به نام خدا

Microbiology Lab 1

By: **Dr. A. Mohammadi**

Department of biology,
Faculty of science,
University of Alzahra

fppt.com

جلسه
مطالعه دانه های سیتوپلاسمی

Dr A.Mohammadi

fppt.com

۱– رنگ آمیزی دانه های ولوتین

- **رنگ‌آمیزی دانه‌های ولوتین (گرانول‌های پلی فسفات یا متاکروماتیک) به شناسایی و افتراق کورینه باکتریوم دیفتریه از سایر دیفتروئیدهای غیربیماری‌زا (فاقد گرانول‌های ولوتین) کمک می‌کند.**
- **این باکتری هنگام رشد در محیط لوفلر تعداد زیادی گرانول ایجاد می‌کند.**

- **شیوه های رنگ آمیزی** :
- آلبرت (Albert)
- لوفلر (Loffler)
- نیسر تغییر یافته (Modified Neisser method)

fppt.com

رنگ آمیزی آلبرت

- رنگ آلبرت دارای دو رنگ قلیایی تولوئیدن بلو و سبز مالاشیت (میل ترکیبی زیاد به اجزای اسیدی)

- pH رنگ آلبرت با استفاده از اسید استیک در ۲/۸ تنظیم می‌شود که برای pH خنثی سیتوپلاسم، اسیدی اما برای دانه های ولوتین (اسیدی تر)، بازی حساب می‌شود

- تولوئیدن بلو موجب رنگ گرفتن اسیدی‌ترین قسمت سلول (دانه‌های ولوتین)
- مالاشیت نیز سیتوپلاسم را به رنگ آبی- سبز درمی‌آورد.

