

دراسة الصفات الشكلية للخلايا البكتيرية Morphological Studies (صبغ الخلايا البكتيرية Bacterial Staining)

الصبغ هو دراسة مورفولوجية يقصد بها دراسة شكل الخلية البكتيري
س: لماذا تصبغ الخلايا البكتيرية؟
الطرق العامة للصبغ تختلف باختلاف الدراسة والغرض
تبدأ عملية فحص الخلايا البكتيرية بتحضير الغشاء البكتيري ثم يتم الصبغ وبعده الفحص
بالمجهر باستخدام العدسة الزيتية.

تحضير الغشاء البكتيري Smear preparation

1. تحت ظروف التعقيم, ينقل الى منتصف شريحة زجاجية نظيفة قطرة من الماء المقطر
2. باستخدام ابرة التلقيح المعقمة ينقل جزء من المزرعة البكتيرية حديثة العمر ويخلط مع قطرة الماء, ويفرد الغشاء على الشريحة
3. تترك الشريحة لتجف في جو المعمل
4. يثبت الغشاء البكتيري بتمريره على اللهب من 3-4 مرات
5. تترك الشريحة لتبرد

صبغ جرام Gram Stain

- تعتبر صبغة مركبة Compound stain – وصبغة تفريقية Differential stain
- من أهم طرق الصبغ شيوعا في المختبرات الميكروبيولوجية
- أول من استخدمها كريستيان جرام
- تكمّن أهميتها في استعمالها لتشخيص البكتيريا حيث بواسطتها يمكن تقسيم البكتيريا الى قسمين:
- Gram positive bacteria - Gram negative bacteria
- لها أهمية في توضيح الاختلافات الأساسية في تركيب الجدار الخلوي للبكتيريا
- الغرض من صبغ جرام: معرفة شكل الخلايا البكتيرية- انتظامها- الاستجابة

