

الماده: مبادئ الاحياء المجهرية العملي  
استاذ المادة: أ.م سهيله جواد كاظم

قسم علوم التربيه والموارد المائيه  
كلية الزراعة / جامعة البصره  
العراق

[suhailajowad@gmail.com](mailto:suhailajowad@gmail.com)

## تصبغ البكتريا : Bacterial Staining

يصعب رؤية البكتريا بصورة واضحة تحت المجهر لأنها شفافة لذلك تصبغ ليسهل رؤيتها والتعرف على بعض التركيبات الخلوية الخارجية والداخلية .

يمكن تقسيم الصبغات المستعملة في صبغ البكتريا الى ما يلي :

اولا - صبغات طبيعية Natural dyes

وهي الصبغات التي تتواجد طبيعيا ويمكن استخلاصها من انسجة النباتات .

ثانيا - صبغات صناعية او تركيبية Artificial or Synthetic dyes :

وهي التي تستعمل حاليا بكثرة وتحضر من قطران الفحم وقد تسمى بأصبغ الانيلين Aniline dyes حيث ان اول صبغة استعملت كانت مشتقة من الانيلين .

الصبغة Dyes : هي مركب عضوي تحتوي على مجموعات حاملة للون ومجاميع مساعدة للألوان والمجموعة الحاملة للون تعطي المركب خاصية اللون . وتكون الصبغات اما حامضية او قاعدية

تتأين الصبغة الحامضية لتعطي الجزء الصبغي من الجزيء الشحنة الكهربائية السالبة Anion اما الصبغة القاعدية فتتأين لتعطي الجزء الصبغي من الجزيء الشحنة الكهربائية الموجبة Cation .

تعتبر الصبغات القاعدية مثل الفوكسين القاعدي Basic fuchsin والكريستال البنفسجي Crystal violet وازرق المثلين Methylene blue والسفرانين Safranin اهم في دراسة البكتريا نظرا لان الخلية البكتيرية غنية في الاحماض النووية والتي تحمل شحنة سالبة ولذلك تصبغ بشدة بالصبغات القاعدية .

قبل البدء بعملية التصبغ يجب مراعاة ما يلي :

1- يغسل السلايد بالماء والصابون ثم بالكحول ثم يجفف ويوضع على مناشف مختبرية لكي يكون جاهزا للاستعمال .

