الاحياء المجهرية

Microbiology

((الجزء العملي))

اعداد

المدرس المساعد

صفاء نعمت حسين

طريقة تحضير شريحة بكتيرية Smear

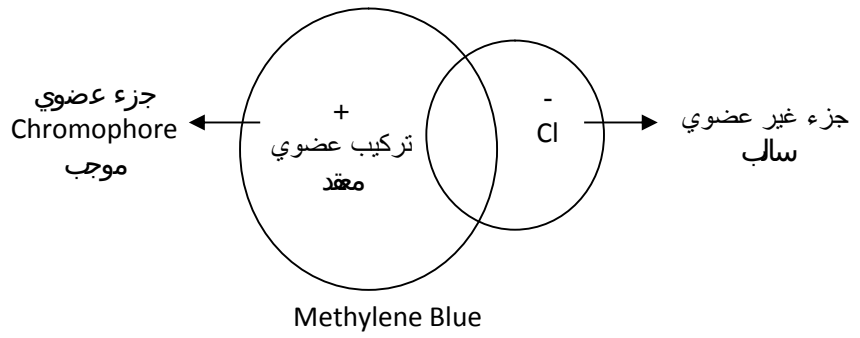
- تؤخذ شريحة زجاجية نظيفة وتوضع فوقها قطرة ماء بواسطة Loop.
- **تسحب مسحة من النمو** البكتيري من مزرعة البكتريا ويمزج جيداً مع قطرة الماء على الشريحة مع نشرها بواسطة Loop **على مساحة 1سم^2 دائري واحد** .
- يجفف مزيج البكتريا وقطرة الماء على الشريحة تجفيفاً هوائياً **ثم تثبت بإمرار** الشريحة على اللهب وبذلك يتحقق التصاق الخلايا بالشريحة .
- يضاف لها **بضع قطرات من صبغة** Crystal violet البنفسجية او صبغة Safranin الحمراء وتترك دقيقة ثم تغسل تحت تيار خفيف من ماء الحنفية وتترك لتجف .
- توضع قطرة من زيت السيدر في وسط الشريحة وتفحص بالمجهر الضوئي عند قوة التكبير X100 .

تصبيغ البكتريا Bacterial Staining

تمتاز بعض الأحياء المجهرية بشفافيتها العالية وهذا يعني إنها تسمح بمرور الضوء من خلالها بكثافة عالية تقارب كثافة الضوء المار من خلال الشريحة الزجاجية تقريباً ، عليه فأن رؤيتها تحت المجهر وهي بحالتها الاعتيادية غير المصبوغة لا تكون واضحة أي إنها لا تتميز كثيراً **من** الشريحة الزجاجية ومن هنا يتم تصبيغ Staining خلايا الأحياء المجهرية ولاسيما البكتريا ، بعبارة أخرى يمكن **أن** تلخيص الغرض الأساس من تصبيغ البكتريا كما يلي :

- **جعل** الخلايا البكترية قابلة للرؤيا تحت المجهر على **نحو واضح** .
- التصبيغ يساعد في تمييز الأشكال الخارجية للبكتريا وتمييز بعض أجزائها **كالسبوارت** (Spores) **والكبسولة** (Capsule)

الصبغات (Dyes) هي مواد كيمياوية مؤلفة من جزئين أحدهما عضوي وهو المسؤول عن التصبيغ (أي منح خلايا البكتريا **لون الصبغة**) ويسمى Chromophore **والجزء الثاني** غير عضوي مكمل قد يكون ايوناً سالباً أو موجباً مثل صبغة المثيلين الأزرق الذي يتألف من جزء عضوي موجب وجزء غير عضوي هو أيون الكلور السالب .



Methylene Blue

تقسيم الصبغات : يتم تقسيم الصبغات على أساسيين :

أولاً : تقسيم على أساس الشحنات التي تحملها **الأجزاء** العضوية المسؤولية عن التصبيغ أي من الناحية الكيمياوية **إلى** :

1- الصبغات القاعدية Basic dyes ومثال عليها :
Methylene Blue **لون الصبغة الأزرق**

Malachite Green لون الصبغة الأخضر
Safranine لون الصبغة احمر أو وردي
Crystal Violet لون الصبغة بنفسجي
ويكون الجزء العضوي في هذه الصبغات حاملاً لشحنة موجبة أما الجزء اللاعضوي فتكون سالباً .

2- الصبغات الحامضية Acidic Dyes ومثال عليها :
Acidic Fuchsin
Nigrosine
ويكون الجزء العضوي في هذه الصبغات حاملاً لشحنات سالبة والجزء اللاعضوي المكمل يكون موجباً .

