



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، آزمایشگاه میکروبیولوژی



# آزمایشگاه میکروبیولوژی پایه

رنگ آمیزی کپسول

تهیه کننده : سهیلا عباسی

# کپسول باکتری

برخی از باکتری ها ماده لزجی ترشح می کنند که در خارج آن متمرکز شده و دیواره باکتری را می پوشاند که کپسول نامیده می شد. کپسول ساختمان متراکم و مشخصی دارد که با رنگ آمیزی مخصوص می توان آن را در اطراف باکتری مشاهده نمود. هنگامی که پلیمر خارج سلولی به صورت متراکم و دارای حدود واضح و مشخص باشد آن را کپسول می نامند و در مواقعی که ماده مذکور متراکم نبود و به صورت الیاف در هم و تا حدودی گسسته از فیبریل های خارج سلولی تشکیل شده باشد، گلیکوکالیکس ( Glycocalix) نامیده می شود. در برخی باکتری ها مقادیر زیادی از ماده مذکور ساخته می شود که ظاهرا از سلول جدا می شود و به نظر می رسد که باکتری در این مواد فرو رفته که در این حالت چنین موادی را قشر لعابی ( Slime Layer) می نامند.

# کپسول باکتری

جنس کپسول در اکثر موارد از پلی ساکارید است و تنها مورد استثناء، مربوط به باسیلوس آنتراسیس (عامل سیاه زخم) است که دارای کپسول پلی پپتیدی (پلیمر اسید گلوتامیک راست بر) است. باسیلوس مگاتریوم دارای کپسولی از پلی ساکارید و پلی پپتید است همچنین جنس کپسول استرپتوکوکوس گروه A, C لنسفید از اسید هیالورونیک و کپسول لکونوستک مزانتروئیدس از دکستران (پلیمر گلوکز) است. کپسول در شرایط نامساعد از خشک شدن باکتریها جلوگیری می نماید و از طرفی نیز به عنوان لایه محافظ عمل کرده و باکتری ها را در برابر عمل بیگانه خواری گلبول های سفید در امان می دارد البته تا زمانی که آنتی بادی علیه کپسول ترشح نشده است. گلیکوکالیکس نقش مهمی در امر اتصال و چسبیدن باکتری ها به سطح سلول های میزبان دارد بعنوان مثال در استرپتوکوکوس موتانس، گلیکوکالیکس که جنس آن از دکستران و لوان (Levan پلیمر فوکوز) است. عامل اصلی چسبندگی باکتری به مینای دندان ها است.

برای رنگ آمیزی کپسول باکتری روشهای مختلفی وجود دارد

# کپسول باکتری

- بعضی از باکتریها ماده لزجی از خود ترشح می کنند که خارج از سلول و پیرامون آن جمع می شود و دیواره سلولی را می پوشاند . این لایه کپسول نامیده می شود که ضخامت‌های متفاوت و چسبندگی متغیر دارد. اندازه کپسول به محیط کشت میکروبی بستگی دارد و همچنین باکتریهای بیماریزا ، در بین باکتریهای تولید کننده کپسول ، کپسولهای بزرگتری دارند. جنس این کپسول از پلی ساکارید است که در آب محلول و غیر یونی است .
- کاربرد کپسول در باکتریها :
- کپسول بعنوان یک سد اسمزی بین باکتری و محیط اطراف آن عمل می کند و در واقع نقش حفاظتی دارد. کپسول مانع از عمل بیگانه خواری گلبولهای سفید می شود همچنین بعنوان مخزن ذخیره مواد غذایی یا دفع مواد زائد هم می تواند عمل کند.
- در تعدادی از باکتریهای بیماریزا ، وجود کپسول شدت بیماریزایی و عفونت زایی را افزایش می دهد و ممکن است حتی این بیماریزایی به وجود کپسول بستگی داشته باشد . مثلا در استرپتوکوکوس پنومونیا اگر توانایی تولید کپسول در باکتری از بین برود این باکتری غیر بیماریزا می شود.

