الجمهورية العربية السورية
وزارة التعليم العالي
جامعة حماة
كلية الزراعة

علم الأحياء الدقيقة

(الجزء العملي)

الجلسة العملية السادسة

إعداد

الدكتور عبد الواحد الطحلي

دكتوراه باختصاص الأحياء الدقيقة

جامعة حماة 2020 – 2021

طرائق التلوين (الصبغات الجرثومية)

Techniques of Staining (Gram Staining)

يوجد عدة طرائق لتلوين الجراثيم تختلف باختلاف الأنواع الجرثومية وهدف التجربة، وطرائق التلوين إما بسيطة أو مركبة.

- **التلوين البسيط Simple staining:**

يتم بوضع الملون بتماس مع الغشاء الجرثومي مدة تتراوح بين دقيقة واحدة وعدة دقائق حسب طبيعة وكثافة الملون فتبدو عندها الجراثيم مصبوغة بلون ذلك الملون. يستفاد من هذه العملية بمعرفة وجود أو عدم وجود الجراثيم وتحديد شكل الجراثيم واصطفافها مثال طريقة التلوين بزرقة الميتلين.

الأدوات والمواد اللازمة:

1- صفائح زجاجية نظيفة.

2- مزارع جرثومية عمرها 24 ساعة موجودة على سطح وسط الآغار.

3- صبغة أزرق الميتلين. (حضر الصبغة، ورشح المحلول قبل الاستعمال).

4- زيت الأرز النقي.

طريقة العمل:

1- حضر الغشاء الجرثومي وثبته بالطريقة السابقة.

2- اغسل الغشاء الجرثومي بتيار خفيف من الماء (عبوة غسيل بلاستيكية) كي لا تنجرف الخلايا الجرثومية من سطح الصفيحة الزجاجية.

3- ضع على الغشاء قطرة من الملون لمدة مناسبة 2- 3 دقائق.

4- أَمِلْ الصفيحة حتى تتخلص من الملون الزائد.

5- اغسل بتيار مائي خفيف حتى زوال كامل الملون من على الصفيحة.

6- جفف الصفيحة بورق النشاف بعناية فائقة أو بتعريضها لتيار من الهواء أو لهب خفيف.

7- ضع قطرة من زيت الأرز على الغشاء الجرثومي، ثم افحصه بالعدسة الغاطسة.

8- دون ملاحظاتك حول التجربة (لون الخلايا – تجمعها – شكلها ..... الخ) مع الرسم.

- **التلوين السلبي Negative staining:**

تعدُّ طريقة التلوين السلبي للأغشية الجرثومية ذات أهمية كبرى في تمييز الخلايا الجرثومية، وتستخدم هذه الطريقة عند الرغبة في قياس حجم البكتريا حيث تظهر الخلايا بحجمها الطبيعي لعدم استخدام الحرارة مطلقاً أثناء إجراء الصبغ بهذه الطريقة كما تستخدم هذه الطريقة لدراسة الشكل الظاهري للجراثيم. وتسمى بالصبغة السالبة لأنه يتم صبغ الشريحة دون الخلايا الجرثومية فتظهر الخلايا شفافة غير مصبوغة بينما بقية الشريحة تظهر ملونة، ويرجع السبب في عدم دخول الصبغة إلى جسم الخلية هو أن الصبغة المستخدمة تكون ذات جزيئات كبيرة لا تنفذ خلال الجدار الخلوي مثل الحبر الهندي (الصيني)، أو تكون صبغات حامضية عديمة أو قليلة التأثير على الخلايا الجرثومية.

