الصبغ المركب

الصبغ بطريقة جرام

Gram-staining procedure

اكتشفها العالم الدنمركى Christian Gram سنة 1884عند صبغه للأنسجة المصابة ببعض البكتريا حيث تأخذ الأنسجة لون بنى خفيف Brownish والبكتريا لون بنفسجى غامق وقد اتضح من التجربة أن استخدام صبغة الجنسيان البنفسجى مع اليود يكون داخل الخلايا معقد بنفسجى لا يزيله الكحول أو الأسيتون من البكتريا الموجبة لجرام G^+ ويزيله الكحول أو الأسيتون من البكتريا السالبة لجرام G^- .

خطوات صبغة جرام

1- تحضير الغشاء وتثبيته جيدا .

3- إزالة الزيادة من الصبغة في حوض الصبغ.

4- غسل الشريحة بتيار هادئ من الماء.



2

غمر الغشاء بصبغة الجنسيان البنفسجي لمدة 1 دقيقة

6- إزالة الزيادة من اليود في حوض الصبغ.



5

غمر الغشاء باليود لمدة 1 دقيقة.



7

غسل الغشاء بالكحول 95% حتى تتساقط قطرات خالية من الصبغة.

8- غسل الشريحة بتيار هادئ من الماء.

10- إزالة الزيادة من الصبغة في حوض الصبغ.

11- غسل الشريحة بتيار هادئ من الماء.

12- تجفيف الغشاء بإستخدام اللهب المباشر.

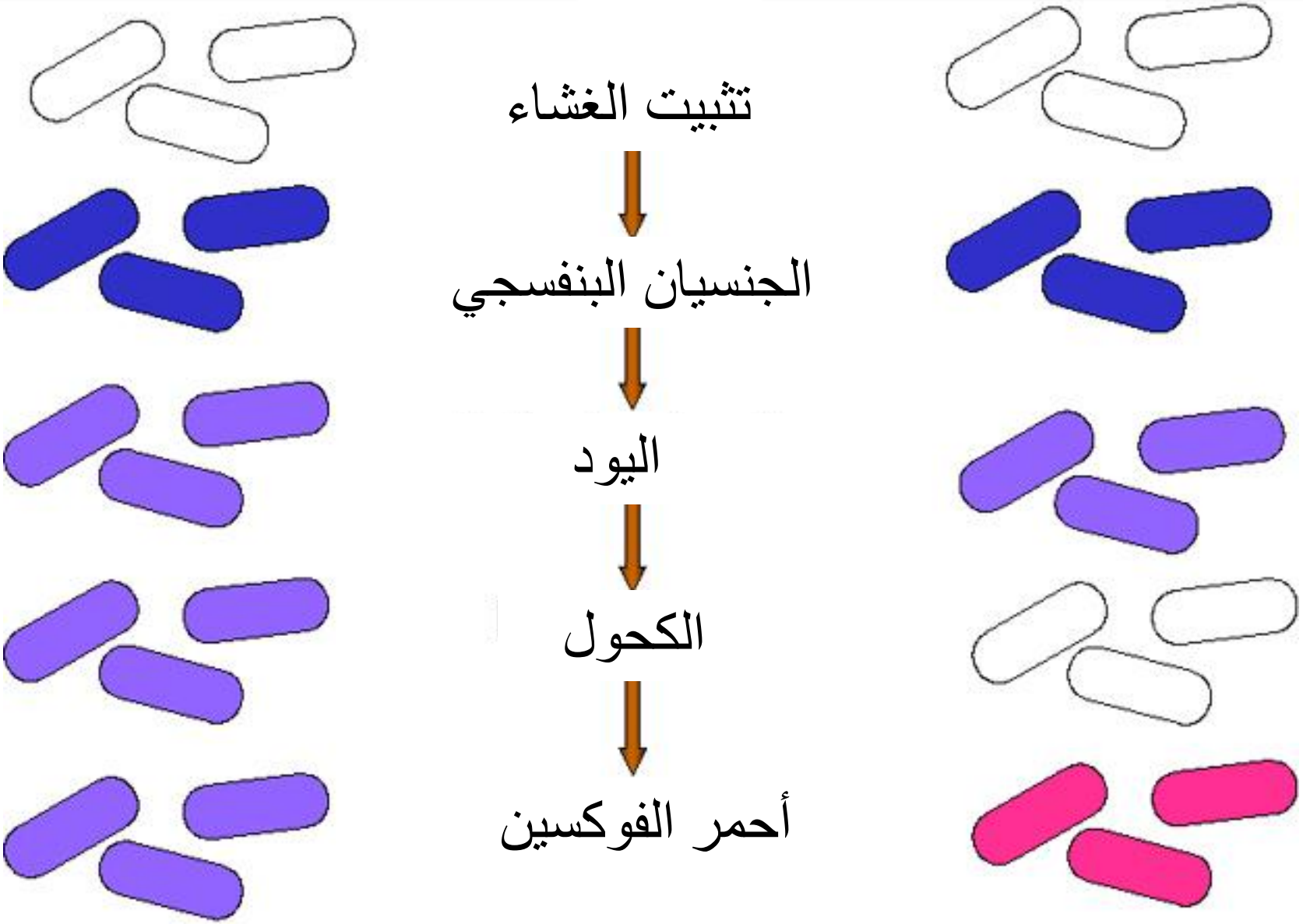


9

غمر الغشاء بصبغة أحمر الفوكسين لمدة 1 دقيقة

البكتريا السالبة لجرام G^-

البكتريا الموجبة لجرام G^+



الأساس العلمي

عند معاملة خلايا البكتريا بصبغة الجنسيان البنفسجى ثم اليود يتكون داخلها معقد بنفسجى

بعض البكتريا تفقد هذا المعقد عند معاملتها بالكحول فتصبح شفافة , وتكتسب لون صبغة أحمر الفوكسين

وتسمى

بالبكتريا السالبة لجرام G^-

بعض البكتريا تحتفظ بالمعقد داخل خلاياها حتى بعد غسيلها بالكحول فتبقى محتفظه باللون البنفسجي

