



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، آزمایشگاه میکروبیولوژی



آزمایشگاه میکروبیولوژی پایه

رنگ آمیزی اسپور

مقدمه

2

- برخی از باکتریها در شرایط نامناسب به اسپور تبدیل می شوند چون اسپور نسبت به شرایط بد مقاوم تر است و کشت باید کهنه باشد تا اسپوری نیز تولید کرده باشد. از رنگهای ملاشیت بزکه اسپور را به رنگ سبز و رنگ سافرانین که اسپور را قرمز قهوه ای میکند اسفاده میکنیم.
- آندوسپورهای (هاگهای) باکتریایی ، ساختارهای کروی و یا بیضی شکل کوچکی هستند که نسبت به دمای بالا ، تشعشع و وجود مواد شیمیایی از قبیل ضد عفونی کننده ها بسیار مقاوم هستند . هاگها به شکل درون سلولی توسط برخی از باسیلها تولید می شوند به همین دلیل به آنها آندوسپور می گویند. آندوسپورها از سلولهای مولد کوچکترند و مشخصات متفاوتی دارند که قابل توجه تر از همه مقاومت زیاد آنها نسبت به شرایط نامساعد است .
- هاگ بخشی از چرخه زندگی بعضی از جنسها باکتریها می باشد و در واقع هاگ یک مرحله خفته یا غیر فعال از زندگی باکتری است . هاگزایی در باکتریها بر خلاف آنچه در بعضی گیاهان عالی دیده می شود ، نوعی تکثیر تولید مثلی نیست. زیرا هر باکتری فقط یک هاگ تولید می کند و هر هاگ به نوبه خود به یک سلول رویشی (باکتری فعال) تبدیل می شود. بنابراین در گونه های مولد هاگ مانند سایر گونه های باکتریایی تکثیر از طریق تقسیم دوتایی باکتری انجام می شود.

مقدمه:

اسپور:

اسپور ساختار مقاومی در سه گروه از باکتریهاست : **Colesteridium , Bacillus** و **Sporosarcina**. تنها این سه گروه توانایی تولید اسپور را دارند . که تولید اسپور جزء لاینفک زندگی این باکتریها محسوب می شود. معمولا این باکتریها در شرایط نامساعد محیطی تمایل به ایجاد اسپور یا هاگ دارند که آنها را در برابر عوامل نامساعد فیزیکی و شیمیایی محیط (حرارت 100 درجه، حرارت پاستوریزاسیون، حرارت تندالیزاسیون و...) مقاوم می سازند. اصطلاحا مرحله اسپور گذاری را **sporulation** می گویند. در مرحله اسپور سازی از یک منبع انرژی به نام PHB (پلی هیدروکسی بوتیرات) استفاده می کنند.

وجود هاگ در کشت باکتریها برای تشخیص و تفکیک آنها اهمیت دارد ، زیرا تشکیل هاگ اساسا محدود با باکتریهای گرم مثبت میله ای شکل در دو جنس باسیلوسها و کلسترییدیومها است .

اندازه و محل قرار گرفتن هاگ در داخل باکتری نیز برای تشخیص ارگانیسرها اهمیت دارد مثلا هاگها می توانند در مرکز ، نزدیک به انتها و یا در انتهای یاخته قرار بگیرد. قطر هاگ می تواند بزرگتر و یا کوچکتر از خود باکتری باشد . اگرهاگ قطر بیشتری نسبت به یاخته رویشی داشته باشد موجب تورم یا بزرگی و تغییر شکل باکتری می شود

ماهیت شیمیایی اسپور:

- 4 لایه اطراف اسپور را احاطه می کنند که از خارج به داخل شامل:
- خارجی ترین لایه، **اگزوسپوریوم**. لایه دوم، **spore coat** ، لایه سوم **cortex** و لایه مرکزی، **core** است. **core** شامل پپتیدو گلیکان و غشای سیتوپلاسمی است و در مرکز **core**، سیتوپلاسم، DNA و RNA قرار دارند.
- قسمت اعظم اسپور از جنس کلسیم و دی پیکلونیک اسید است و وجود این دو باعث استحکام اسپور می گردد. همچنین یون منگنز و اسید آمینه سیستئین نیز به مقدار زیادی موجودند. سیستئین موجب مقاومت اسپور در برابر اشعه های X و UV می گردد. آب و فسفر و فسفات نیز به مقدر بسیار کمی در ساختار شیمیایی اسپور دیده شده است.
- باکتریهای اسپور دار در میکروبیولوژی غذایی بسیار مورد توجه قرار می گیرند، بویژه در صنایع کنسرو سازی. این باکتری ها موجب مسمومیت های غذایی می گردند و گاهی با تولید توکسین باعث بروز علائمی همچون تهوع ، اسهال و استفراغ می شوند.