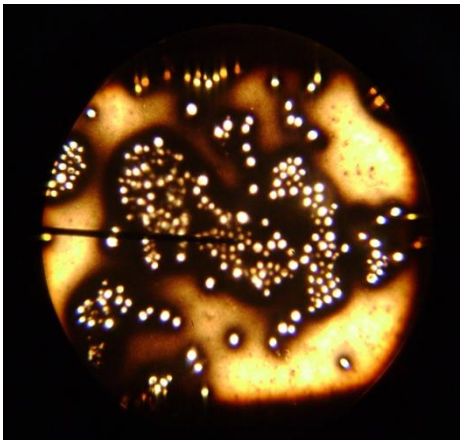
- **آلية التلوين السلبي:** (الشكل 17)

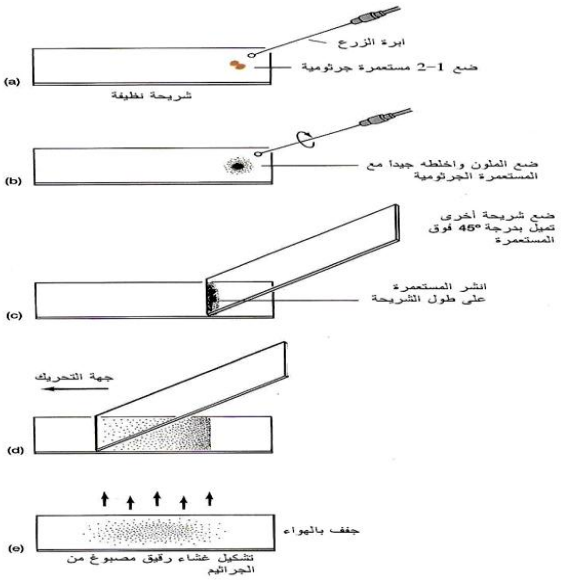
1- ضع جزءاً من مستعمرة جرثومية على طرف صفيحة نظيفة باستعمال إبرة زرع معقمة. يمكن أخذ جزء من بين الأسنان.

2- ضع فوق جزء المستعمرة المنقول قطرة أو اثنتين بالإبرة من أحد الملونات المراد استخدامها مثل النيغروسين Nigrosin أو الحبر الصيني أو محلول الإيوزين، وامزجهم مع الجراثيم بشكل جيد.

3- افرش المعلق على كامل الصفيحة باستخدام ساترة حيث توضع الساترة على مكان المعلق فوق الصفيحة بزاوية 45° بحيث ينتشر معلق الجرثوم- الملون على كامل طرف الساترة الملامس للصفيحة، ثم تفرش بالساترة على كامل الصفيحة مكونة ما يشبه اللطاخة.

4- جفف اللطاخة بتركها في الهواء، ولا تجفف بالحرارة، ثمّ ادرس المحضر تحت المجهر.





الشكل 17- آلية التلوين السلبي

- **التلوين المركب:**

سميت بذلك لاستعمال أكثر من ملون واحد فيها، وتتضمن هذه الطريقة عدة مراحل هي:

1- **مرحلة التلوين:** يتم فيها وضع الملون المراد استعماله على الغشاء لزمن كاف.

2- **مرحلة الترسيخ:** يتم فيها تقوية فعل الملون وتثبيته (تشكيل معقدات أكثر ثباتاً داخل الخلية)، وذلك باستعمال محلول لوغول (الشكل 18) أو حمض الفيني أو حمض الخل أو غيرها.

3- **مرحلة التمييز:** يتم فيها توضيح العينة بإزالة الملون من بعض الخلايا باستخدام الكحول أو مزيج من الكحول والخلون (الأسيتون) أو حمض كلور الماء أو حمض الكبريت الربعي أو غيرها حسب الغاية المرجوة، ومن ثم نستخدم الملون المتمم الذي يحمل لوناً مغايراً للون الملون الأساسي المستعمل حيث تتلون به جميع الجراثيم التي زال منها اللون بعملية التمييز. نستعرض بعض الطرائق الأكثر استعمالاً.

الشكل (18): محلول لوغول، وبنفسجي الجانسيان (البلورات البنفسجية)

- **طريقة صبغة غرام Gram staining:**

تعتمد هذه الطريقة تقنية التلوين الاصطفائية حيث تستجيب الجراثيم بشكل مختلف أثناء عملية تلوينها تبعاً لخصائصها الكيميائية الحيوية وخاصة التركيب الكيميائي للغلاف الخلوي، وتعدُّ طريقة غرام في التلوين أكثر الطرق نفعاً واستخداماً في مجال تلوين الجراثيم حيث تمكننا من تمييز مجموعتين مختلفتين من الجراثيم بالرغم من تشابه شكلها وحجمها (الشكل 22).