fppt.com

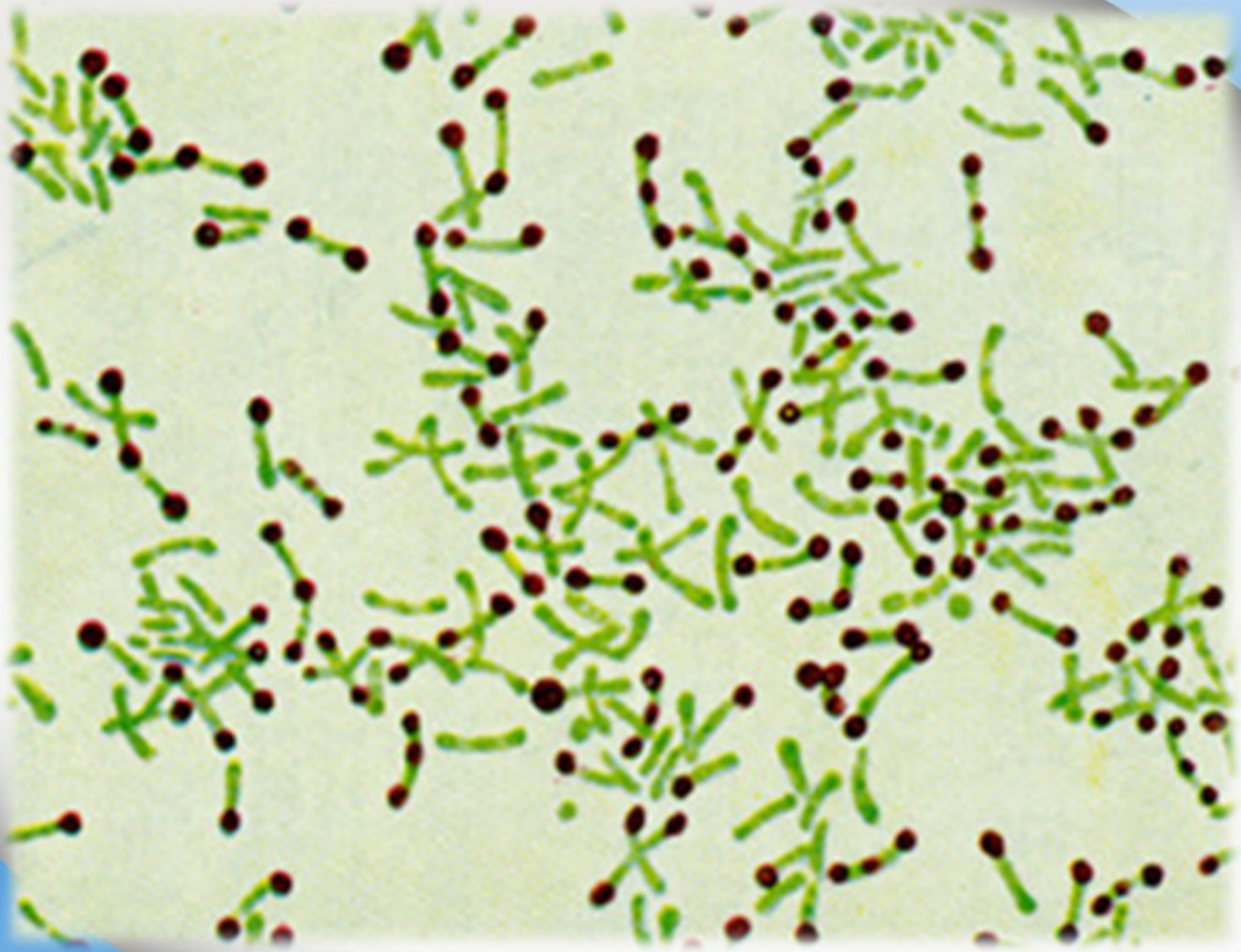
رنگ آمیزی آلبرت

- با توجه به ویژگی متاکروماتیک، گرانول‌ها به رنگ قرمز درمی‌آیند. با بکارگیری محلول یُد آلبرت (آیودین) ویژگی متاکروماتیک دیده نشده و گرانول‌ها به رنگ آبی ظاهر می‌شوند.

- در صورت وجود باکتری کورینه باکتریوم دیفتریه در نمونه به صورت میله‌های سبز رنگ با آرایش زاویه‌دار نسبت به هم (مشابه حروف انگلیسی L و V یا حروف چینی) و گرانول‌های متاکروماتیک به رنگ آبی تیره در قطب‌ها مشاهده می‌شود.

- در برخی از سلول‌ها، گرانول‌ها در دو انتها قرار داشته و از این رو منجر به رنگ‌آمیزی با ظاهر دوقطبی می‌شوند.