ثانياً: تقسيم على أساس الغرض من استخدامها اي الغرض من عملية التصبيغ :

1- التصبيغ البسيط Simple Stain
وفيه يستخدم صبغة واحدة في جميع مراحل التصبيغ مثل Methylene Blue ، Crystal Violt، Safranine حيث يتم من خلاله استعمال الصبغة البسيطة لمشاهدة البكتريا فقط من غير ان نميز بين Gram Ve + أو Gram Ve –
خطوات التصبيغ البسيط :
أ- توضع قطرة من الصبغة المطلوبة (صبغة المثيلين الازرق) على الغشاء المحضر وتترك لمدة 2-3 دقائق .
ب- تغسل الصبغة بإمرار ماء حنفية جاري خفيف على الغشاء المصبوغ .
ت- تجفف الشريحة هوائياً أو باللهب ثم تفحص الخلايا تحت المجهر على القوة الكبرى تحت العدسة الزيتية.

2- الصبغات التفريقية Differential Stain ومثال عليها :
Grams Stain ، Giemsa Stain ، Acid-Fast Stain وفيها تستخدم أكثر من صبغة واحدة خلال مراحل التصبيغ وبالنتيجة تكتسب خلايا البكتريا لون صبغة واحدة من هذه الصبغات وليس جميع الصبغات المستخدمة وتفيد هذه الصبغات في تمييز البكتريا إلى مجموعتين أو أكثر اعتماداً على لون الصبغة المكتسبة، وسيأتي تفصيل تصبيغ البكتريا بصبغة كرام لاحقاً.

3- الصبغات السالبة Negative Stain
ويقصد بها الصبغات الحامضية وهذه لا تصبغ البكتريا نفسها وإنما محيط البكتريا تاركة البكتريا تبدو شفافة تحت المجهر.

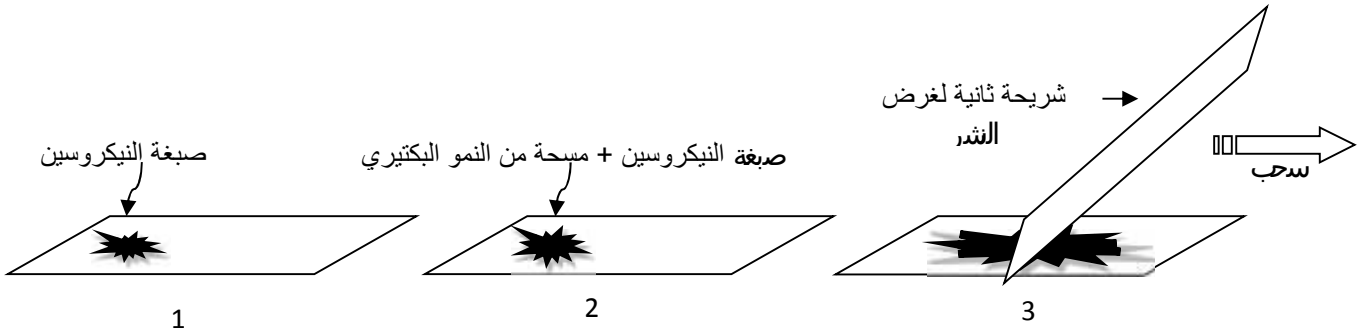
4- الصبغات المتخصصة Special Stain
وهذه الصبغات تستخدم لتصبيغ أجزاء معينة من البكتريا كالسبورات Spore Stain والكبسولة Capsule والاسواط Flagelia Stain دون أجزاء الخلية الأخرى .

التصبيغ السالب Negative Staining

يهدف هذا النوع من التصبيغ إلى التعرف على الشكل المورفولوجي للبكتريا حيث يستخدم فيه صبغات حامضية أي التي تتنافر مع خلايا البكتريا ذات الطبيعة الحمضية أيضا فيحدث إن الصبغة لا تدخل إلى داخل الخلية البكتيرية ولا تتصبغ بها فتبقى الصبغة خارج الخلية وتعمل على تلوين محيط الخلية بلون الصبغة المستخدمة .

وتتم عملية التصبيغ بأتباع الخطوات التالية :

1- توضع قطرات من صبغة النيكروسين (Nigrosin) قريباً من إحدى نهايتي الشريحة .
2- تؤخذ مسحة من النمو البكتيري من المزرعة بواسطة Loop تمزج مع الصبغة على الشريحة .
3- يتم نشر مزيج النمو البكتيري والصبغة على طول الشريحة بإمرار حافة شريحة ثانية نظيفة ويوزع المزيج على طول الشريحة الأولى .



4- تترك الشريحة إلى أن تجف تماماً وتفحص تحت المجهر باستعمال العدسة الصغرى ثم الزيتية حيث تلاحظ الخلايا شفافة (غير مصبوغة) تلألأ في محيط أسود مصبوغ بلون صبغة النيكروسين الأسود .

<u>ملاحظة</u> : ليست هنالك معاملة حرارة أو تثبيت البكتريا بطريقة تحضير الغشاء في هذه الطريقة وبهذا تختلف هذه الطريقة عن باقي طرق التصبيغ الأخرى.