1- **جراثيم إيجابية غرام** تحتفظ بلون البلورات البنفسجية، وتبدو تحت المجهر بلون بنفسجي.

2- **جراثيم سلبية غرام** تأخذ تحت المجهر لوناً زهرياً كما في (الشكل 19).

تعطينا هذه الطريقة فكرة جيدة عن سلوك الجراثيم بالنسبة لعدد من العوامل الفيزيائية والكيميائية بما يتضمنه ذلك من تطبيقات مفيدة خاصة في مجال مقاومة الجراثيم الممرضة باستخدام المضادات الحيوية والمركبات الكيميائية المختلفة.

طريقة العمل: (الشكل 20)

1- حضر الغشاء الجرثومي، وثبته بالطريقة المعروفة، واغسله بحذر بتيار مائي خفيف.

2- ضع على الغشاء بضع قطرات من صبغة الكريستال البنفسجي لمدة نصف دقيقة، ثم أَمِلْ الصفيحة للتخلص من الصبغة الزائدة ، ثم وبحذر شديد اغسل بتيار خفيف من الماء مدة 5 ثوان حتى زوال كامل اللون من الماء المنسكب.

3- اغمر الغشاء بمحلول لوغول (اليود اليودي) لمدة دقيقة واحدة، ثم أَمِلْ الصفيحة للتخلص من الصبغة الزائدة، ثم وبحذر شديد اغسل بتيار خفيف من الماء مدة 5 ثوان حتى زوال كامل اللون من الماء المنسكب.

4- أزل اللون بمحلول الأسيتون والكحول الإيتيلي 96 % لمدة نصف دقيقة، ثم اغسل بالماء الجاري.

5- اغمر الغشاء بصبغة السفرانين أو الفوكسين لمدة دقيقة واحدة أو دقيقة ونصف، ثم تخلص من الصبغة الزائدة بالغسيل بالماء مدة 5 ثوان.

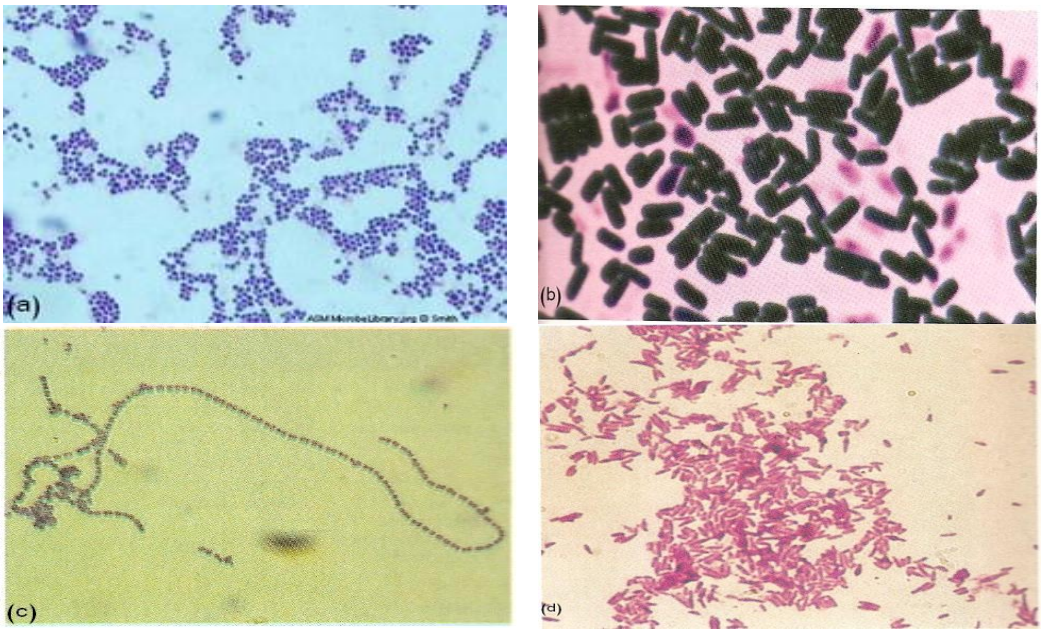
6- اترك المحضر ليجف بتيار من الهواء، أو جففه بورق النشاف بعناية فائقة.

