المحاضرة الرابعة - درس الأحياء المجهرية المتقدم -الجزء العملي-

1- تصبيغ كرام Gram Stain

سميت هذه الصبغة بالصبغة العظيمة لأنها من اهم وأكثر الصبغات استخداما، يذكر ان التصنيف الحالي للبكتريا يشمل 1000 جنس مع 500 نوع اضافة إلى الاعداد الجديدة التي تكتشف سنوياً لذلك اعتمدت هذه الصبغة كخطوة اولى في تشخيص البكتريا ومنذ اكتشافها عام 1883 من قبل العالم Christian Gram تصنف هذه الصبغة الاجناس البكترية إلى مجموعتين كبيرتين هما:

1-بكتريا موجبة لصبغة كرام +G (البنفسجية اللون) مثل المكورات cocci مثل *Staphylococcus aureus* والعصيات rods مثل *Bacillus subtilis* .
2-بكتريا سالبة لصبغة كرام –G وردية أو حمراء مثل *Escherichia coli*. (coccobacilli)
, (rods) *Pseudomonas aeruginosa* لهذه الصبغة اهمية في تصنيف وتشخيص البكتريا.

خطوات التصبيغ:

1-تحضر المسحة.
2-تغمر الشريحة بصبغة crystal violet البنفسجية لمدة دقيقة واحدة
3-تغسل بالماء الجاري.
4-يضاف المحلول المثبت Gram's iodine (mordant) لمدة دقيقة واحدة
5-اغسل بالماء الجاري.
6-اضف القاصر decolorizer ايثانول 95% لمدة نصف دقيقة لحد نزول اخر قطرة ملونة.
7-اغسل بالماء الجاري.
8-اضف الصبغة المعاكسة counterstain السفرانين لمدة نصف دقيقة .
9-اغسل بالماء الجاري جفف بين طبقتين من ورقة الترشيح افحص.

نلاحظ ما يلي من صبغة كرام :

1- في الخطوة الاولى وعند اضافة الصبغة الاولية crystal violet (primary stain)
وهي صبغة قاعدية أي ان شحنتها موجبة ، لذلك ستصبغ جميع انواع البكتريا (الموجبة لصبغة كرام والسالبة لها) باللون البنفسجي.
2-عند اضافة المثبت أو اليود سيكون اليود معقد مع بلورات الصبغة تنحصر جزيئات هذا المعقد بين شبكة crystal violet-iodine complex CV-I البيتيدوكلايكان ضمن مكونات الجدار بحيث يصعب ازالتها خاصة في حالة البكتريا الموجبة لصبغة كرام (السبب هو سمك جدار هذه الخلايا كما سنبين فيما بعد) .
4-عند اضافة القاصر (الايثانول) يزال اللون البنفسجي من البكتريا السالبة لصبغة كرام لان طبقة البيتيدوكلايكان تكون اقل سمكا من نظيرتها في جدار البكتريا الموجبة اضافة إلى احتواء جدار البكتريا السالبة لصبغة كرام نسبة عالية من الدهون كما مبين في الرسم التفاعل الموجب أو السالب لصبغة كرام له علاقة بطبيعة الجدار في كلا النوعين يبين اهم الفروقات بين جدار البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام.

2-صبغة السبور Schaeffer-fulton method (Spore staining)

بعض انواع البكتريا لها القدرة على التحول إلى اجسام عالية المقاومة للظروف البيئية الصعبة تدعى السبورات الداخلية endospore (سبورات تنتج داخل الخلية البكتيرية) وهي عبارة عن خلايا خاملة تنتج بعملية sporulation عند نفاذ بعض المواد الغذائية الرئيسية مثل الكاربون والنايتروجين حالما تستلم الخلايا الخضرية هذا الحافز تمر بعملية تحول تستغرق حوالي 6-8 ساعات ينتج عنها سبورات داخلية .

هذه التراكيب تعتبر اكثر انواع الحياة مقاومة للظروف الصعبة والتي لا تتحملها الخلايا الخضرية مثل الحرارة والجفاف المركبات الكيمائية السامة الاشعة فوق البنفسجية وحتى الغليان لعدة ساعات ، وبسب هذه المقاومة العالية تتواجد هذه التراكيب في كل مكان في التربة، الطعام، الاجهزة الطبية، المستشفيات، في الهواء... هناك خمسة اجناس فقط مكونة للسبورات وهي :

البكتريا العصوية Bacillus--- rod-shaped .

