



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، آزمایشگاه میکروبیولوژی



آزمایشگاه میکروبیولوژی پایه

رنگ آمیزی ساده

آزمایش مستقیم نمونه ها

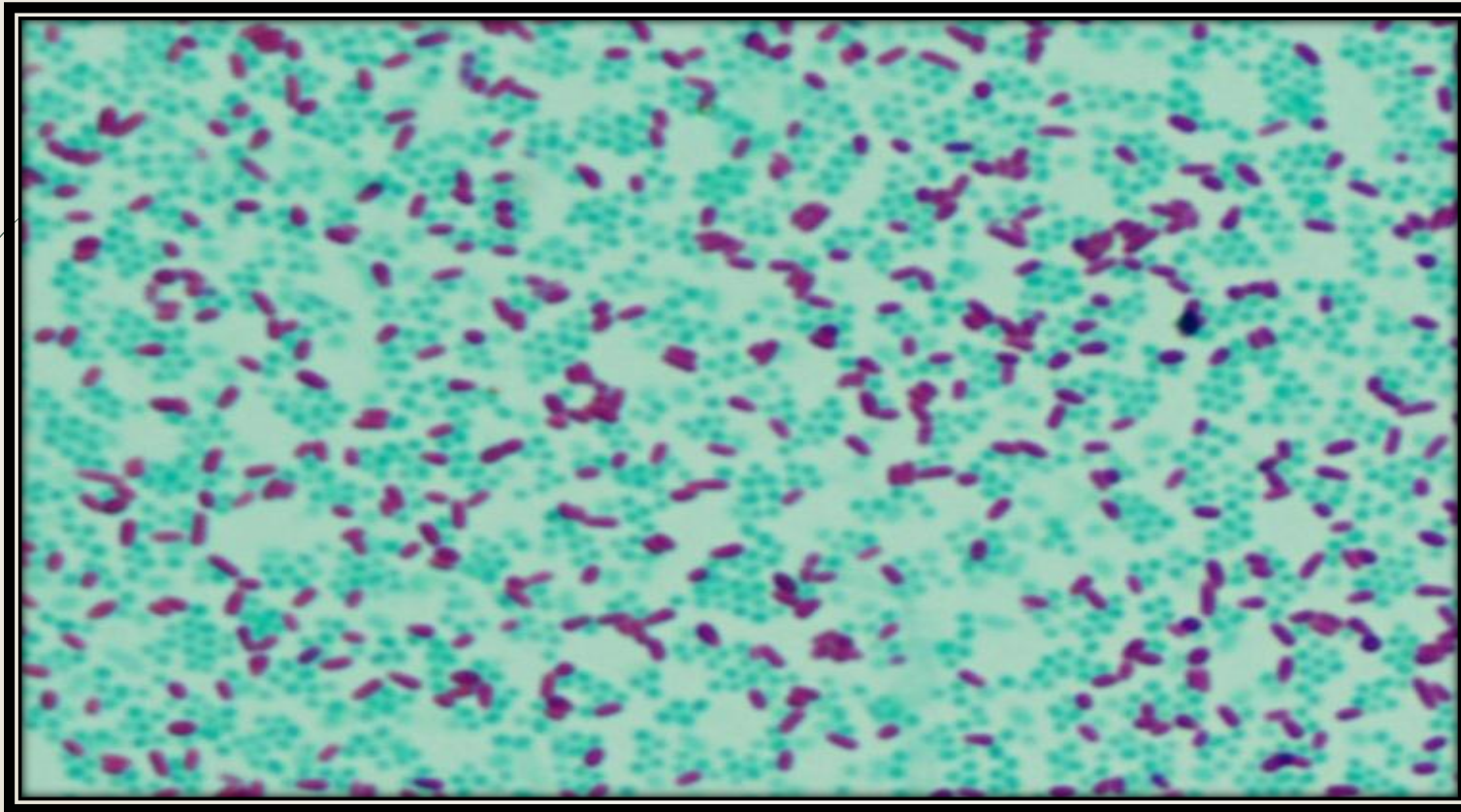
- مشاهده مستقیم لام یکی از مهمترین و اصلی ترین مراحل تشخیص در آزمایشگاه باکتریولوژی است. در حالت کلی در آزمایشگاه در دو حالت لام تهیه می شود:
- الف) تهیه لام از محیط کشت باکتری و مشاهده کلنی ها:
- معمولاً بعد از جداسازی باکتری ها در محیط کشت و رشد کلنی های خاص در محیط کشت، برای تشخیص نوع باکتری و تصمیم گیری برای ادامه مراحل آزمایش، باید لام تهیه شود و رنگ آمیزی گرم انجام گیرد.
- ب) تهیه لام از بیماران فرستاده شده به آزمایشگاه قبل از کشت :
- نمونه مایع نخاع، نمونه زخم و غیره در برخی موارد خاص باید بعد از دریافت نمونه ها هرچه سریع تر از آن ها لام مستقیم تهیه کرد.
- آزمایش مستقیم نمونه ها شامل تهیه لام و رنگ آمیزی می باشد.

