الفحص المجهري للاحياء المجهرية

الفحص البكتيري:

أولا: الفحص المجهري للخلايا وهي حية دون تصبيغها:

1- طريقة القطرة الرطبة Wet mount

تستخدم هذه الطريقة في كثير من الفحوصات المبدئية خاصة في مجال الفحوص الميكروبية الطبية لمعرفة المسبب للإصابة بشكل مبدئي فمثلاً يمكن التعرف على البكتيريا أو مشاهدة الخيوط الفطرية أو وجود خلايا الدم كمؤشر لحدوث الإلتهاب.

طريقة العمل:

1- ضع نقطة من معلق بكتيري أو من مزرعة بكتيرية سائلة على سطح شريحة عادية أو يمكن استخدام نقطة من محلول ملحي ومزج كمية قليلة من الخلايا البكتيرية خاصة إذا أخذت العينة من وسط صلب كما يمكن خلط كمية من النمو مع كمية من المحلول الملحي في أنبوب لعمل معلق بكتيري ثم وضع قطرة منه على شريحة وفحصها كم ويمكن أخذ العينة مثل أحد سوائل الجسم وفحصها مباشرة من خلال استخدام هذه الطريقة كما سير معنا لاحقاً.

2- غط النقطة بغطاء شريحة رقيق Cover slipe.

3- افحص الشريحة بالعدسة الكبرى ثم بالعدسة الزيتية لملاحظة الحركة في البكتيريا أو مشاهدة الخيوط الفطرية .

ويمكن استخدام المجهر ذو الأطوار المتباينة لرؤية الحركة وكذلك لمشاهدة تجمعات الخلايا البكتيرية . و تعد هذه الطريقة من أسرع الطرق ومما يؤخذ على هذه الطريقة سرعة جفاف التحضي

2- طريقة القطرة المعلقة Slide of hanging drop

طريقة القطرة المعلقة اختبار قدرة البكتيريا على الحركة ومراقبة حركة البكتيريا

مميزاتها التالية:-

1- نادراً ما يحدث جفاف للشريحة

1- بقاء الخلايا في حالة نشطة لمدة أطول من الطريقة الرطبة.

طريقة العمل:

- تنظف الشريحة ذات التجويف تنظيفا جيداً Depression Slide مع غطائها بالماء الساخن والصابون إلزالة المواد الدهنية العالقة بها.
- توضع أربعة نقط من الماء أو الفازلين أو الهلام النفطي على كل زاوية من غطاء الشريحة بواسطة ناقل البيئة.
- توضع قطرة من البيئة البكترية في وسط غطاء الشريحة الزجاجية الرقيقة.

- توضع الشريحة على غطاء الشريحة الزجاجية الرقيقة ،بحيث يكون التجويف مقابال للقطرة في وسط التجويف، بحيث يكون الغطاء ملتصقا مع الشريحة.
- تقلب الشريحة بسرعة مع الحفاظ على وجود نقطة البيئة البكتيرية في منتصف التجويف.
- فحص النقطة المعلقة تحت المجهر، مستعمال العدسة الصغيرة القوة، ثم يخفض المكثف قليلا، ويقفل الحجاب جزئياً لتقليل الاضاءة للتمكن من رؤية العينة بوضوح.
- تعدل حافة الشريحة لوضع حافة النقطة في وسط مجال المجهري.
- تغير العدسة الصغيرة إلى كبيرة القوة، ثم إلى الزيتية، بعد وضع نقطة زيت السيدر، على غطاء الشريحة.
- تفحص حافة العينة، مع تحريك الضابط الدقيق ببطء، معتعديل اإلضاءة، بواسطة المكثف، حتى ترى البكتيريا بشكل واضح.
- لحظ حركة البكتيريا، عند حافة النقطة المعلقة.
- دون الملاحظات برسم شكل البكتيرية، وطريقة تجميع الخاليا البكتيرية ونوعية حركتها.

