جامعة تكريت
كلية التربية للبنات
قسم الاقتصاد المنزلي

المادة :- احياء مجهرية عملي

المرحلة الثانية

عنوان المحاضرة :- طرق تصبيغ البكتريا

مدرس المادة

م.م. بيادر جلال عبد الحميد النعيمي

الايميل الجامعي:- Bayaderjalal@tu.edu.iq

المدرس المساعد بيادر جلال عبد الحميد

جامعة تكريت
كلية التربية للبنات
قسم الاقتصاد المنزلي

- **تصبيغ البكتريا:**

عند فحص البكتريا تحت المجهر بشكلها الطبيعي وبدون تصبيغ يمكن رؤية اجسام صغيرة حية وشفافة ودقيقة واحيانا متحركة كذلك يمكن فحص البكتريا بصورتها الطبيعية بعد تعليق الخلايا في المحلول الفسيلوجي saline قم تؤخذ قطرة من العالق وتوضع على شريحة نظيفة ثم يوضع الغطاء وتفحص. هذه الطريقة تسمى ب wet mount.

- **حركة البكتريا نوعان :**

1- الحركة البراونية: هي حركة غير حقيقية للبكتريا تظهر نتيجة تذبذب او اهتزاز البكتريا نتيجة تصادم جزيئات المحلول مع خلايا البكتريا وهي تحصل بين الجزيئات ضمن المحلول.
2- حركة البكتريا: وهي حركة ناتجة عن امتلاك بعض الانواع من البكتريا على اعضاء الحركة او الاسواط البكتيرية من مكان الى أخر.

المسحة : هي اول واهم خطوة في التصبيغ.

1- الصبغة البسيطة\ simple stain .

هي اسرع واسهل طرق تصبيغ البكتريا سميت بهذا الاسم لأنها تستخدم نوع واحد من الاصباغ في خطوة واحدة.

أن معظم الصبغات التي تستخدم في الاحياء المجهرية تعد املاح من نوعين.

أ- الاملاح الحامضية: والتي يكون فيها الايون الحامل للصبغة او اللون شحنة سالبة مثلا: -sodium+ eosinate الصبغة في هذه الحالة هي الايوسين.

ب- الاملاح القاعدية: يكون فيها الكروموفور موجب الشحنة مثلا: - methylene blue + chloride الصبغة في هذه الحالة المثلين الأزرق.

ان النوع الاول من الاصباغ وهي الحامضية يتحد مع قاعدة مثل NaOH لتكوين مركب ملحي هو الصبغة.

اما النوع الثاني وهي القاعدية تتفاعل مع حامض مثل HCL ليعطي المركب الملحي او الصبغة , اذا الاصباغ الحامضية هي التي تحمل شحنة سالبة والقاعدية هي التي تحمل شحنة موجبة. اما البكتريا فقد تحمل العديد من الاحماض(سالبة الشحنة) كما تحتوي على طبيعة قاعدية (موجبة الشحنة) لكن الحصيلة النهائية للبكتريا هي الشحنة السالبة اي تتصرف البكتريا ك جسم سالب تجاه الصبغات حيث ان الاصباغ القاعدية ذات الشحنة الموجبة تنجذب الى الخلايا البكتيرية اما الاحماض سالبة الشحنة تتنافر مع الشحنة
السالبة على الخلية البكتيرية.

جامعة تكريت
كلية التربية للبنات
قسم الاقتصاد المنزلي

2- الاصباغ التفاضلية/ التفريقية. Differental stains.

تساعد هذه الصبغة علماء الاحياء المجهرية بتقسيم البكتريا مباشرة الى مجموعات اصغر يمكن التعامل معها بشكل افضل لغرض تشخيصها ولاجراء هذا التمرين يجب

1- فهم أهمية صبغة كرام وماهي مكوناتها الخلوية البكتيرية المعنية بتفاعلات التصبيغ التفريقية
2- فهم الأهمية السريرية لطرق التصبيغ بالصبغة المقاومة للاحماض وحبيبات Metachromatic ومعرفة الية عمل هذه الصبغات
3- معرفة مكونات طرق التصبيغ التفريقي ولماذا تختلف عن طرق التصبيغ البسيط

هي من مساوئ التحضيرات الحية حيث ان الشريحة سريعة الجفاف تحت تأثير حرارة المصدر الضوئي للمجهر اضافة الى خطورة تلوث اليدين بالبكتريا الحية.

