جامعة حماه – كلية الصيدلة **الجلسة العملية الثالثة**

السنة الثالثة **دراسة المستعمرات الجرثومية**

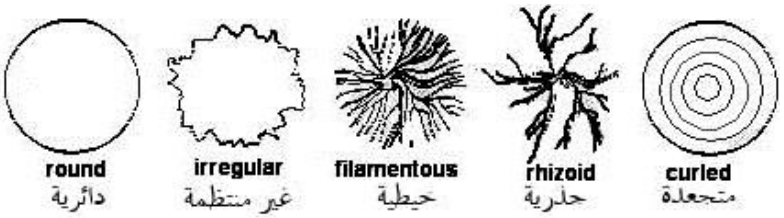
يعبر عن المزرعة الجرثومية بالنمو الحاصل عند استنبات الجراثيم على الأوساط الغذائية المختلفة، ولكن إضافة مادة مصلبة مثل الآغار إلى المزرعة السائلة التي تحتوي على خلايا جرثومية تجعل النمو الناتج من خلية جرثومية واحدة يثبت في مكانه، فبدلاً من أن تطفو وتسبح الخلايا النامية في الوسط السائل، فإنها في حالة البيئة الصلبة تكّون مستعمرة Colony ثابتة تنمو لتكون كتلة مرئية.

وبناء على ذلك يمكن أن نعّرف المستعمرة الجرثومية Bacterial Colony بأنها النمو الحاصل من خلية جرثومية واحدة أو أكثر ضمن الحيز الموجودة فيه في الوسط الصلب لتشكل كتلة خلوية يمكن رؤيتها بالعين المجردة.

وتختلف المستعمرات النامية في الشكل، والحجم، والقوام، واللون باختلاف أنواع الكائنات الدقيقة لذلك فإن مظهر المستعمرة يعتبر دليلاً قيماً للتعرف على المزرعة والتأكد من نقاوتها.

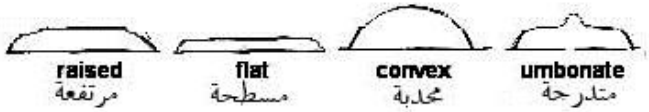
اللون	شفافة، حليبي، عسلي، برتقالي، ليموني، زهري، مركز أسود، أخضر لامع، أحمر
السطح	ناعم لامع S، خشن R، مغصن، جاف دقيقي
الارتفاع	مسطح، مرتفع، محدب، مدرج
الحافة	كاملة، خيطية، متموجة، مفصصة، مجعدة
شكل المستعمرة	نقطية (رأس دبوس)، دائرية، جذرية، غير منتظمة، خيطية

شكل المستعمرة



شكل الحافة

الارتفاع



Dr.Hiba Ahamed Alquini

دراسة الخلايا الجرثومية والتعرف على أشكالها

Studying of Bacterial cell's Forms

للتعرف على الصفات الشكلية للخلايا الجرثومية يمكن بطريقتين:

- **بفحص الخلايا الحية دون صبغها، كما يحدث في فحص حركة الجراثيم.**
- **بفحص الخلايا المثبتة (الميتة) المصبوغة بالصبغات المتنوعة.**

وبما أن الجراثيم الحية عديمة اللون تقريباً فإن ذلك يجعل تباينها مع الوسط المائي المعلقة به لا يكفي لرؤيتها بوضـوح، لذلك فإن صـبغ وتلوينها الجراثيم يزيد من التباين Contrast في اللون بين الخلية الجرثومية والوسط الموجودة فيه، فتصبح مرئية ويسهل تميزها.

وعلى ذلك فإن المزايا الرئيسية للصبغ هي:

1. توفير التباين بين الكائنات الدقيقة وبين الخلفية الموجودة فيها Background مما يســـمح بالتميز بين الأشكال المختلفة.
2. تسهيل دراسة التركيبات الداخلية للخلايا الجرثومية، مثل جدار الخلية الفجوات Vacuoles والأجسام النووية.
3. تمكين الباحث في علم الجراثيم Bacteriologist من استعمال قوة تكبير أعلى.