Simple Staining and Bacterial Cell Morphology

3

Preparing a smear for staining

(The following procedure is used for all of our staining)



تهیه کننده : سهیلا عباسی

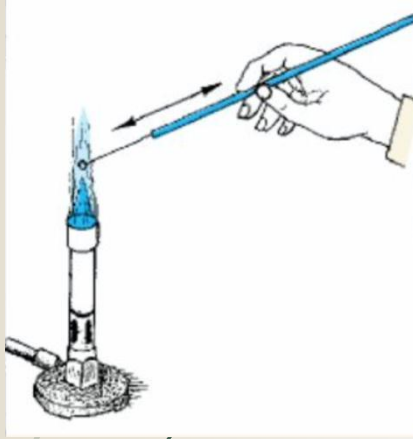
مواد و وسایل

5

- 1- لوپ یا فیلدوپلاتین
- 2- لام شیشه ای تمیز
- 3- تشتک مخصوص رنگ آمیزی
- 4- آبقشان (پی ست)
- 5- کشت های میکروبی 24 ساعته روی نوترینت آگار شامل باکتری های زیر:
 - باسیلوس سرئوس
 - اشریشیا کلی
 - استافیلوکوکوس آرتوس
- 5- محلول های رنگی
 - کریستال ویوله
 - متیلن بلو
 - سافرانین

