

الدرس العملى العاشر

الصبغ المركب

أو المزدوج (التفريقى)

١- الصبغ بطريقة جرام

## الصبغ المركب أو المزدوج (التفريقي)

يشتمل على عدة طرق للصبغ مثل :

- ١- الصبغ بطريقة جرام
- ٢- صبغ الجراثيم البكتيرية
- ٣- صبغ البكتيريا الصامدة (المقاومة) للأحماض
- ٤- صبغ الغلاف.

وفي أى طريقة من هذه الطرق فإنه يستخدم **نوعين** من الصبغات ، تسمى الصبغة الأولى بالصبغة **الأساسية** بينما تسمى الصبغة الثانية بالصبغة **المضادة** ، وإذا إكتسب الميكروب لون الصبغة الأساسية كلون نهائي فإنه يعتبر **موجب** لهذه الطريقة من الصبغ ، بينما إذا كان اللون النهائي له هو لون الصبغة المضادة فإنه يعتبر **سالِباً** لهذه الطريقة من الصبغ

## الصبغ بطريقة جرام (تعديل هوكر)

### أهمية هذه الطريقة من الصبغ :

- ١- من أهم الطرق المستعملة للفرقة بين أنواع البكتيريا إذ بواسطتها يمكن وضع البكتيريا فى إحدى المجموعتين الآتيتين :
  - أ- البكتيريا الموجبة لصبغة جرام (G+) Gram positive bacteria.
  - ب- البكتيريا السالبة لصبغة جرام (G-) Gram negative bacteria.
- ٢- لها أهمية كبيرة للحكم على مدى نقاوة المزرعة البكتيرية.

## البكتيريا المختلفة لصبغة جرام Gram variable bacteria

هناك أنواع كثيرة من البكتيريا تظهر أحياناً موجبة وأحياناً أخرى سالبة للصبغة ويطلق عليها البكتيريا المختلفة لصبغة جرام Gram variable bacteria ويرجع ذلك للأسباب الآتية

أ- صعوبة الطريقة في إجراء عملية إزالة اللون decolorization :

حيث أن عدم الدقة في إجراء العملية لبعض أنواع البكتيريا يوصلنا إلى نتائج خاطئة إذ تظهر بعض البكتيريا موجبة بتقصير مدة إزالة اللون وسالبة بإطالة هذه المدة.

ب- عدم الدقة في تجهيز الغشاء:

فإن لم يتمثل الغشاء فإنه يستحيل الحصول على نتائج حاسمة لصعوبة ضبط عملية إزالة اللون بمذيبات الصبغ.

ج- عمر المزرعة المستخدمة وعدم تناسب البيئة الغذائية لها:

حيث يجب أن تكون البكتيريا حديثة العمر نامية في بيئة غذائية مناسبة.

د- إنخفاض درجة الـ pH :

يضعف من قدرة البكتيريا على تقبل الصبغة.

هـ- معاملة الخلايا بإنزيم الريبونوكليز Ribonuclease:

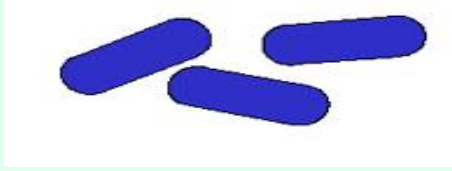
# فكرة الصبغ بطريقة جرام

البكتيريا السالبة لجرام

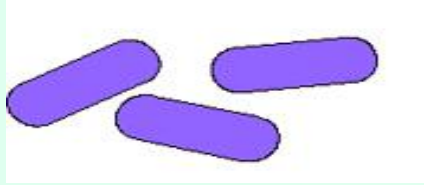
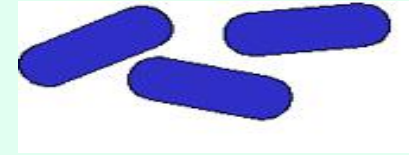
البكتيريا الموجبة لجرام



