كلية العلوم

القسم : علم الحياة

السنة : الرابعة

المادة : بيولوجيا الجراثيم والفيروسات

المحاضرة : الرابعة/عملي/

{{ مكتبة A to Z }}

Facebook Group : مكتبة A to Z

كلية العلوم ، كلية الصيدلة ، الهندسة التقنية ، تكنولوجيا المعلومات والاتصالات

4

يمكنكم طلب المحاضرات برسالة نصية (SMS) أو عبر (What's app-Telegram) على الرقم 0931497960

دراسة الخلايا الميكروبية ومكوناتها

- تعتمد الدراسة المورفولوجية (الشكلية) للأحياء الدقيقة على الشرائح الملونة، والتلوين يعني صبغ الكائن الحي الدقيق بصبغات حيوية تختلف بطبيعتها وبتقنية تحضيرها حسب البنية المطلوب دراستها.
- تُستخدم في عمليات التلوين مواد وتقنيات خاصة لتحضير وتجهيز المحضرات بعد تثبيتها،علمًا أن الأحياء الدقيقة تبدو بالمجهر الضوئي العادي غير ملونة.

– الملونات : Stains

الملونات (الأصبغة) : هي مواد صباغية كيميائية تُلوِّن خلايا الأحياء الدقيقة، ويكون هذا التلوين إما بالتصاق المادة الملونة وترسبها على الخلية وهذا ما يطلق عليه اسم التفضيض، كما هو الحال في أملاح الفضة، أو بدخول هذه الملونات عبر الجدار الخلوي إلى داخل الخلية وتكوين معقدات مع مكوناتها الكيميائية.

تصنف الملونات المستعملة إلى:

ملونات طبيعية Natural Stains :

وهي الصبغات المستخلصة من النسج النباتية مثل الهيماتوكسلين Hematoxylin .

ملونات إصطناعية أو تركيبية Synthetic Stains :

وهي عبارة عن أملاح تتألف من أيونات موجبة وسالبة، ومنها القاعدية أو الأساسية

ويرجع لونها إلى الأيون الموجب الذي يتفاعل مع المكونات السالبة في الخلية الميكروبية. وللملونات الأساسية مقدرة كبيرة على صبغ الخلايا البكتيرية وخاصة النواة ، لهذا فهي شائعة الاستعمال ، وقد تصبغ البكتريا وهي حية.

من الملونات الأساسية (القاعدية) نذكر الكريستال البنفسجي Crystal Violet، وأزرق الميتيلين Methylene Blue، والسفرانين Safranine، والفوكسين القاعدي Fuchsin Basic.

أما الملونات الحامضية فلا تنجذب نحو أغلب الميكروبات السالبة (الميكروبات تكون عادة مشحونة بشكل ضعيف بشحنة سالبة)، فالملون إذاً لا يلون العينة وإنما يلون ماحولها ، يبدو الميكروب غير ملون على قاعدة ملونة، لذا دُعيت هذه الطريقة بالتلوين السالب Negative Staining، وهي طريقة جيدة لملاحظة الشكل العام للخلية وحجمها ودراسة المحفظة Capsule ، ومن أمثلتها : الأيوزين Eosine ، والنيجروسين Nigrosine ، والفوكسين الحامضي Acidic Fuchsin، وحمض البيكريك Acid Picric .

– أنواع التلوين : Kinds of Stains

يستخدم الميكروبيولوجيون عادة ثلاثة طرائق في التلوين:

التلوين البسيط Simple Stains .

التلوين المتمايز أوالمركب Different or Complex Stains

التلوين الخاص Special Stains .

٢- ٢ – ١ –التلوين البسيط : Simple Stains

يقصد به استعمال صبغة مفردة في تلوين الميكروبات، وذلك بعد تحضير اللطاخة.

توضع الصبغة بتماس مباشر مع المحضر لمدة (١ – ٣) دقائق حسب تركيز الصبغة، تستخدم هذه الطريقة للتحري عن وجود أو عدم وجود الميكروبات في وسط ما، ولتحديد الشكل المورفولوجي لها ، وتوضعاتها بالنسبة لبعضها البعض.

من الأصبغة المستخدمة في هذه الطريقة نذكر: أزرق الميتيلين Methylene Blue ، كاربول الفوكسين Carbol fuchsin ، الكريستال البنفسجي Crystal Violet ، السفرانين Safranin .

تُتبع الخطوات التالية في عملية التلوين :

تُنظف الشريحة الزجاجية جيداً لإزالة كافة الأوساخ خصوصاً آثار المواد الدسمة، ثم تُمرر الشريحة على لهب مصباح غازي (لهب بنزن)، أو لهب مصباح كحولي ثلاث مرات بغرض التعقيم الجزئي والتنظيف.