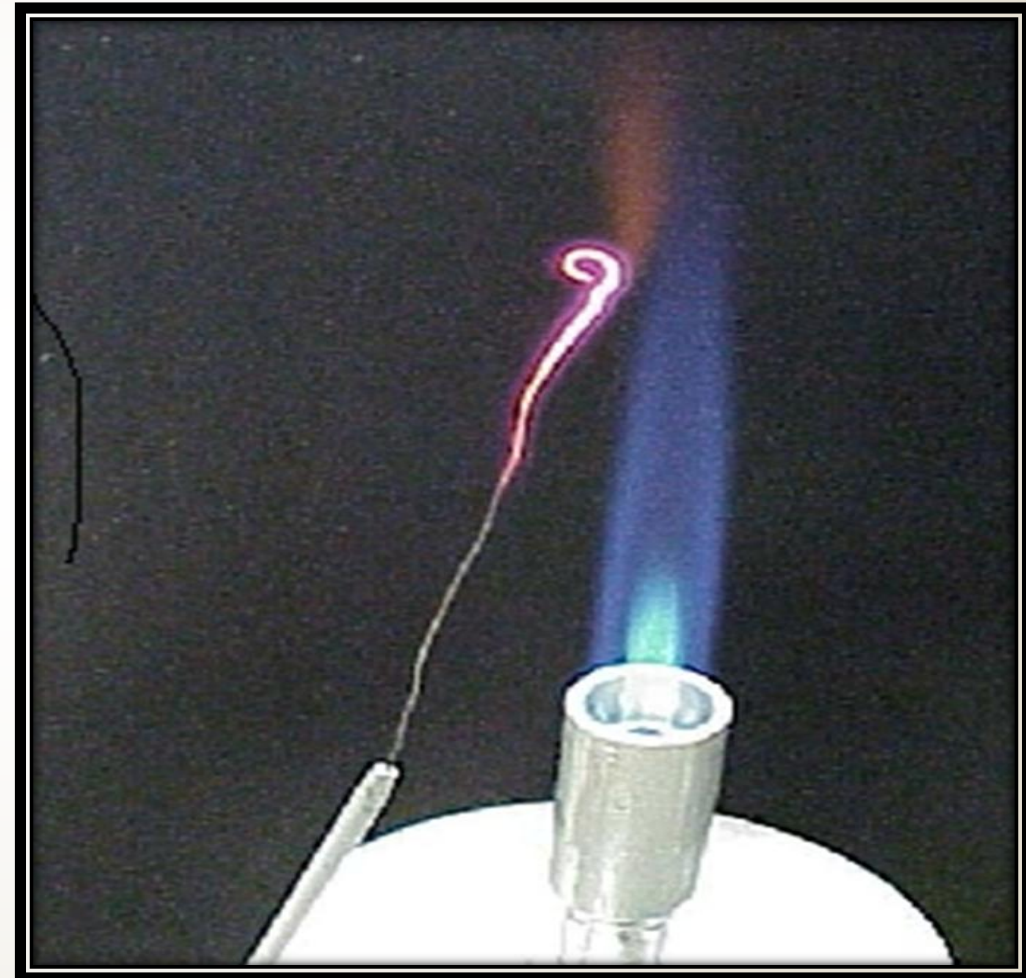
روش کار

6



- ۱- یک قطره متوسط از آب مقطر بر روی لام بچکانید.
- ۲- لوپ را توسط حرارت شعله مستقیم مانند شکل رو به رو استریل کنید به گونه ای که سر لوپ ملتهب شود.
- ۳- لوپ را در محدوده ۳۰ سانتی متری شعله نگه دارید تا به آرامی خنک شود.
- ۴- در پلیت را در محدوده شعله نیمه باز کنید و توسط لوپ یک کلنی را بردارید.
- ۵- با لوپ کلنی را در قطره آب حل کنید تا کدر شود.
- ۶- صبر کنید تا سوسپانسون روی لام خشک شود.
- ۷- لام را ۳ بار و هر بار به مدت ۳ ثانیه از روی شعله رد کنید.
- ۸- روی گستره (فروتی) چند قطره کریستال ویوله یا سافرانین بریزید.
- ۹- یک دقیقه بعد لام را با آب مقطر شست شو دهید تا رنگ ها بروند و فقط گستره رنگی باشد.
- ۱۰- بعد از خشک شدن لام آن را با میکروسکوپ مشاهده کنید.

1. Flame (sterilize) your inoculating loop/needle before *and* after use. Heat from base to tip. Be sure to get the entire wire red hot.