باکتری های اسپور دار:

- عامل سیاه زخم - دارای اسپور مرکزی **Bacillus anthracis**
- عامل کزاز - دارای اسپور نزدیک انتهایی **Colesteridium tetani**
- عامل بوتولیسم - دارای اسپور نزدیک انتهایی **Colesteridium botulinum**
- عامل قانقاریا - (gasgengrene) دارای اسپور نزدیک انتهایی **Colestridium prefrigenes**

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.

رنگ آمیزی اسپور:

- اسپور ها بوسیله رنگ آمیزی معمولی به دلیل ساختارهای لایه ای اسپور و غیر قابل نفوذ بودن برخی رنگ ها، رنگ نمی گیرند بنابراین نیاز به رنگ آمیزی اختصاصی دارند که با اعمال حرارت بر روی رنگ ها به منظور نفوذ پذیری بیشتر صورت می گیرد.
- رنگ آمیزی اسپور ها به دو روش **مالاشیت گرین** و **مولر** انجام می گیرد. البته معرف مولر ماده ای سمی است و این روش را در آزمایشگاه انجام نمی دهیم.

مواد و وسایل

9

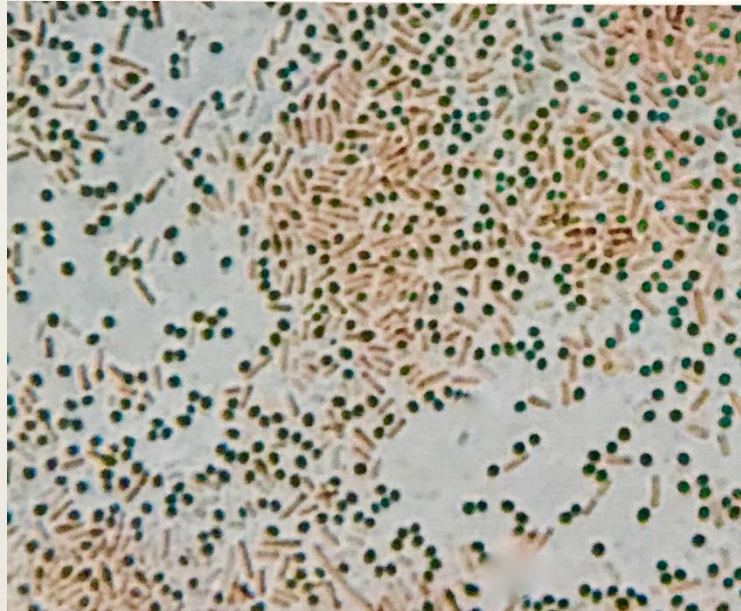
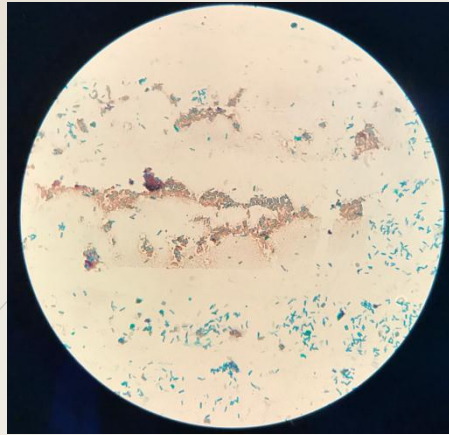
- 1- لوپ یا فیلدوپلاتین
 - 2- لام شیشه ای تمیز
 - 3- تشتک مخصوص رنگ آمیزی
 - 4- آبقشان (پی ست)
 - 5- کشت های میکروبی 24 ساعته باسیلوس
 - 5- محلول های رنگی
- مالاشیت سبز
سافرانین

- ۱- با لوپ استریل یک کلنی باکتری بردارید و درون یک قطره آب بروی لام تشکیل سوسپانسیون دهید
- ۲- صبر کنید تا سوسپانسیون خشک شود
- ۳- فروتی را با شعله ۳ بار به مدت ۳ ثانیه فیکس کنید
- ۴- لام را روی تشتک گذاشته و با پنس پنبه الکلی را گرفته آتش زده و زیر لام بگیرید و به مدت ۵ دقیقه رنگ مالاشیت سبز را روی فروتی قرار دهید (اگر رنگ در حال تبخیر یا جوشیدن بود شعله را عقب بگیرید و پس از رفع شدن دوباره نزدیک کنید و اگر رنگ در حال چسبیدن بود روی لا رنگ بریزید)
- ۵- رنگ را از لام بشوید و پنبه را خاموش کرده و دور بیاندازید
- ۶- سافرانین را به مدت ۱ دقیقه روی لام قرار دهید
- ۷- لام را بشوید و منتظر شوید تا خشک شود
- ۸- توسط عدسی ۱۰ و عدسی ۱۰۰ با روغن امرسیون لام را مشاهده کنید
- ۹- در پایان کار لام را درون سابلون بیاندازید و عدسی ۱۰۰ را با پنبه الکلی تمیز کنید

رنگ آمیزی اسپور:

➤ روش مالاشیت گرین (شیفر فولتون):