3- صبغة كرام. Gram stain.

تسمى بالصبغة العظيمة لأنها من اهم واكثر الصبغات استخداما واعتمدت هذه الصبغة كخطوة اولى في تشخيص البكتريا منذ اكتشافها من Christian gram في عام 1883 م وتصنف الى مجموعتين هما:

أ- بكتيريا موجبة لصبغة كرام مثل المكورات و العصيات.
ب- بكتريا سالبة لصبغة كرام وردية او حمراء.

4- صبغة السبور. Spare staining.

هي عبارة عن خلايا خاملة يتم انتاجها عند نفاذ بعض المواد الغذائية الرئيسية مثل الكاربون والنايتروجين. حالما تستلم الخلايا الخضرية هذا الحافز تمر بعملية تحول تستغرق حوالي 6 الى 8 ساعات ينتج عنها سبورات داخلية. وهذه التراكيب تعد اكثر الانواع المقاومة للظروف الصعبة والتي لا تتحملها الخلايا الخضرية مثل الحرارة والجفاف والاشعة فوق البنفسجية وحتى الغليان لعدة ساعات. وبسبب هذه المقاومة العالية تتواجد هذه التراكيب في كل مكان الا ان هناك خمسة اجناس فقط مكونة للسبورات وهي :

أ- البكتريا العصوية.
ب- المطثيات.
ت- بكتريا الكروية.
ث- عصيات الحليب المكونة للسبورات.

ج- العصيات اللاهوائية.
وبعضها قد اكون ممرضة للأنسان.
أ- كلوستريديوم بوتولينوم: تسبب مرض التسمم البوتيوليني وهو مرض ناتج عن تلوث الخضراوات والاطعمة المعلبة بالخلايا الخضرية التي تنتج سموم قاتلة.
ب- المطثية الحاطمة :التي تسبب موت الانسجة.
ت- بكتريا الكزاز: تسبب مرض الكزاز.
ث- العصوية الجمرية : التي تسبب الجمرة الخبيثة.

مقاومة هذه التراكيب للظروف الصعبة بسبب الأتي:

أ- ان غلاف السبور متعدد الطبقات ويحتوي على حامض بأسم dipicolinic acid وهذه المادة تؤدي الى ازالة الماء من السبور ولذلك يصبح خامل ايضيا وذو مقاومة عالية للجفاف والحرارة وأن اغلفة الجدار المتعددة تحمي السبور من تأثير الاشعاع والمواد .
ب- قلة الماء الحر في السايتوبلازم.
ج- احتواء بعض السبورات على انزيمات مقاومة للحرارة.

اشكال السبور ومواقعه: يأتي السبور بشكل كروي او بيضوي ومواقعه:

1- شبه نهائي.
2- نهائي.
3- وسطي.

- **الجزء العملي**

طريقة التصبيغ بصبغة كرام

التحضيرات

1- مزرعة بكتيرية عمرها 24 ساعة
2- شريحة زجاجية مع غطاء الشريحة
3- صبغة كرام
4- لوب لنقل المزرع
5- مصباح بنزن

اعداد المساعد باسل جلال عبدالحميد

6- مجهر ضوئي
7- قطرة زيتية .

طريقة لعمل

1- نعقم اللوب على مصباح بنزن لغرض التعقيم
2- نضع قطرة من الماء المقطر وناخذ جزء من المستعمرة وننشرها على السلايد وتجفف المستعمرة بالتمرير على مصباح بنزن
3- بعد التثبيت نبدا بتصبيغ البكتريا حسب تسلسل الصبغات
4- صبغة محلول Crystal violet
5- محلول اليود
6- كحول تركيز 95% او استون
7- محلول Safranin الصبغة المعادلة
8- تجفف الشريحة ثم يتم فحصها تحت المجهر بقوة تكبير 100 وباستخدام القطرة الزيتية

عند ظهور المستعمرات باللون الأحمر يدل على انها سالبة لصبغة كرام اما اذا ظهرت باللون البنفسجي فتدل على انها موجبة لصبغة كرام .

انتهت المحاضرة.

م.م. عباس احمد مساعد بيادر جلال عبدالحميد