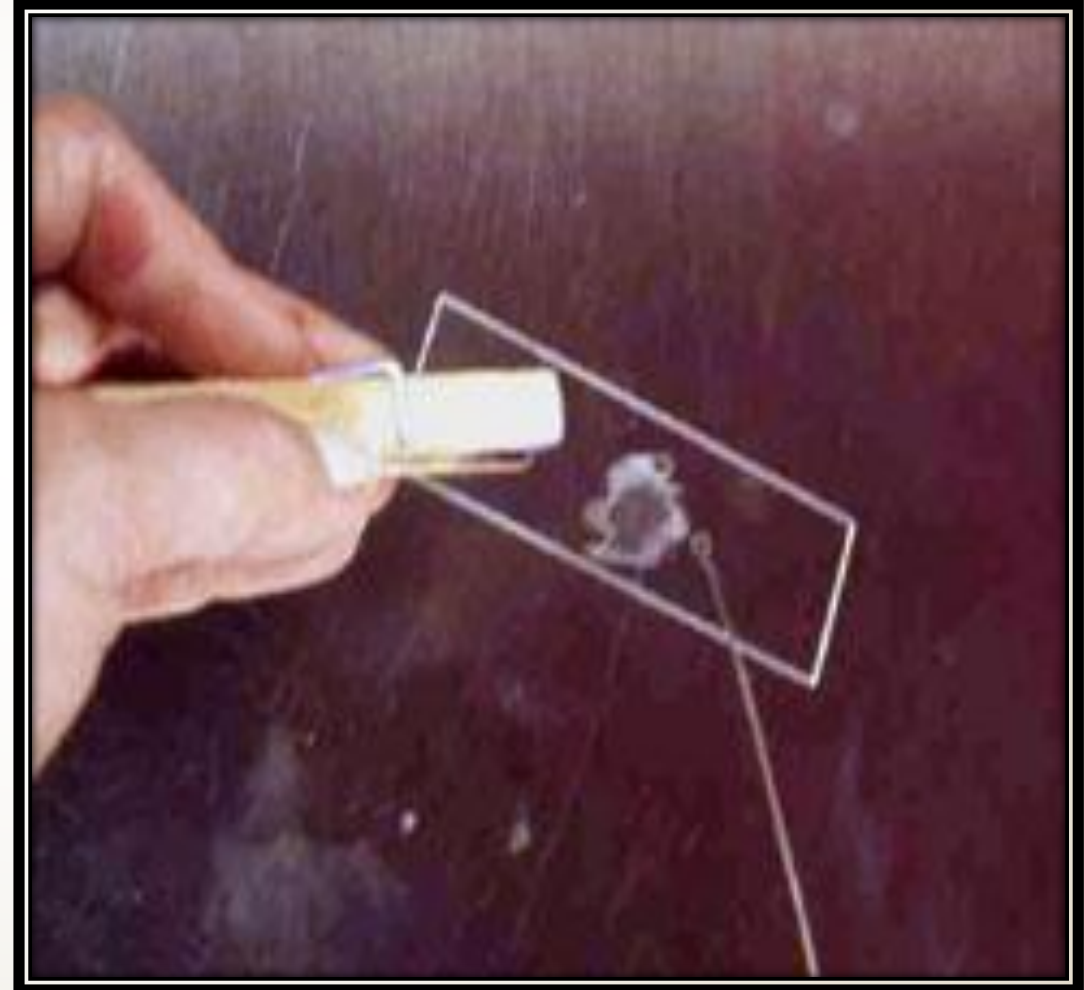
2. Prepare the smear

- a. If you have a solid culture (agar colony), place a *small* drop of distilled water on a clean slide. Drag the sterile inoculating needle tip through the *edge* of an isolated colony.
- b. Gently spread the mixture into a circle the size of a quarter.

(A loop of liquid culture can be placed directly on the slide and spread out.)



3. Let the smear air dry completely. Do not apply heat while drying because this can lyse the cells.



4. Heat-Fix the smear.

Smears are heat-fixed by quickly passing the slide through a flame (smear side up), two or three times.

This causes the microbes to stick to the slide and not get washed off during the staining process.



5. Stain the smear.

Place the slide on a staining rack over the sink. Flood the smear with stain and let it sit for 60-90 seconds. Rinse gently and *blot* dry.



6. Observe the slide under low and high-dry lenses to locate, center, and focus the image.

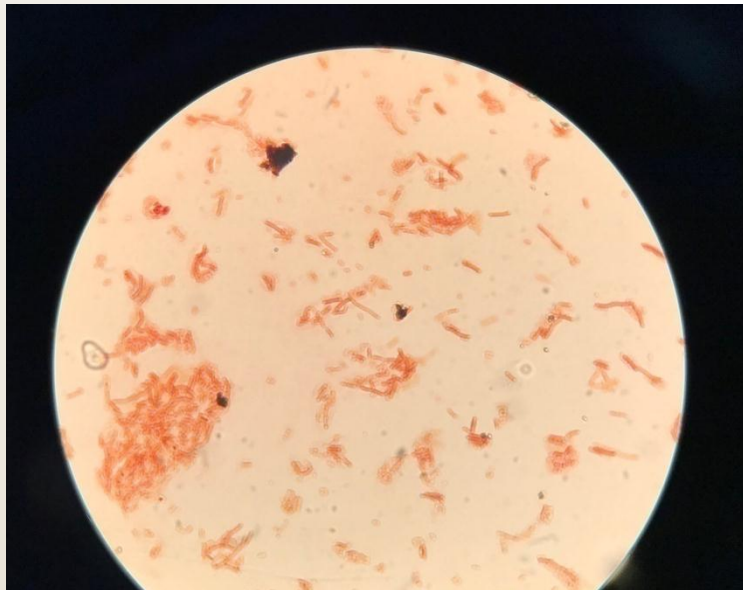
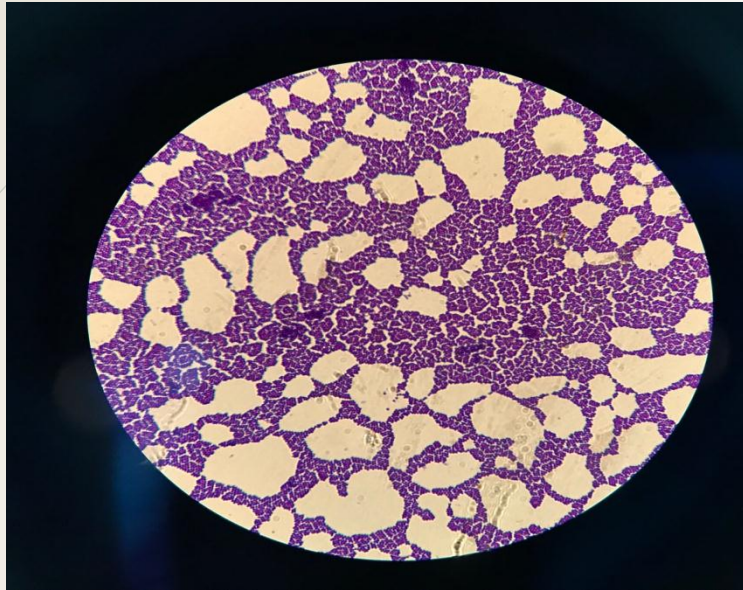
Then, place a drop of oil directly on the stained smear (no cover slip). Turn the oil immersion lens into position and fine focus to observe the cells.