7- ضع قطرة من زيت الأرز على الغشاء، ثم افحص تحت المجهر بالتكبير الضعيف أولاً ثم بالعدسة الغاطسة.

8- دوّن ملاحظاتك حول التجربة (من حيث اللون – شكل الخلايا – تجمعها) مع الرسم.

- نذكر من الجراثيم موجبة غرام: *Staphylococous aureus* العنقودية الذهبية، *Staphylococous epidermidis* العنقودية الجلدية، *Bacilius subtitis* العصوية الرقيقة.

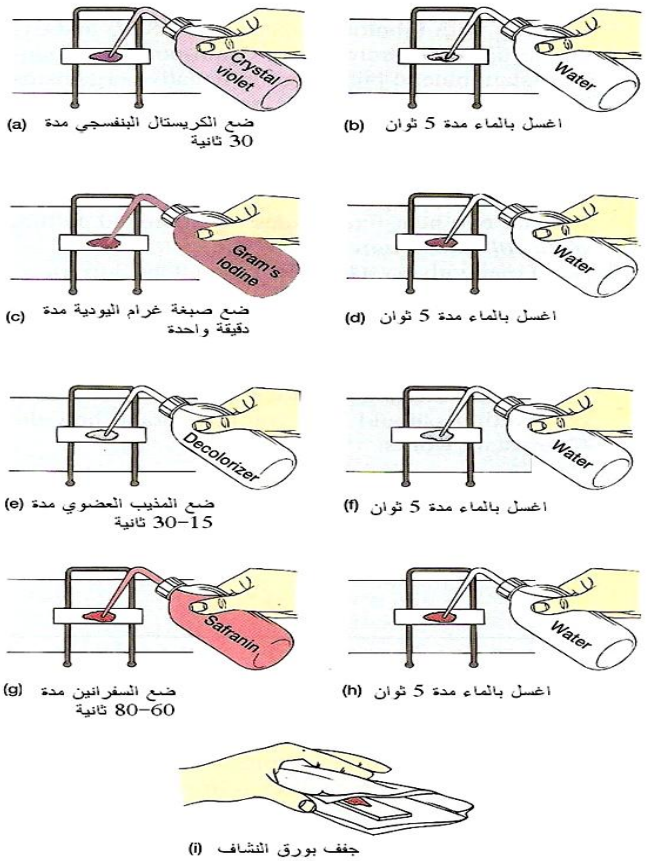
- نذكر من الجراثيم سالبة غرام: *E. coli*، *Klebsilla pneumoniae*، *Shigilla flexneri*، *Salmonella typhi* (الشكل 19).



الشكل 19- يظهر الشكل جراثيم وقد تلونت بصبغة غرام

(a) خلايا *Staphylococcus aureus* موجبة غرام- (b) عصيات *Clostridium perfringens* موجبة غرام-

(c) مكورات *Streptococcus pyogenes* موجبة غرام- (d) عصيات *E. coli* سالبة غرام.



الشكل 20- آلية إجراء تلوين غرام

التفسير: (الشكل 21)