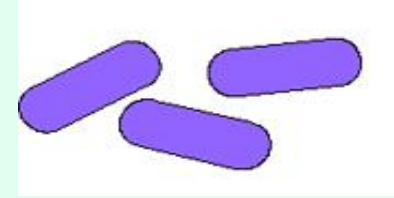
عمل غشاء وتثبيتته



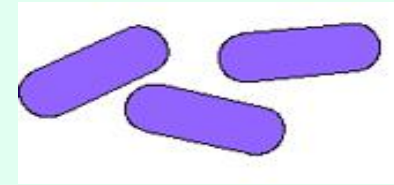
الصبغ بالجنسيان



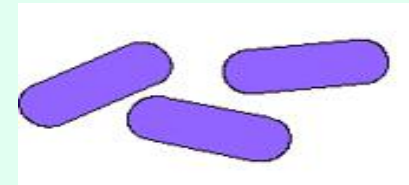
المعاملة باليود



إزالة اللون بالكحول



الصبغ بالفوكسين



# فكرة الصبغ بطريقة جرام

الفوكسين



تتلون البكتيريا  
العصوية باللون  
الأحمر

الكحول



تفقد البكتيريا العصوية  
لونها وتظل البكتيريا  
الكروية بنفسجية اللون

اليود



يظل لون البكتيريا  
الكروية والعصوية  
بنفسجي

الجنسيان



تتلون البكتيريا  
الكروية والعصوية  
باللون البنفسجي

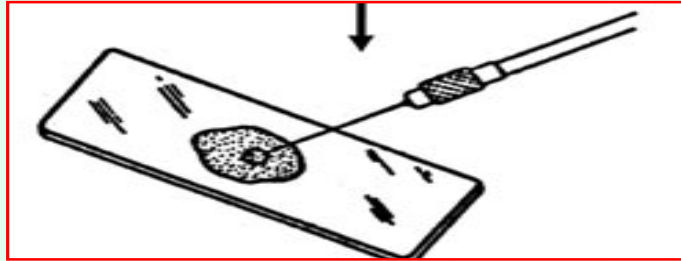
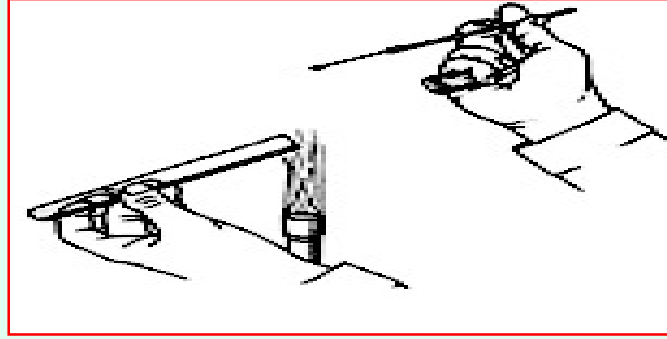
## السبب فى إختلاف البكتيريا الموجبة لجرام عن البكتيريا السالبة لجرام

هو أن الميكروبات الموجية لجرام تحتوى على مركبات خاصة فى الغشاء السيتوبلازمى تتفاعل مع الجنسيان واليود مجتمعين مكونة مركباً معقداً يصعب على المذيب إزالته ، بينما الميكروبات السالبة لجرام لا يتكون فيها مثل هذا المركب المعقد وبالتالي يسهل على المذيب إزالة صبغة الجنسيان ، وعليه تصبغ هذه الميكروبات بالصبغة المضادة (الفوكسين) ويصبح لونها أحمر.

ولقد أثبتت الأبحاث الحديثة أن المادة التى تتحد مع الجنسيان واليود لتكوين المركب المعقد هى ملح الماغنسيوم للحامض النووى RNA.