نتیجه

استافیلوکوک

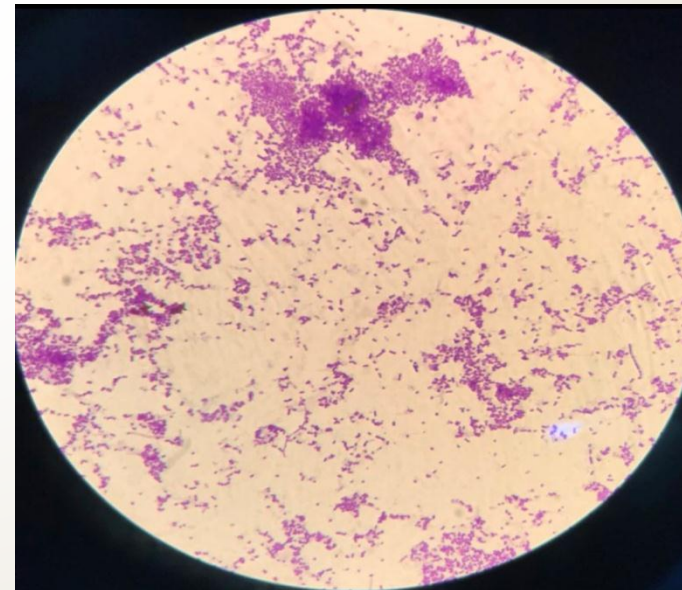
13



باسیل

➤ - تشخیص باکتری ها با رنگ آمیزی ساده تر است.

➤ - باکتری هایی با شکل های استافیلوکوکوس، کوکسی و باسیل مشاهده شد.



کوکسی

زمینه ی نظری

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 :

۱- 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.

۲- مارپیچی؛ این باکتری ها مارپیچی شکل می باشند و اندازه آن ها متفاوت است.

۳- کوکسی یا کروی شکل؛ این باکتری ها کاملاً گرد یا بیضی شکل هستند و به طور متوسط اندازه آن ها ۰.۵ تا ۱ میکرون است. اکثر باکتری ها با تقسیم دو تایی و تشکیل دو سلول جدا از هم که فیزیولوژی مستقل دارند، تولید مثل میکنند ، 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 میتوان 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 زنجیره های شکل در کنار یکدیگر قرار می گیرند.

