فحص الأحياء الدقيقة بالمجهر
The Microscopic Examination of Microorganisms

تعريف المجهر

يعد المجهر (الميكروسكوب) The Microscope، من أهم الأدوات اللازمة لعمل الأحياء الدقيقة. وتعني كلمة ميكروسكوب: آلة لتكبير الأشياء الصغيرة أو الدقيقة. ويمكّننا هذا التكبير magnification من أن نرى الأحياء الدقيقة التي لا ترى بالعين المجردة كما يوضح شكلها وتركيبها. وتتراوح قدرة التكبير التي يمكن الحصول عليها من المجاهر ما بين مائة مرة (× ١٠٠) إلى أربعمائة ألف مرة أو يزيد (× ٤٠٠٠٠٠) وذلك على حسب نوع المجهر وعدساته وقدرتها على التكبير. علاوة على ذلك فإن أنواعاً عديدة من المجاهر متاحة الآن، كما أن تقنيات عديدة قد تطورت بحيث يمكن بواسطتها إعداد عينات الأحياء الدقيقة للفحص. وكل نوع من المجاهر وكل طريقة في إعداد العينات للفحص إنما تقدم مميزات لتوضيح ملامح مورفولوجية (شكلية) خاصة.

المجاهر والفحص المجهري
Microscopes and Microscopy

تقع المجاهر عموما في نوعين: الضوئي (Light = Optical) والإلكتروني Electron إعتماداً على القاعدة التي ينبني عليها التكبير.

أ) **المجاهر الضوئية Light microscopes**: ويعتمد التكبير في المجاهر الضوئية على نظام من العدسات الضوئية optical lenses وذلك باستخدام أمواج الضوء. وتضم المجاهر الضوئية الأنواع التالية:

١- مجهر المجال المبهر Bright Field.

٢- مجهر المجال المظلم Dark Field.

٣- المجهر الفلوريسيني Fluorescent.

٤- مجهر تباين الطور Phase-Contrast.

ب) **المجاهر الإلكترونية Electron Microscopes (E.M)**: ومن اسمها يتضح بأنها تستخدم حزماً beams من الإلكترونات بدلاً من الموجات الضوئية لكي تعطي الصورة. ويمكن فحص الأحياء الدقيقة بأي من المجهرين الإلكترونيين النافذ Transmission أو الماسح Scanning.

وحدات القياس المجهري Microscopy Measuring Units

يستخدم في قياس الأطوال والأبعاد والأحجام للأشكال التي تفحص تحت مجهر النظام المتري metric system، ووحداته هي المتر، الديسيمتر، السنتيمتر والميلليمتر. وكل وحدة تنتسب إلى الأخرى بالمعامل ١٠، فمثلاً المتر = ١٠ ديسيمتر = ١٠٠ سم = ١٠٠٠ ملم.

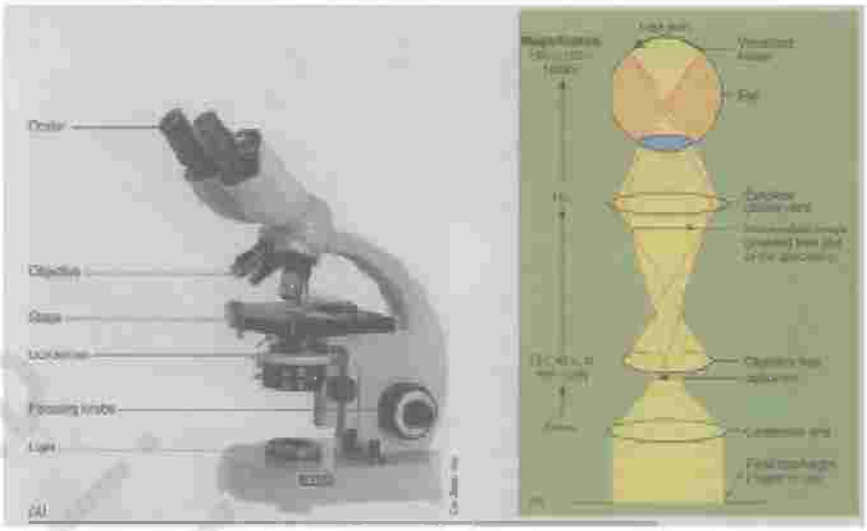
وحيث إن الأحياء الدقيقة متناهية الصغر فإن الوحدات التي تستخدم في قياسها هي الميكرومتر (µm) micrometer والنانومتر nanometer (nm)، والأنجستروم angestrom (Å) . فالميكرومتر الذي كان يعرف سابقاً باسم ميكرون micron = $١٠^{-٣}$ من المتر، والنانومتر الذي كان يعرف سابقاً باسم الميلليميكرون = $١٠^{-٦}$ من المتر. وكذلك الأنجستروم Å = $١٠^{-١٠}$ من المتر.