fppt.com



Dr A.Mohammadi

fppt.com

مراحل رنگ آمیزی آلبرت

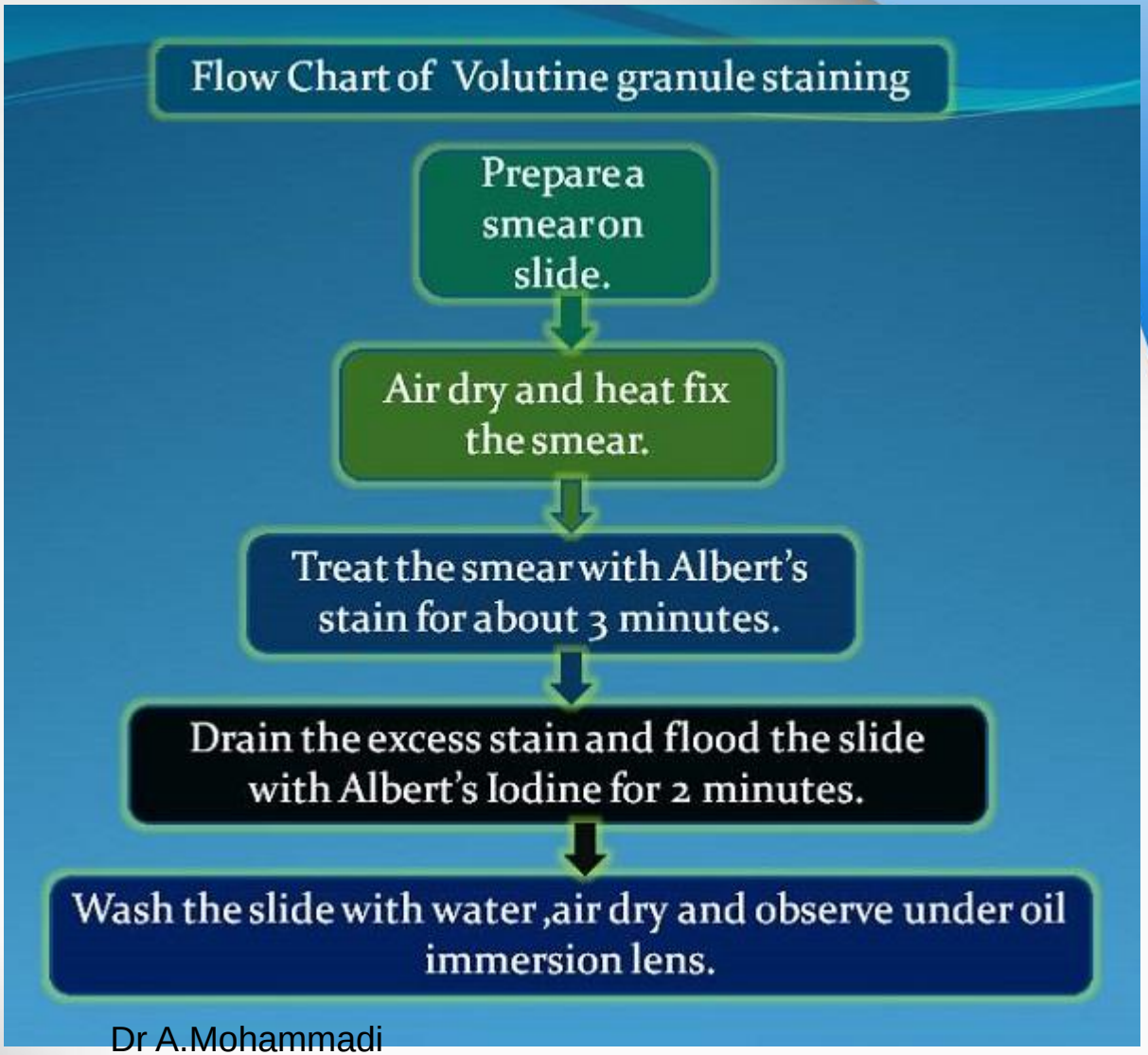
Albert stain is composed of two reagents:

Albert's A solution consist of

1. Toludine blue	0.15 gm
2. Malachite green	0.20 gm
3. Glacial acetic acid	1 ml
4. Alcohol (95% ethanol)	2ml

Albert's B solution consist of

1. Iodine	2gm
2. Potassium iodide (KI)	3 gm



Dr A.Mohammadi

fppt.com

مراحل کار این جلسه

- **مراحل رنگ آمیزی آلبرت (روش ۱ برای گروه های فرد):**

- ۱–تهیه گستره و تثبیت حرارتی (نمونه باکتری و نمونه ماست)
- ۲– محلول A (رنگ)– ۱ دقیقه
- ۳– خالی کردن، شستشو با آب و خشک کردن
- ۴– محلول B (آیودین)– ۱ دقیقه
- ۵– خالی کردن، شستشو با آب و خشک کردن
- ۶– محلول C (سافرانین) – ۱ دقیقه
- ۷– خالی کردن، شستشو با آب و خشک کردن
- ۸– مشاهده دانه ها به رنگ آبی تیره و سلول قرمز رنگ