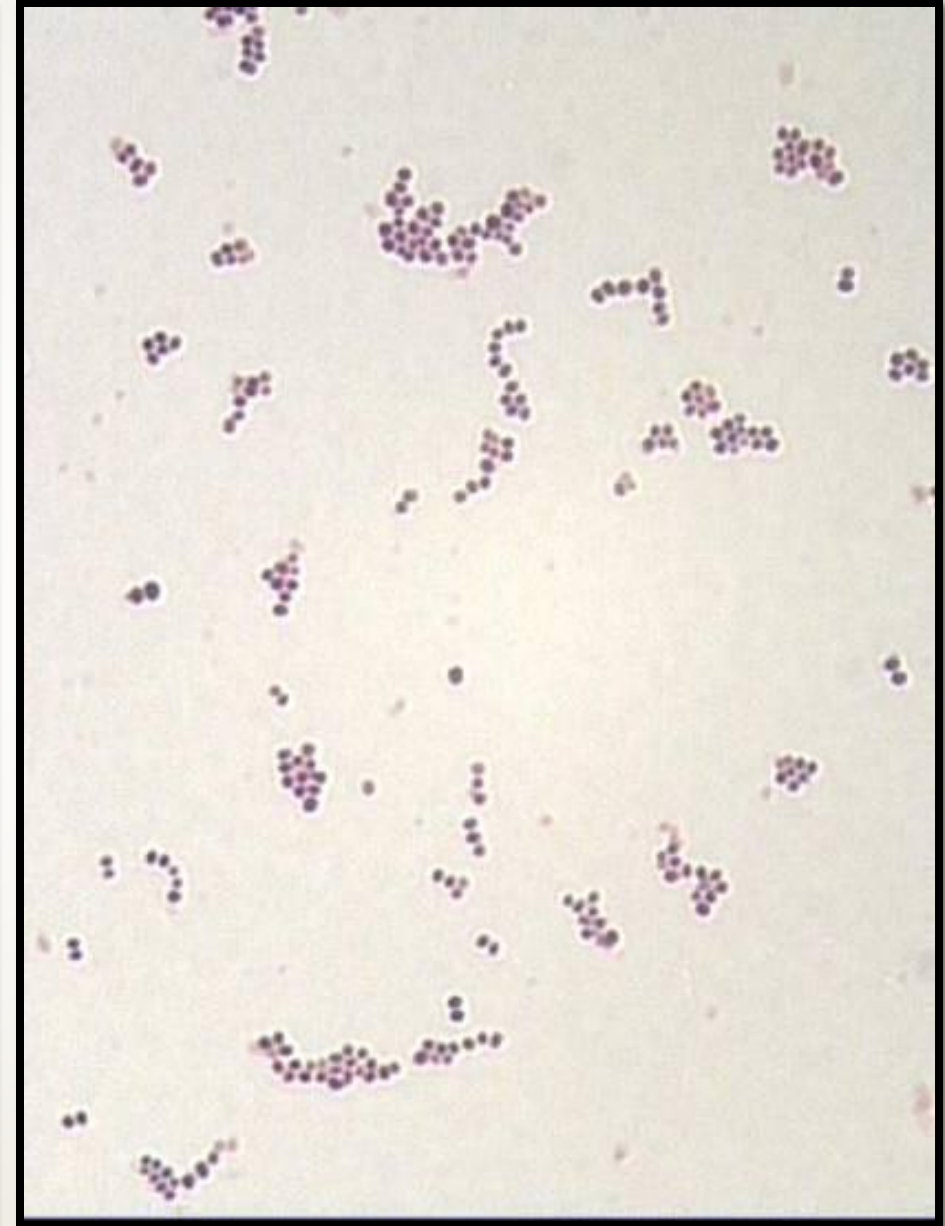
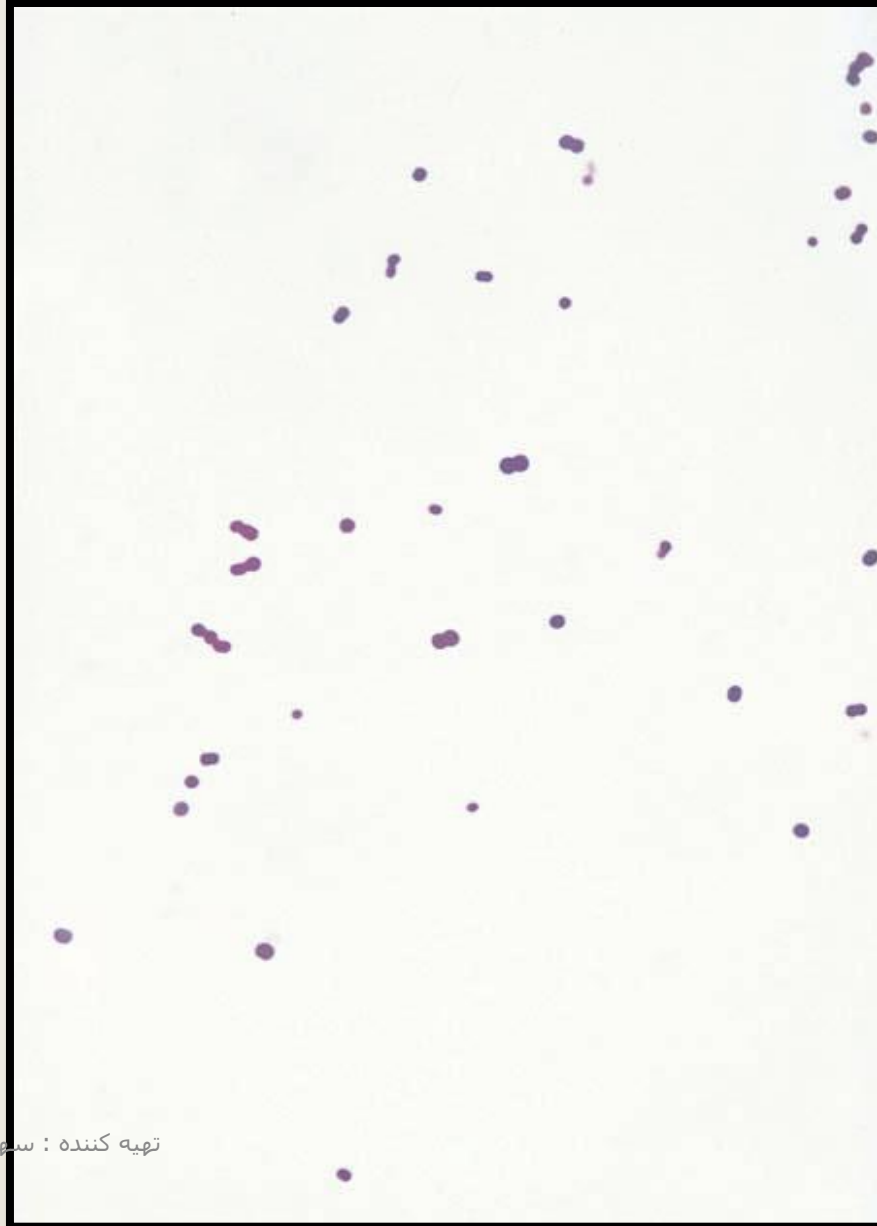
- دیپلوکوک؛ این باکتری ها به طور عمده به شکل دوتایی در کنار یکدیگر قرار می گیرند.