Dr.Hiba Alhamed Alduini

الملونات (الصبغات) Stains (Days)

الملونات عبارة عن أملاح تتألف من أيونات سالبة وموجبة، أحدهما هو الذي يصبغ.

فالملونات أو **الصبغات الأساسية** Basic Dyes يكون الإيون الفعال فيها هو الأيون الموجب، –على عكس الأصبغة الحامضية Acidic Dyes–، وغالباً ما تكون الجراثيم مشحونة بشحنة سالبة ضعيفة، لذا فالأيون الموجب في الملونات الأساسية ينجذب تجاه الخلية الجرثومية السالبة. ومن الملونات الأساسية نذكر: الكريستال البنفسجي (بنفسجي جانسيان) Crystal Violet وأزرق الميتلين Methelin Blue والسفرانين Safranine.

أما **الملونات الحامضية** فلا ينجذب الأيون الفعال فيها إلى أغلب الجراثيم، فالملون إذاً لا يلون الجرثوم أو العينة وإنما يلون ما حولها، فالجرثوم يظهر غير ملون على قاعدة أو خلفية ملونة، وقد سميت هذه الطريقة بطرقة التلوين السالب Negative Staining، وهي طريقة جيدة للتعرف على الشكل العام للخلية الجرثومية وحجمها، ولدراسة المحافظ Capsule المحيطة بالخلايا الجرثومية في بعض الأنواع، ومن أهم تلك الأصبغة الحامضية الأيوزين Eosin والنيجروسين Negrosin.

أنوع الصبغات الجرثومية:

تستخدم الآن عدد من الأنواع المختلفة من الصبغات Dyes / Stains بطرق متعددة. فمن أهم الصبغات المستخدمة لتلوين الجراثيم.

1 – صبغات بسيطة: والتي تضم:

- صبغات قاعديةBasic Dyes.
- صبغات حامضية Acidic Dyes.
- صبغات غير محددة التأثير Indifferent Dyes.

2 – صبغات مركبة: وتضم:

- صبغة غرام Gram Stain.
- الصبغة المقاومة للأحماض Acid Fast Stain.

طرائق التلوين:

يستخدم المختصين بعلم الأحياء الدقيقة Microbiologists ثلاث طرائق في تلوين الجراثيم، وهي:

1. التلوين البسيط Simple Stain:

ويستخدم فيها ملون واحد فقط، تستخدم هذه الطريقة لفحص المظهر العام للجراثيم وتوضعاتها بالنسبة لبعضها بعضاً.

Dr.Hiba Alhamed Alduihi

2. التلوين المتمايز Differential Stains:

والذي يضم أكثر من ملون، ويستخدم للتفريق بين الأنواع الجرثومية وأكثرها شيوعاً صبغة غرام Gram Stain.

3. التلوين الحامضي Acid Fast Stain:

ويضم أكثر من ملون، ويستخدم لكشف بعض الأنواع الجرثومية الصعبة التلوين بالطرق العادية وللتعرف على الأبواغ.

ولتلوين الجراثيم وفحصها نلجأ أولاً إلى تحضير العينية وتثبيتها ثم تلوينها.

Dr.Hiba Alhamed Alduihi

تحضير الغشاء الجرثومي وتثبيته:

I- نظف الشريحة الزجاجية بمسحها وعقمها بتمريرها على اللهب.

II- ضع بواسطة إبرة التلقيح المعقمة قطرة من الماء المقطر في منتصف الشريحة.

III- عقم إبرة التلقيح ثانيةً بإمرارها على اللهب، ثم خذ جزء من سطح المستعمرة الجرثومية (تحاشى حفر الوسط أو أخذ جزء منه) وأمزج جيداً ما أخذت في قطرة الماء الموجودة على الصفيحة (هذا إذا كانت المزرعة صلبة، أما إذا كانت سائلة فتأخذ قطرة منها وتنشر على الصفيحة بشكل طبقة رقيقة جداً دون مزجها بقطرة ماء).

