أهمية التثبيت :

- يؤكد التصاق adhesion الخلايا البكتيرية على الشريحة الميكروسكوبية .

- يقتل الخلايا المثبتة .

- يغير طبيعة أنزيمات الخلية وذلك يمنعها من هضم أجزاء الخلية الذي قد يؤدي إلى التحلل الذاتي autolysis وفقد العينة . طرق التثبيت :

أ- تثبيت بالحرارة fix heat:

ويتم إما بتمرير الشريحة على لهب بنزن Bunsen burner عدة مرات _ ويراعى أن استعمال الحرارة أكثر من اللازم سيشوه شكل وتركيب الخلية المصبوغة ، لذا يجب أن تكون الشريحة دافئة وليست ساخنة _ أو بوضع الشريحة على مسخن الشرائح slide warmer (hot plate) عند 60ºم لمدة عشر دقائق .

ب- تثبيت كيميائي fix chemically:

بوضع كحول ميثيلي methyl alcohol 95% لمدة دقيقة ثم نميل الشريحة للتخلص من الكحول الفائض .

طريقة العمل PROCEDURE :

والطريقة العامة الموضحة في هذا التدريب ، تعتبر أساسية في معظم طرق الصبغ المستعملة للبكتيريا . ففي هذا التدريب سنستعمل الحرارة لقتل الخلايا وتثبيتها على الشريحة.

1- نمرر سطح شريحةslide نظيفة في لهب بنزن Bunsen عدة مرات للتعقيم الجزئي ولإزالة ما يكون عالقاً بها من حبيبات دهن، ثم نتركها على حاملها لتبرد.

2- أ* بواسطة الإبرة ذات العقدةinoculating loop ، نضع غمستين tow loop full أو ثلاث من المزرعة السائلة على سطح الشريحة

ب* وفي حالة المزرعة الصلبة ، نضع نقطة ماء نظيفة في وسط الشريحة . ثم نأخذ جزءاً صغيراً من النمو البكتيري بواسطة الإبرة ذات العقدة inoculating loop ونمزجهما جيداً .

3- ننشر بالإبرة مزيج المزرعة الصلبة (أو غمسه المزرعة السائلة) على مساحة حوالي 1سم بوسط الشريحة ، لتكون غشاء رقيق thin film منتظم.

4- نترك الغشاء ليجف تماما في الهواء air dry على درجة حرارة الغرفة. أو بمسك الشريحة أعلى اللهب بحوالي cm20 بحيث لا يغلي الغشاء الموجود على الشريحة.

5- بعد ذلك نثبت الغشاء المتكّون بتمرير الشريحة في اللهب عدة مرات (*نراعي أن يكون سطح الشريحة الذي عليه الغشاء متجها باستمرار إلى أعلى*) .

***ملاحظات**

- لتنظيف أي شريحة نستخدم المواد المنظفة أو الكاشطة مثل الصابون abrasive soap ثم نغسل ونجفف الشريحة . أو يمكننا أن نضع قطرة من الزّيلين (xylene xylol)على سطح الشريحة ثم ننظف بقطعة قماش.

- إذا كانت الشريحة نظيفة فانه يمكن فرد المعلق على سطحها بانتظام ، أما الشريحة غير النظيفة فإن المعلق يتجمع على سطحها بشكل قطرات متفرقة ولا يتكون غشاء منتظم .

- تمسك الشريحة بالأصابع من حوافها حتى لا يعلق بها أي مواد دهنية موجودة بالأصابع .

والتثبيت النموذجي هو الذي يحفظ تركيبات الخلية في شكلها ووضعها الطبيعي ، دون حدوث تشوهات ، أو ظهور تركيبات لم تكن موجودة بالخلية الحية .

وبعد تثبيت الغشاء نقوم بعملية الصبغ stain، ونبدأ بالصبغ البسيط .

1- الصبغ البسيط simple stain :

يقصد به استعمال صبغة مفردة في صبغ الخلايا.