- سارسینا؛ این باکتریها به صورت ۸ تایی و حتی بیشتر از این تعداد مشاهده می شوند.

۴- بعضی از باکتری ها حالت بین گرد و میله ای را دارند که به این باکتری ها کوکوباسیل می گویند.

Coccus (cocci pl.)

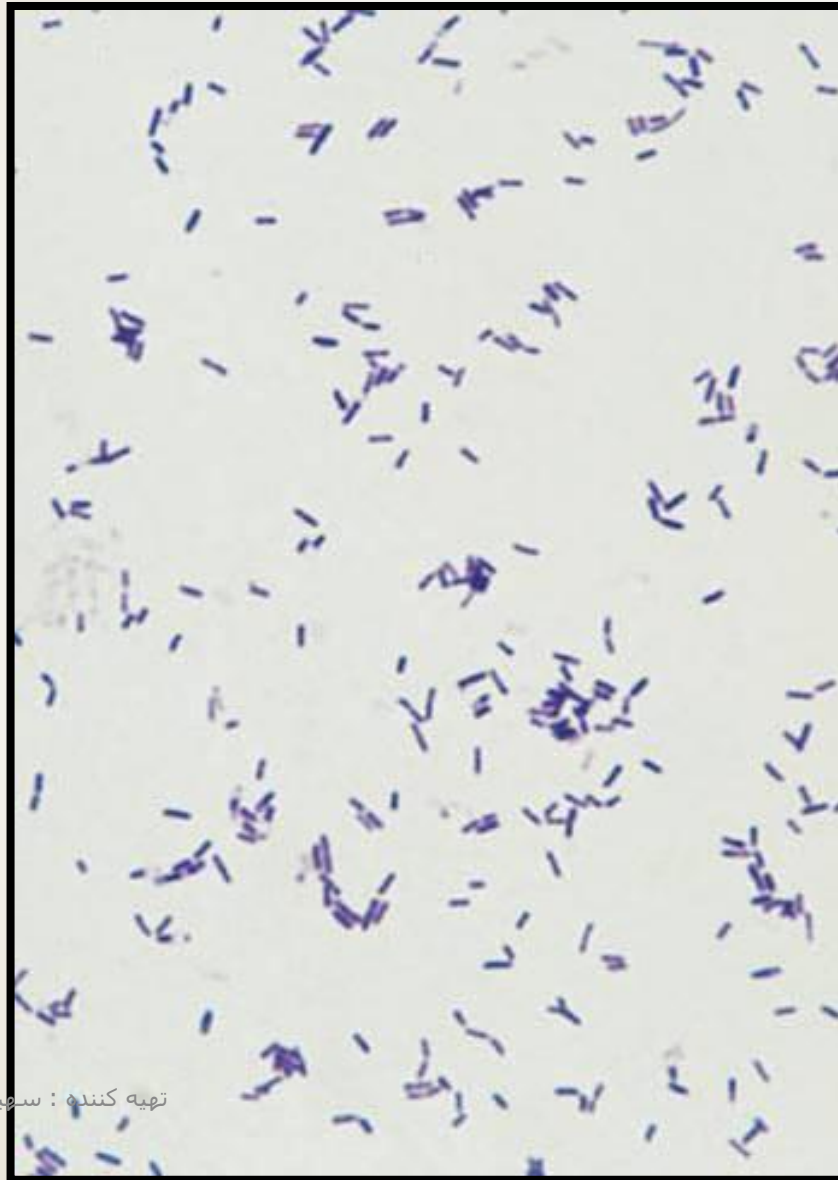
15



تهیه کننده : سهیلا عباسی

Bacillus (Bacilli pl.)

