كلية : التربية الاساسية – حديثة

القسم او الفرع : العلوم العامة فرع الاحياء

المرحلة: الثانية

أستاذ المادة : لما دلي ابراهيم

اسم المادة بالغة العربية : احياء مجهرية / الجزء العملي

اسم المادة باللغة الإنكليزية : Microbiology

اسم المحاضرة الخامسة باللغة العربية: تصبيغ البكتريا ا

اسم المحاضرة الخامسة باللغة الإنكليزية: 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 : ؟
البكتريا عبارة عن خلايا شفافة لا يمكن رؤيتها بالمجهر الا بعد تصبيغها التصبيغ يفيدنا في 1- : رؤية الخلايا الشفافة بوضوح 2-معرفة شكل وحجم الخلايا البكتيرية 3-للكشف عن بعض التفاعلا الفيزيائية والكيميائية التي تحدثها الصبغات مع الخلية البكتيرية لتساعد في تشخيص البكتريا

- 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 .
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 .

1. الصبغات الحامضية Acidic Dyes ومثال عليها :
   Acidic Fuchsin
   Nigrosine

ويكون الجزء العضوي في هذه الصبغات حالماً 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 –

<u>خطوات التصبيغ البسيط</u> :

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.

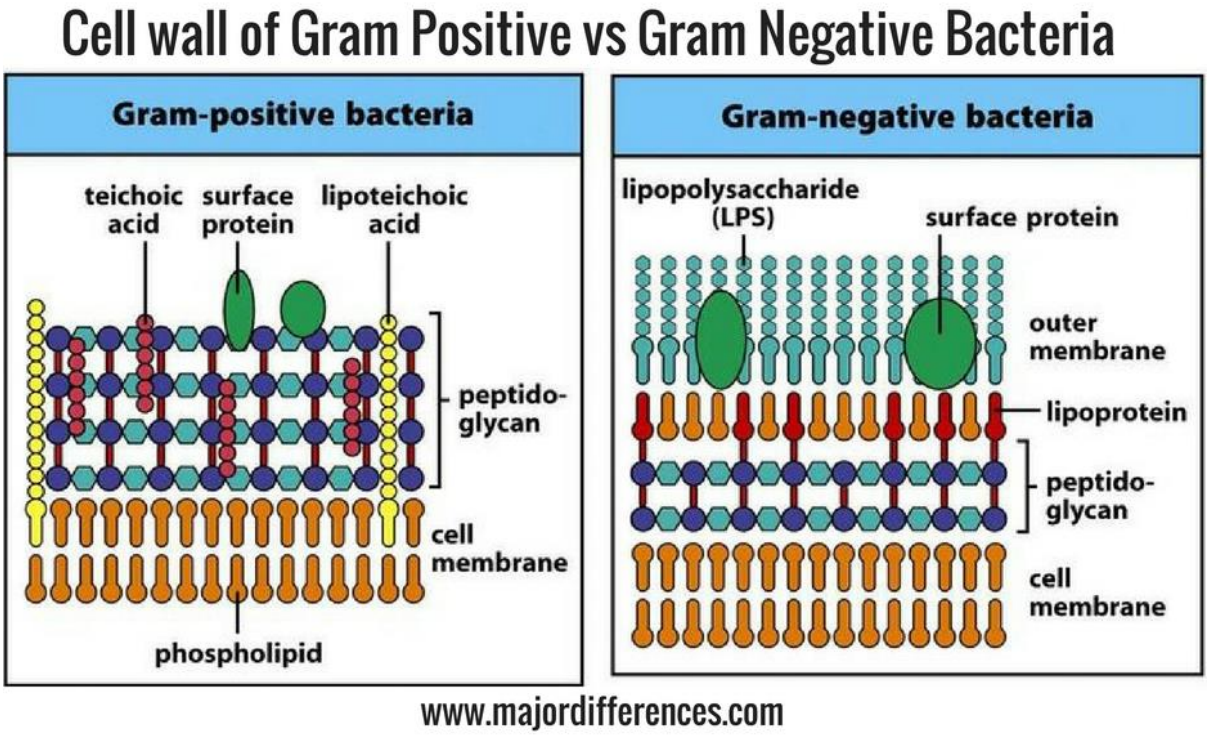
الصبغ المركب) staining compound تصبيغ(gram)

تستخدم فية اكثرمن صبغة واحدة ويعرف ايضا بالصبغ التفريقي differential staining لانه يتم فية التفرقة بين البكتريا في مجاميع مختلفة تبعا لقابليتها وتفاعلها مع الاصباغ المستخدمة في الصبغ. ومن اهم طرق الصبغ المركب صبغ جرام.