fppt.com

مراحل کار این جلسه

- **مراحل رنگ آمیزی آلبرت (روش ۲برای گروه های زوج):**

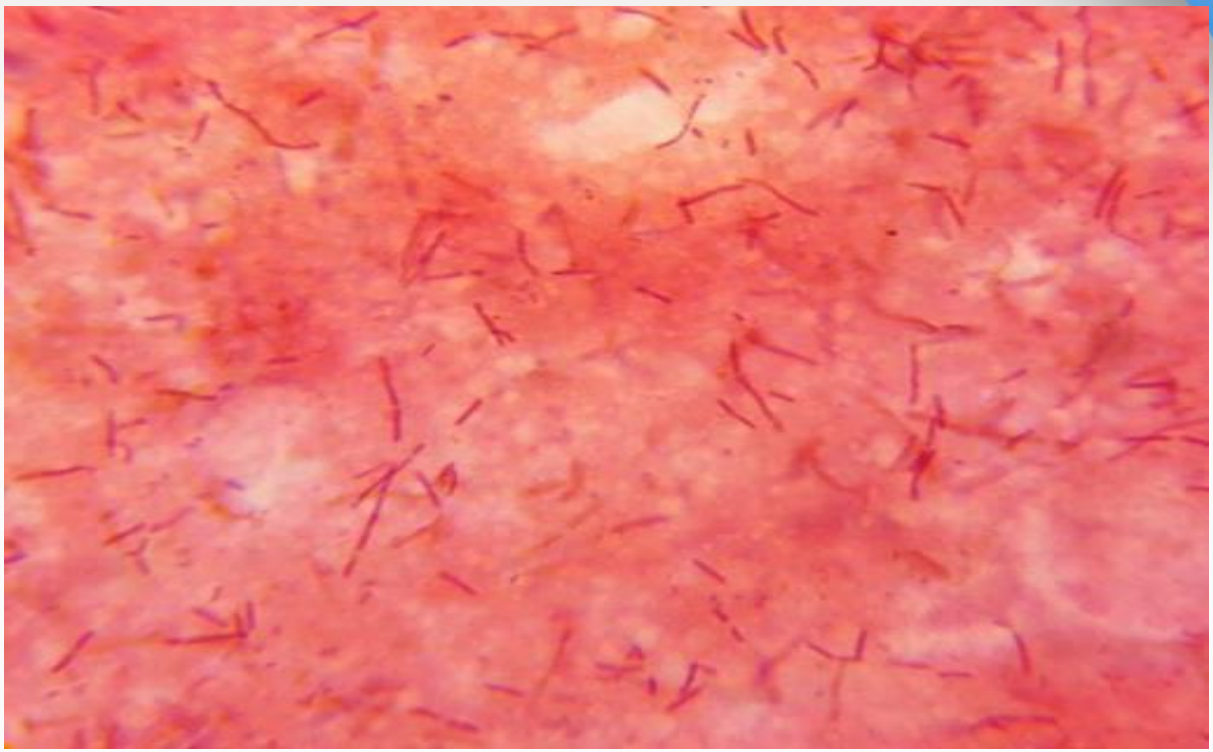
- ۱–تهیه گستره و تثبیت حرارتی (نمونه باکتری و نمونه ماست)
- ۲– محلول A (رنگ آلبرت)– ۳ دقیقه
- ۳– خالی کردن رنگ
- ۴– محلول B (آیودین)– ۲ دقیقه
- ۵– خالی کردن، شستشو با آب و خشک کردن
- ۶– مشاهده دانه ها به رنگ آبی تیره و سیتوپلاسم به رنگ سبز روشن

fppt.com

رنگ آمیزی البرت نمونه ماست محلی لاکتو باسیل

100x

داخل لاکتو باسیل ها دانه های متاکروماتیک زیادی مشاهده خواهد شد . لاکتو باسیل ها به روش رنگ آمیزی البرت به رنگ سبز و دانه های کروماتیک نیز به رنگ آبی تا قهوه ای سوخته مشاهده میشود . ولی در اینجا لاکتو باسیل ها به رنگ صورتی و دانه های ریزکروماتیک به رنگ قرمز یا قهوه ای مشاهده میشود.