المطثيات Clostridium rod-shaped

بكتريا الكروية Sporosarcina cocci,found in soil

عصيات الحليب المكونة للسبور Sporolactobacillus rod-shaped

العصيات اللاهوائية Desulfolomaculum rod-shaped, ananerobic

بعض هذه الانواع قد تكون ممرضة للإنسان ، مثلا :

Clostridium botulinum تسبب مرض التسمم البوتيوليني botulism وهو مرض ناتج عن تلوث الخضروات والأطعمة المعلبة بالخلايا الخضرية التي تنتج سموم قاتلة. ففي حالة عدم تعقيم هذه الاطعمة بطريقة صحيحة خلال عملية التعليب فان هذه السبورات تنمو وتنتعش تحت ظروف لا هوائية لتنتج سموم تؤدي إلى الشلل.

Clostridium perfringens التي تسبب موت الانسجة Gas ganarene

Clostridium tetani تسبب مرض الكزاز tetanus

Bacillus anthracis . التي تسبب مرض الجمرة الخثية anthrax

مقاومة هذه التراكيب للظروف الصعبة تعود إلى ان غلاف السبور متعدد الطبقات ويحتوي على مادة dipicolinic acid هذه المادة تؤدي إلى ازالة الماء من السبور dehydration ولذلك يصبح خامل ايضيا وذو مقاومة عالية للجفاف والحرارة .اضافة إلى ذلك فان اغلفة الجدار المتعددة تحمي السبور من تأثير الاشعاع والمواد الكيميائية هذه الخواص غير موجودة في الخلايا الخضرية.

-قلة الماء الحر في السايتوبلازم .

احتواء بعض السبورات على انزيمات مقاومة للحرارة thermostable enzymes

ملاحظة لا يعد السبور طريقة تكاثرية وإنما لحيوية البكتريا والحفاظ على النوع بدليل ان كل خلية خضرية تعطي سبور واحد .عند الانبات يعطي السبور خلية خضرية واحدة ان لشكل السبور وموقعه أهمية في تشخيص البكتريا المكونة له .

شكل السبور قد يكون بيضوي أو كروي .اما موقع السبور فقد يكون:

نهائي شبه Subterminal او نهائي terminal او وسطي central .

مثال ذلك بكتريا *Clostridium tetani* المسببة لمرض الكزاز يعتبر شكل البكتريا العصوي وبداخله السبور الكروي والتي تشبه مضرب الطبل drum-stick هي صفة تشخصيه لمرض الكزاز .

معلومات هامة عن السبور:

1-عملية البسترة (التسخين بدرجة 63 - 66م) لمدة نصف ساعة او 71.6م لمدة 15 ثانية غير كافية للقضاء على السبورات.

2-بسبب تعدد اغلفة السبور فأنها لا تصطبغ بالصبغات الاعتيادية مثل صبغة كارم أو الصبغة البسيطة ولكن تظهر في هذه الصبغات على شكل اجسام شفافة غير مصبغة وعاكسة للضوء .

3-لهذه التراكيب القدرة على البقاء حية لمئات السنين بل للاف السنين أو اكثر وأخر ما سجل كان من قبل باحث من كاليفورنيا حيث وجد سبورات حية في نحلة متحجرة منذ 25 مليون سنة!

4-القضاء على السبورات يعتبر من المهمات الصعبة عند تعقيم مصانع تعليب الاغذية والمستشفيات.

المواد:

1- .مزرعة لبكتريا *Bacillus subtilis* بعمر اسبوع . 2- صبغة الملكايت الاخضر5 %

3-صبغة السفرانين. 4-شرائح نظيفة. 5-حمام مائي.

طريقة التصبيغ

1-تحضر مسحة مثبتة للبكتريا اعلاه
2-تغطي بورقة ترشيح مشبعة بصبغة الملكايت الاخضر وتوضع فوق حمام مائي لمدة 5 دقائق مع مراعاة عدم جفاف الصبغة وذلك بتقطير المزيد من الصبغة كلما اقتضت الحاجة.
3-تبرد الشريحة ثم تغسل بالماء.
4-تضاف الصبغة المعاكسة وهي السفرانين لمدة 2 دق.
5-تغسل بالماء تجفف وتفحص .

3- الصبغة الصامدة للحامض Acid – Fast stain

تعد هذه الطريقة من طرق التصبيغ التفريقي المهمة لتفريق جنس Mycobacterium عن بقية الاجناس اذ ينفرد هذا الجنس باحتواء على كمية من معقد دهني Mycolic acids على سطح الخلايا يعطي السطح خاصية شمعية وبالتالي من الصعب تصبيغ هذه الخلايا بالطرق الاعتيادية . ممكن تلافي صعوبة التصبيغ في هذه الخلايا باستخدام الحرارة لتليين المكونات الدهنية والشمعية على الجدار ثم تسهيل دخول الصبغة الى الخلايا .هذا النوع من الخلايا حالما تصطبغ يصعب ازالة الصبغة منها بالمواد القاصرة مثل الكحول المحمض ولذلك تدعى الصامدة للحامض.