2- ترسم دائرة قطرها 1.5 سم في الجهة السفلى من السلايد

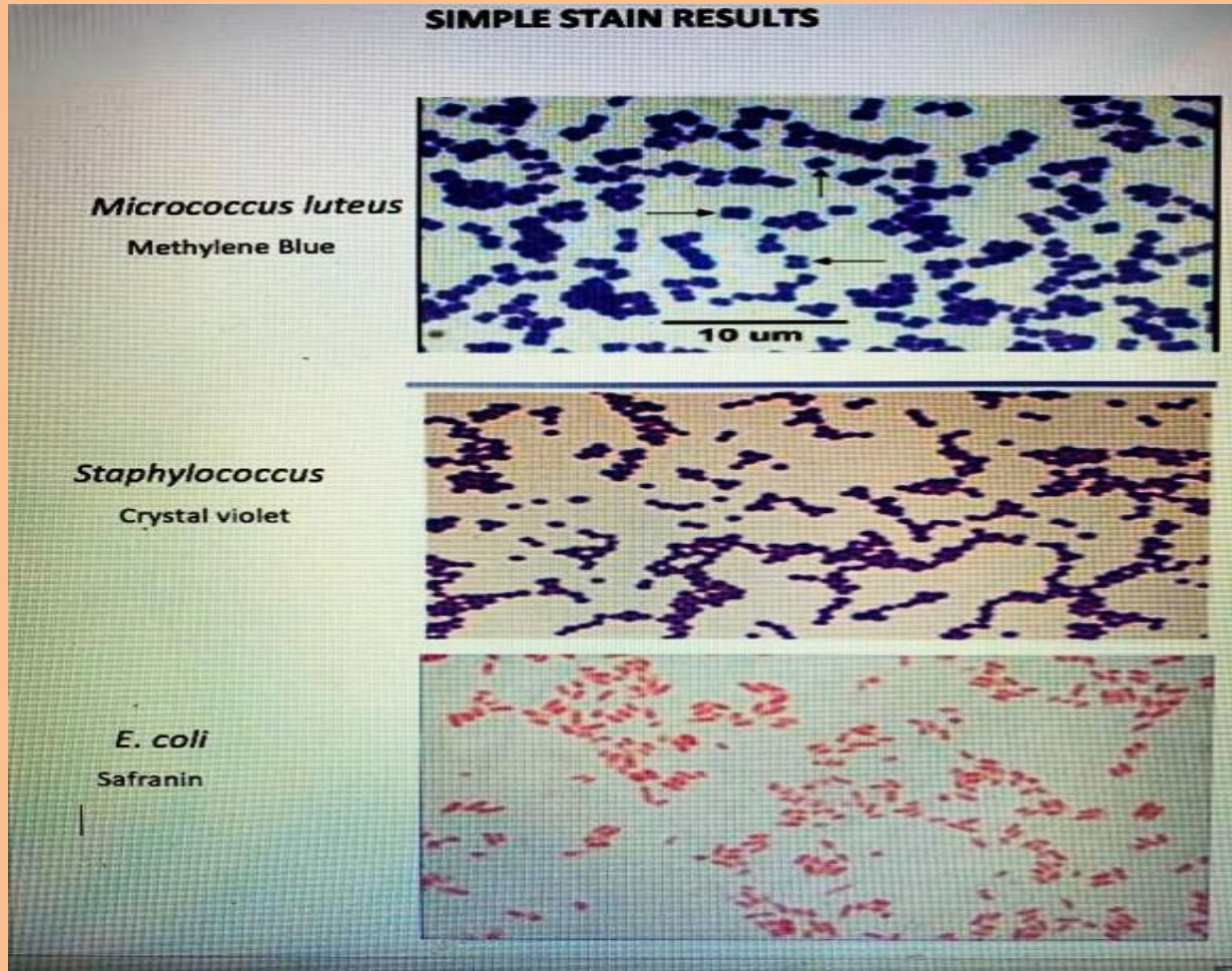
- 3- الالحاح في نشر عالق البكتريا على السلايد يؤدي الى تحطيم ترتيب الخلايا .
- 4- الانتباه الى عدم عمل لطخة ( smear ) سميكة من المزرعة الجرثومية لان اللطخة السميكة لا تسمح للإضاءة بالنفاذ من خلالها ما يجعل من الصعوبة رؤية شكل الخلايا ( اللطخة عادة ما تكون على شكل طبقة من غشاء ابيض بعد التثبيت بالحرارة )
- 5- الانتباه الى عدم التسخين الزائد للسلايد لأن هذا يعمل على تخبثر بروتين الخلايا وهذا يؤدي الى تحطيم شكل الخلايا .
- ان اهم الطرق المستعملة في تصبيغ البكتريا هي :

### أولا- التصبيغ البسيط Simple Staining :

تستعمل هذه الطريقة في معرفة اشكال وترتيب البكتريا shapes and arrangement of bacteria حيث تستعمل صبغة واحدة فقط و يمكن استعمال صبغات مختلفة مثل المثيل الازرق Methylene Blue او البلورات الارجوانية Crystal violet والتي هي من الصبغات القاعدية وتظهر البكتريا تحت المجهر مصبغة بلون الصبغة المستعملة . ولإجراء عملية التصبيغ البسيط يتبع ما يلي :

- 1- اغسل وجفف الشريحة الزجاجية جيدا .
  - 2- عقم ال Loop وذلك بمسكه بصورة مائلة وتمريه على لهب ناري ثم انقل بواسطته قطرة ماء صغيرة الى وسط الشريحة .
  - 3- عقم ال Loop ثانية ثم انقل جزء من المزرعة الميكروبية الى قطرة الماء الموجودة على الشريحة .
  - 4- بواسطة ال Loop انشر القطرة على مساحة دائرية ( قطرها حوالي 1.5 سم في وسط الشريحة )
  - عقم ال Loop جيدا بالنار قبل اعادته الى منضدة العمل
  - 5- جفف الشريحة بالهواء ثم ثبتها على النار وذلك بتمريرها على اللهب مرتين او ثلاث حتى تجف جيدا دون ان يؤدي ذلك الى حرق النموذج المراد فحصه .
- النقاط الخمسة اعلاه تمثل عملية التثبيت الحراري Heat fixation للطخة .

- 6- اصف صبغة المثيل الازرق الى الشريحة أو البلورات الارجوانية أو السفرائين Safranin ( بحيث تغطي اللوحة بصورة كاملة ) و اتركها لمدة دقيقتين ثم اغسلها بماء الحنفية لإزالة الصبغة الزائدة .
- 7- جفف الشريحة بالهواء او بورق تنظيف بوضعها بين طبقاته دون ان يؤدي ذلك الى ازالة النموذج من الشريحة وافحص تحت المجهر باستعمال العدسة الزيتية .
- 8- ارسم ما تشاهده تحت المجهر مدونا كافة الملاحظات عن النموذج المفحوص.