وتسمى

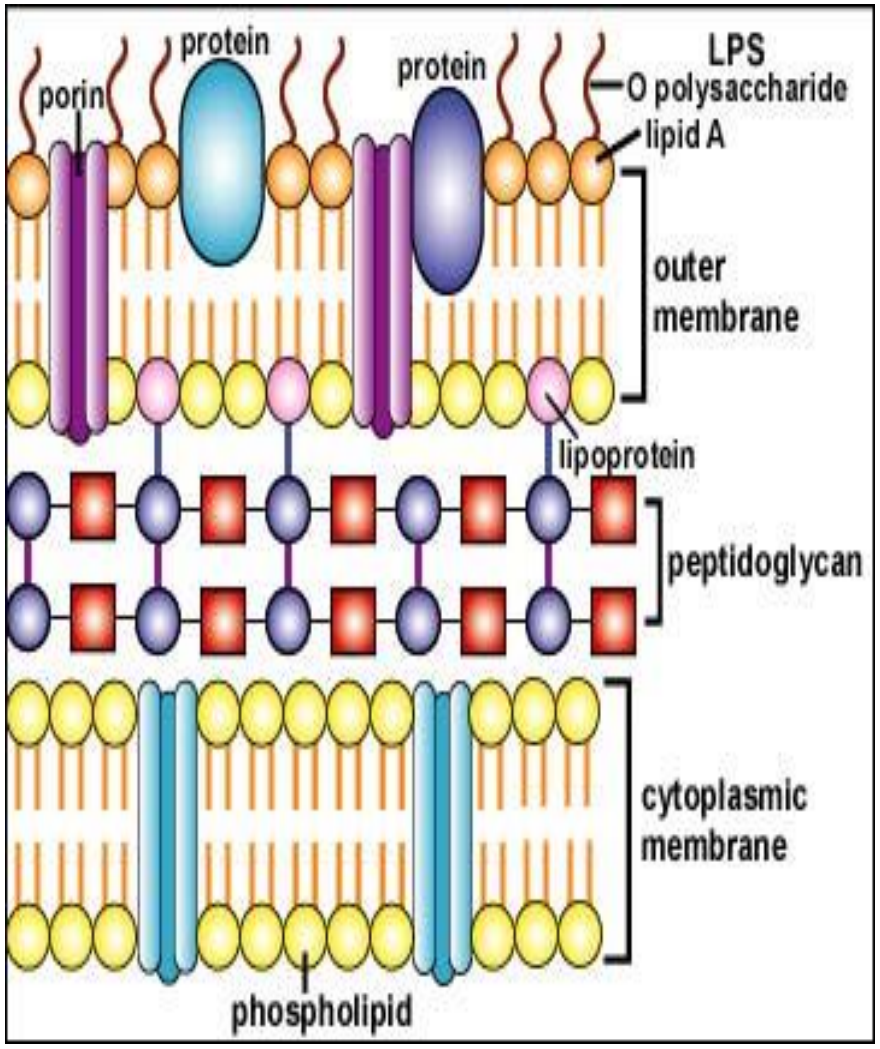
بالبكتريا الموجبة لجرام G^+

ويفسر ذلك بعض النظريات

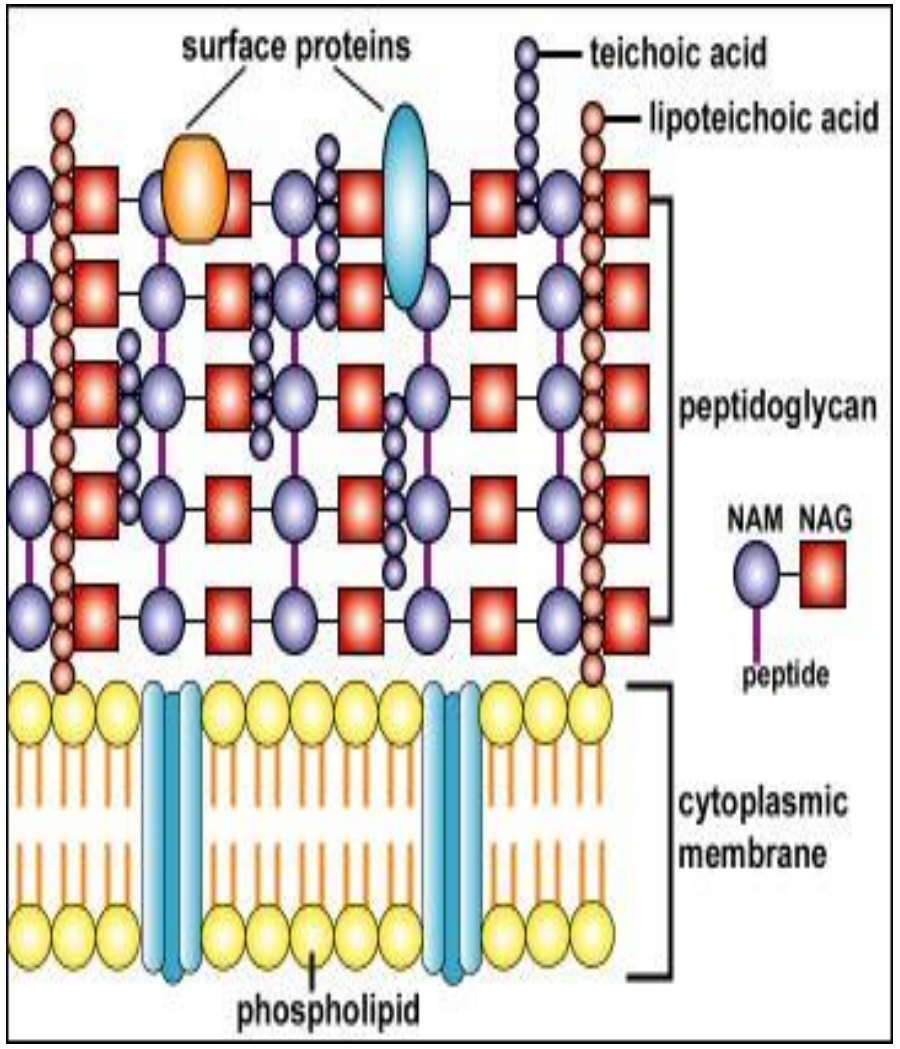
النظرية الأولى: (الاختلاف فى تركيب الجدار)

جدار البكتريا G^+ به نسبة عالية من مركب Peptidoglycan ونسبة منخفضة من الدهون أما جدار البكتريا G^- فبه نسبة أعلى من الدهون و بالتالى فإن المعاملة بالكحول تعمل على إذابة الدهون فى جدار البكتريا G^- محدثا فتحات كبيرة يخرج منها معقد الصبغة, بينما تتكون فتحات صغيرة في جدار البكتريا G^+ لا يخرج منها المعقد.

البكتريا السالبة لجرام



البكتريا الموجبة لجرام



النظرية الثانية: (الاختلاف فى تركيب البروتوبلازم)

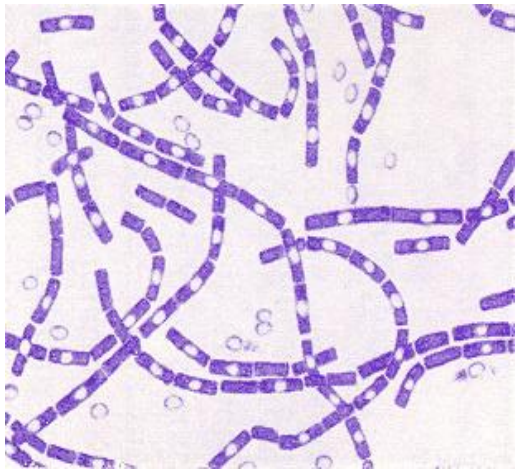
يختلف التركيب الكيميائى لبروتوبلازم الخلايا G^+ , G^- حيث يتكون معقد من الجنسيان واليود وبروتوبلازم الخلايا G^+ فتحتفظ باللون البنفسجى ولا يتكون هذا المعقد مع الخلايا G^- .

الأهمية البكتريولوجية لصبغة جرام

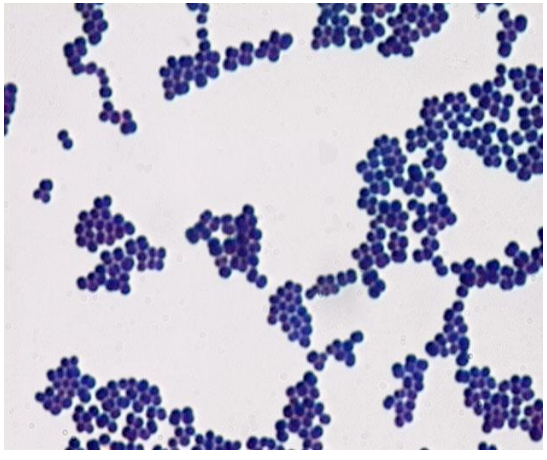
1- تستخدم فى تقسيم البكتريا الى نوعين البكتريا G^+ و البكتريا G^-.

2- تستخدم فى الكشف عن نقاوة المزارع البكتيرية.

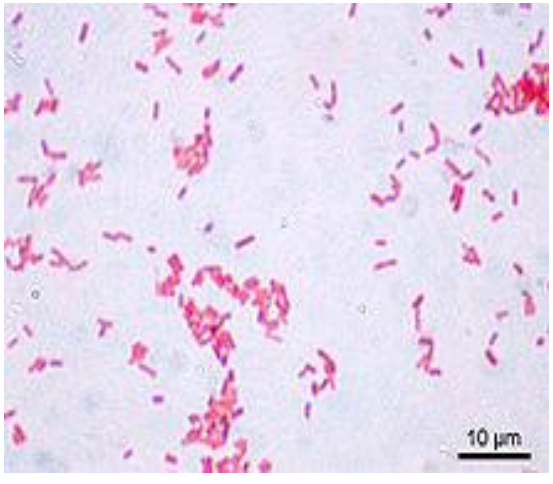
3- تستخدم فى تشخيص بعض الأمراض.