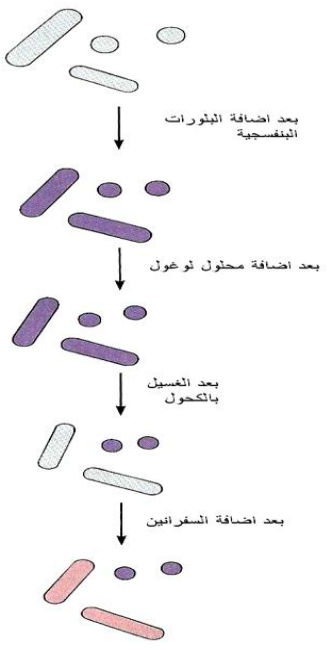
ترتبط آلية التلوين بصبغة غرام ارتباطاً وثيقاً بالتركيب الكيميائي للغلاف الخلوي، فهو يرتبط بنفوذية المذيبات الشحمية (كحول– أسيتون) عبر الجدار الخلوي. بدايةً يتم تلوين جميع الخلايا دون استثناء باللون البنفسجي، لأن جميع الخلايا يمكنها امتصاص ملون البلورات البنفسجية، وبعد إضافة محلول لوغول يتشكل معقد لونه مائل للسواد داخل الخلايا، وبذلك يكون قد تم ترسيخ اللون، أما عند إضافة الكحول يمكن أن نميز بين نوعين من الخلايا:

النوع الأول:

خلايا جدارها الخلوي غني بالدهون حيث يملك نسبة 20% تقريباً، وهذه الشحوم تذوب بالكحول بسرعة مما يسمح للكحول بالدخول إلى داخل الخلايا، وهذا يؤدي إلى حل المعقد المتشكل بين البلورات البنفسجية، ومحلول لوغول وخروجه من الخلية الجرثومية، فتصبح هذه الخلايا عديمة اللون وتأخذ اللون الزهري عند إضافة السفرانين أو الفوكسين، وتسمى جراثيم سالبة غرام ويرمز لها G^-.

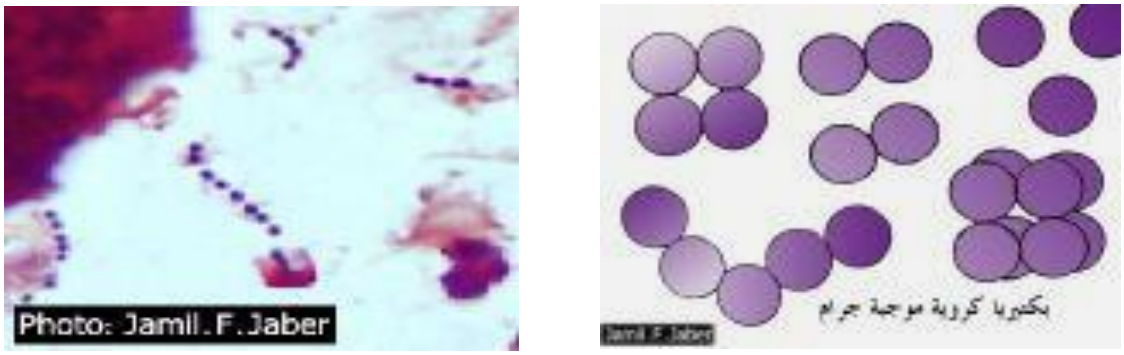
النوع الثاني :

خلايا جدارها الخلوي فقير بالدهون حيث يملك نسبة 2% تقريباً، فلا يستطيع الكحول المرور لداخل الخلايا بسهولة، ومِنْ ثَمَّ تكون كمية الكحول التي تعبر لداخل الخلايا غير كافية لحل المعقد خلال نفس الزمن من المعالجة، مما يؤدي إلى بقاء المعقد داخل الخلايا الجرثومية، ومِنْ ثَمَّ تبقى محتفظة بلون البلورات البنفسجية، وتسمى إيجابية غرام ويرمز لها G^+.