ثانيا: الفحص المجهري للخلايا وهي ميتة بعد تصبيغها:

البكتيريا الحية عديمة اللون تقريباً، وتباينها مع الوسط المائي المعلقة به لا يكفي لرؤيتها بوضوح، لذلك فإن صبغ البكتيريا يجعلها تتباين contrast في اللون عن الوسط الموجودة به، فتصبح مرئية visible ويسهل تمييزها. كما تستعمل أيضاً بعض الصبغات dyes لتمييز التركيبات الداخلية للخلايا internal structuresوالتي بدون صبغها تكون غير مرئية invisible وبالإضافة إلى ذلك، فإنه لكي تستخدم العدسة الزيتية oil immerging lens في الفحص للوصول إلى أكبر درجة تكبير ، فإنه من الأنسب استعمال تحضيرات مصبوغة stained preparations عن استعمال التحضيرات المبتلة wet preparations mounts رغم أن البكتيريا لا تبدو مختلفة بدرجة كبيرة عن الوسط المحيط بها، إلا أنها تختلف عنه كثيراً من الناحية الكيميائية، هذه الاختلافات الكيميائية بين البكتيريا والوسط، هي التي تمكننا من تمييز البكتيريا بواسطة الصبغ. فالصبغة تتحد غالباً مع الخلية البكتيرية وليس مع الوسط المحيط.

خطـــــــــــــــوات التحضـــــــــــــــير:

1- عمل الغـــشـــــــــــــــــــــــــــــــــــاء (المسحة) Smear:

قبل إجراء عملية الصبغ تثبت البكتريا المراد فحصها، بمعنى أن تلتصق البكتريا بسطح الشريحة التي ستصبغ عليها، وإذا لم يثبت التحضير أو الغشاء فسوف يزول من على الشريحة أثناء عملية الصبغ.

طريقة العمل:

- بواسطة الإبرة ذات العقدة، ضعي غمسه إبرة من كل مزرعة سائلة على سطح الشريحة.
- انشر على مساحة 1 سم بواسطة إبرة التلقيح أو الساق الزجاجية.

- اترك الشريحة لتجف في الهواء أو بمسك الشريحة أعلى اللهب بحيث لا يغلي الغشاء الموجود على الشريحة.

- بعد ذلك تثبيت الغشاء بتمرير الشريحة على اللهب ثلاث مرات مع ملاحظة وجود الغشاء على السطح العلوي.

أ- تثبيت بالحرارة:heat fix

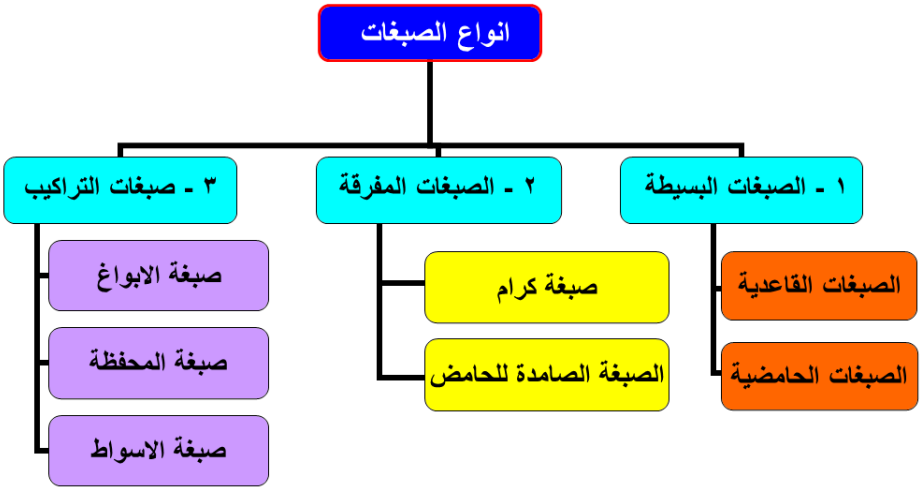
ويتم إما بتمرير الشريحة على لهب بنزن Bunsen burner عدة مرات _ ويراعى أن استعمال الحرارة أكثر من اللازم سيشوه شكل وتركيب الخلية المصبوغة ، لذا يجب أن تكون الشريحة دافئة وليست ساخنة _ أو بوضع الشريحة على مسخن الشرائح (slide warmer (hot plate عند 60°م لمدة عشر دقائق.