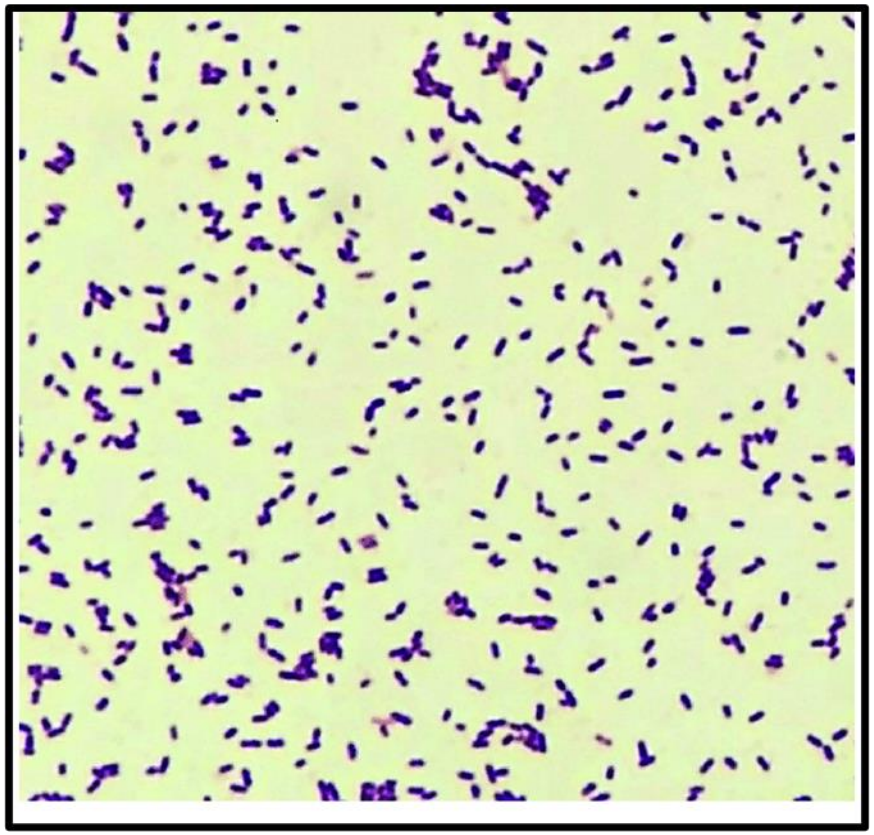
Bacillus subtilis



***Micrococcus* spp**



Escherichia coli



Listeria monocytogenes

انتشارالبكتريا فى الطبيعة

تنتشر البكتريا فى الطبيعة انتشارا واسعا وذلك:

- لصغر حجمها حيث يسهل حملها بالهواء.
- سرعة تكاثرها حيث توجد باعداد كبيرة.
- تنوع إحتياجاتها الغذائية.

ومع ذلك هناك اماكن محدودة خالية من البكتريا هى:

- الأنسجة الداخلية للحيوانات السليمة و النباتات.
- الأعماق البعيدة من التربة.
- داخل الصخور.
- داخل البراكين النشطة.

إختبار مدى إنتشار البكتريا في الهواء و التراب و الجلد

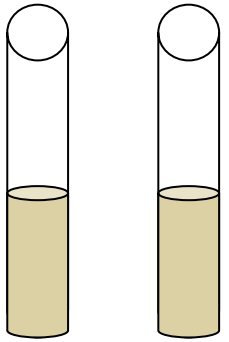
الأدوات المطلوبة:

1- عدد 2 انبوبة اجار مغذي عميق معقم.

2- عدد 2 طبق بترى معقم.

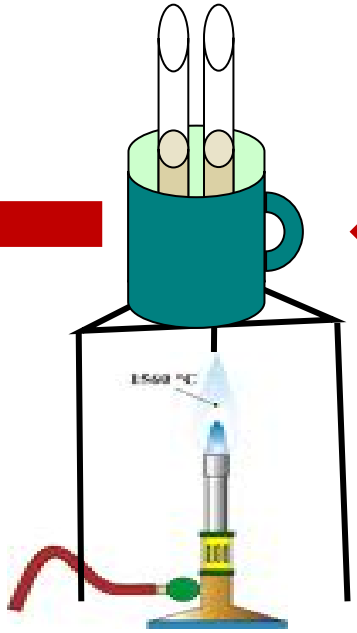
3- حمام مائي.

4- ترمومتر.