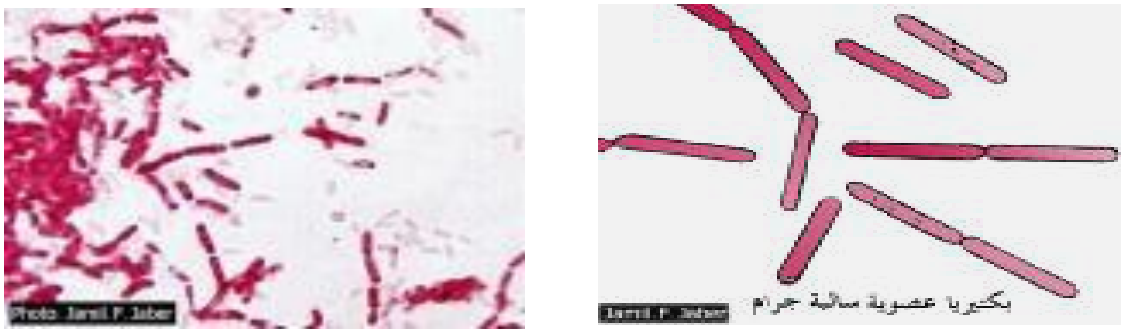


الشكل (21): المراحل التي تمر بها الخلايا الجرثومية عند تلوين غرام

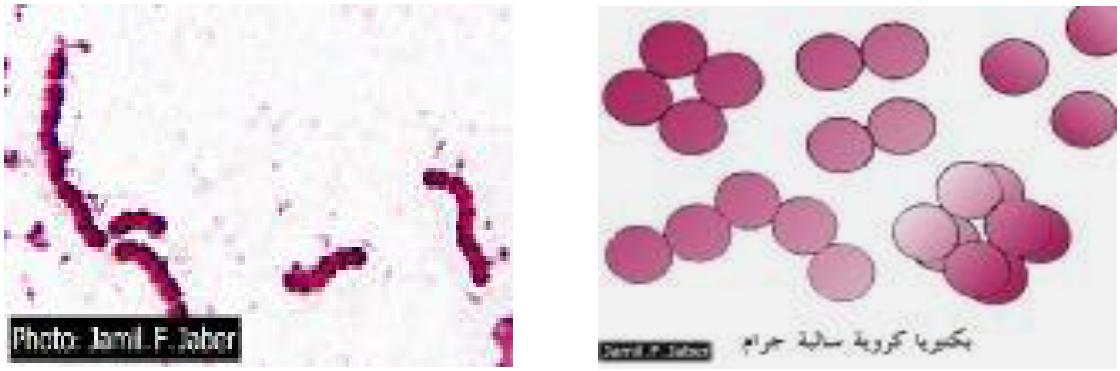
الجراثيم العصوية – موجبة غرام



الجراثيم الكروية – موجبة غرام



الجراثيم العصوية – سالبة غرام



الجراثيم الكروية – سالبة غرام

الشكل (22): الجراثيم الكروية والعصوية سالبة وموجبة غرام

- **الأبواغ الجرثومية:**

تعد الأبواغ الداخلية Endospores الطور الساكن لبعض الجراثيم مثل أنواع المطثيات *Clostridium* والعصيات *Bacillus* (الشكل 23)، وتتصف الأبواغ بأنها أقل قابلية للتلون من الخلايا الإعاشية للجراثيم بسبب جدارها السميك وكثافة محتوياتها السيتوبلاسمية من البروتينات والدهون لذلك تبدو بشكل بقعة بيضاء لامعة داخل الخلايا الملونة بملونات عادية، فهي تتلون بصعوبة ولكنها تقاوم بشدة عملية إزالة اللون وتأثير الملونات المعاكسة، كما يمكن ملاحظتها دون تلوين باستخدام مجهر الأطوار المتباينة. إن صفة التبوغ في الجراثيم مرتبطة بالجنس وليست انعكاساً للبيئة أي أن الجراثيم تتبوغ بعد زمن معين سواء كانت البيئة سيئة للنمو أو جيدة، وهي محافظة على النوع وليست صفة إكثار. لا تتبوغ جميع الجراثيم فالعصيات معظمها متبوغ أما المكورات فهي غير متبوغة.

الشكل (23): الأبواغ الداخلية Endospores لجراثيم المطثيات *Clostridium* والعصيات *Bacillus*

- **المحفظة الجرثومية (الكبسولة) Capsule:**

هي طبقة سميكة لزجة واقية تحيط بالخلية الجرثومية تختلف ثخانتها من خلية إلى أخرى، وتتكون من مواد سكرية أو ببتيدية معقدة، من أهم وظائفها أنها تحمي الخلية من الظروف غير الملائمة. هناك عدة طرق لإظهار المحفظة لكن تجدر الإشارة إلى عدم استعمال الماء مهما تكن الطريقة المستخدمة في أثناء تحضير الغشاء لأن المحفظة قابلة للذوبان به.