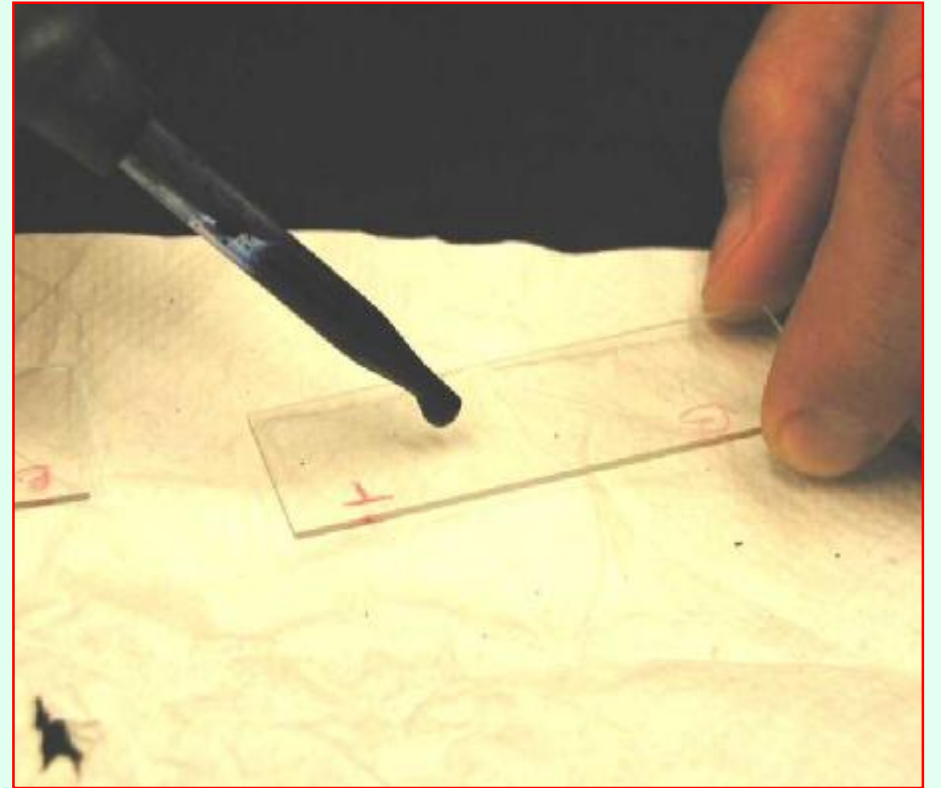
# خطوات الصبغ بطريقة جرام (تعديل هوكر)

١- حضر غشاء من المزارع الموجودة أمامك وثبته كالمعتاد





- ٢- ضع قليل من صبغة الكريستال البنفسجي (الجنسيان) على الغشاء.
- ٣- إتركها على الحامل المخصص لذلك لمدة ١ دقيقة.



- ٤- تخلص من الصبغة الزائدة بصبها في حوض الصبغ.
- ٥- اغسل الشريحة بتيار هادئ من الماء.
- ٦- اغمر الغشاء بمحلول اليود لمدة دقيقة واحدة ثم اغسل بالماء.



٧- ضع قليلاً من الكحول على الغشاء نقطة بنقطة مع إمالة الشريحة إلى الأمام وإلى الخلف وكرر هذه العملية حتى يصبح لون الكحول المزال رائقاً (بنفسجي خفيف جداً) ثم اغسل بالماء.

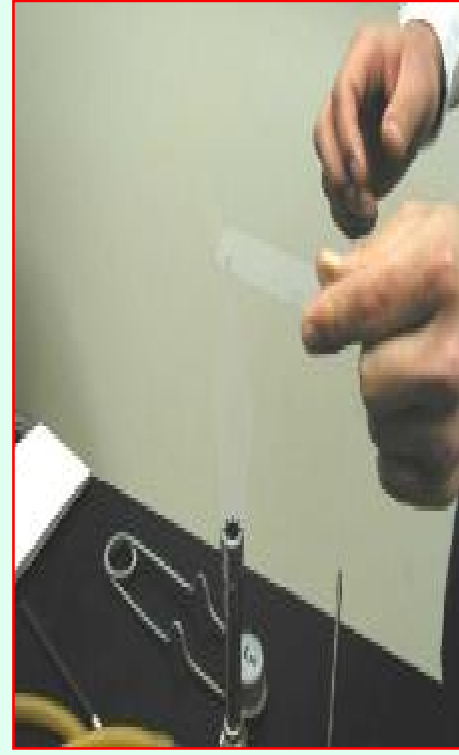
٨- اغمر الغشاء بالفوكسين المخفف أو السفرائين المخفف لمدة نصف دقيقة ثم أزل الصبغة واغسل بالماء.