عند اتباع هذة الطريقة نجد ان البكتريا تنقسم الى مجموعتين 1-بكتريا تصبغ بالصبغة القاعدية الاساسية الكريستال البفسجي(في وجود اليود بدرجة لايمكن معها ازالة الصبغة من الخلايا الغسيل بالكحول او الاسيتون positive gram .وتصبغ خلايا البكتريا باللون البفسجي وتعرف بالبكتريا الموجبة لجرام

2-بكتريا سالبة لصبغة كرام تزال منها الصبغة البنفسجية بعد الغسل بالكحول بسهولة لذلك)لذلك تصبح الخلايا شفافة بعد الغسل بالكحول)ولتسهيل رؤية خلاياها تصبغ بصبغ احمر مثل)السفرانين (وتسمى بالصبغة العكسية . حيث تصبغ خاليا البكتريا باللون االحمر وتسمى البكتريا السالبة لجرام . negative gramوتفسير هذا الاختلاف يرجع الى اسس كيمائية اذ ان سطح خلايا البكتريا الموجبة لجرام يحتوي على كميات من ملح المغنيسيوم لحمض الريبونيوكليك والتي تكون مركب معقد مع كل من البروتين الخلوي وصبغة الكريستال البفسجية واليود.وهذاالمركب المعقد يثبت الصبغة في الخلية ويجلعها اكثر مقاومة لالزالة عند الغسيل بالكحول.اما البكتريا السالبة لجرام فسطح خلاياها لايحتوي على حمض الريبو نيوكليك والمغنسيوم لذلك فأن صبغة الكريستال البنفسجي لاتثبت وتزال عندالغسيل بالكحول.

خطوات العمل1- : يحضر غشاء بكتيري من مزرعة بكتريا النامية على الاكار ،ثم يثبت بتمريرة في اللهب عدة مرات2- .تترك الشريحة لتبرد ثم يغمر الغشاء بضبغة الكريستال البنفسجي لمدة دقيقة3- .تغسل الشريحة بالماء الجاري4- .يغمر الغشاء باليود لمدة دقيقة 1-تغسل الشريحة بالماء ثم تترك لتجف بالهواء6- .يغسل الغشاء بالكحول الايثانول باضافتة للشريحة نقطة نقطة مع امالة الشريحة ليتساقط منها الكحول حتى يصبح الكحول المتساقط عديم اللون 7-يغسل الغشاء بالماء8- .يغمر الغشاء بصبغ السفرانين لمدة نصف دقيقة6- .يغسل الغشاء بالماء11- .تجفف الشريحة ثم تفحص بالمجهر



• **الفرق بين البكتريا الموجبة لصبغة جرام والسالبة**

هو تركيب جدار الخلية الكيميائي حيث الموجبة لصبغة جرام تحتوي على أحماض أمنية أقل من السالبة لصبغة جرام و تحتوي مود دهنية في البكتيريا السالبة لجرام أعلى من الموجبة لجرام ، و الجدار الخلوي في البكتيريا الموجبة لصبغة جرام أقل تعقيداً من البكتيريا السالبة حيث إن الجدار الخلوي في البكتيريا الموجبة لصبغة جرام تتكون من طبقتين وهما طبقة الموكوبيبتيد mucopeptide وتعرف بـ peptidoglycan و الطبقة الثانية مكون من حمض التيكوئيك teicoic acid ، أما جدار الخلوي للبكتيريا السالبة لصبغة الجرام تتكون من ثلاث طبقات هي طبقة الموكوبيبتيد mucopeptide وتعرف بـ peptidoglycan و طبقة دهنية سكرية lipo polysaccharides و طبقة دهنية بروتينية lipo protein .

المصادر/ الكتاب العلمي للاحياء المجهرية /رمضن الحديثي_ عمـــان : دار زهران للنشر،عامن، 2.