# رنگ آمیزی کپسول باکتری

- ▶ در عمل رنگ آمیزی شرط رنگ گیری یک سلول یونی بودن آن می باشد یعنی وقتی سلول حالت یونی داشته باشد هنگام رنگ آمیزی بین نواحی یونیزه سطح سلول و اجزای یونیزه مولکولهای رنگ پیوند بوجود می آید . در نتیجه بین بارهای مخالف موجود در سطح سلول و مولکولهای رنگ پیوند یونی تشکیل می شود و باکتری رنگ می گیرد . اما چون کپسول را بعلت غیر یونی بودن آن نمی توان رنگ آمیزی کرد در نتیجه برای دیدن آن در زیر میکروسکوپ ، زمینه باکتری رنگ آمیزی می شود و در نتیجه امکان دیدن کپسول باکتری که بصورت بیرنگ ظاهر می شود ، فراهم می شود. این روش را رنگ آمیزی منفی می نامند.
- ▶ در این روش رنگ آمیزی برای تثبیت گسترش از حرارت استفاده نمی شود . چون در اثر حرارت ، باکتری در داخل کپسول از شکل طبیعی خود خارج می شود.

# مواد و وسایل

6

- ۱- کشت باکتری (کلبسیلاپنومونیه)
- ۲- رنگ کریستال ویوله 1%
- 3- سولفات مس 20%
- 4- سرم انسان یا خرگوش
- 5- تشتک رنگ آمیزی
- 6- لوپ
- 7- پی پت پاستور
- 8- لام



## الف) روش آزمایش رنگ آمیزی کپسول به روش هیس (Hiss Method)

- ۱- ابتدا بر روی لام تمیز یک قطره سرم فیزیولوژی را با یک قطره سرم مخلوط نمایید.
  - ۲- توسط آنس استرسل مقداری از کلنی باکتری کپسول دار را در آن حل نموده و بصورت یکنواخت گسترش نمایید.
  - ۳- صبر کنید تا گسترش در حرارت آزمایشگاه خشک شود.
  - ۴- با حرارت گسترش را فیکس کنید.
  - ۵- لام را در تانگ رنگ آمیزی قرارداده و بر روی آن رنگ کریستال ویوله یک درصد در آب بریزید و یک دقیقه صبر نماید
  - ۶- سپس لام را به آرامی با محلول سولفات مس ۲۰٪ در آب بشوئید.
  - ۷- لام را به صورت مورب قرار دهید تا خشک شود.
  - ۸- با عدسی ۱۰۰ و روغن ایمرسیون مشاهده کنید و مشاهدات خود را در گزارش نمایید.
- در این روش رنگ آمیزی کپسول به صورت هاله آبی کمرنگ و باکتریها به رنگ آبی تیره مشاهده می گردند.

## ب ( روش آزمایش رنگ آمیزی کپسول به روش ولش (Welch Method)

- ۱- ابتدا از باکتری کپسول دار گسترش تهیه نمایید.
- ۲- پس از خشک شدن به مدت ۷ تا ۱۰ دقیقه با کریستال ویوله یک درصد آبکی، رنگ آمیزی نمایید.
- ۳- با سولفات مس ۲۰٪ شستشو دهید.
- ۴- پس از خشک شدن با عدسی ۱۰۰ و روغن میکروسکوپ مشاهده کنید.
- ۵- مشاهدات خود را گزارش نمایید.

در این روش جسم باکتری به رنگ آبی پررنگ و کپسول باکتری، آبی کمرنگ مشاهده می شود. سولفات مس در این روش علاوه بر شستشوی لام موجب رنگ آمیزی زمینه لام نیز می گردد.