ب- تثبيت كيميائي:chemically fix

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

2- التصبيـــغ Staining:

إن أغلب دراسات الأحياء الدقيقة- لتحديد أشكالها العامة أو أجزائها المختلفة – تتم على عينات مصبوغة. ويقصد بعملية الصبغ هذه تلوين الكائنات الحية الدقيقة بصبغات خاصة لتحديد أجزائها المختلفة كالأسواط الابواغ الداخلية والمحفظة وغيرها وقبل الحديث عن أنواع الصبغات , نعطي تعريفا مبسطا للصبغة.هي مادة ملونة عضوية لها القدرة على الالتحام مع المواد الأخرى معطية لها اللون . والصبغات إما أن تكون طبيعية وهي التي تنتج طبيعياً، ويمكن استخلاصها من أنسجة النباتات، ومن أمثلتها صبغة الهيماتوكسيلين، وإما أن تكون صناعية وهي التي تستخدم حالياً بكثرة وتستخلص من قطران الفحم. وسنتطرق هنا إلى بعض أنواع الصبغات الأكثر استخداما في مجال الدراسات الميكروبية.



أولا: الصبغات البسيطة Simple stain :

أ- الصبغات القاعدية : Basic dyes

- تتركب الصبغة من أملاح حيث يحتوي المركب الملحي على أيونات سالبة وأيونات موجبة، **إن وجود اللون في الأيون الموجب من الصبغة يعني أن الصبغة قاعدية**
- مثال على ذلك صبغة المثيلين الأزرق Methylene blue التي تتكون من كلوريد المثيلين ألأزرق Methylene blue chloride والذي يتحلل كما يلي :

$$MB\ Cl \longrightarrow MB^{+} + Cl^{-}$$

- حيث أن اللون ألأزرق يكون موجود في أيون الشحنة الموجبة MB^{+} وبما أن خلايا الجراثيم تكون ذات شحنات سالبة لذلك تتحد شحناتها مع الشحنة الموجبة الزرقاء فتصطبغ الخلية الجرثومية باللون ألأزرق.

ب - الصبغات الحامضية : Acidic dyes

- تعتبر الصبغة حامضية **إذا كان اللون في الايون السالب** مثل صبغة النجروسين Nigrosin والحبر الهندي Indian ink اللتان تستخدمان لصبغ المحفظة الجرثومية.

طريقة التصبيغ: Staining method

١. **اغمر الشريحة الزجاجية بمحلول الكحول الاثيلي ٥٠ %** لإزالة الأوساخ والطبقة الشمعية الموجودة على الشريحة ثم امسحها بقطعة قماش نظيفة وجافة كما يمكن أن تمرر الشريحة فوق اللهب للتأكد من إزالة الطبقة الشمعية.

٢. **ضع بواسطة الحلقة الناقلة قطرة صغيرة من المزرعة الجرثومية السائلة على الشريحة الزجاجية** ، أما إذا أخذت الجراثيم من مستعمرة جرثومية نامية على وسط صلب ففي البداية توضع قطرة صغيرة من الماء على الشريحة وتمزج مع نقلة صغيرة جداً من المستعمرة الجرثومية.

٣. **أنشر النقلة على الشريحة لتكوين طبقة رقيقة** ، ويجب الانتباه إلى عدم جعل المسحة سميكة لأنها سوف تكون معتمة للضوء.

٤. **تجفف المسحة بالهواء** أو بوضع الشريحة الزجاجية على مجففة الشرائح Slide dryer .

٥. **تثبت المسحة** وذلك بتمرير الشريحة الزجاجية ثلاث مرات فوق اللهب وبسرعة معقولة مع الانتباه إلى وضع الطبقة الجرثومية إلى الأعلى. فإذا لم تثبت بصورة جيدة فأن الغشاء المتكون سوف يزال أثناء التصبيغ.

٦. **تضاف الصبغة المراد استعمالها مثل.**

المثيلين الزرقاء	Methylene blue
البنفسج البلوري	Crystal violet
الكاربول فوكسين	Carbol fuchsin
السفرانين	Safranin

٧. **تغسل الشريحة بالماء الهادئ** ، ثم تجفف ، وتفحص بالعدسة الزيتية .

☺ **ملاحظة :** إن الغاية من تثبيت الجراثيم هو لقتل الجراثيم، حيث تعمل الحرارة على تجلط بروتوبلازم الخلية الجرثومية ، والتصاق الخلية الجرثومية على الشريحة الزجاجية مما يؤدي إلى تثبيتها على الشريحة وعدم زوالها أثناء معاملتها بالصبغات أو غسلها بالماء.