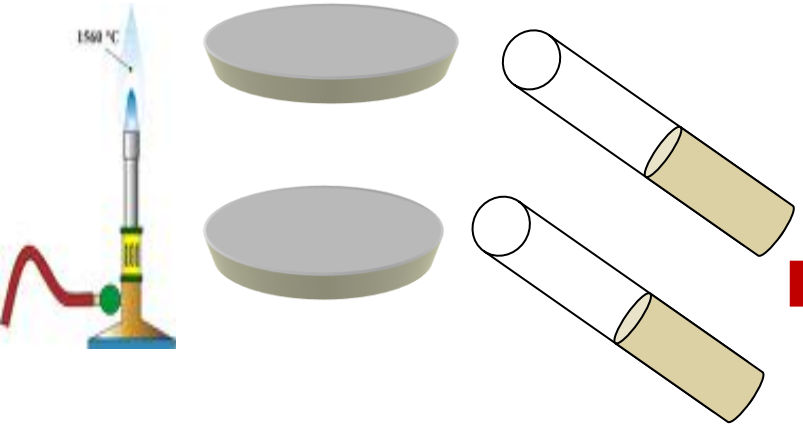
2 أنبوبة بيئة
أجار عميق

اسالة بيئة الآجار
العميق علي 100 ° م



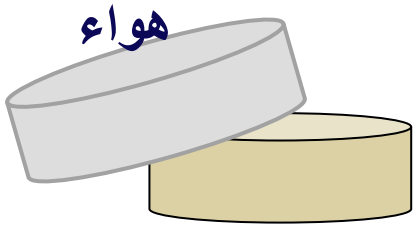
تبريد البيئة الى
50 ° م

- تحريك الأطباق رحويا
- ترك الأطباق حتى يتجمد الاجار



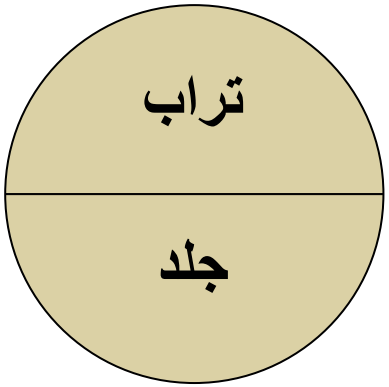
صب الأجار في الأطباق
بجوار اللهب

يكتب على أحد الأطباق هواء و يترك مفتوحا بعيدا عن اللهب لمدة 15 دقيقة



غلق الطبق

تقسم قاعدة الطبق الاخر الى قسمين و يكتب على أحدهما تراب و الآخر جلد



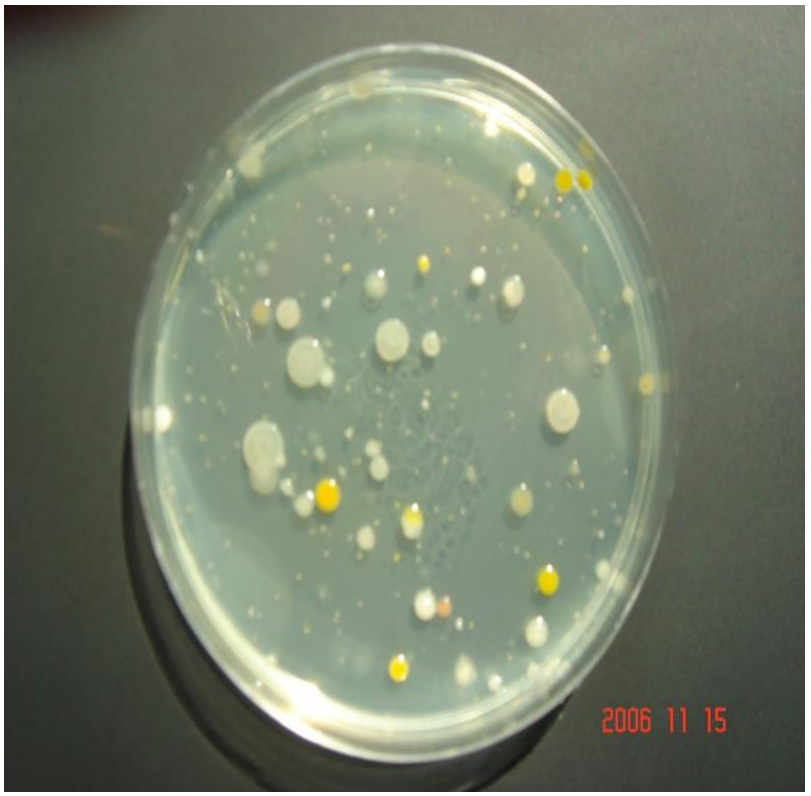
التحضين على 30 ° م
لمدة 48 – 72 ساعة

-التخطيط بإصبع اليد على سطح البيئة في النصف المكتوب علية جلد

- إمرار قطعة من القطن بما عليها من تراب على سطح البيئة في النصف المكتوب علية تراب

بعد التحضين:

تتكون مجاميع ميكروبية (مستعمرات Colonies) يمكن رؤيتها بالعين المجردة نتيجة لتكاثر الميكروبات وتكون عدد كبير من الخلايا.





دراسة صفات المجاميع البكتيرية

الهدف من دراسة المجاميع البكتيرية:-

فصل و تنقية وتمييز وتصنيف الميكروبات

دراسة ووصف المجموعات البكتيرية

صفات تدرس بالعين المجردة	صفات تدرس ميكروسكوبيا بالعدسة الصغرى	دراسة الشكل المورفولوجي للخلايا
1- الشكل 2- الإرتفاع 3- اللون 4- القوام 5- الإنتشار 6- الشفافية	1- الحافة 2- التركيب الداخلي	عمل شريحة من المجموعة البكتيرية و صبغها بطريقة جرام

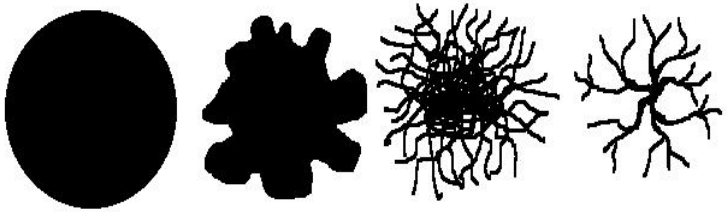
صفات تدرس بالعين المجردة

1- الشكل الخارجى	دائرى – أهليجى – مغزلى – قوقعى – وردى – جذرى - خيطى
2-الأرتفاع	مسطح – مرتفع – مدرج – محدب - مقعر
3- اللون	أصفر- وردى - كريمى.....
4- القوام	مائى – لزج – ثقيل - يابس
5-الأنتشار	منتشرة - محددة
6- الشفافية	شفافة - نصف شفافة - معتمة

صفات تدرس ميكروسكوبيا بالعدسة الصغرى

1- الحافة	كاملة – ممزقة – متموجة – مفصصة - هدبية.
2- التركيب الداخلى	حبيبى – شبكى – متراكم – مجعد - مشعع.

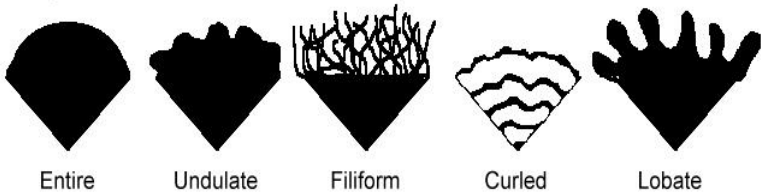
Form

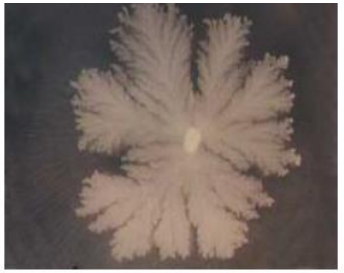


Elevation



Margin













تقسيم الميكروبات تبعا لاحتياجاتها الهوائية:

1- ميكروبات هوائية حتما: Obligate aerobes

تحتاج الـ O_2 في نموها، مثل: *Bacillus* sp.

2- ميكروبات لاهوائية حتما: Obligate anaerobes

تنمو في غياب الـ O_2، مثل: *Clostridium* sp.

3- ميكروبات أختيارية: Facultative anaerobes

تنمو في وجود وغياب الـ O_2، مثل: *Micrococcus* sp.

4- ميكروبات شحيحة الأحتياج للأكسجين: Microaerophilic

محبة للتركيزات المنخفضة من الـ O_2، مثل: *Campylobacter* sp.

طرق تنمية البكتريا اللاهوائية:-

البكتريا اللاهوائية هي: نوع من البكتريا التي تنمو في غياب الأكسجين , ووجوده في البيئة يؤدي لتثبيط نمو أو قتل هذه البكتريا.

وتوجد طرق عديدة لتنمية البكتريا بعيدا عن الأكسجين ومنها:

1- تنمية ميكروب هوائي مع آخر لاهوائي بغرض أستهلاك الأكسجين

2-أمتصاص الأكسجين بواسطة المواد الكيميائية

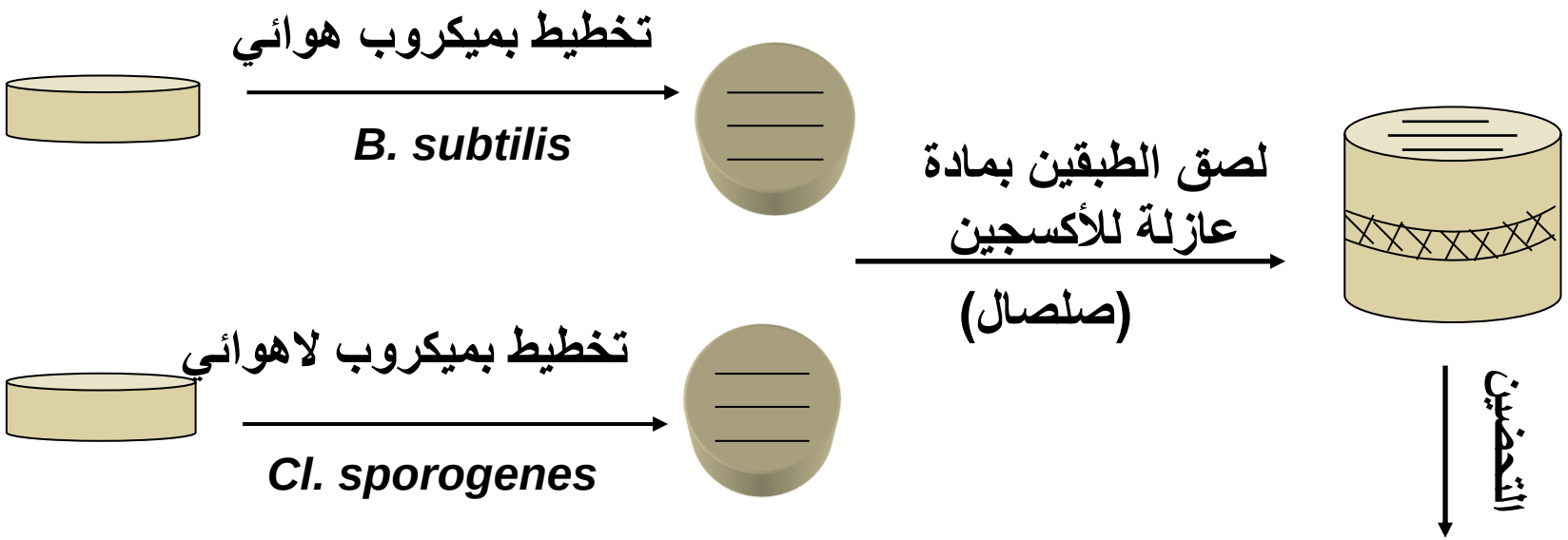
3-حجز البيئة عن الأكسجين بأستخدام الفاسبر