تستخدم في تشخيص عصيات السل التي تعود لهذا الجنس اذ ان هناك نوعان ممرضان للإنسان وهما : *Mycobacterium tuberculosis* تسبب السل Tuberculosis و *Mycobacterium leprae* تسبب الجذام leprosy .

كغيرها من الصبغات التفريقية يستخدم فيها نوعين من الاصباغ :الاولية carbolfuchsin الحمراء والصبغة المعاكسة methylene blue الزرقاء اما القاصر 1-3% حامض الهيدروكلوريك في 95% كحول والكحول المحمض في هذه الطريقة هو قاصر قوي جدا .في هذه الطريقة الصبغة الحمراء تدخل الى الخلية باستخدام الحرارة اضافة الى ان الفينول (وهو جزء من محلول الصبغة) يسرع في اختراق الصبغة.

المواد:

مسحة من عينة قشع لمريض مصاب بالسل .
صبغة الكاربول فوكسين الحمراء، صبغة المثلين الازرق .
كحول محمض حمام مائي، ورق ترشيح، شرائح زجاجية .

طريقة العمل :

توضع ورقة ترشيح مشبعة بصبغة الكاربول فوكسين على المسحة ثم توضع الشريحة فوق حمام مائي لمدة 5 دقائق مع مراعاة عدم جفاف الصبغة. تبرد الشريحة وترفع ورقة الترشيح ثم تغسل بماء الحنفية يضاف الكحول المحمض لقصر الصبغة لمدة 15-20 ثانية بعدها تغسل الشريحة ثم تضاف الصبغة المعاكسة وهي المثلين الازرق لمدة 20-30 دقيقة تغسل وتجفف وتفحص.

ملاحظة :تستخدم هذه الصبغة لتشخيص عصيات السل والجذام leprosy وجنس Nocardia التي تسبب اصابات في الجلد والرئة .

4-صبغة الكبسول (الصبغة السالبة) Capsule stain (Negative stain)

العديد من البكتريا تغلف نفسها بمادة تشبه الجيلاتين تدعى Glycocalyx إذا كانت هذه الطبقة جلاتينية وذات معالم واضحة يطلق عليها مصطلح capsule والتي يمكن تمييزها مجهريا باستخدام الصبغة السالبة اما إذا كانت هذه الطبقة غير منتظمة ،قابلة للذوبان ورخوة يطلق عليها اسم Slime layer البكتريا التي تنتج أي من هاتين الطبقتين تكون سكريات متعددة مثل dextran, glucan والتي تتخذ شكل شبكي خارج جدار الخلية ويمكن تخليص وظيفة هذه الطبقات بما يلي:

1-تساعد البكتريا على تثبيت نفسها على السطوح المختلفة مثل الاسنان، جذور النباتات، الامعاء الدقيقة، الصخور، وحتى على خلايا بكترية اخرى .مثال بكتريا *Streptococcus mutans* والتي تثبت نفسها بقوة من خلال الكبسول، ثم تنمو شكل طبقة Biofilm أي تجمعات من الخلايا تحيط نفسها بالسكريات المتعددة إذ تقوم هذه البكتريا باستخدام السكروز في

الغذاء لبناء مادة الكبسول هذا يسهل التصاق انواع اخرى من البكتريا لتنتج جميع الانواع حوامض تؤدي إلى تسوس الاسنان هذا يفسر علاقة تناول الاغذية السكرية بالتسوس.
2-لحماية البكتريا من عملية الالتهام phagocytosis التي تقوم بها بعض كريات الدم البيضاء كوسيلة دفاعية للجسم ويذكر ان انتاج الكبسول هي صفة وراثية وكغيرها من الصفات قد تتعرض إلى طفرات وراثية ينتج عنها افراد غير مكونة للكبسولة .الخلايا المنتجة للكبسولة تكون ممرضة اكثر من غير المنتجة لها مثل :
Streptococcus pneumoniae التي لولا انتاجها للكبسول لما تمكنت من ان تسبب ذات الرئة .
3- microcapsule طبقة رقيقة تحمل البصمة الخاصة أو الهوية لنوع البكتريا مثلا هناك 80 نوع من *Streptococcus pneumoniae* حسب الطبيعة المستضدية المحمولة على هذه الطبقة .