- ويعتمد الصبغ البسيط على حقيقة أن خلايا البكتيريا تختلف كيميائياً عن الوسط المحيط بها ، لذلك فإنها تصبغ لإظهار التباين بينها وبين الوسط.

- ويفيد في توضيح الفروق الموجودة في حجم الخلايا cell size، وشكلها morphology ، ونظام تجمعها arrangement.

*** الصبغ البسيط الذي يستهدف الخلايا البكتيرية ذاتها يسمى الصبغ المباشر direct stain**

*** الصبغ البسيط الذي يصبغ الخلفية ويترك الخلايا البكتيرية غير مصبوغة**

طريقة العمل PROCEDURE :

1- نضع الشريحة التي عليها الغشاء المثبت – الذي سبق تحضيره في بداية هذا التمرين – على سلك للصبغ بأسفله حوض.

2- نغمر الغشاء بالصبغة المطلوبة ، ونتركها وقتاً كافياً للتفاعل : 30 ثانية لأزرق الميثيلين أو السفرانين ، و 10 ثوان للكريستال البنفسجي .

3- نتخلص من محلول الصبغة ثم نغسل الغشاء المصبوغ بالماء ، وذلك لإزالة الصبغة الزائدة.

4- نجفف الشريحة بوضعها بين ورقتي نشاف نظيف ثم تمرر أعلى اللهب عدة مرات.

5- نضع نقطة من زيت السيدر على الغشاء المصبوغ ثم نفحص بواسطة العدسة الزيتية oil-immersion) high-power (lens.

(إذا كان الغشاء المحضر سميكاً ، فسيظهر الغشاء المصبوغ ككتل متجمعة من مادة مصبوغة مع قليل جداً من الخلايا الفردية.)

<u>طريقة فحص الغشاء باستعمال العدسة الزيتية :</u>

1- توضع الشريحة على مسرح الميكروسكوب.

2- يضبط الضوء بالاستعانة بالعدسة الشيئية الصغرى والمكثف حتى يشاهد المجال الميكروسكوبي ومنطقة الغشاء مضاء إضاءة عالية ومتجانسة .

3- توضع نقطة زيت سيدرoil على الغشاء ثم تحرك القطعة الأنفية لوضع العدسة الزيتية في وضع الاستعمال ويدار الضابط الكبير حتى تنغمس العدسة في نقطة الزيت وتلامس سطح الشريحة ، يجب أن لا يدار الضابط بسرعة حتى لا تنكسر الشريحة . ونقوم بهذه الخطوة ونحن نراقب الشريحة والعدسة الزيتية من الخارج

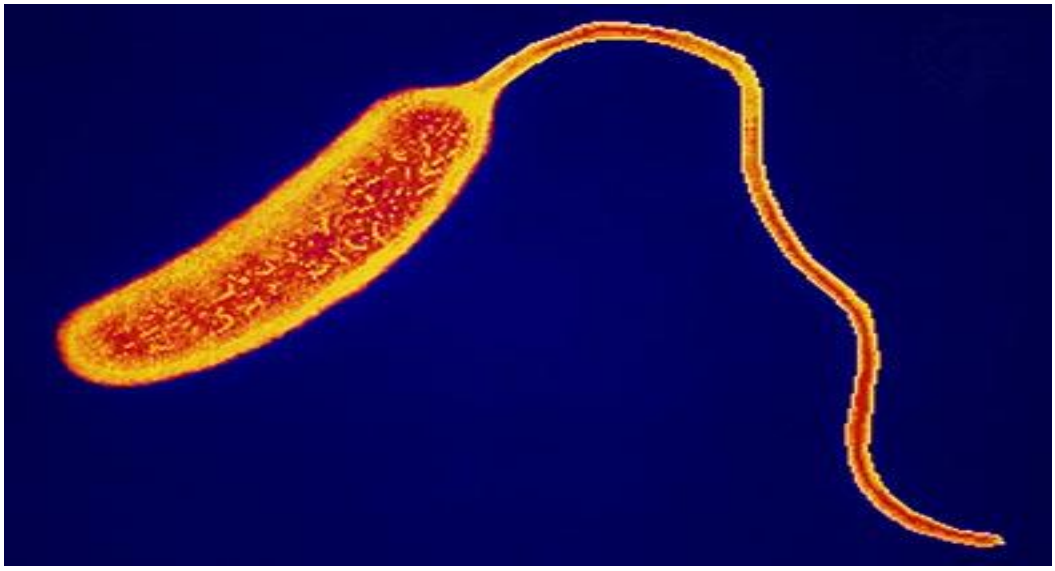
4- ننظر من خلال العدسة العينية ونحرك الضابط الدقيق لرفع أنبوبة الميكروسكوب إلى أعلى حتى نرى الخلايا البكتيرية بوضوح .