4-الوخز في آجار الجلوكوز العميق

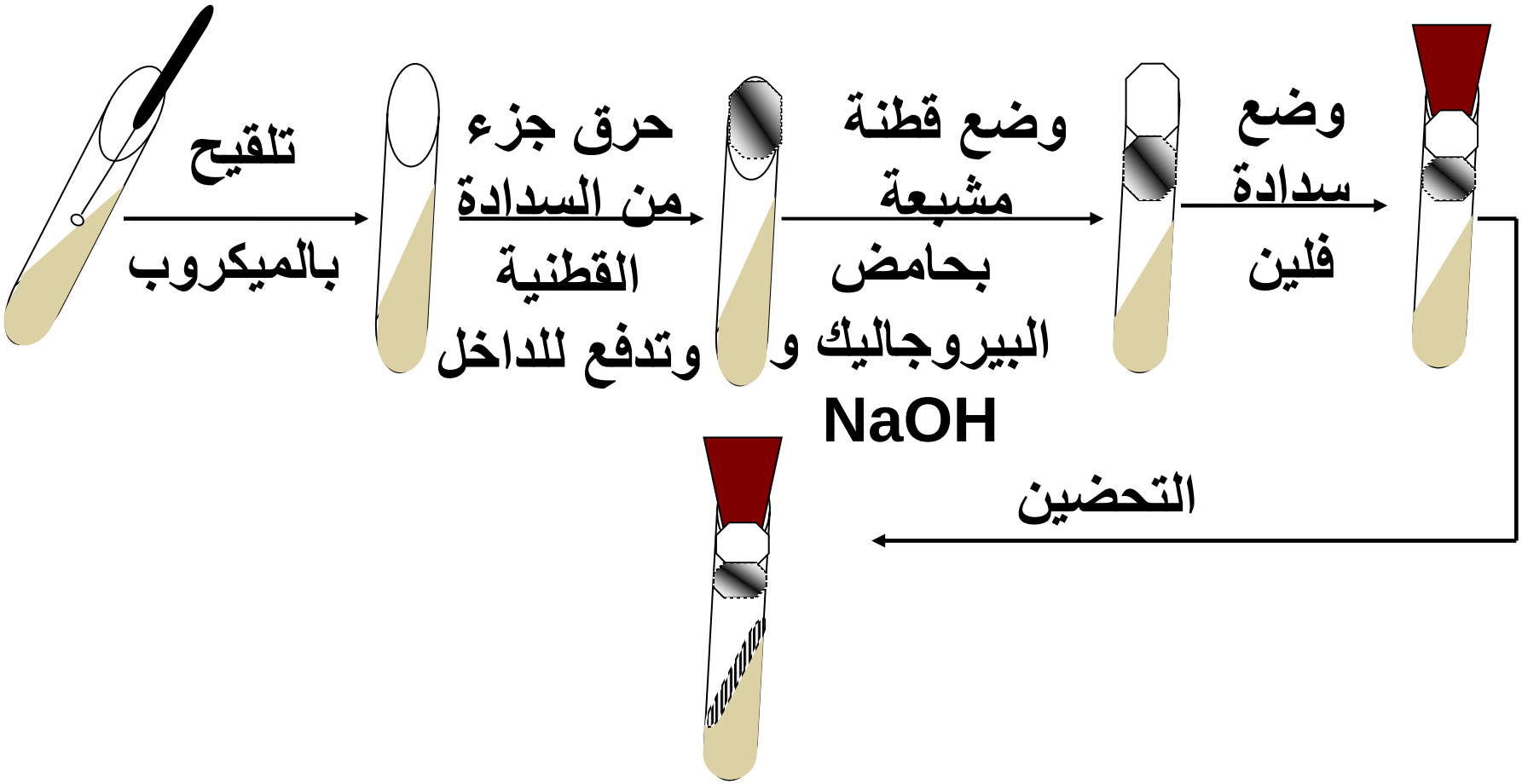
5- المزرعة المهتزة

6- احلال غاز خامل محل الأكسجين (جهاز ماكنتوش)

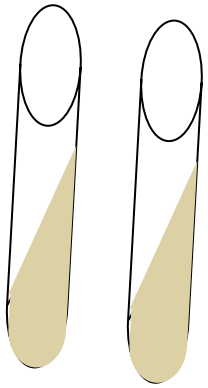
1- تنمية ميكروب هوائي مع آخر لاهوائي بغرض إستهلاك الأكسجين



2-أمتصاص الأكسجين بواسطة المواد الكيميائية

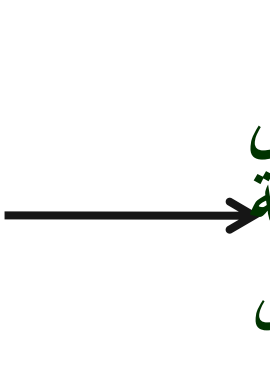


هل تستخدم تلك الطريقة لتقدير إحتياج الميكروبات للأكسجين؟

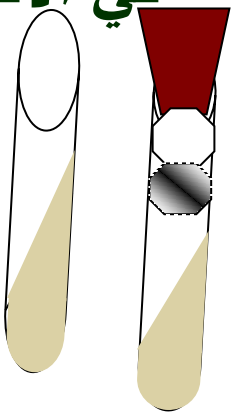


2 أنبوبة أجار
جلوكوز مائل

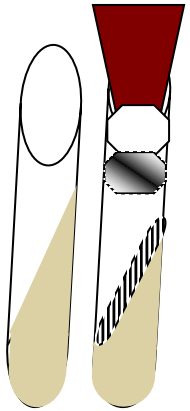
تلقيح الأنبوبتين
بالميكروب المختبر



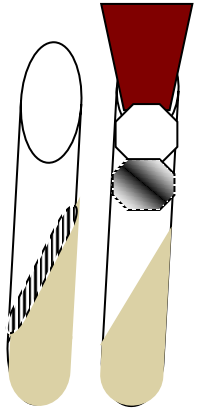
جعل الظروف لاهوائية فى
إحدى الأنبوبتين و هوائية
في الأخرى