تُوضع الشريحة على حامل الشرائح على أن يكون السطح المنظف للأعلى.

تُعقم إبرة التلقيح وذلك بوضع السلك عموديًا فوق اللهب حتى درجة الإحمرار لضمان قتل كافة الأحياء الدقيقة التي قد تتواجد عليها ، يتم نقل قطرة من الماء بواسطة الإبرة إلى مركز الشريحة (هذا إذا كانت المزرعة الميكروبية قد نمت على سطح وسط زرعي صلب)، أما إذا كانت المزرعة منماة في وسط سائل فلا داعي لوضع قطرة الماء.

تُعقم الإبرة ثانية وتُنزع سدادة المزرعة المحمولة باليد اليسرى بواسطة الخنصر وراحة اليد اليمنى، وتُمرر فوهة الأنبوب الحاوي على المزرعة فوق اللهب بغرض التعقيم، ثم يؤخذ جزء من النمو الميكروبي.

تُعقم فوهة الأنبوب ثانية، ثم تُوضع السدادة مكانها ويُعاد الأنبوب مكانه.

يُنقل ماأخذ بالإبرة إلى قطرة الماء الموضوعة بمركز الشريحة، وتُخلط بها حتى نحصل على معلق متجانس، ثم نقوم بنشر هذه المعلق على سطح الشريحة بحيث نحصل على لطاخة متجانسة مساحتها بحدود ٢ سم .

تُعقم الإبرة من جديد بواسطة اللهب حتى درجة الإحمرار بعد الفروغ من استخدامها

تُترك اللطاخة لتجف بالهواء أو تُعرض للهب عن مسافة ١٥-٢٠ سم بحيث لا تحترق ، ويُراعى بحيث يكون اتجاه اللطاخة نحو الأعلى .

تُلون اللطاخة بالملون المناسب ولفترة زمنية محددة وذلك بغمرها بالملون ، فمثلاً عند استخدام ملون أزرق الميتيلين يكون زمن التلوين (٢-٣) دقيقة، وعند استخدام ملون الفوكسين يكون زمن التلوين (١-٢) دقيقة.

يُغسل المحضر بالماء، وذلك بتمرير تيار ماء جارٍ خفيف على الشريحة المائلة لإزالة الملون الزائد.

يُجفف المحضر بالهواء أو يُعرض للهب الخفيف، ثم يُفحص تحت المجهر بالعدسة المناسبة (التكبير المناسب).

التلوين المتمايز أو المركب : Different or Complex Stains

تُستخدم هذه الطريقة للتفريق بين الأنواع أو المجموعات المختلفة من الأحياء الدقيقة استنادا إلى خواصها بالنسبة للملونات ، ومن أهم طرق التلوين هذه: التلوين بصبغة غرام Gram Stain والتلوين الحامضي Acid – fast Stain .

– طريقة غرام: Gram Stain

اقترحت هذه الطريقة من قبل العالم الدانماركي هانس كريستيان غرام عام ١٨٨٤، وهي من أكثر الطرق المتبعة في الفحص الميكروبي للتعرف على البكتريا وتمييزها عن بعضها، واستنادا إليها تقسم البكتريا إلى سلبية الغرام (-) Gram Negative، وهي التي لاتتلون بصبغة غرام وتكتسب اللون الأحمر الزهري، و بكتريا موجبة الغرام (+) Gram Positive وهي التي تتلون بصبغة غرام وتكتسب اللون البنفسجي.

يمكن تجزئة الطريقة إلى ثلاث مراحل:

١ –**التلوين** : صبغ المحضر بالملونات المطلوبة.

٢ –**الترسيخ أو التثبيت** : تقوية فعل الملون باستعمال محلول لوغول أو حمض الخل % ١ .

٣ – **التمييز** : توضيح المحضر وإعطائه دقة أكبر وذلك بتخليصه من الملون الزائد بالكحول أو بمزيج من الكحول والأسيتون (محلول نيكول) .

محاليل صبغة غرام :

١-الجنسيان البنفسجي (الكريستال البنفجسي) Crystal Violet : ويتركب من :

كريستال بنفسجي	١	غ
كحول إتيلي	١٠	مل
فينول (حمض الكربوليك)	١	غ
ماء مقطر يكمل حتى	١٠٠	مل

يُترك المحلول لمدة ٢٤ ساعة ثم يُرشح .

٢- محلول لوغول (اليود اليودي) Iodine Solution :

يود	١	غ
يود البوتاسيوم	٢	غ
ماء مقطر يكمل حتى	٢٠٠	مل

يُحفظ بعيداً عن الضوء ، وفي حال ظهور رواسب أثناء التخزين نضيف بيكربونات الصوديوم يُحرك ثم يُرشح .