IV- مرر الصفيحة على اللهب عدة مرات حتى تجف تماماً بحيث يكون الغشاء الجرثومي للأعلى، والغاية من هذه العملية قتل الجراثيم ثم لصقها على الصفيحة الزجاجية، وهذا ما يسمى بعملية التثبيت Fixation.

ويمكن إجراء عملية التثبيت أيضاً باستعمال الكحول حيث يسكب على العينة المجففة مخبرياً بضع قطرات من الكحول 96 % وتترك من 10 – 20 ثانية، ومن ثم يغسل في الماء لإيقاف عمل الكحول.

V- يغمس الغشاء الجرثومي بعد تثبيته بالماء المقطر وذلك للتخلص من آثار بعض الأملاح المعدنية التي كانت موجودة في الوسط المغذي للجرثوم المدروس.

Dr.Hiba Alhamed Alduhi

التطبيق العملي 1 :

سـنقوم بإجراء التلوين البسـيط باسـتخدام الطريق الأكثر شـهرة لذلك وهي طريقة **أزرق المتيلين Methelin Blue Method**، إذ تســـتعمل هذه الطريقة بكثرة للتعرف على الشـــكل العام للخلايا الجرثومية.

طريقة العمل Procedure:

1 – يحضر الغشاء الجرثومي ويثبت بالطريقة السابقة.

2 – يوضع على الغشاء قطرة من صبغة أزرق الميتلين مدة من 3–5 دقائق.

3 – يغسل الغشاء الجرثومي بتيار مائي خفيف من ماء الصنبور وتجفف الصفيحة.

4 – توضع قطرة من زيت الأرز على الغشاء ثم تفحص بالعدسة الغاطسة.

5 – تكتب الملاحظات حول التجربة (لون المحضر، شكل الخلايا، تجمعاتها...) مع الرسم.

6 – بعد الانتهاء من العمل تمسح العدسة الغاطسة بشكل جيد بالكزايلول Xylole.

ستشاهد أشكالاً جرثومية عديدة وخاصةً إذا كانت المزرعة التي قمت بفحصها مزرعة مختلطة.

قم بعمل محضـرين على الأقل من مسـتعمرتين جرثوميتن مختلفتين، وبناءً على ما تشـاهده في المجهر؛ املأ التقرير المختبري مع رســـم الأشـــكال الجرثومية التي تراها في المجهر، ودون ملاحظاتك.

Dr.Hiba Alhamed Alduri

صبغة غرام Gram Stain

قام العالم الدنماركي Hans Christian Gram عام 1884 بتطوير تقنية خاصة في الصباغ قادرة على أن تميز مجموعتين من الجراثيم وهما:

- **مجموعة الجراثيم الإيجابية الغرام (+G) Gram Positive Bacteria.**
- **مجموعة الجراثيم السلبية الغرام (-G) Gram Negative Bacteria.**

تعتمد طريقة صبغة غرام على قدرة الجراثيم على الاحتفاظ باللون البنفسجي الناتج عن صبغة الكريستال البنفسجي Crystal Violet خلال مرحلة مزيل اللون.

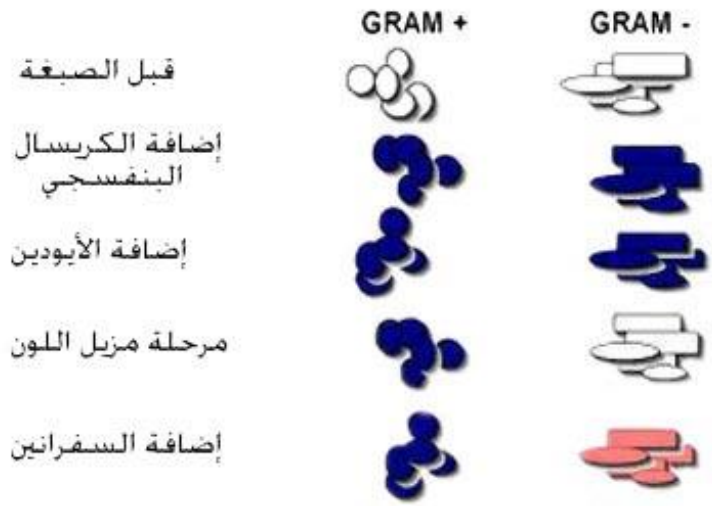
تتخلى الجراثيم السلبية الغرام عن اللون البنفسجي المكتسب من الكريستال البنفسجي عند استخدام مزيل اللون أما الجراثيم الإيجابية الغرام فإنها –على عكس السلبية– تبقى محتفظة باللون البنفسجي (أو الأزرق الأرجواني) عند استخدام مزيل اللون، وفي المرحلة التالية تستخدم الصبغة الثانية، وهي مادة السفرانين ذات اللون الأحمر أو الوردي Pink Color، والتي الجراثيم السلبية الغرام اللون ذاته بينما لا تتأثر به الجراثيم الإيجابية الغرام.