fppt.com

۲– رنگ آمیزی دانه های لیپیدی

- کربن را به صورت دانه‌های چربی یا گرانول‌های لیپیدی
- ضخامت ۲ الی ۷ دهم میکرومتر در گونه‌های مختلفی از باکتری‌های جنس مایکوباکتریوم، باسیلوس، ازتوباکتر، اسپیریلوم و جنس‌های دیگر
- ماده مشترک ذخیره چربی که منحصر به باکتری‌ها می‌باشد، عبارت است از اسید پلی بتا هیدروکسی بوتیریک .(PHB)
- انکلوزیون‌های لیپیدی توسط سلول‌های رنگ شده با رنگ‌های چربی دوست مانند رنگ سودان سیاه نشان داده می‌شوند.
- این دانه‌ها با گرفتن رنگ متضاد، به صورت اجسام تیره رنگی در سیتوپلاسم دیده می‌شوند.
- در صورتی که سلول‌ها قبل از رنگ‌آمیزی با الکل و یا هر حلال آلی دیگر تیمار شوند، این دانه‌ها ناپدید می‌شوند.
- برای آنکه باکتری‌ها مملو از چنین گرانول‌هایی شوند، آن‌ها را در محیط گلیسرول (نوترینت آگار حاوی ۵٪ گلیسرول) کشت می‌دهند.

fppt.com

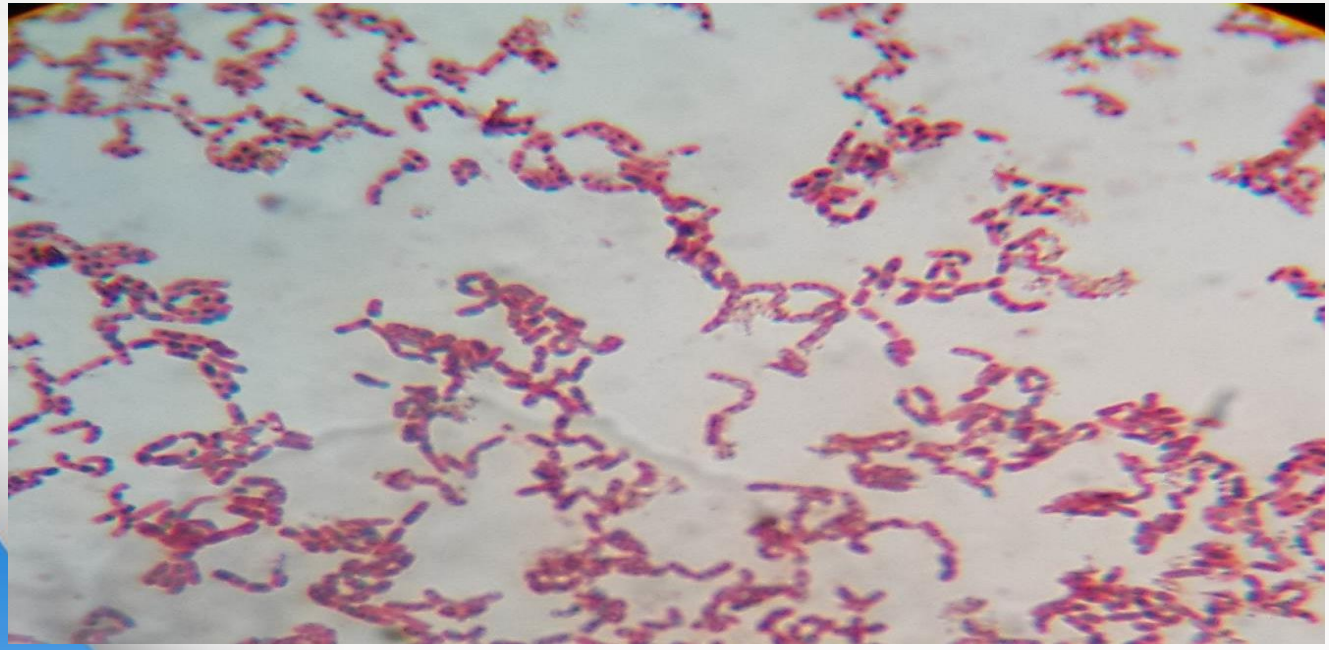
مراحل کار این جلسه

- مراحل:

