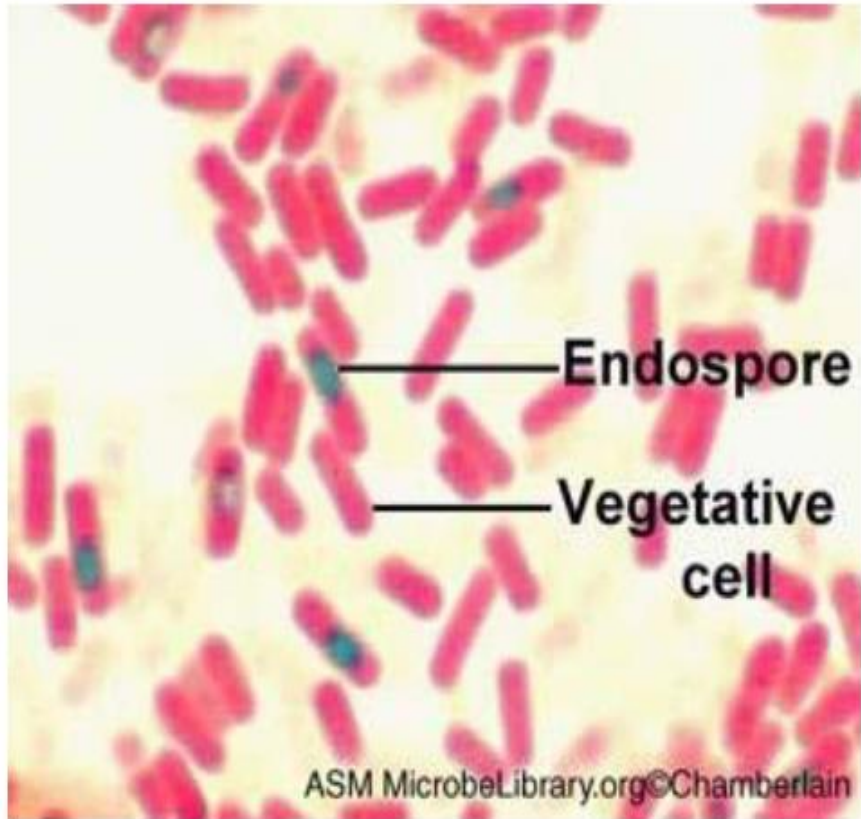


4 Wash off the safranin with tap water.



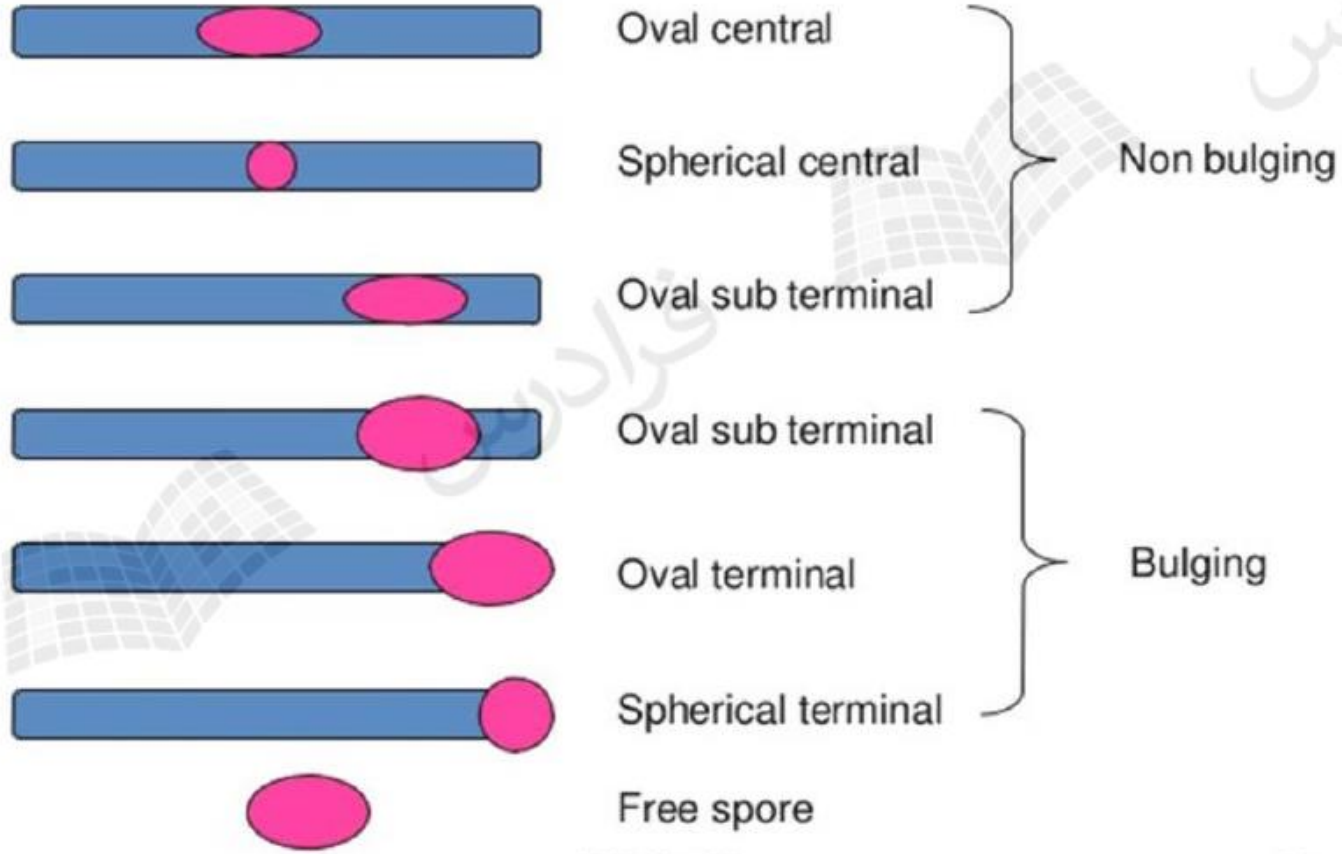
5 Blot the slide dry with bibulous paper.

در این روش رنگ آمیزی اسپورها به رنگ سبز و فرم های دیگر سلول باکتری به رنگ قرمز دیده خواهند شد.



# انواع شکل اسپور

## Shape & position of bacterial spore



# The Endospore Stain



# با تشکر از حسن توجه شما