ففي البداية يعمل الكريستال البنفسجي على صبغ كل من الجراثيم الإيجابية الغرام والسلبية الغرام باللون البنفسجي، يليه إضافة مادة الإيودين Iodine، –وهي مادة كاوية أو حارقة Mordant–، التي على الاتحاد مع الكريستال البنفسجي لتشكل مركباً غير قابل للانحلال في الجدار الخلوي للجراثيم الإيجابية الغرام، ويبقى لون الجراثيم الإيجابية الغرام والسلبية الغرام بنفسجياً.

لكن عند إضافة مادة محلة مثل الكحول (إيتانول 95%) أو أي مزيل لون آخر فإنه سيقوم بإزالة اللون البنفسجي من الجراثيم السلبية الغرام، بينما يبقى اللون البنفسجي في الجدار الخلوي للجراثيم الإيجابية الغرام.

وفي الخطوة الأخيرة تعمل صبغة السفرانين على إعطاء اللون الوردي للجراثيم السلبية الغرام دون أن تؤثر على اللون البنفسجي للجراثيم الإيجابية الغرام.

Dr.Hiba Ahamed Alduihi



تعد صبغة غرام المفتاح الأساسي في علم الأحياء الدقيقة للتعرف على الجراثيم، إذ تستخدم في تحديد هوية بعض الجراثيم المجهولة بسهولة، كما أنها هامة جداً في المجال الطبي والمخبري والبحثي لأنها تعطي معلومات سريعة عن الجرثوم تفيد في المعالجة. فعلى سبيل المثال نذكر أن الجراثيم الإيجابية الغرام تكون غالباً شديدة التأثر بالبنسلينات Penicillins والسلفاميدات Sulfamides، أما الجراثيم السلبية الغرام فهي مقاومة لها ولكنها تتأثر بشدة بالستربتومايسين Streptomycine والكلورامفينيكول Cloramphenicol والتتراسيكلينات Tetracyclins.

إنّ أداء هذه التقنية بشكل دقيق يتطلب من الباحث في علم الجراثيم Bacteriologist خبرة في التعامل معها، وللحصول على نتائج أقرب ما تكون إلى الصحة باستخدام صبغة غرام، مراعاة عدة أمور أهمها: عدم تحضير غشاء جرثومي سميك، وعدم ترك المحضر في مزيل اللون مدة طويلة ويعتمد ذلك على سماكة الغشاء أيضاً، كما يجب استخدام جراثيم فتية لا يزيد عمرها عن 24 ساعة.

وبالرغم من أهمية صبغة غرام في علم الجراثيم الطبية Medical Bacteriology فلا يمكن إعطاءها الثقة المطلقة، إذ أن المزارع القديمة أو الهرمة للجراثيم الإيجابية الغرام تميل إلى أن تتخلى عن اللون البنفسجي فتبدو سلبية الغرام على عكس المزارع الفتية.

أضف إلى ذلك أن بعض أنواع العصيات تكون متغيرة الغرام Gram Variable، أي تبدو في تارة سلبية الغرام وتارةً أخرى إيجابية الغرام.