٩- جفف الشريحة كالمعتاد بين ورقتي نشاف ثم على اللهب.

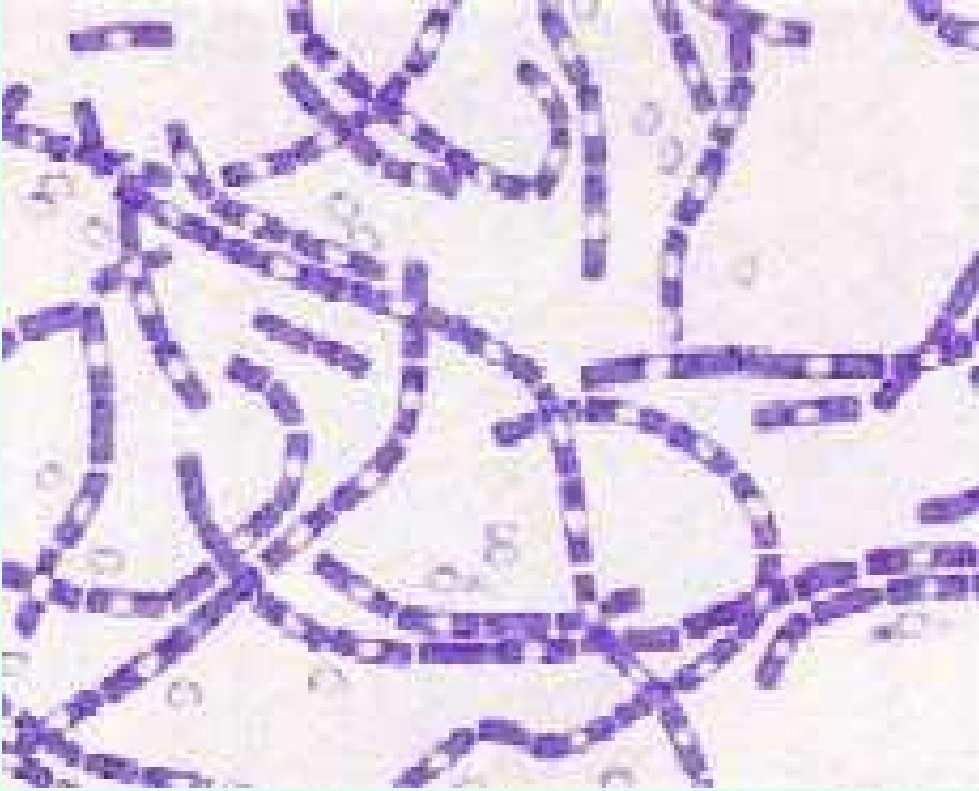
١١- ضع نقطة من زيت السيدر على الغشاء.

١٠- إحص باستخدام العدسة الزيتية ، وصف وإرسم ما تشاهده ودون نتيجة الصبغ.



## الإسم العلمى : Bacillus subtilis

- شكل الميكروب : عصوي طويل
- نظام التجمع : مفرد أو فى سلاسل من خليتين أو ثلاث
- نوع الصبغ : مركب (طريقة جرام)
- اسم الصبغة الأساسية : الجنسيان البنفسجى (الكريستال)
- اسم الصبغة المضادة : الفوكسين
- لون خلايا الميكروب : بنفسجى
- النتيجة : موجبة



## الإسم العلمي : Pseudomonas fluorescens

- شكل الميكروب : عصوي قصير
- نظام التجمع : مفرد
- نوع الصبغ : مركب (طريقة جرام)
- اسم الصبغة الأساسية : الجنسيان البنفسجي (الكريستال)
- اسم الصبغة المضادة : الفوكسين
- لون خلايا الميكروب : أحمر
- النتيجة : سالبة