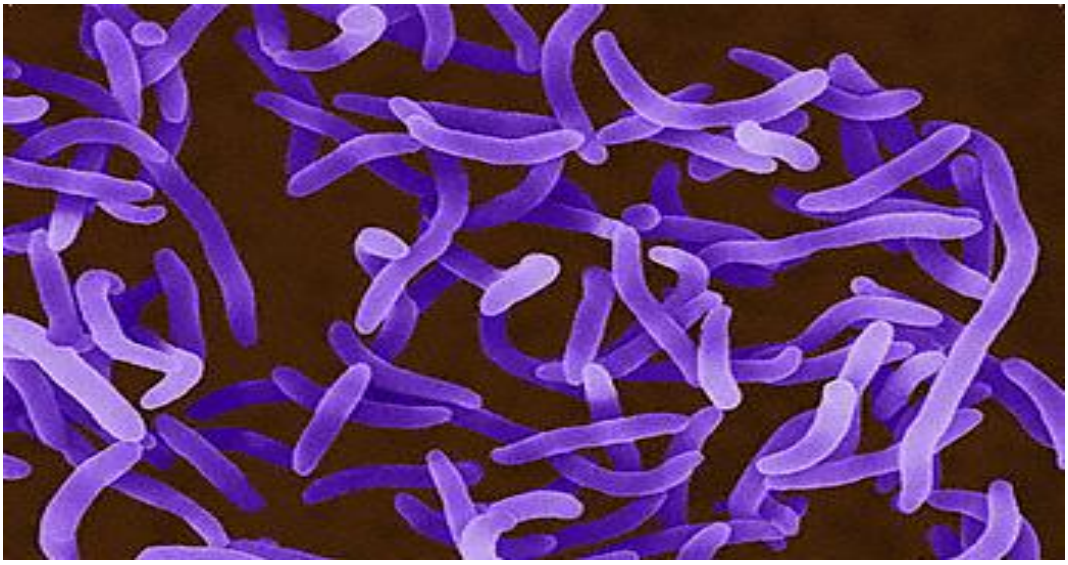
<u>2- الصبغ المركب (التفريقي) compound(differential) stain</u>

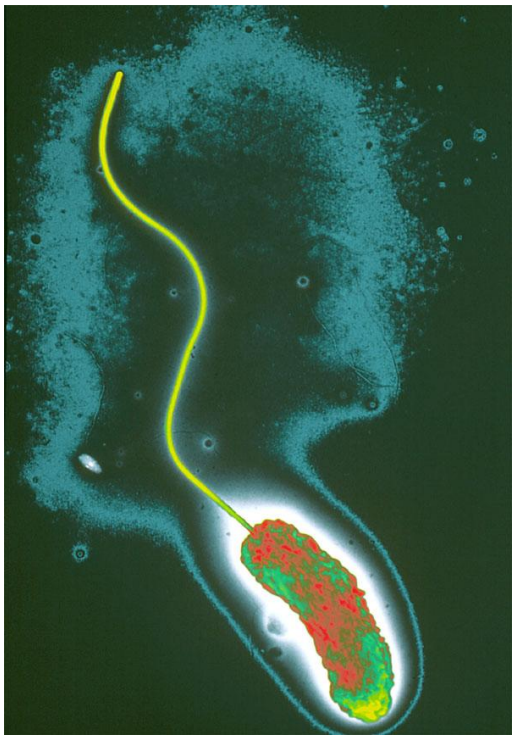
- الصبغ المركب :لأننا تستعمل في هذه الطرق أكثر من صبغة واحدة .