## د) روش رنگ آمیزی کپسول با مرکب چین - گسترش خشک:

- ۱- یک قطره گلوکز ۶٪ یا سرم فیزیولوژی در یک طرف لام تمیز قرار دهید.
- ۲- مقداری کمی از کلنی باکتری کپسول دار در آن حل نمایید. سپس یک قطره مرکب چین به آن اضافه کنید.
- ۳- با کمک لبه یک لام دیگر مانند روش تهیه گسترش در هماتولوژی ، سوسپانسیون فوق را روی لام گسترش نمایید.
- ۴- صبر کنید تا گسترش در حرارت آزمایشگاه خشک شود.
- ۵- ترجیحاً "بوسیله الکل متانول لام را فیکس نمایید.
- ۶- از رنگ متیل ویوله یا کریستال ویوله رنگ آمیزی گرم روی لام ریخته و ۱-۲ دقیقه صبر کنید.
- ۷- لام را با آب معمولی شسته و به صورت مورب قرار دهید تا خشک شود.
- ۸- پس از خشک شدن لام آن را با عدسی ۱۰۰ و روغن میکروسکوپ مشاهده کنید. در این روش باکتریها به رنگ بنفش تیره و کپسول به صورت هاله روشن (سفید مهتابی) در اطراف باکتری مشاهده می شود و زمینه لام تیره رنگ است.

## ه) رنگ آمیزی کپسول روش چرچمن: (Churchman Method)

- ۱- یک قطره از محلول رنگی رایت (Wright) را روی لام قرار دهید.
  - ۲- با استفاده از فیلدوپلاتین مقداری از باکتری کپسول دار را برداشت نموده، در قطره رنگ حل نمایید و گسترش تهیه کنید.
  - ۳- صبر کنید تا گسترش خشک شود.
  - ۴- لام را به آرامی شستشو داده و صبر کنید تا در حرارت آزمایشگاه خشک شود.
  - ۵- در زیر میکروسکوپ با عدسی ۱۰۰ و روغن ایمرسیون مشاهده کنید و مشاهدات خود را ترسیم نمایید.
- در این روش کپسول به رنگ صورتی و باکتری آبی رنگ دیده می شود.
  - محلول رنگی رایت برای رنگ آمیزی خون به کار می رود. (۱/۰ گرم ماده رنگی رایت در ۶۰ میلی لیتر الکل متیلیک خالص).

در اثر پاساژ دادن های مکرر ممکن است ژن تولید کپسول خاموش شده و کپسول از بین برود. ▶

دو روش رنگ آمیزی برای کپسول وجود دارد. در روش رنگ آمیزی منفی، مرکب چینی یا نیگروزین را با سوسپانسیون باکتری مخلوط می کنند و کپسول ها به صورت شفاف در این روش قابل مشاهده است. در روش هیس (Hiss)، که در این آزمایش مورد استفاده قرار می گیرد، کپسول به صورت هاله ای روشن تر از باکتری دیده می شود.

# روش کار

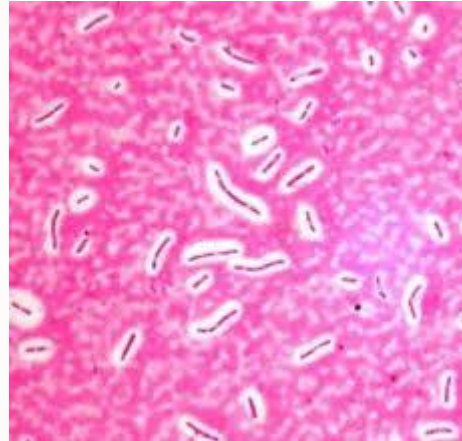
13

- 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 دناتورده 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 ۰.۲٪ لام را شست شو دهید و صبر کنید تا خشک شود ۵- لام را با ابتدا با عدسی ۱۰ و سپس با عدسی ۱۰۰ و روغن امرسیون مشاهده کنید.