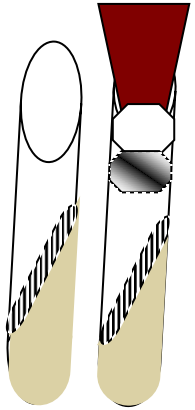
التحضين



ميكروب لاهوائي

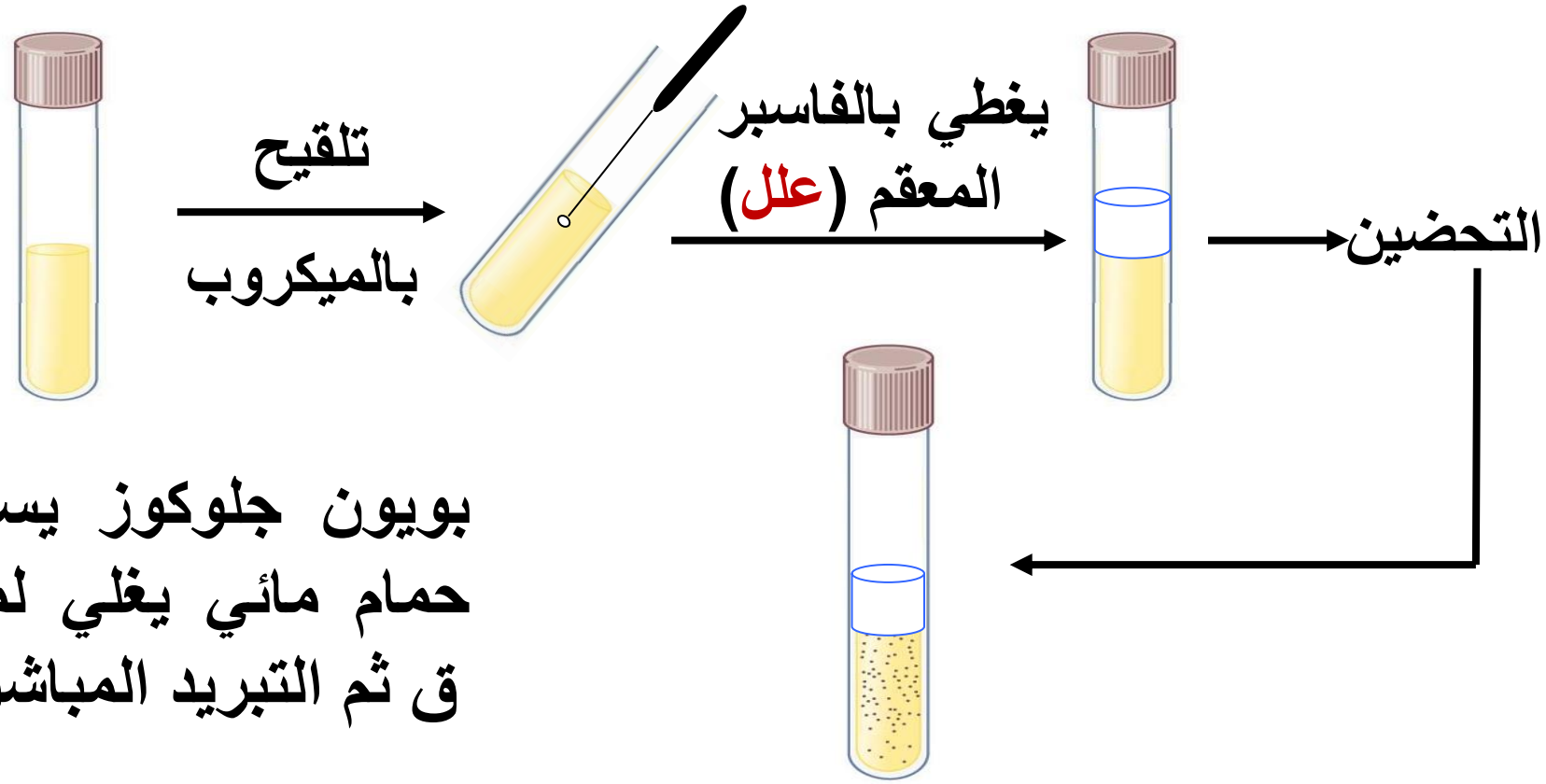


ميكروب هوائي



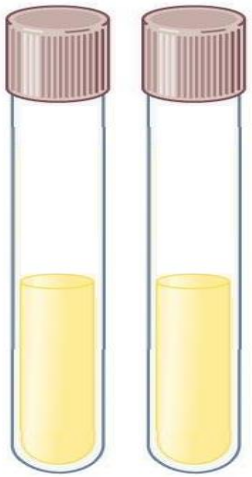
ميكروب اختياري

3- حجز البيئة عن الأكسجين بأستخدام الفاسبر



بويون جلوكوز يسخن في حمام مائي يغلي لمدة 10 ق ثم التبريد المباشر (علل)

هل تستخدم تلك الطريقة لتقدير إحتياج الميكروبات للأكسجين؟



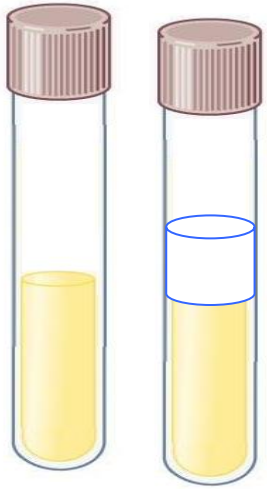
2 أنبوبة بويون جلوكوز

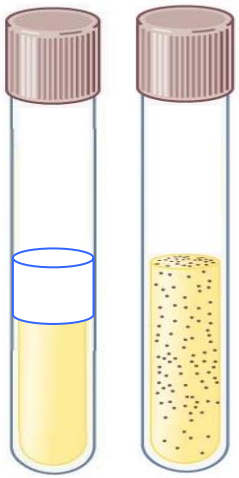
تسخين إحدى الانبوبتين على 100° م /10ق

تلقيح الأنبوبتين بالميكروب المختبر

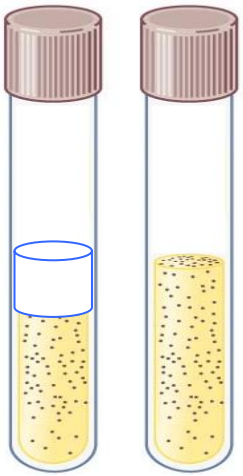
جعل الظروف لاهوائية في إحدى الأنبوبتين و هوائية في الأخرى

