روش رنگ آمیزی گرم

معروفترین نوع رنگ آمیزی مرکب نوع گرم می باشد . این روش مفیدترین روش تشخیص باکتریها می باشد.
میکروب شناسی ، بنام کریتستیان گرم در سال 1884 بطور تصادفی واکنشی را کشف کرد که بعدها واکنش رنگ آمیزی گرم نامیده شد.

بر این اساس باکتریها با توجه با ساختمان دیواره یاخته ای (سلولی) به دو بخش بزرگ و کلی تقسیم می شوند: باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی . تفاوت عمده بین این دو گروه تفاوتهای ساختاری(ساختمانی) بین این دو گونه می باشد به این ترتیب که در گونه گرم مثبتها در دیواره سلولی نوعی پلی ساکارید بکار رفته و دیواره سلولی آن کمی ضخیمتر می باشد در صورتیکه در دیواره سلولی نوع گرم منفی مقدار چربی بیشتری بکار رفته و دیواره سلولی آن کمی نازکتر از نوع گرم منفی می باشد.
بر همین اساس در رنگ آمیزی گرم با توجه به این تفاوت مهم در دیواره سلولی ، از دو نوع رنگ استفاده می شود ، رنگ اولیه کریستال ویوله می باشد . هنگامیکه محلول کریستال ویوله به گسترش باکتریایی اضافه می شود این رنگ با ریبونوکلئات موجود در دیواره سلولی ترکیب شده و کمپلکس کریستال ویوله – ریبونوکلئات را بوجود می آورد و بعد از شستشوی رنگ اضافی ، محلول ید را بکار می برند . این محلول ید که ترکیبی فلزی می باشد به رنگ متصل شده و یک ترکیب رنگی غیر محلول ایجاد می کند بنام کمپلکس کریستال ویوله –ید که در سر دیگر آن متصل شده به ریبونوکلئات موجود در دیواره سلولی و تشکیل کریستال ویوله – ید – ریبونوکلئات داده است در حالیکه در باکتریهای گرم منفی چنین کمپلکسی ایجاد نمی شود. این پیوند در باکتریهای گرم مثبت بسیار پایدار است و در مرجله بعدی توسط ماده رنگ بر شکسته نمی شود و رنگ بنفش کریستال ویوله را در خود حفظ کرده بنابراین باکتریهای گرم مثبت زیر میکروسکوپ بنفش رنگ دیده می شوند.
از طرفی در دیواره سلولی باکتریهای گرم منفی مقدار چربی بیشتری بکار رفته است بنابراین چربیها در الکل استن که در مرحله بعدی بعنوان رنگ بر بکار می روند ، محلول هستند و در اثر این واکنش چربیها از دیواره سلولی خارج شده و در اثر شستشو با حلال رنگ بر ، رنگ کریستال ویوله هم از سطح باکتری خارج می شود . با خروج چربی توسط ماده رنگ بر ، بر اندازه منافذ دیواره سلولی افزوده شده که این امر باعث بی رنگ شدن سریع باکتریهای گرم منفی می شود .در این مرحله باکتریهای گرم منفی از کریستال ویوله پاک می شوند . بنابراین بعد از شستشو توسط آب و افزوده شدن رنگ دوم یعنی سافرانین (فوشین) ، این رنگ به دیواره سلولی باکتریهای گرم منفی جذب شده و باکتریها به رنگ قرمز در می آیند و در بررسی میکروسکوپی ، باکتریهای گرم منفی برنگ قرمز دیده می شوند.
اکثر باکتریهای موجود ، گرم منفی هستند البته بعضی از باکتریها ، مخمرها و تعدادی از کپکها گرم مثبت هستند.
بنابراین مراحل رنگ آمیزی گرم را می توان به شرح زیر بیان نمود:
1- تهیه گسترش روی لام : ابتدا از نمونه باکتری یک گسترش روی لام تهیه می کنید.
2- رنگ آمیزی با کریستال ویوله : در این مرحله مقداری از رنگ کریستال ویوله را با قطره چکان به روی سطح گسترش میکروبی روی لام بریزید و بگذارید 1 دقیقه بماند تا رنگ در دیواره سلولی میکروبها نفوذ کند.
3- مرحله شستشو: پس از سپری شدن مدت زمان 1 دقیقه ، رنگ اضافی روی لام را خالی کرده و با استفاده از آب مقطر سطح روی گسترش را شستشو دهید.
4- مرحله اضافه کردن محلول ید : جند قطره از محلول ید را روی گسترش پخش نموده و بگذارید بمدت 1 دقیقه به همان حالت بماند . بعد محلول اضافی را خالی کرده و با آب مقطر لام را شستشو دهید.
5- مرحله رنگ بری با استفاده از استن – الکل : لام را با زاویه 45 درجه نگهدارید بعد با استفاده از محلول رنگ بر الکل – استن که بر روی گستره می ریزید بسرعت آنرا بی رنگ کنید. دقت کنید مرحله بی رنگ سازی بیش از اندازه نباشد. بعد از آن لام را بسرعت بشوئید . این عمل ، بی رنگ شده را متوقف خواهد کرد.