ثانيا: الصبغات المفرقة (التفريقية) المركبة: (Compound) Differential stain

1- صبغة كرام(Gram Stain) :

يعرف هذا النوع من الصبغ أيضاً بالصبغ المركب Compound staining أو الأصباغ التميزية ويعتبر العالم Christian Gram عام 1884م أول من رصد تلك الظاهرة، لذلك فهي تعرف باسمه وهي تمييز بين مجموعات بكتيرية مختلفة .

تتكون صبغة كرام من أربعة محاليل مختلفة :

1- صبغة قاعدية " الكريستال البنفسجي" وتعتبر الصبغة الأساسية .

2- محلول "اليود" .

3- عامل مزيل للون "الكحول" .

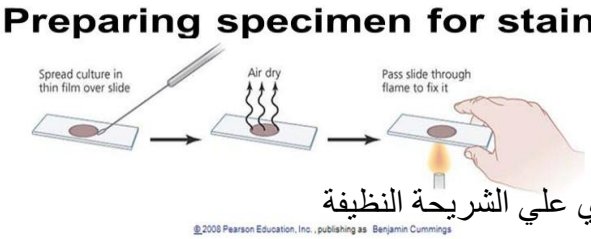
4- صبغة مضادة "السفرانين .

عند إتباع هذه الطريقة نجد أن بعض أن أنواع البكتيريا تصطبغ بالصبغة القاعدية في وجود اليود، بدرجة لا يمكن معها إزالة الصبغة من الخلايا عن طريق الغسيل بالكحول أو الأسيتون في حين أن البعض الآخر من خلايا البكتيريا يمكن إزالة الصبغة منها بسهولة باستعمال الكحول، والمجموعة الأولى من البكتيريا تعرف بالبكتيريا الموجبة لتفاعل كرام Gram positive Bacteria، أما المجموعة الثانية فهي تعرف بالبكتيريا السالبة لتفاعل كرام Gram negative Bacteria ، ولتسهيل رؤية خلايا المجموعة الثانية تستعمل صبغة أخرى ذات لون أحمر مثل السفرانين واتي تضاف بعد الغسيل بالكحول وتسمى الصبغة العكسية،حيث تصطبغ الخلايا بعدها باللون الأحمر.

الأدوات والمواد اللازمة :

1- نحضر مزارع حديثة العمر Young cultures، عمرها من 18-24ساعة ، (لأن المزارع القديمة تميل إلى فقد خاصية الصبغ الموجب) و نجهز منها معلق بكتيري مناسب.
2- صبغة الكرستال البنفسجي, كحول اثيلي, محلول يود و صبغة الصفرانين .
3- زيت سيدر (الارز).
4- شرائح زجاجية وابر خاصة بالبكتريا.

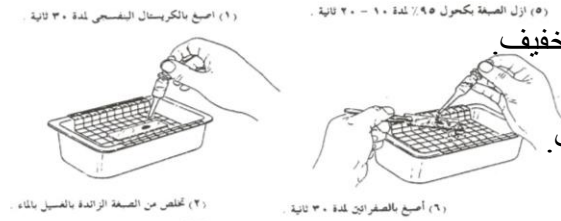
طريقة تحضير الشريحة:



- عمل الغشاء والتثبيت:

1- باستخدام إبرة العزل نأخذ نقطة من المعلق البكتيري علي الشريحة النظيفة
2- ونفردها علي الشريحة
3- ثم نثبتها باللهب.

- التصبيغ :



1- نصبغ الغشاء بمحلول بالكريستال البنفسجي لمدة دقيقة.
2- نتخلص من محلول الصبغة ، ثم نغسل الشريحة بالماء الجاري الخفيف.
3- نغمر الغشاء بمحلول اليود، ونتركه لمدة دقيقة .
4- نتخلص من محلول اليود ، ثم نغسل الغشاء بالماء الجاري الخفيف.
5- نترك الشريحة لتجف في الهواء .
6- نغسل الغشاء بمحلول الإيثانول (95%)، وذلك بإضافته للشريحة قطرة قطرة مع إمالة الشريحة ليتساقط منها الكحول بعد مروره على الغشاء ، وتستمر الإضافة حتى يصبح الكحول المتساقط يكاد يكون عديم اللون.
7- نغسل الغشاء بعد ذلك بالماء الجاري الخفيف.
8- نغمر الغشاء بمحلول السفرانين لمدة نصف دقيقة.
9- نتخلص من محلول الصبغة ، ثم اغسلي بالماء الجاري الخفيف.
10- نترك الشريحة في الهواء كي تجف تماما ، ويمكن الإسراع من عملية التجفيف بتعريض الشريحة إلى الهواء الساخن فوق لهب بنزن.
11- نضع نقطة بسيطة جداً من زيت السيدر على الغشاء الميكروبي.
12- نفحص الشريحة بإستعمال العدسة الزيتية.
13- ندون المشاهدة ونعلق علي التجربة.