٣ –محلول تسيل (الفوكسين الكربولي) Ziehl 'Solution :

فوكسين قاعدي	٠.٣ – ١	غ
كحول إتيلي % ٩٥	١٠	مل
فينول	٥	غ
ماء مقطر يكمل حتى	١٠٠	مل

نحل الفوكسين في الكحول الإيتلي بشكل كامل ثم نضيف إليه الفينول ونترك المحلول لمدة ٢٤ ساعة ثم نرشح .

٤ –محلول نيكول Nichol – Solution :

كحول إتيلي	٧٠	مل
أسيتون	٣٠	مل

خطوات العمل بطريقة غرام Gram method :

١ – تُحضر اللطاخة من مزرعة بكتيرية حديثة وتُثبت بتمريرها على اللهب مرات عدة.

٢ – تُغمر اللطاخة بمحلول الجنسيان البنفسجي لمدة دقيقة واحدة .

٣ – يتم التخلص من فائض الجنسيان البنفسجي بتيار ماء جارٍ خفيف على الشريحة المائلة .

٤ – تُغمر اللطاخة بمحلول لوغول لمدة دقيقة واحدة .

٥ – تُغسل الشريحة بالماء وتُعامل بمحلول نيكول قطرة قطرة لمدة ١٥ – ٢٠ ثانية حتى يزول لون ماء الغسيل الناتج أو يصبح لونه رائقاً أوبنفسجياً (فاتح جداً)، ويمكن إستخدام محلول الكحول الإتيلي ذو التركيز ٩٥ % أو كحول مطلق ، وهذه الخطوة حساسة جداً لأن زيادة زمن معاملة المحضر بالكحول عن المدة المحددة يؤدي إلى زوال لون البكتريا موجبة الغرام ، كما أن الإنقاص من زمن المعاملة بالكحول الإتيلي يؤدي إلى إبقاء المحضر ملوناً بالصبغة الأساسية (الكريستال + لوغول) ، وتبدو البكتريا ملونة وكأنها موجبة الغرام ، ولا يمكن حينئذ تمييز البكتريا سالبة الغرام عن الموجبة .

٦ – بعد غسل المحضر بالماء تُغمر الشريحة بمحلول تسيل لمدة ٠.٥ –١.٠دقيقة .

٧ – تغسل الشريحة بعدها بالماء الجاري للتخلص من الملون الزائد .

٨ – تجفف الشريحة بالهواء العادي أو الهواء الساخن فوق اللهب الخفيف.

٩ – تفحص العينة بالعدسة الغاطسة للمجهر بعد وضع قطرة من زيت الأرز.

آلية الصبغ :

يلعب الجدار الخلوي دورا أساسيا في عملية التلوين ، فبعد اختراق الكريستال البنفسجي الجدار الخلوي للخلية الميكروبية، ومن ثم إضافة محلول لوغول يتشكل معقد اليود مع الكريستال البنفسجي داخل الخلية، وعند إضافة مزيج الكحول والأسيتون فإنه يخترق الجدار الخلوي للخلايا سلبية غرام ويؤدي إلى حل المعقد وإذابته وخروجه خارج الخلية ، وتصبح الخلية عديمة اللون، وبعد إضافة محلول تسيل تنصبغ الخلايا باللون الأحمر ولذلك نسميها سلبية غرام ـ

أما خلايا البكتريا موجبة الغرام فإن الكحول والأسيتون يجدان صعوبة في اختراق الجدار الخلوي ، والزمن لا يكون كافياً لإتمام هذه العملية ولذلك يبقى لونها بنفسجي ، وتدعى البكتريا بموجبة الغرام .

هناك **تفسير آخر للظاهرة :** يتعلق بتركيب الجدار الخلوي للبكتريا حيث إن جدار الخلايا سالبة الغرام يحتوي على أكثر من ٢٠ % دهون ، وعند المعاملة بالكحول تتم إذابة هذه الدهون وزيادة نفاذية الخلية مما يسهل إنحلال معقد الكريستال البنفجسي مع اليود وإخراجه خارج الخلية، وعلى العكس من ذلك فإن انخفاض نسبة الدهون في الجدار الخلوي للبكتريا موجبة الغرام إلى أقل من ٥ % يجعلها تفقد جزءا من مائها عند معاملتها بالكحول مما يؤدي إلى تقلص مساماتها وعدم إمكانية خروج معقد الكريستال البنفجسي مع اليود، أي أنها تحتفظ بالصبغة الأصلية وتظهر ملونة بلون بنفسجي وبالتالي توصف بأنها موجبة الغرام.