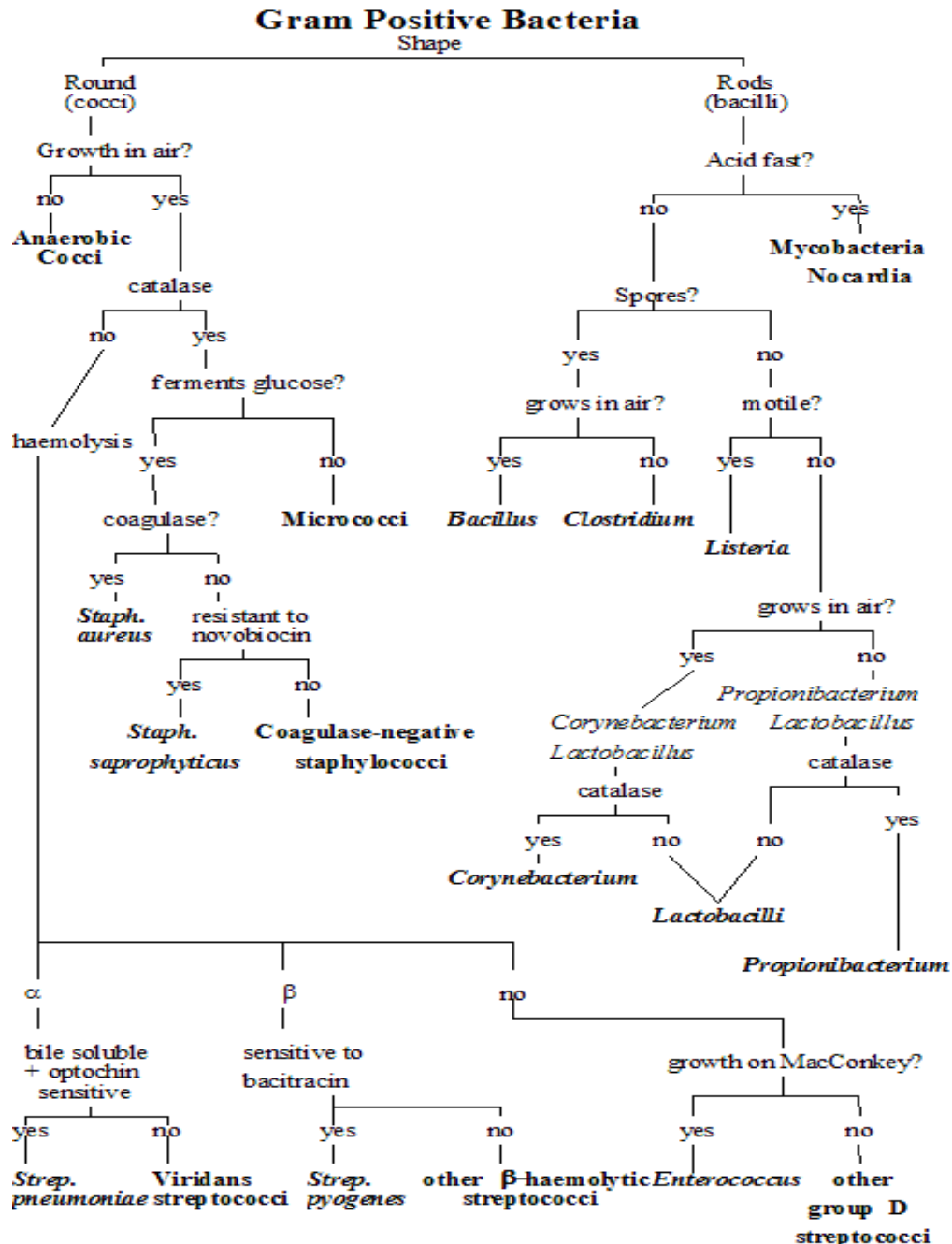
طريقة الصبغ: Stain technique

1. يتم اعداد غشاء بكتيري وتثيته كما سبق
 2. يغمر الغشاء البكتيري بكمية مناسبة من صبغة الكريستال البنفسجي لمدة دقيقة
 3. يغسل الغشاء تحت تيار ماء خفيف
 4. يغمر الغشاء بكمية مناسبة من اليود لمدة دقيقة
 5. يغسل الغشاء البكتيري بالكحول 70% بوضع مائل حتى تنزل القطرات شبه رائقة
 6. يغسل الغشاء تحت تيار ماء خفيف
 7. يغمر الغشاء بصبغة الصفرانين لمدة دقيقة
 8. يغسل الغشاء تحت تيار ماء خفيف
 9. تجفف الشريحة بين ورقتي ترشيع
 - 10- تفحص الشريحة باستخدام العدسة الزيتية وزيت السيدر
- المشاهدة: اذا تلونت الخلايا بلون أزرق بنفسي تكون موجبة لجرام
اذا ظهرت الخلايا بلون احمر تكون سالبة لجرام