۱) تهیه گستره و تثبیت حرارتی از باسیلوس سرئوس (سوبتیلیس) رشد کرده در NA حاوی ۵% گلیسرول
۲) سودان سیاه – ۱۰ دقیقه
۳) خالی کردن، شستشو با آب و خشک کردن
۴) افزودن چند قطره گزیلن (قطره قطره به لام مورب)
۵) خشک کردن (بدون شسشو با آب)
۶) محلول سافرانین ۰/۵ درصد – ۱۰–۱۵ ثانیه
۷) خالی کردن، شستشو با آب و خشک کردن
۸) مشاهده دانه ها به رنگ آبی تیره و سلول قرمز رنگ

fppt.com

رنگ آمیزی دانه های چربی



دانه های چربی سیاه رنگ در داخل سلول مخمر کروی یا بیضی شکل قرمز رنگ مشاهده می شوند.مشاهده میشود که در داخل باکتری های باسیلوس سرئوس ذرات چربی به رنگ سیاه ذخیره شده اند .

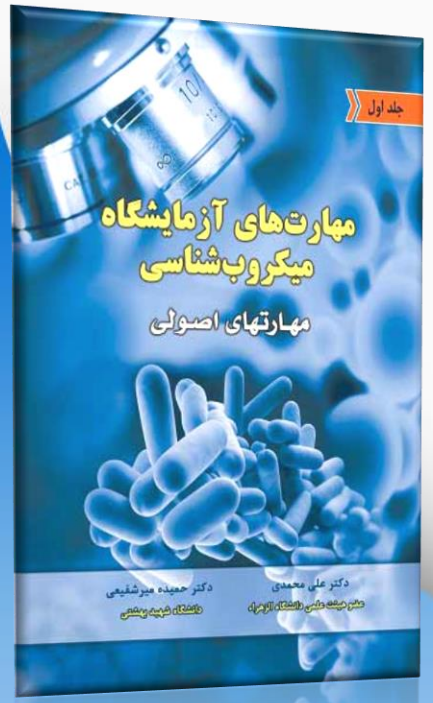
fppt.com

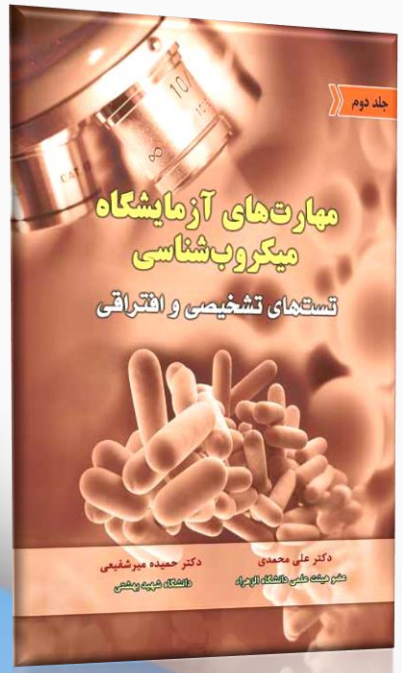
منبع:

- **مهارت های آزمایشگاه میکروب شناسی** ، جلد ۱ –۳ ،

نگارش:

- دکتر علی محمدی–عضو هیئت علمی دانشگاه الزهرا (س)
- دکتر حمیده میرشفیعی – دانشگاه شهید بهشتی





fppt.com

از توجه شما سپاسگزارم

WWW.DrAMohammadi.IR

@DrAMohammadi