- 1. تهیه گسترش از باکتری باسیلوس آنتراسیس
- 2. خشک شدن و فیکساسیون با اعمال حرارت
- 3. لام را بر روی بشر حاوی آب جوش قرار داده و مالاشیت گرین را به مدت **5 الی 10 دقیقه** بر روی لام می ریزیم تا تحت حرارت قرار گیرد.
- 4. شستشو با آب
- 5. سافرانین 5% به مدت **5 دقیقه**
- 6. شستشو با آب
- 7. خشک شدن لام در هوا و مشاهده با عدسی 100



تهیه کننده : سهیلا عباسی

نتیجه

- - باکتری ها به رنگ قرمز و اسپور ها به رنگ سبز دیده می شوند.
- - حالت اسپور های داخلی، خارجی و اسپور بزرگ تر از باکتری قابل مشاهده است.





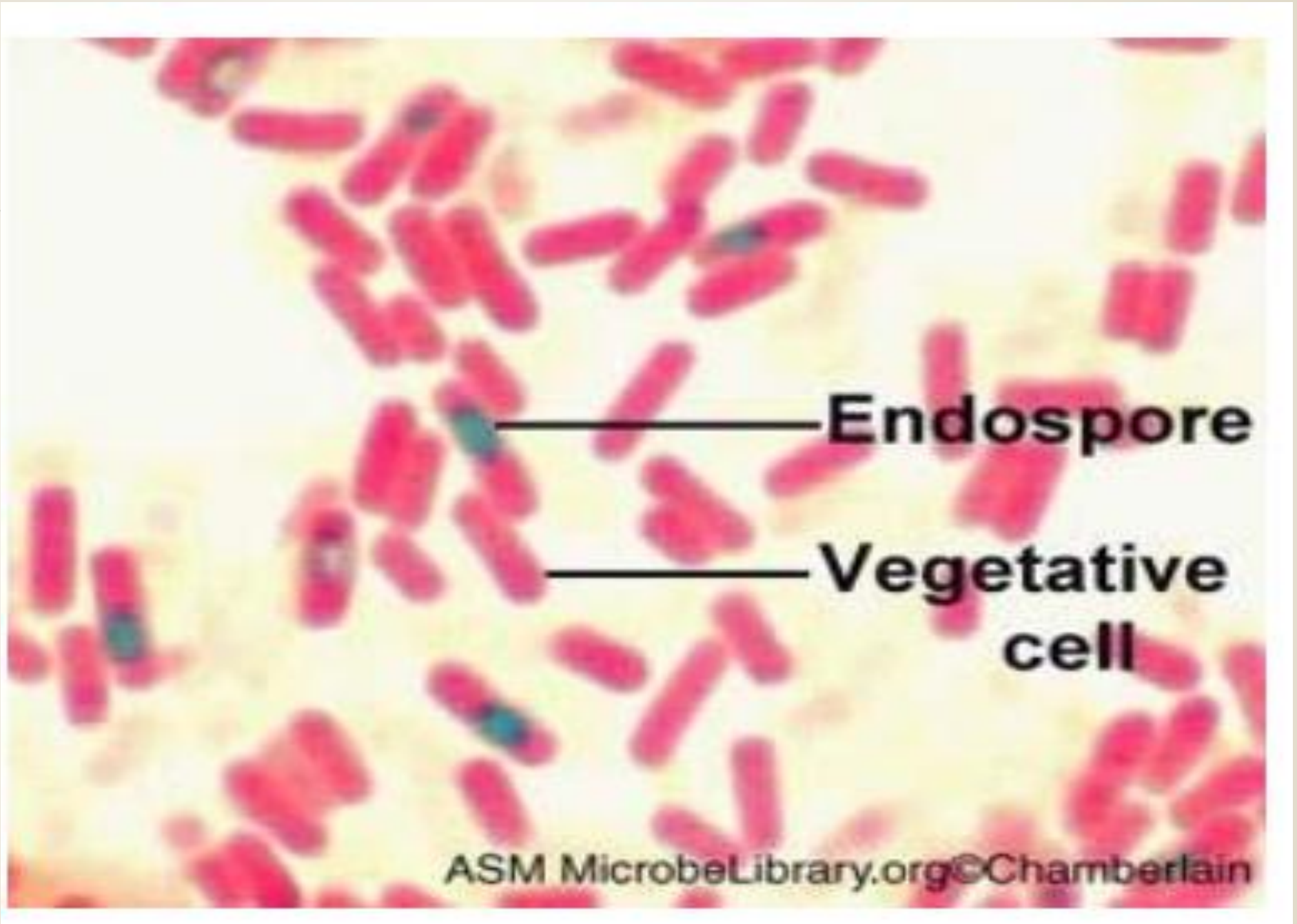
➤ **قرار گیری اسپور در سلولهای رویشی باکتری ها:**

➤ به 3 صورت :

➤ 1. مرکزی Central:

➤ 2. نزدیک انتهایی Subterminal:

➤ 3. انتهایی Terminal:





تهیه کننده : سهیلا عباسی