2- الصبغة الصامدة للاحماض Acid fast staining

يتم تنفيذها بطريقتين

الأولى: Ziehl-Neelsen :

الثانية: Kinyoun THE COLD METHOD ACID FAST STAIN :

الصبغة الصامده للاحماض هى صبغة تستخدم للبكتريا التي تحتوى على محتوى عالى من اللبيدات وصبغ هذه الخلايا يحتاج الى تسخين مع أستعمال هذه الصبغة والتي يصبح من الصعب أزالتها بعد صبغتها حتى بكحول مضافا له حمض وتتضمن الطريقة الصبغ بكاربول الفوكسين الساخن ثم محاولة أزالة اللون بمحلول من الكحول الحامضي والقصد بمحاولة ازالة اللون هو التخفيف من الصبغة ثم الصبغ المضاد للخلايا ويزول اللون من البكتريا الصامده للاحماض ببطء شديد بالكحول الحامضي ولهذا تحتفظ بلون الصبغة الاساسية بعد الصبغة المضادة وتستعمل هذه الطريقة في تشخيص ودراسة بعض الامراض مثل السل.

Method:

1)Make a smear and fix it into fire

2)Flood slide with carbol fuchsin and heat it until steam rise for 3 to 5 min

3)Wash with water

4)Decolourize with acid alcohol for 20 sec

5)Wash with water

6)Put methylene blue for 2 min

7)wash with water

ومن ثم تظهر الخلايا بلون أحمر فاتح وخلفية زرقاء .

ثالثا: صبغة التراكيب Structure stain

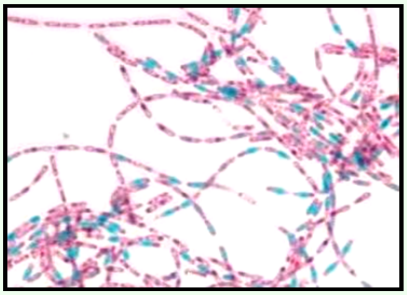
تستعمل هذه الصبغات لصبغ تراكيب الخلية الجرثومية وأهمها :

١. صبغة الابواغ Spore stain

إن بعض الجراثيم التابعة لجنس العصيات *Bacillus* والمطثيات *Clostridium* تنتج تراكيب مقاومة للحرارة تدعى ابواغ داخلية endospores بالإضافة إلى كون هذه التراكيب مقاومة للحرارة فإنها تقاوم بعض المواد الكيمياوية التي لها خاصية لتحطيم الابواغ. إن هذه التراكيب لا يمكن صبغها بواسطة صبغة كرام أو الصبغات الاعتيادية وتستخدم في صبغها الحرارة (التسخين) التي تعمل على سرعة اختراق الصبغة لجدار البوغ وتسهل عملية التصبيغ .

خطوات تصبيغ الابواغ:

- حضر مسحة من جراثيم العصيات أو المطثيات ثم ثبتها بواسطة الحرارة.
- ضع محلول ٥ % من صبغة الملاكايت الخضراء ثم قم بتسخين الشريحة إلى حد التبخير لمدة ٥ دقائق.



- **اغسل بالماء.**
- أضف الصبغة المغايرة السفرانين safranin لمدة ٢٠ ثانية.
- **اغسل بالماء.**
- جفف الشريحة وافحصها باستخدام العدسة الزيتية oil immersion lens.