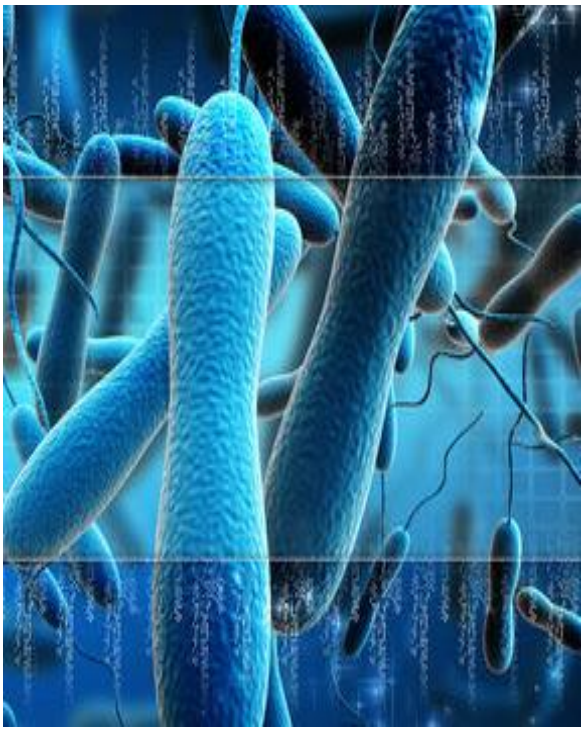
- الصبغ التفريقي : لأنه طريقة للتمييز، والتفرقة بين أنواع البكتيريا ،حيث تختلف الكائنات فيما بينها كيميائياً وفيزيائياً ، ولذلك فإنها تتفاعل بدرجات مختلفة بالنسبة لطريقة صبغ معينة ، وهذا هو الأساس الذي يعتمد عليه الصبغ التفريقي . وتعتبر صبغة جرام من أهم طرق الصبغ المركب المتبعة في الدراسات البكتيريولوجية