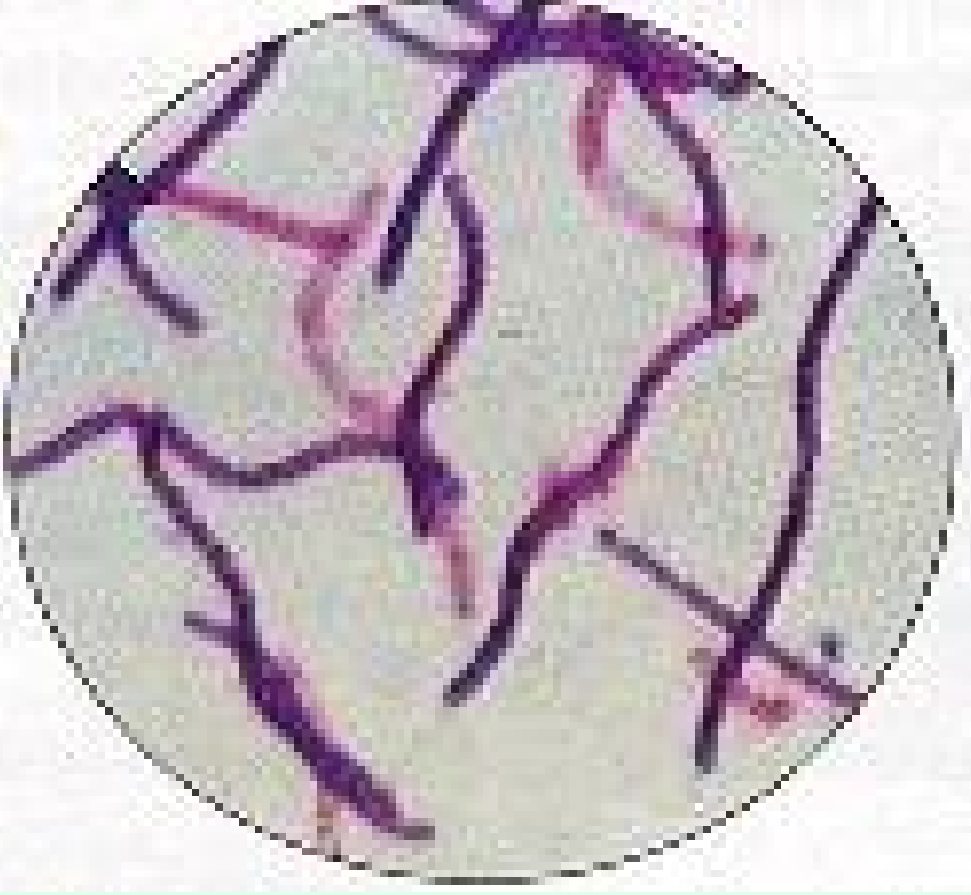
## الإسم العلمى : Micrococcus luteus

- شكل الميكروب : كروى
- نظام التجمع : مفرد أو فى تجمعات غير منتظمة
- نوع الصبغ : مركب (طريقة جرام)
- اسم الصبغة الأساسية : الجنسيان البنفسجى (الكريستال)
- اسم الصبغة المضادة : الفوكسين
- لون خلايا الميكروب : بنفسجى
- النتيجة : موجبة



## الإسم العلمي : Streptomyces albus

- شكل الميكروب : خيطى متفرع
- نظام التجمع : مفرد
- نوع الصبغ : مركب (طريقة جرام)
- اسم الصبغة الأساسية : الجنسيان البنفسجى (الكريستال)
- اسم الصبغة المضادة : الفوكسين
- لون خلايا الميكروب : بنفسجى
- النتيجة : موجبة





يمكنك زيارة المواقع التالية على الشبكة الدولية للإتصالات

[http://www.rlc.dcccd.edu/mathsci/reynolds/micro/ab\\_manual/TOC.html](http://www.rlc.dcccd.edu/mathsci/reynolds/micro/ab_manual/TOC.html)

<http://www.spjc.cc.fl.us/hec/vettech/vtde/ATE2639LGS/gramstain.htm>

<http://www.sirinet.net/~jgjohnso/monerans.html>