# نتیجه

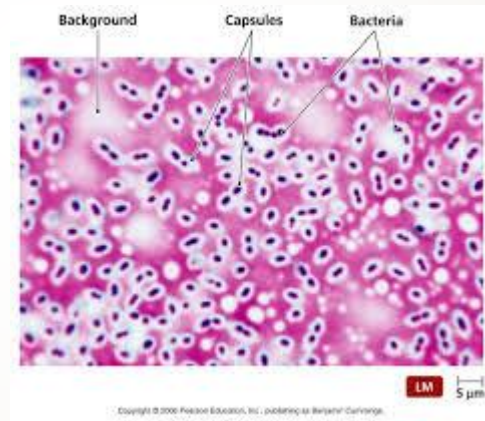
14

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



تهیه کننده : سهیلا عباسی



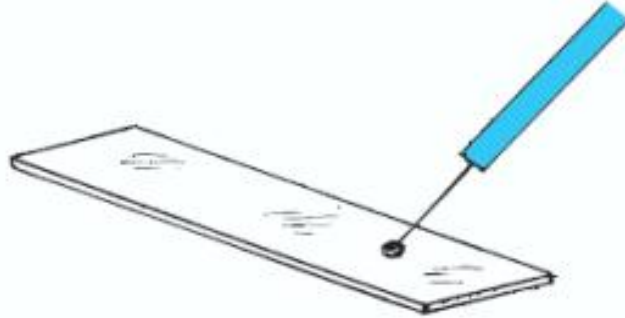


تهیه کننده : سهیلا عباسی

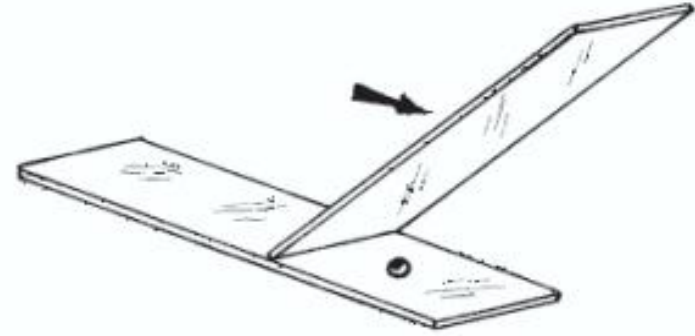
## روش کار در رنگ آمیزی کپسول

- 1- روی یک انتهای لام ، یک قطره مرکب چین یا قطره کوچکی از نیگروزین قرار داده و با لوپ (نوک آنس) مقدار کمی از کشت باکتری را به آن اضافه کنید ، سوسپانسیون را به آرامی و کاملاً مخلوط کنید.
- 2- یک لام دیگر برداشته و روی قطره رنگ حاوی باکتری ها قرار داده و بوسیله آن گسترش را روی لام پخش کنید.
- 3- بگذارید لام در مجاورت هوا خشک شود. هیچگاه برای خشک کردن لام ، کاغذ خشک کن یا دستمال را روی آن نکشید.
- 4- مشاهده در زیر میکروسکوپ

در این رنگ آمیزی کپسول باکتری ها بصورت بیرنگ و شفاف و در زمینه ای سیاه رنگ مشاهده می شوند.



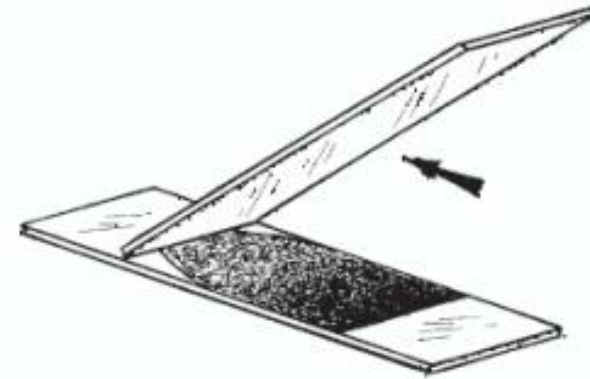
- 1** Organisms are dispersed into a small drop of nigrosine or India ink. Drop should not exceed 1/8" diameter and should be near one end of the slide.



- 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.



تهیه کننده : سهیلا عباسی