Vibrio cholerae



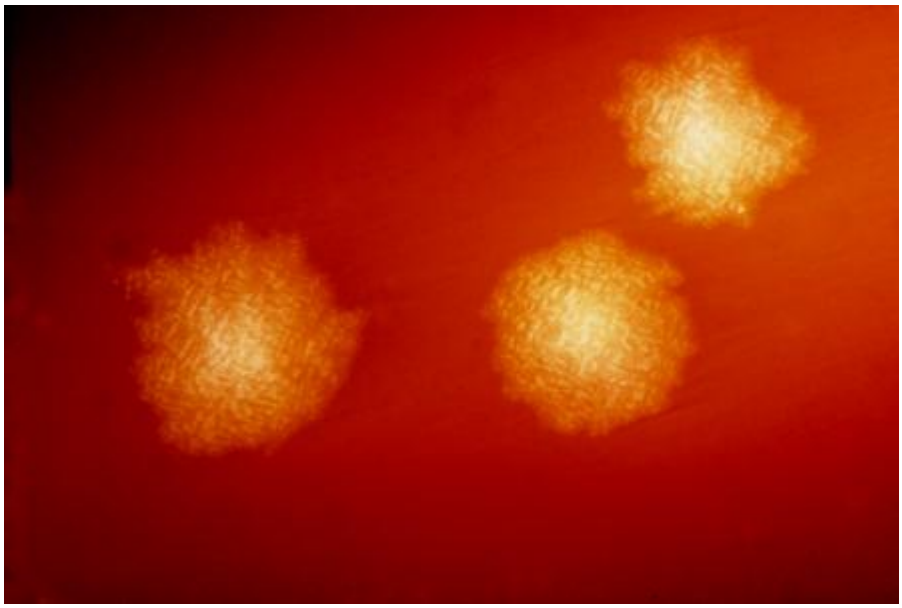






Clostridium

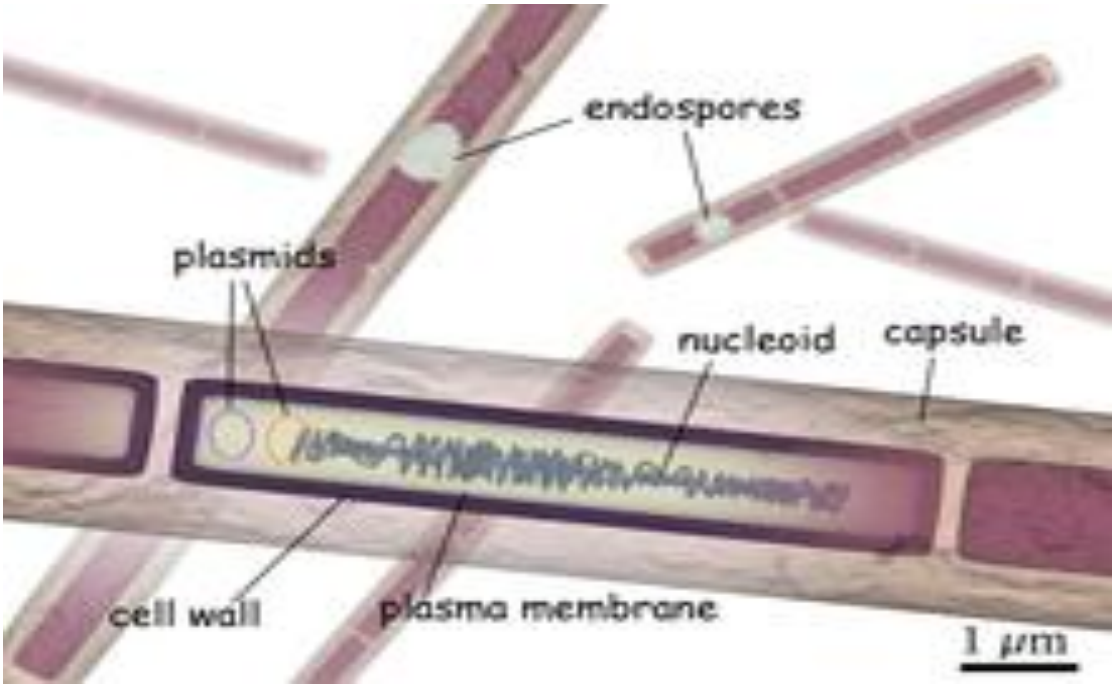
C. difficile colonies on a blood agar plate