فمثلاً بعض الجراثيم اللاهوائية موجبة الغرام Anaerobic Gram-Positive Bacteria يمكن أن تتخلى عن اللون بسهولة فتبدو –بشكل مخادع– على أنها جراثيم سلبيات الغرام؛ في حين أن بعض الجراثيم سلبيات الغرام مثل العصيات من النوع *Streptobacillus moniliformis* (التي تعد المسبب الأساسي لحمى عضة الجرذ Rat-Bite Fever) يمكن أن تتلون في بعض الأحيان على أنها جراثيم إيجابيات الغرام.

Dr.Hiba Ahmed Alduni

فالسؤال الذي يطرح نفسه هنا بقوة هل من طريقة للتأكد من صحة صبغة غرام على الأحياء الدقيقة المشكوك في أمر تلونها بصبغة غرام؟

في الحقيقة يوجد عدد من الطرائق للتأكد من مصداقية صبغة غرام على الجراثيم، إحدى أهم هذه الطرائق هي طريقة اختبار هيدروكسيد البوتاسيوم KOH (Potassium Hydroxide Test).

تتم بوضع من قطرتين من محلول KOH 3% (3 غ من مادة الـ KOH في 100 ml من الماء المقطر) على شريحة زجاجية نظيفة، ومن ثم ينقل ملئ عقدة من مزرعة جرثومية نقية نامية على الآغار المائل أو في طبق بتري، وتمزج بشكل جيد مع محلول KOH بشكل متواصل مدة 30 ثانية.

وللتأكد من أن الجراثيم المفحوصة سلبية أو إيجابية الغرام، يتم رفع العقدة عن المزيج لمسافة 2 – 1 سم، فإذا لوحظ تشكل خيوط مخاطية عالقة ما بين العقدة والمزيج فنجزم بأن الجراثيم سلبية الغرام تماماً، إذ أن محلول KOH على تحطيم الجدران الخلوية للجراثيم السلبية الغرام محررة بذلك خيوط الـ DNA والتي تعمل على تشكيل خيوط لزجة عالقة ما بين العقدة والمزيج، بينما لا تشكل الجراثيم إيجابية الغرام هذه الخيوط اللزجة.

من الجراثيم الإيجابية الغرام نذكر:

Staphylococcus aureus، *Staphylococcus Epidermidis*، *Bacillus Pumilus*، *Bacillus Subtillis*.

ومن الجراثيم السلبية الغرام نذكر:

E. coli، *Klebsilla pneumonia*، *Pseudomonas earoginosa*، *Salmonella typhi*، *Shigilla Flexineri*.

تركيب الجدار الخلوي:

يتألف الجدار الخلوي للجراثيم الإيجابية الغرام من عدة طبقات من الـ Peptidoglycan كما يحتوي جدارها الخلوي على سكريات متعددة تدعى Teichoic Acid تساعد في تحديد أنواع الجراثيم.

بينما يحتوي الجدار الخلوي للجراثيم السلبية الغرام على طبقة رقيقة من الـ Peptidoglycan، لذلك فإن جدارها الخلوي أكثر قابلية للتحطم الميكانيكي من الإيجابية الغرام، كما أن طبقة الـ Teichoic Acid تغيب نهائياً في السلبيات الغرام.

وبالإضافة إلى تلك الطبقة الرقيقة من البيبتيدوغليكان، فإن الجدار الخلوي للجراثيم السلبية الغرام يشتمل على الطبقات التالية:

1– طبقة الليبوبروتين Lipoprotein، 2– طبقة الفوسفوليبيد Phospholipid، 3– طبقة الليبوبوليسكاريد Lipopolysaccharide