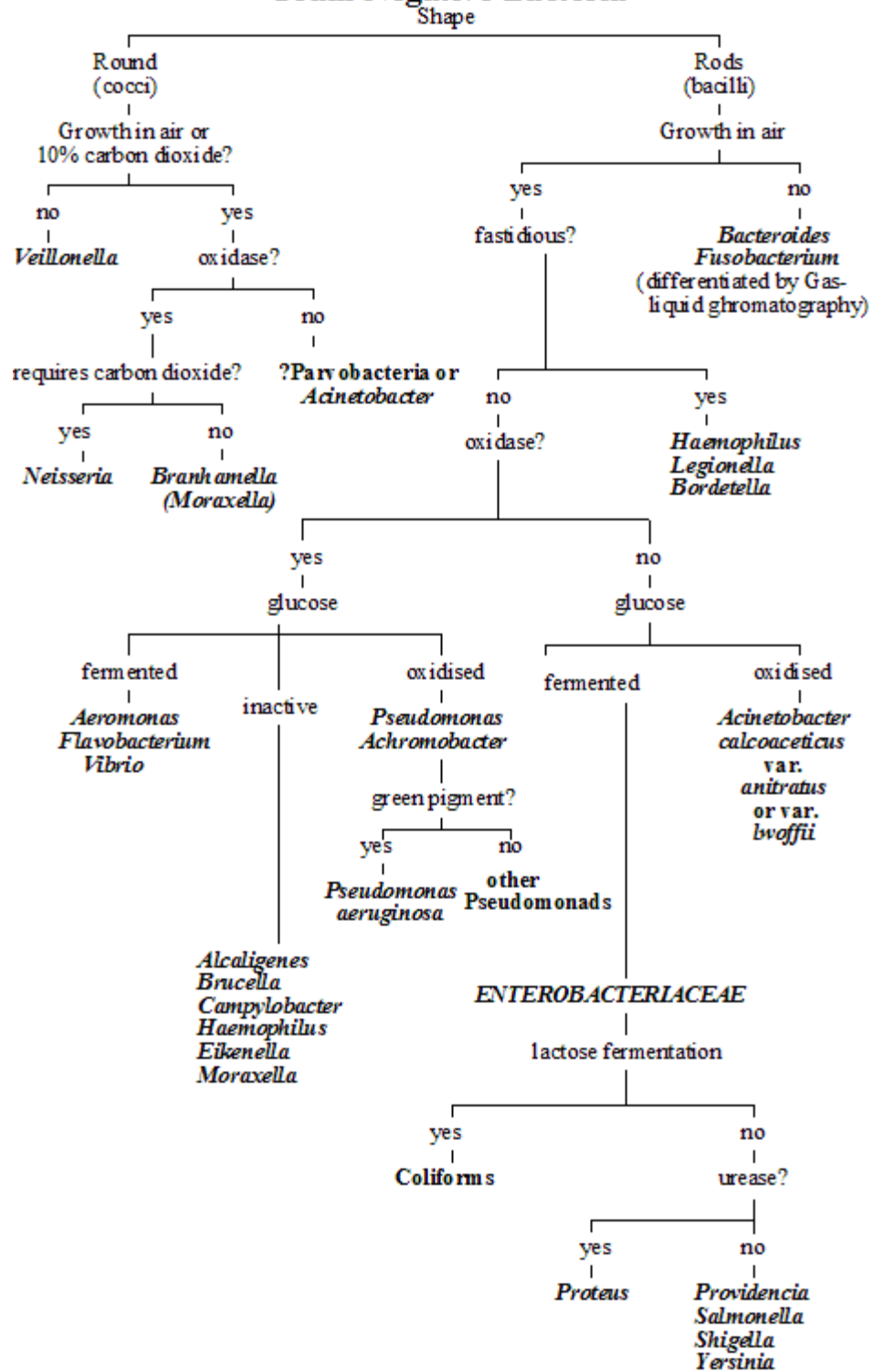
ملاحظة: استعمال المحاليل الصبغية بصورة غير كافية من ناحية الكمية أو الوقت ينتج عنه
صبغ غير جيد وتناثر النتيجة

- لماذا اختلفت البكتيريا في استجابتها لصبغ جرام؟
- هل تتغير استجابة البكتيريا لصبغ جرام؟
- لماذا يستخدم زيت السيدر اثناء فحص الغشاء البكتيري؟

Identification of Pathogenic Bacteria

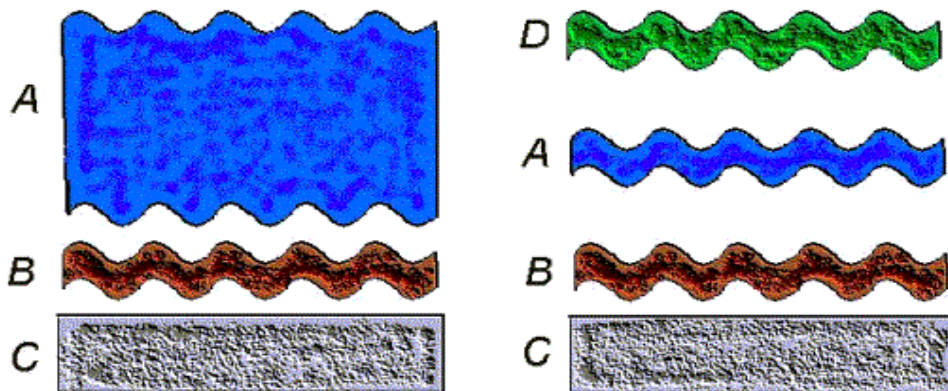


Gram Negative Bacteria



Bacillus

A Gram Positive Bacteria Cell and a Gram Negative Bacteria Cell



A: Peptidoglycan layer Note the difference in thickness between the two cells. This difference is what allows gram-positive and gram-negative bacteria to stain in separate colors.