الطريقة الاولى (الطريقة الرطبة Capsule stain)
1-ضع قطرة من مزرعة بكتريا سائلة او حملة من مزرعة صلبة مع قطرة ماء وامزج جيدا.
2-نضع قطرة من صبغة النيكروسين اوالحبر الهندي في وسط شريحة نظيفة وتخلط مع البكتريا ثم تغطى بغطاءالشريحة

الطريقة الثانية (الطريقة الجافة Capsule stain)
1-ضع قطرة من محلول % 6 كلوكوز على احدى نهايتي شريحة زجاجية نظيفة.
2-انقل قطرة من مزرعة البكتريا السائلة وامزجها مع قطرة الكلوكوز جيدا للحصول على معلق متجانس.
3-اضف قطرة من صبغة النيكروسين وامزجها جيدا" ايضا"
4-انشر المزيج على الشريحة للحصول على غشاء رقيق باستعمال نهاية شريحة اخرى
5-جفف بالهواء.
6-ثبت المسحة بإضافة الكحول المثيلي.
7-جفف في الهواء الساخن.
8-اصبغ بصبغة الكريستال البنفسجية لمدة دقيقة واحدة. واغسل بالماء وإجراء الفحص .

الطريقة الثالثة Capsule stain التصبيغ بطريقة (Hiss method)
1-امزج قطرة من عالق البكتريا في محلول الملح الفسيولوجي مع قطرة من المصل الطبيعي على سطح شريحة زجاجية نظيفة. 2-اترك المسحة تجف بالهواء. 3-ثبت بالتسخين.
4-اغمر الشريحة بمحلول صبغة الكريستال البنفسجية لمدة دقيقة واحدة ثم اغسل بمحلول كبريتات النحاس 20 %جفف.

معلومات هامة:
*الكبسولة غير ضرورية لحيوية الخلية و ممكن ازالتها دون ان يؤثر ذلك على حياة الخلية.
*للحصول على كبسولة واضح يفضل عزل البكتريا من الجسم أو من حالات مرضية مثل عينات دم، ادرار او قيح .

الاسواط والحركة Flagella and motility
تمتلك الانواع المتحركة من البكتريا زوائد خيطية طويلة تتكون من بروتين Flagellin تدعى الاسواط أو Flagella ترتبط هذه الزوائد بجسم البكتريا عند الجسم القاعديbasal body هذه التراكيب رقيقة ورفيعة جدا بحيث يصعب رؤية سوط مفرد واحد مباشر تحت المجهر إلا بعد معاملته بمواد كيمياوية .هذه العملية تحتاج إلى مهارة وخبرة عالية قد يحتاج نجاحها تكرار خطوات التصبيغ لأكثر من مرة . تترتب الاسواط على البكتريا كما يلي :
1-القطبية polar أي تترتب الاسواط في احد اقطاب البكتريا أو كلاهما
2- lophotrichous أي تتمركز مجموعة من الاسواط في احدى نهايات الخلية
3- peritrichous أي الاسواط تحيط بالخلية البكتيرية
اما اهمية هذه الاسواط اضافة إلى الحركة يمكن ان تستخدم في تصنيف البكتريا وفي بعض الحالات مثل *Helicobacter Pylori* والمسببة لقرحة المعدة تمتلك اسواط متعددة وقوية في احدى نهايات الخلية الحلزونية للبكتريا تلعب الاسواط في هذه البكتريا دورا في اختراق الطبقة المخاطية اللزجة المبطنة للمعدة.

معلومات هامة عن الاسواط:

*حركة البكتريا تتم بدوران السوط باتجاه عقارب الساعة ودوران الجسم عكس عقارب الساعة.
*ان دوران الاسواط يحرك البكتريا خلال الوسط السائل بسرعة تقارب 60 مرة طول خلية/ثا

طرق دراسة الحركة:

أ -فحص الحركة باستخدام القطرة المعلقة Hanging Drop Method
ب -فحص الحركة عن طريق استخدام الأنبوب الزجاجي على شكل حرف U
U-shaped tube:- وفي هذه الطريقة يستخدم انبوب زجاجي على شكل حرف U
يحتوي على وسط نصف صلب (نسبة الاكار فيه ربع النسبة الاعتيادية علما ان النسبة الاعتيادية هي 1.5% يمكن معرفة ان كانت البكتريا متحركة وذلك بتلقيح احد الطرفين بالبكتريا المعينة بطريقة الطعن Stabbing باستخدام Needle ابرة التلقيح بدلا loop ويحضن بدرجة حرارة ° 37 م لمدة 24 ساعة وتسجل النتيجة
ج -ظاهرة العج Swarming :وهي احد اشكال حركة البكتريا والتي ينفرد بها جنس Proteus على الاوساط الصلبة حيث تكون الخلايا على حافة المستعمرة نشيطة الحركة ثم تتوقف وتنمو و تتكاثر لتعطي جيل اسرع وانشط ليتحرك بعيدا مرة اخرى وهكذا .

د. صلاح ناجي عزيز