٢. صبغة المحفظـة Capsule stain

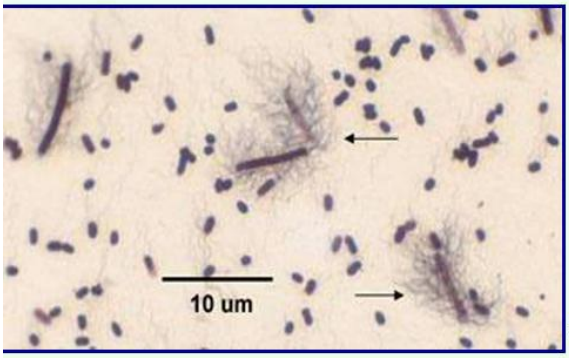
- تحاط بعض الجراثيم بطبقة من مواد جيلاتينية أو هلامية تدعى بالمحفظة capsule والتي تعتبر أحد الوسائل الدفاعية التي تستخدمها الجراثيم.
- إن المحفظة تتكون من البروتين السكري glycoprotein والبعض الأخر تتكون من متعدد البيبتيدات polypeptides وهذه المواد بطبيعتها هي مواد ذائبة في الماء water – soluble.
- لا يمكن تصبيغ الجراثيم الحاوية على المحفظة capsule بالطرق الاعتيادية والمشكلة تكمن في عملية تثبيت المسحة الجرثومية bacterial smear حيث أن الحرارة المستعملة في التثبيت تعمل على تحطيم المحفظة capsule ولذلك تستعمل صبغة تربط بين التصبيغ السالب والتصبيغ البسيط (استعمال صبغات سالبة وهي صبغة النكروسين Nigrosin وصبغة الحبر الهندي India ink).
- تعتبر صبغة النكروسين وصبغة الحبر الهندي من الصبغات الحامضية وذلك لاحتوائها على الأيون السالب الصابغ.
- عندما تصبغ الجراثيم ذات الشحنة السالبة بصبغة حامضية سالبة الشحنة أيضاً سوف لن تتحد الصبغة مع الشحنات السالبة الموجودة على الجراثيم.
- وبعكسه فأنها سوف تتكدس حول الخلية الجرثومية مما يؤدي إلى اصطباغ المحفظة فقط لعدم مقدرة الصبغة على اختراق الخلية الجرثومية.
- هذا النوع من التصبغ يسمى بالتصبيغ السالب negative staining كما هو الحال في صبغ جرثومة *Klebsiella*.

خطوات التصبيغ:

- امزج قطرة من المعلق الجرثومي مع قطرة من الصبغة Indian ink أو النكروسين Nigrosin على الشريحة الزجاجية.
- إسحب بواسطة شريحة زجاجية ثانية كما يحدث عند تحضير مسحة الدم blood smear.
- جفف الشريحة ثم افحص تحت العدسة الزيتية .

ملاحظـة : عند عمل المسحة يجب أن تكون رقيقة لان المسحات السميكة تحجب الضوء، أي عدم وضع كمية كبيرة من صبغة النكروسين أو الحبر الهندي .

٣. صبغة الاسواط Flagellar stain



الصبغة المستعملة تتكون مما يلي :

- كلوريد الصوديوم NaCl 1%
- حامض التانيك tannic acid 3%
- الفوكسين القاعدي basic fuchsin % 1.25 مذاب في كحول أثيلي ٩٥ %.

عند تحضير الشريحة وصبغها يجب مراعاة ما يلي :

- أن تكون المزرعة الجرثومية فتية.
- يجب تحضير المسحة بعناية ، ويفضل أن يكون المستحضر الذي يحتوي على الجراثيم غير مركز.
- عند وضع معلق الجراثيم على الشريحة يفضل عدم نشرها بالناقلة بل تركها تنسكب قليلاً ثم تجفف بالهواء ولا تستعمل الحرارة لكي لا تتقلص الاسواط أو تتحطم.
- إن جسم الجرثومة سوف لن يصبغ ولذلك يفضل استعمال صبغة مغايرة بسيطة مثل المثلين الزرقاء ، حيث ينصبغ جسم الجرثومة باللون الأزرق أما الاسواط فتصبغ باللون ألأحمر.

جدول يوضح خطوات التصبيغ الأساسية مع مكونتها التي ذكرت سابقا

Stain Type	Simple Stain	Negative Stain	Gram Stain	Acid-Fast Stain	Capsule Stain	Spore Stain
Primary Dye الصبغة الأولية	Methylene Blue, Crystal violet or Safranin	Nigrosin	Crystal Violet	Carbolfuschin	India Ink	Malachite Green
Mordant المثبت	None	None	Gram's Iodine	Heat	None	None
Decolorizer القصر (ازالة اللون)	None	None	Acetone Alcohol	Acid Alcohol	None	None
Counter stain الصبغة المغايرة	None	None	Safranin	Loeffler's Methylene Blue	Crystal Violet	Safranin