## التصبغ بطريقة كرام : Gram Staining

تعتبر صبغة جرام من اهم انواع الصبغات المستعملة في تشخيص البكتريا ويعود الفضل في اكتشافها الى الطبيب الدانماركي Hans Christian Gram ( 1853 – 1939 ) م . حيث قام بتطوير هذه الطريقة لتساعده في التفريق بين انواع البكتريا المسببة لذات الرئة وهي احدى طرق التصبغ التمييزي ( differential stain ) والتي تقسم البكتريا الى مجموعتين :

الاولى : الموجبة لصبغة جرام  $G^+$  ( Gram positive )، حيث تظهر البكتريا تحت المجهر مصبغه باللون البنفسجي بلون صبغة البلورات الارجوانية Crystal violet ( C.V)









الثانية : السالبة لصبغة جرام  $G^-$  ( Gram negative )، يكون لونها احمر وردي تحت المجهر بلون صبغة السفرائين Safranin .

يحتوي جدار خلية  $G^+$  على احماض امينية اقل من السالبة وهو اقل تعقيدا من جدار خلية  $G^-$  حيث يتكون جدار خلية  $G^+$  من طبقتين ، طبقة من الببتيدوكلايكان peptidoglycan والثانية تتكون من حامض التيكويك teicoic acid اما جدار خلية  $G^-$  يتكون من ثلاث طبقات هي طبقة peptidoglycan وطبقة دهنية سكرية Lipo polysacchrides وطبقة دهنية بروتينية Lipo protein .

عند اضافة صبغة الـ C.V. الى الشريحة تدخل هذه الصبغة الى داخل جدار الخلية وعند اضافة محلول اليود Iodine solution ( I ) الذي يعمل كمثبت ، سوف يتفاعل اليود ( I ) مع الـ (C.V.) وبذلك يتكون معقد من ( CV-I ) ، وعند اضافة مزيل اللون ( الكحول ) alcohol فانه يتفاعل مع دهون غشاء خلية  $G^-$  وبالتالي تفقد خلايا  $G^-$  الغشاء الخارجي وتترك طبقة الببتيدوكلايكان مكشوفة حيث يتم غسل المعقد ( CV-I ) من  $G^-$  مع الغشاء الخارجي ، وبذلك يفرغ جدار خلية  $G^-$  من اي صبغة فعند اضافة Safranin ذات اللون الاحمر فأنها ستدخل الى داخل جدار الخلية وتلونه فتكون البكتريا سالبة لصبغة جرام ، اما اذا كان المعقد ( CV – I ) غير قابل للذوبان في الكحول فأن ( C.V. ) سوف يثبت في جدار الخلية فعند اضافة السفرائين فأنها لن تجد لها مكان داخل الخلية تثبت فيه وبذلك تكون موجبة لصبغة جرام

## طريقة العمل :

- 1- حضر وثبت اللطخه كما في التصبيغ البسيط .
- 2- اضع صبغة Crystal violet (C.V.) الى اللطخه واتركها لمدة دقيقة واحدة ثم اغسل الصبغة الزائدة بالماء .
- 3- اضع محلول اليود ( Iodine solution ) واتركه لمدة دقيقة واحدة ثم اغسل بالماء .
- 4 – اضع قطرات من الكحول الايثيلي Ethyl alcohol (تركيز 95% ) واتركه لمدة نصف دقيقه ثم اغسل بالماء .
- 5 – اضع صبغة الـ ( Safranin ) واتركها لمدة نصف دقيقة ايضا ثم اغسل بالماء .
- 6 – جفف الشريحة بالهواء او بورقة تنظيف وافحص تحت المجهر مميزا البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام .
- 7 – ارسم ما تشاهده تحت المجهر مدونا كافة الملاحظات عن النموذج المفحوص .

G <sup>+</sup>	G <sup>-</sup>	تأثير الصبغة	خطوات التصبيغ
		تصبغ الخلايا باللون البنفسجي	<b>C.V. – 1</b> الصبغة الرئيسية
		يجعل الصبغة اقل قابليه للذوبان لذا فهي تلتصق بجدران الخلايا	<b>Iodine – 2</b> مثبت الصبغة
		يغسل الصبغة من جدران G <sup>-</sup>	<b>Alcohol-3</b> مزيل الصبغة
		صبغة مضادة تلتصق ب G <sup>-</sup>	<b>Safranin-4</b> الصبغة المضادة