التحضين

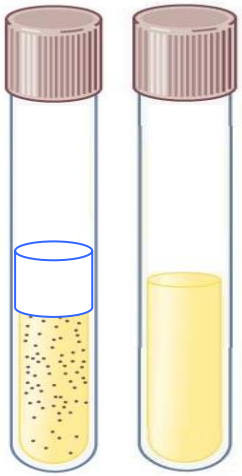




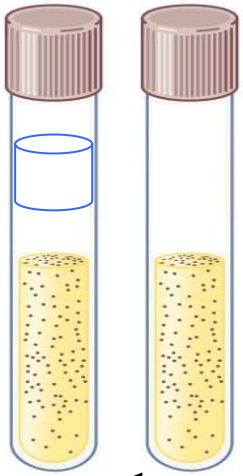
ميكروب هوائي



ميكروب اختياري

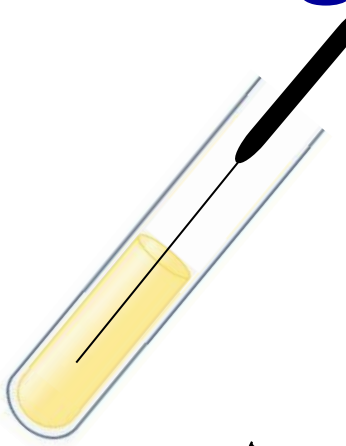


ميكروب لاهوائي

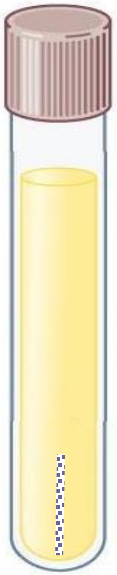


ميكروب اختياري+ غاز

4- الوخز في آجار الجلوكوز العميق

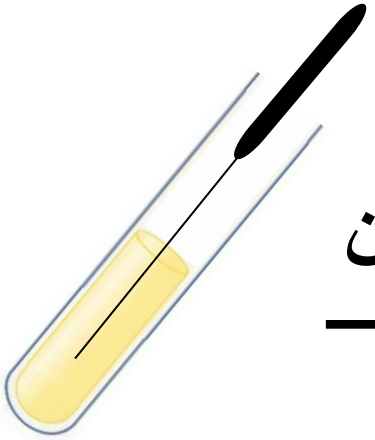


تلقيح بالوخز
والتحضين



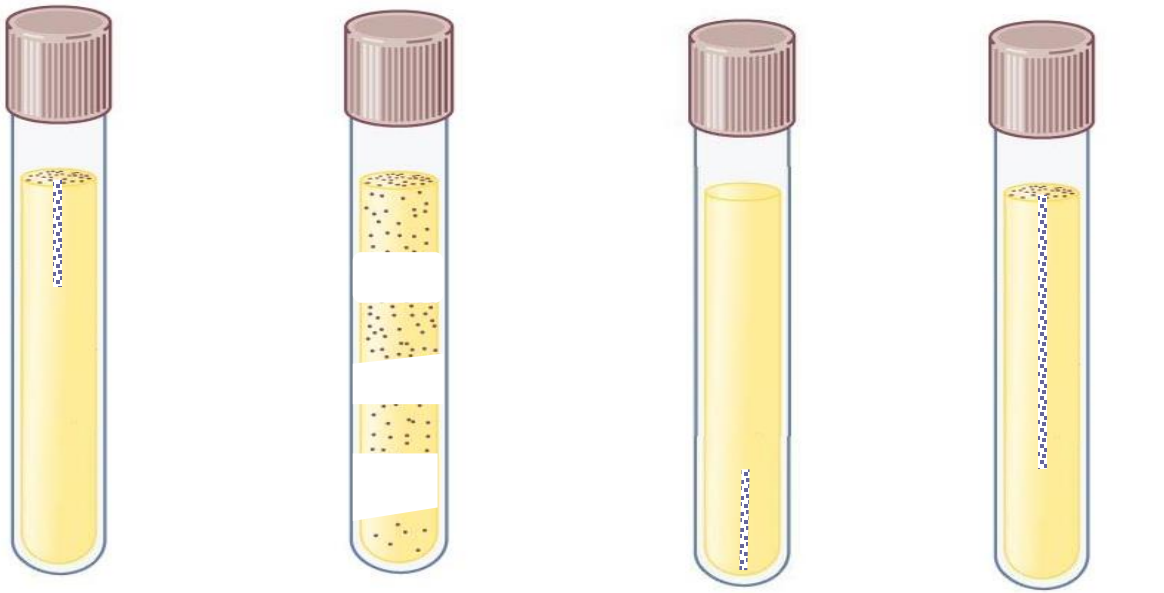
اجار جلوكوز عميق يسال في حمام مائي يغلي لمدة 10 ق ثم التبريد المباشر حتى يتجمد
(علل)

هل تستخدم تلك الطريقة لتقدير إحتياج الميكروبات للأكسجين؟



تليقح بالوخز والتحضين

اجار جلوكوز عميق يسال في حمام مائي يغلي لمدة 10 ق ثم التبريد المباشر حتى يتجمد



ميكروب اختياري

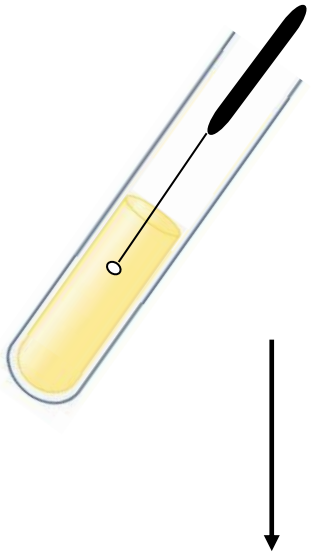
ميكروب لاهوائي

ميكروب اختياري + غاز

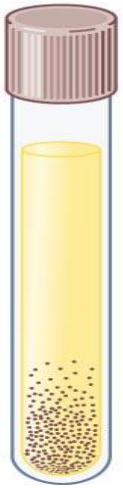
ميكروب هوائي

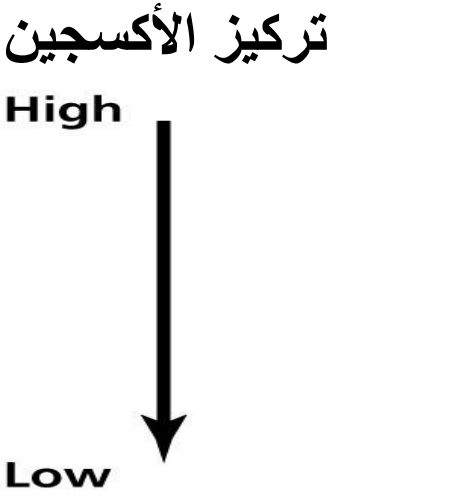
5- المزرعة المهتزة

التلقيح بابرة التلقيح ذات العقدة والتحضين



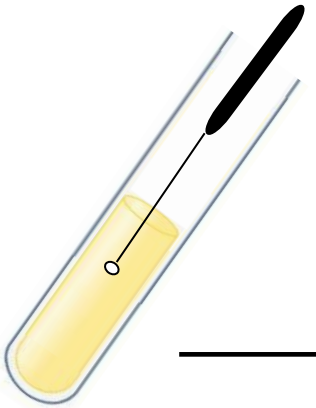
آجار جلوكوز عميق يسال في حمام مائي يغلي لمدة 10 ق ثم التبريد المباشر مع مراعاة عدم تصلب البيئة.

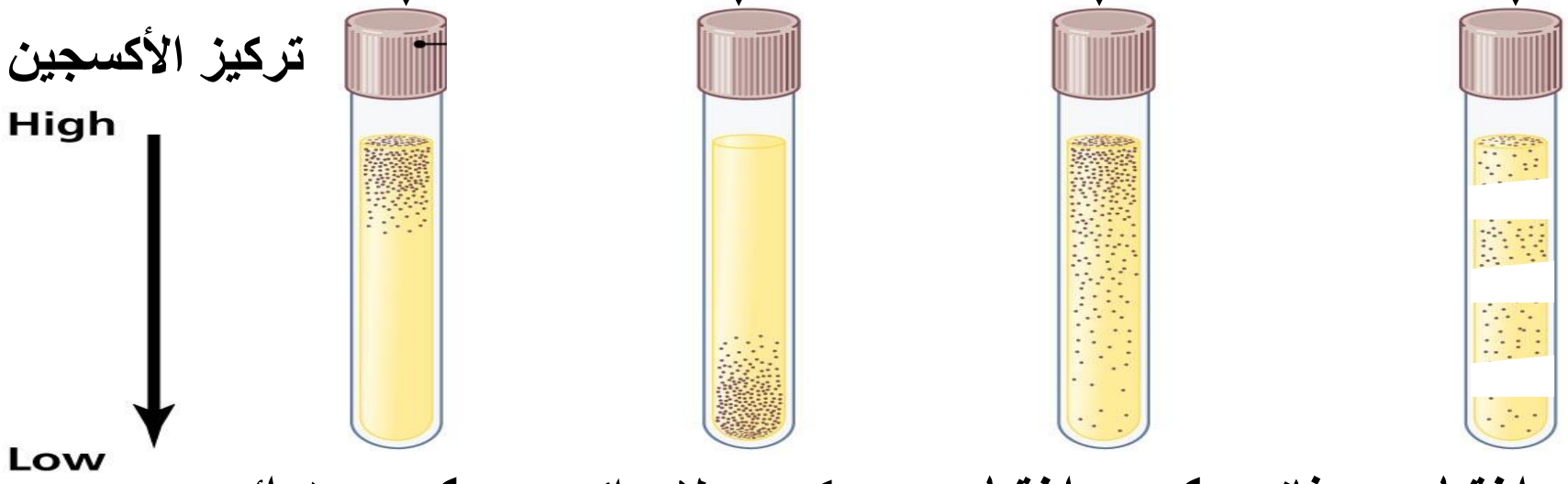




آجار جلوكوز عميق يسال في حمام مائي يغلي لمدة 10 ق ثم التبريد المباشر مع مراعاة عدم تصلب البيئة.