- طريقة ولتش Welch method:

تستخدم هذه الطريقة لتلوين المحفظة الجرثومية Capsule staining.

الأدوات والمواد اللازمة:

1- مزارع جرثومية فتية بعمر 24 ساعة لجراثيم *Klebsiella pneumonia*.

2- محاليل الصبغات التالية: محلول صبغة الفوكسين القاعدية 30%- محلول كبريتات النحاس $Cu\ SO_4$ 20% - محلول أزرق الميتلين 1%. 3- صفائح زجاجية نظيفة. 4- زيت الأرز النقي.

طريقة العمل:

1-حضر الغشاء الجرثومي، وثبته بالطريقة المعروفة، وتجنب غسيله بالماء.

2- اغمر الغشاء الجرثومي بمحلول الفوكسين القاعدي، ومررها فوق اللهب حتى بدء تصاعد البخار.

3- اغسل بمحلول كبريتات النحاس.

4- اغمر الغشاء بمحلول أزرق الميتلين، ثم اغسل بالماء.

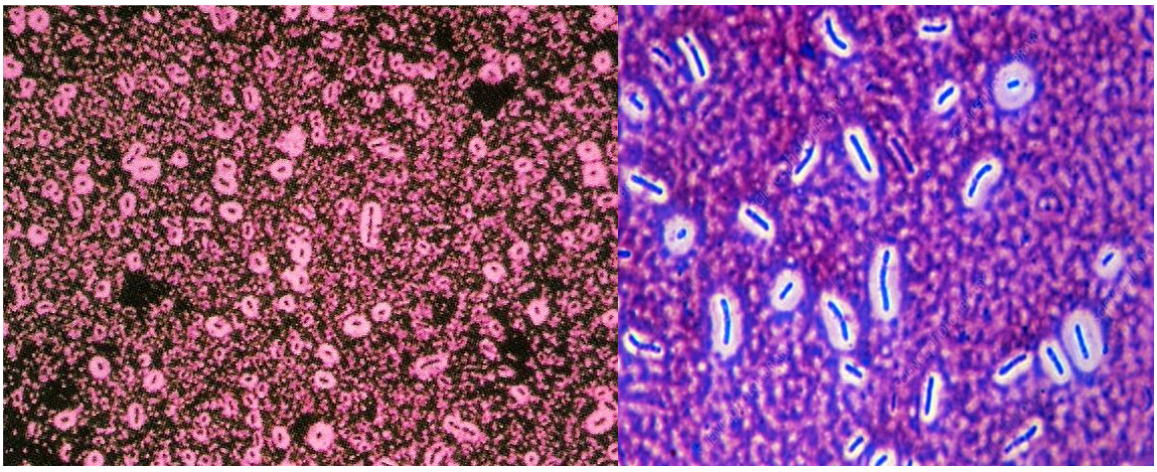
5- جفف الصفيحة بالهواء، وضع عليها قطرة من زيت الأرز، ثم افحصها بالعدسة الغاطسة.

6- دوّن ملاحظاتك مع الرسم.

(لاحظ تلون المحفظة باللون الأزرق والخلية الجرثومية باللون الأحمر).

- طريقة الحبر الصيني:

تستخدم هذه الطريقة لتلوين المحفظة الجرثومية، وهي من أبسط طرق تلوين المحفظة، ويتم ذلك بمزج قطرة من مستحلب كثيف للجرثوم مع قطرة من الحبر الصيني أو الهندي وفرشها على صفيحة نظيفة وتركها تجف في الهواء (طريقة التلوين السلبي)، فتظهر المحفظة بشكل هالة لامعة عديمة اللون تحيط بالخلية الجرثومية الحمراء في ساحة مظلمة (الشكل 22).



الشكل 22- المحفظة كما تبدو بعد التلوين بالحبر الصيني عند جراثيم *Klebsiella*

انتهت المحاضرة