6- رنگ آمیزی با سافرانین : در این مرحله سطح گسترش را با رنگ ثانویه یعنی سافرانین بپوشانید و 30 تا 60 ثانیه صبر کنید . بعد از آن رنگ اضافی را خالی کرده و با آب مقطر لام را شستشو دهید.
7- لام رنگ آمیزی شده را آهسته روی کاغذ خشک کن قرار دهید ولی کاغذ را روی گسترش نکشید.
نکات مهم :
1- حرارت بیش از اندازه هنگام تثبیت گسترش باعث پاره شدن دیواره سلولی باکتری شده . بنابراین باکتری گرم مثبت رنگ اولیه (کریستال ویوله) را هنگام رنگ بری از دست می دهد و رنگ ثانویه را جذب می نماید و در نتیجه باکتری گرم مثبت ، بصورت گرم منفی دیده می شود.
2- اگر گسترش ضخیم باشد هنگام مرحله بی رنگ شدن ، ممکن است مانند یم گسترش معمولی رنگ نشود و این مسئله باعث خطا در تشخیص شما در گرم منفی یا مثبت بودن باکتری خواهد شد.
3- غلظت درست و تازه بودن رنگها هم در رنگ آمیزی موثر است .
4- رنگ بری بیش از حد ممکن است باعت پاره شدن جدار باکتریهای گرم مثبت شده در نتیجه این باکتریها رنگ کریستال ویوله خود را از دست داده و رنگ ثانویه را جذب می نماید و بصورت گرم منفی دیده می شود.
5- دقت شود هنگام تهیه گسترش روی لام از محیط کشت ، سن کشت باکتری باید 24 ساعت یا کمتر باشد . بنابراین در محیط کشتهایی که از عمر آنها گذشته و کهنه شده اند ، در قابلیت نفوذ دیواره سلولی باکتریها تغییراتی حاصل می شود که خاصیت گرم مثبت بودن را از دست می دهد.
در رنگ آمیزی گرم مثبت باکتریها را به 5 گروه تقسیم بندی می کنند:
1- میله ای (باسیل ) گرم مثبت 2- میله ای گرم منفی 3- کوکوس (گرد) گرم مثبت 4- کوکوس گرم منفی 5- باکتریهای بدون واکنش به رنگ آمیزی گرم.
در این رنگ آمیزی می توان هر باکتری ناشناخته ای را در یکی از این 5 گروه قرار داده و با اطمینان 4 گروه دیگر را حذف کرد و به مطالعه در مورد آن باکتری پرداخت .
خصوصیات باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی :
1- باکتریهای گرم مثبت نسبت به پنی سیلین و مواد ضد باکتریایی حساستر از گرم منفی ها هستند.
2- گرم مثبت بودن یک باکتری خصوصیتی است که براحتی از بین می رود اما گرم منفی بودن تحت هیچ شرایطی از بین نمی رود . پس هنگام تشخیص و رنگ آمیزی باید به این نکته هم توجه داشت . یعنی در لامهای رنگ آمیزی شده گرم متبت ، باکتریهای گرم منفی هم دیده می شود اما در لامهای گرم منفی از یک کشت خالص هرگز باکتریهای گرم مثبت دیده نمی شوند.
3- باکتریهای گرم منفی سخت رشد ترند یعنی نیاز غذایی آنها پیچیده تر است .
4- باکتریهای گرم منفی نسبت به مواد اسیدی و قلیایی قوی و آنزیم لیزوزیم حساسترند. همه اینها موجب پاره شدن دیواره سلولی این باکتری و هضم و متلاشی شده آن می شوند.
طرز تهیه رنگها و محلولهای گرم :
1- کریستال ویوله :
- کریستال ویوله 2 گرم
- اتانول 95% 20سی سی
- اگزالات آمونیوم(خالص) 8/.گرم
- آب مقطر 80سی سی
کریستال ویوله را در اتانول حل کنید. اگزالات آمونیوم را در آب حل کنیدو سپس دو محلول را روی هم ریخته و بخوبی مخلوط کنید.
2- محلول ید:
- ید 1 گرم
- یدور پتاسیم 2 گرم
- آب مقطر 300 سی سی
ید و یدور پتاسیم را با هم در هاون بسائید تا کاملا نرم شود . مقدار کمی آب اضافه کنید تا محتویات هاون شسته شود. بقیه آب را هم اضافه کرده و کاملا مخلوط کنید . این محلول را باید در شیشه تیره رنگ نگداری کنید.
3- محلول سافرانین :
- سافرانین 25 گرم
- اتانول 95% 10سی سی
- آب مقطر 100سی سی
سافرانین را در اتانول حل کنید . آب مقطر را اضافه کرده و خوب مخلوط کنید . محلول را از کاغذ صافی عبور دهید.
4- محلول استن – الکل :
- اتانول 95% 70 سی سی
- استن 30سی سی

دو محلول را کاملا با هم مخلوط کنید