16

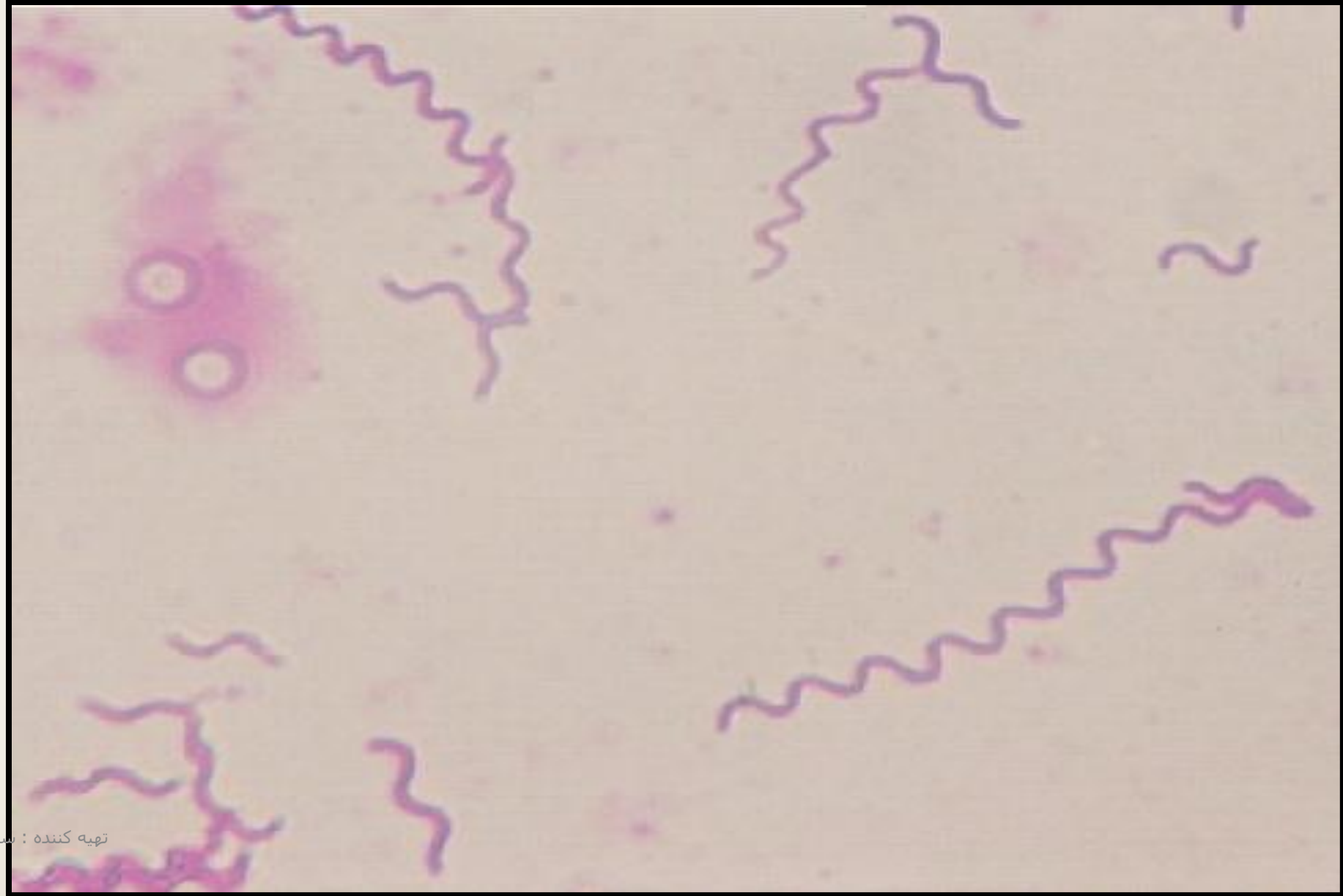


تهیه کننده : سهیلا عباسی



Spirillum (Spirilli pl.)

17



تهیه کننده : سهیلا عباسی

Name the bacterial morphologies (shapes and arrangements) seen here.

Answers:

1. Spirillum
2. Coccus
3. Bacillus
4. Diplobacillus
5. Streptobacillus
6. Diplococcus