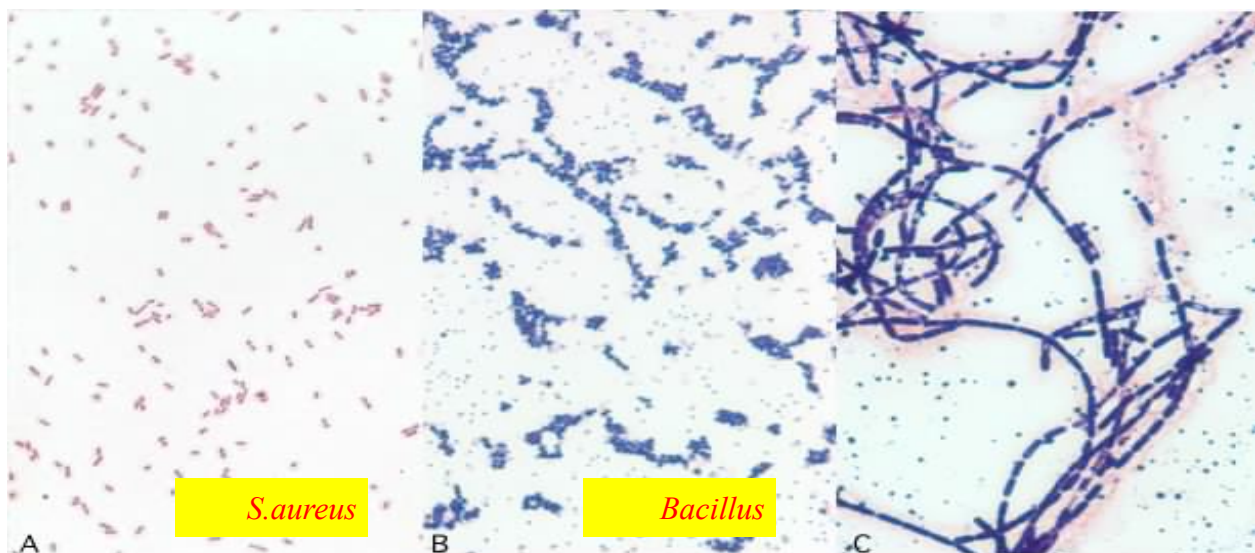
B: Cytoplasmic Membrane Encases the cell's cytoplasm.

C: Cytoplasm Living cell substance holding all of the cell's "organs."

D: Outer membrane Found only in gram-negative bacteria. It holds special chemicals toxic to animals. This membrane is highly resistant to many antibacterial chemicals

Another feature found exclusively in gram-negative bacteria is the periplasmic space, found between the outer membrane (D) and the cytoplasmic membrane (B). Most of the periplasmic space is empty, except for the thin peptidoglycan layer (A) found inside.

Typical Gram Stain



Gram-positive cocci

Clusters: usually characteristic of *Staphylococcus* spp., such as *S. aureus*



Chain: usually characteristic of *Streptococcus* spp., such as [*S. pneumoniae*](#), [*B group streptococci*](#)

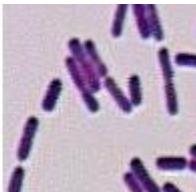


Tetrad: usually characteristic of *Micrococcus* spp.



Gram positive bacilli

Thick : usually characteristic of *Clostridium* spp., such as [*C. perfringens*](#),



Thin: usually characteristic of *Listeria* spp.

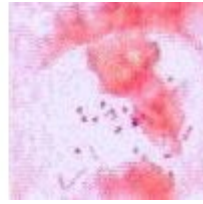


Branched: usually characteristic of Actinomycetes and Nocardia , such as [*A. israelii*](#) .