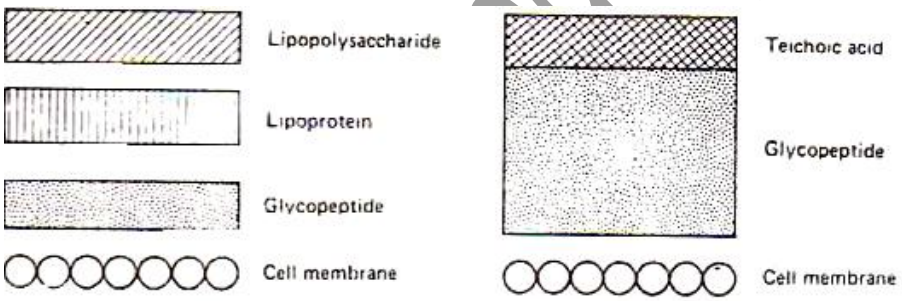
Dr.Hiba Alhamed Alduihi

وتلعب هذه الطبقات الثلاث دوراً هاماً كرداء واق Barrier ضد مرور بعض المواد من الوسط المحيط إلى داخل الخلية الجرثومية، كبعض الصادات الحيوية مثل البنسلينات وبعض الأصبغة والأملاح الصفراوية.

إذ تعد طبقة الـــ Lipoprotein مسؤولة عن بعض خصائص الجراثيم السلبية الغرام، فالكريستال البنفسجي يلون طبقة الـــLipoprotein ولكنه يزول عندما يحل الكحول أو مزيل اللون هذه الطبقة، وبإضافة السفرانين بعدئذ فإن الجرثوم يكتسب أو يتلون باللون الأحمر.

أما في الجراثيم الإيجابيات الغرام فإنها تكتسب اللون البنفسجي لأن الكريستال البنفسجي يتفاعل مع الإيودين ويشكل مركباً معقداً داخل الجدار السميك لطبقة الـ Peptidoglycan.

أما دور طبقة الليبوبوليسكاريد Lipopolysaccharides في الطبقة السطحية للجراثيم السلبية الغرام فهو حماية الخلية من التمزق والانفجار، ويكسب الخلية الجرثومية مقاومة تجاه عمليات البلعمة، –وتقابل هذه الطبقة طبقة حمض التكوئيك الـ Teichoic Acid في الجراثيم الإيجابية الغرام–، كما تكسبها الصفة السمية بدخولها للبدن ووصولها للدم، فتسبب الحمى وتحلل الدم (تفكك الكريات الحمراء Hemolysis).



الجراثيم سالبة الغرام

الجراثيم موجبة الغرام

Dr.Hiba Ahmad Alduihi

التطبيق العملي 2:

1. حضـر غشـاء جرثومي رقيق ومتجانس (قم بتحضـير ثلاث ثلاث محضـرات على الأقل من مستعمرات جرثومية مختلفة).
2. لون الغشاء بنقاط من صبغة الكريستال البنفسجي مدة من 30– 60 ثانية.
3. اغسل بتيار خفيف من الماء وتخلص من الماء الزائد بسرعة.
4. ضع عدة نقاط من محلول الإيودين Iodine (محلول لوغول) مدة دقيقة واحدة.
5. اغسل المحضر لإزالة آثار الإيودين بتيار خفيف من الماء.
6. ضـــع المحضـــر في الكحول الإيتيلي بنســـبة 95% أو في مزيل اللون الخاص مدة 10– 20 ثانية. أو يمكنك إضـافة مزيل اللون نقطة تلو الأخرى ضـمن الفترة المحددة ثم تقوم بغسـيل مباشر بتيار خفيف من الماء لإيقاف عمل مزيل اللون.

   هذه الخطوة حساسـة وحاسـمة جداً فالغشـاء الثخين يحتاج لزمن أطول بينما الغشـاء الرقيق يحتاج لزمن أقل، **لذلك تعد هذه المرحلة اكثر مراحل صـبغة غرام حسـاسـية وتتطلب دقة عالية.**
7. لون المحضر بالسفرانين مدة 30 - 20 ثانية.
8. اغســل المحضــر بلطف مدة ثواني ومن ثم نشــف المحضــر بلطف بورق الترشــيح. ونظف الشـريحة وجهز مجهرك للبدء بفحص المحضـر. **(لا تنس مسـح المجهر وخاصـة العدسـات العينية والجسمية بحلول الكزايلول).**
9. افحص المحضـر بوضـع قطرة من زيت الأرز تحت العدسـة الغاطسـة، ودون ملاحظاتك في التقرير المختبري.

Dr.Hiba Ahmed Alduhi