التلقيح بابرة التلقيح ذات العقدة والتحضين





6- احلال غاز خامل محل الأكسجين (جهاز ماكنتوش)



- تلقح المزارع وتوضع في الجهاز
- يوضع أنبوبة دليل (محلول مائي من الجلوكوز و الصودا الكاوية و أزرق الميثيلين) بعد أن تغلى للتأكد من خلو الجهاز من الـ O_2
- يتم احلال غاز H_2 محل الـ O_2
- قفل الصمامات و تشغيل الملف الكهربائي
- تحضين الجهاز في المحضن

دراسة حركة البكتيريا
(Wet mount)

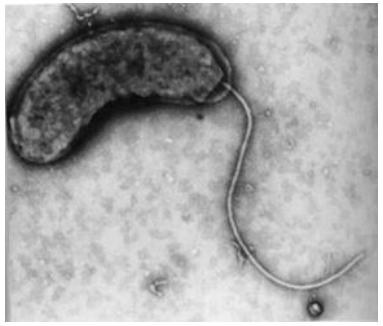
Motility of bacteria حركة البكتيريا

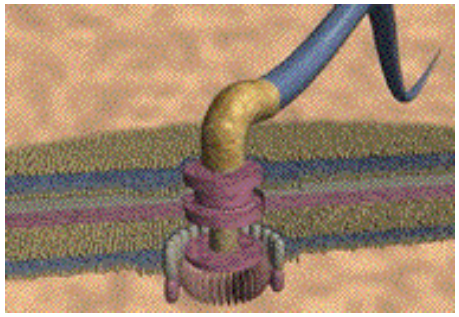
(Wet mount)

الغرض منها :-

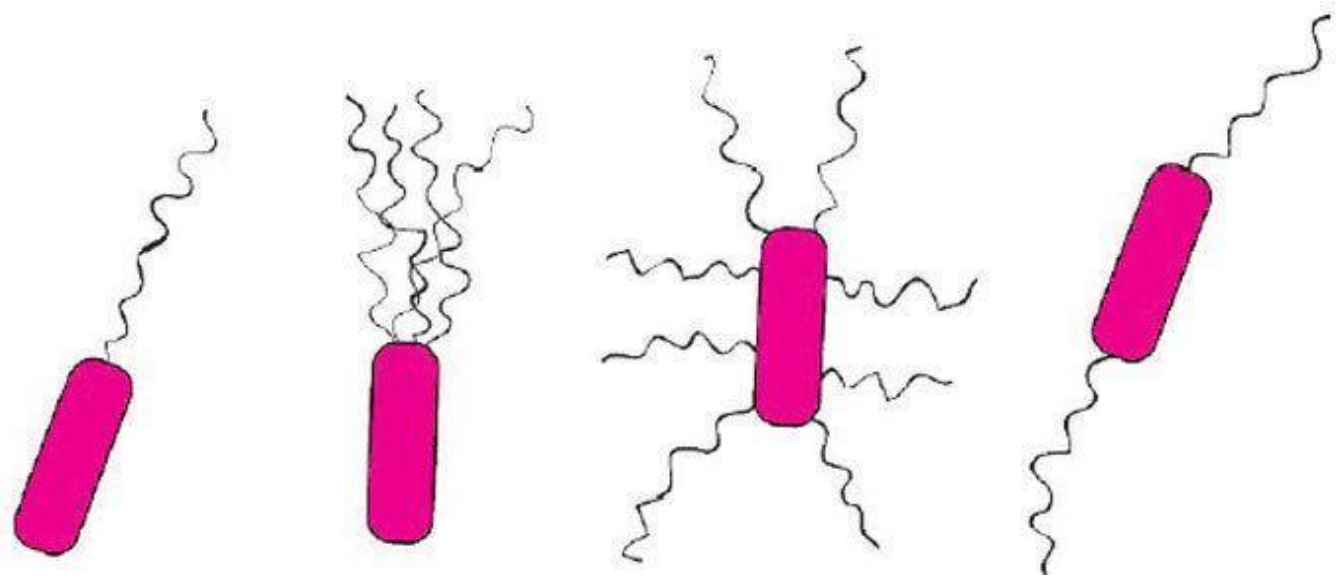
التحقق من حركة الميكروبات حيث أن بعض الميكروبات لها القدرة على الحركة وهى التى تمتلك أعضاء الحركة

الفلاجيلا Flagella ومفردها Flagellum والبعض الأخر لا يمتلك أعضاء حركة و بالتالي فهو غير متحرك.





توزيع الفلاجيلا على الخلايا



Monotrichous Lophotrichous Peritrichous Amphitrichous

طريقة عمل شريحة Wet mount

1- نظف الشريحة الزجاجية.

2- أغسل غطاء الشريحة (Cover) بالماء وجففه جيداً.

3- ضع الـ cover فى وضع أفقى على سطح نظيف.

4- رج المزرعة السائلة جيداً بين راحتى اليد لضمان توزيع الخلايا البكتيرية.

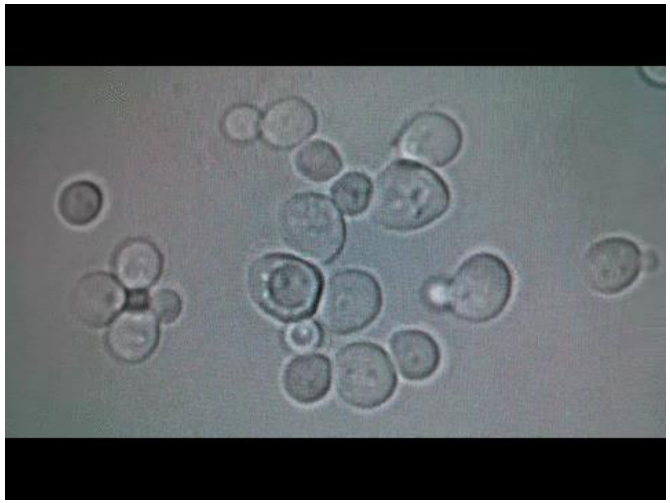
5- عقم إبرة التلقيح ذات العقدة وخذ من المزرعة العقدة الرابعة وذلك (لضمان تبريد الإبرة حتى تتبقى الميكروبات حية) وتوضع النقطة فى منتصف الشريحة الزجاجية.

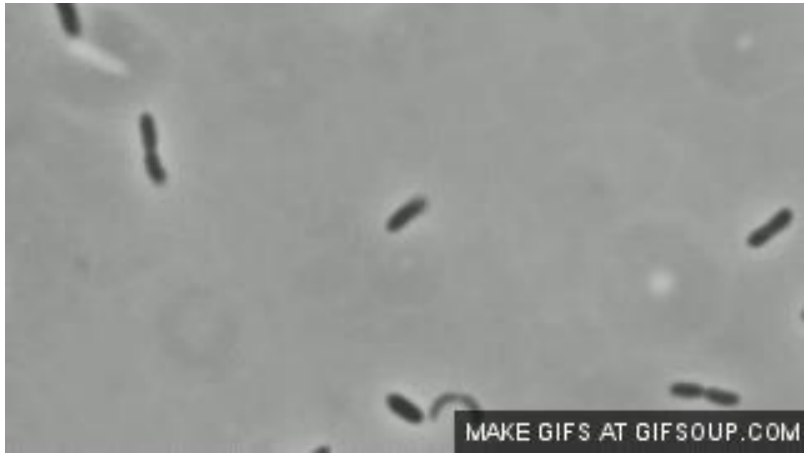
6- ضع الـ cover على الشريحة الزجاجية بحيث يكون ملاصق للنقطة

7- تفحص النقطة Wet mount بالميكرسكوب الضوئى

حيث يتم وضع زيت سيدر على الـcover و يتم فحص حركة البكتريا بالعدسه الزيتيه (100x)


MAKE GIFS AT GIFSOUP.COM




MAKE GIFS AT GIFSOUP.COM

دراسة حركة البكتيريا
(Wet mount)
Bacillus subtilis

مزرعة سائلة تحتوى على ميكروب

Bacillus subtilis