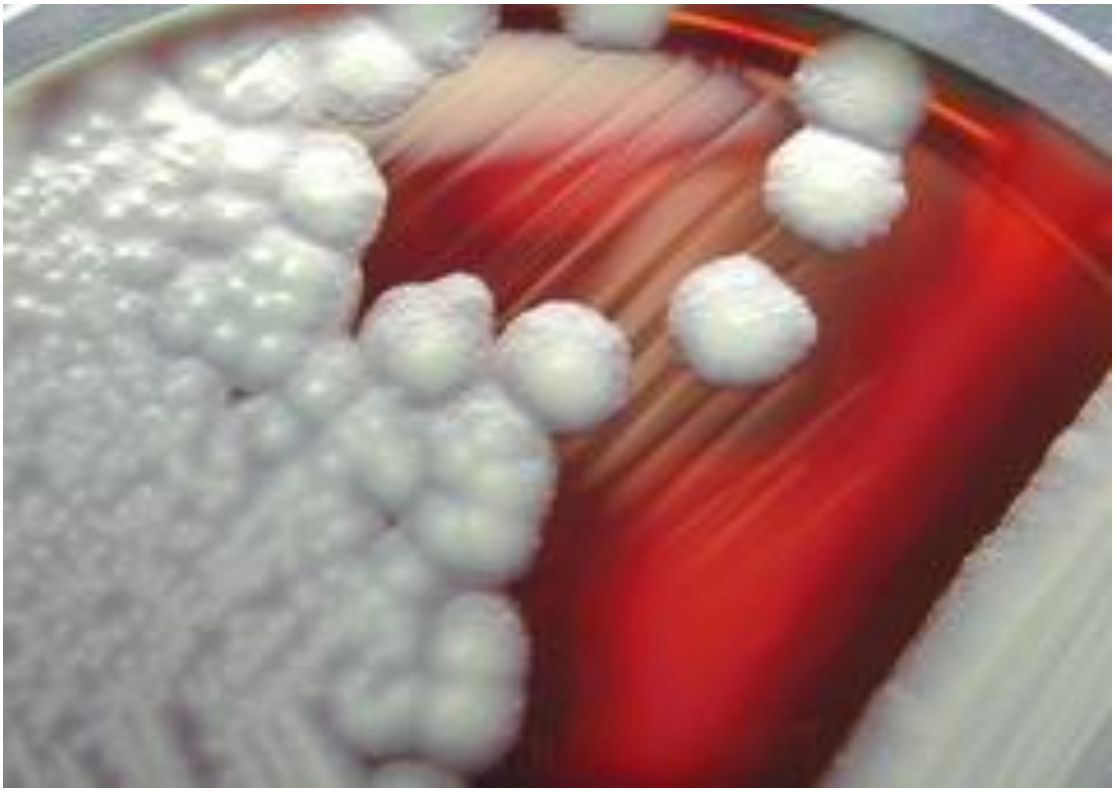


Bacillus

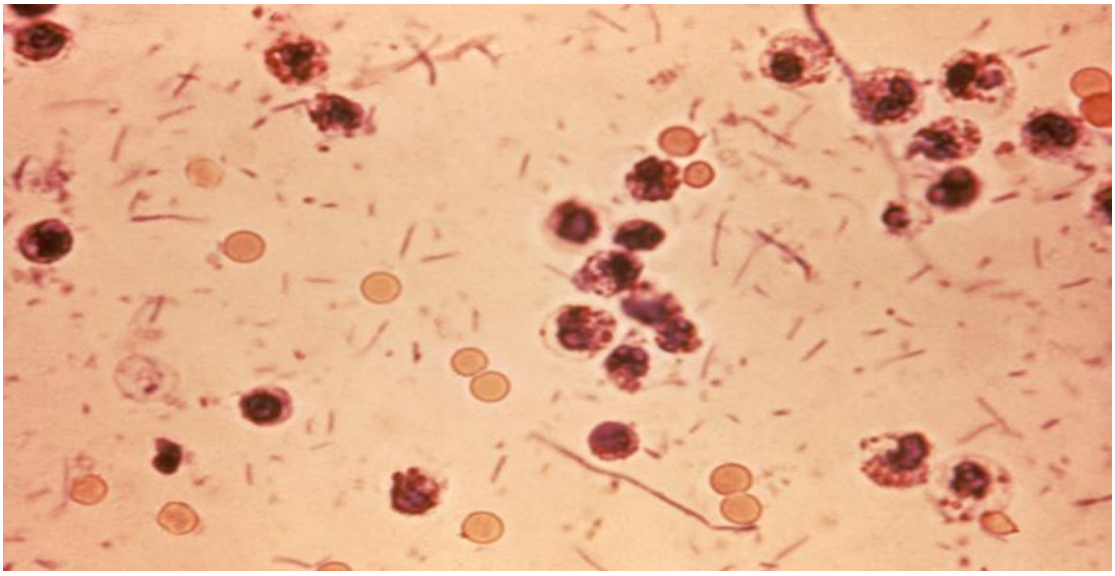
Gram-stained *Bacillus subtilis*

Sporulating *Bacillus subtilis*


endospores
plasmids
nucleoid
capsule
cell wall
plasma membrane
1 μm



Shigella



Salmonella