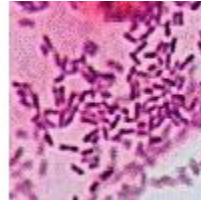


Gram-negative cocci

Diplococci: usually characteristic of *Neisseria* spp., such as [*N. meningitidis*](#)



Coccobacilli: usually characteristic of *Acinetobacter* spp., which can be either Gram-positive or Gram-negative, and is often Gram-variable.

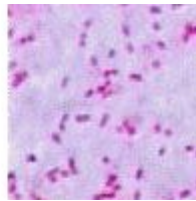


Gram-negative bacilli

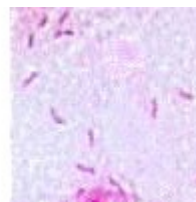
Thin rods: usually characteristic of enterobacteriaceae, such as [*E. Coli*](#)



Coccobacilli: usually characteristic of *Haemophilus* spp., such as [*H. influenzae*](#)



Curved: usually characteristic of *Vibrio* spp.; *Campylobacter* spp., such as [*V. cholerae*](#)



Thin needle shape: usually characteristic of *Fusobacterium* spp.



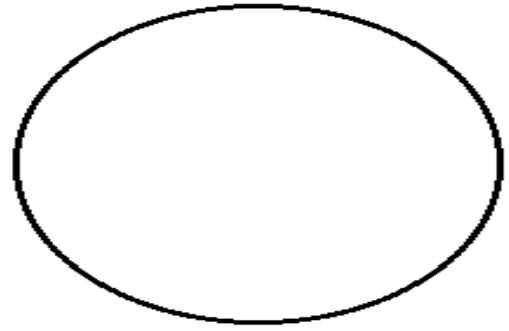
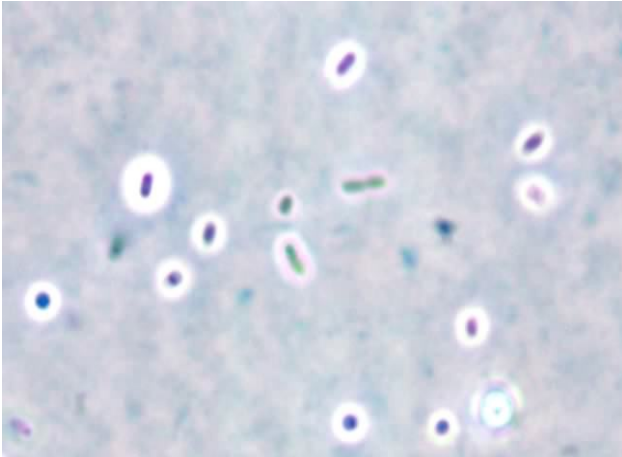
صبغ الغلاف Staining of Capsule

- الغلاف هو منطقة هلامية تحيط بالجدار الخلوي من الخارج , ويطلق عليه الغلاف أو الطبقة الخارجية Outer layer أو الطبقة الهلامية Slime layer
- يتخلف سمك الغلاف في البكتيريا المغلفة Encapsulated وقد لا يوجد الغلاف اصلا في البكتيريا الغير مغلفة Nonencapsulated
- تتتركب مادة الغلاف في معظم الحالات من عديدات السكر Polysaccharides
- يصعب صبغ الغلاف بالطرق العادية

طريقة العمل:

1. يحضر غشاء بكتيري لمزرعة حديثة العمر ويترك الغشاء ليحفظ في الهواء (لا تستخدم الحرارة)
2. يصبغ الغشاء بمحلول مائي لصبغة الكريستال البنفسجي لمدة 2 دقيقة
3. يغسل الغشاء بمحلول كبريتات النحاس 20% (لا يستخدم الماء)
4. تترك الشريحة لتجف في الهواء تماما
5. يفحص الغشاء تحت المجهر

6. يوصف مع الرسم الخلايا وما قد يحيط بها من منطقة الغلاف (سوف تظهر الخلايا بلون أزرق غامق بينما تظهر طبقة الغلاف كهالة زرقاء باهتة)



SAMPLE _____