وللطلاب الذين يدرسون مقرر الأحياء الدقيقة لأول مرة، فإنهم يعتمدون في فحصها أساساً على مجهر المجال المبهر. وهذا المجهر واسع الاستعمال في معامل الأحياء بصفة عامة، أما الأنواع الأخرى من المجاهر فإن لاستخدامها أغراضاً خاصة أو في الفحوص الخاصة بالأبحاث. ومع ذلك فإنه ينبغي على الطلاب الإلمام باستخدامها حيث إن لبعضها صفات فريدة بحيث يمكن الاستفادة منها في توضيح تركيب معين بالخلية. وفيما يلي بيان موجز عن أنواع المجاهر واستخداماتها:

أنواع المجاهر الضوئية

١– مجهر المجال المبهر (المجهر الضوئي) Bright-field microscope (light microscope)

في المجهر الضوئي ذي المجال المبهر من الضوء، فإن مجال المجهر (المساحة المفحوصة) تكون مضاءة بشدة brightly والتي فيها يظهر الكائن الدقيق (أو الشيء المفحوص) مظلماً؛ لأنه يمتص بعض الضوء. وعادة لا تمتص الأحياء الدقيقة كثيراً من الضوء. لكن صبغها ببعض الصبغات يزيد من قدرتها على إمتصاص الضوء بشدة. مما ينتج عنه تبايناً contrast أكبر وتمايزاً differentiation في اللون. ويوضح الشكل رقم (١٤) المجهر الضوئي والأجزاء الضوئية للمجهر الضوئي المركب compound light microscope ومسار الأشعة الضوئية لتعطي التكبير للشيء object المفحوص. وعادة فإن هذا النوع من المجاهر يعطي تكبيراً قدره ١٠٠٠× أو ٢٠٠٠×، أما التكبير الأعلى من ذلك فإنه يجعل الصورة غير واضحة fuzzy لأسباب ستتضح فيما يلي.



الشكل رقم (١٤). (a) المجهر الضوئي المركب (b) مسار الضوء خلال المجهر الضوئي المركب (عن: Madigan, *et al.*, 1997).

إذ إن قصور المجهر الضوئي ليس في التكبير magnification وإنما في قوة التوضيح resolving power، أي القدرة على التمييز بين نقطتين متجاورتين على أنهما واضحتان ومفصولتان، وزيادة الحجم (مزيد من التكبير) بدون القدرة على تمييز التفاصيل التركيبية (مزيد من التوضيح) ليس مفيداً.

ولذلك فإن أقصى قوة تكبير يمكن الحصول عليها بالمجهر قد لا تكون مفيدة لأن الصورة الناتجة قد تكون غير واضحة أو متداخلة.

وحدود التوضيح، limit of resolution إنما هي عبارة عن أصغر مسافة يمكن أن ينفصل بها شيئان والتي عندها لا يزال يمكن التمييز بين شيئين منفصلين.

أما التكبير magnification لأعلى من قوة التوضيح فإنه يكون عديم القيمة حيث إن الصورة الأكبر سوف تكون أقل توضيحاً في التفاصيل ويصبح مظهرها قاتماً. ويمكن مقارنة ذلك بما يحدث في شاشة السينما أو التليفزيون فإذا تحركنا أقرب وأقرب إلى الشاشة فإن الصورة تصبح أكبر لكنها ليست حادة وواضحة المعالم كما نشاهدها من مسافة.

وتُجهَّز معظم المجاهر الضوئية المركبة بالمعامل بثلاث عدسات شيئية كل منها لها درجة مختلفة من التكبير. ويطلق على هذه العدسات الشيئية objective lenses : العدسة الزيتية oil immersion، والعدسة عالية الجفاف high dry، والعدسة الشيئية الصغرى low-power، وتُدوَّن قوة التكبير على كل عدسة. أما قوة التكبير الكلية لنظام العدسات فإنها تقدر بحاصل ضرب قوة تكبير العدسة العينية eye lens في قوة تكبير العدسة الشيئية. وعادة تحتوي القطعة العينية على عدسة قوة تكبيرها ١٠ ×، على الرغم من أنه يمكن استبدالها بقطع عينية ذات قوة أكبر أو أصغر من ذلك. وطول موجة الضوء المرئي تتراوح ما بين ٤٠٠ نانومتر إلى ٨٠٠ نانومتر ومن ثم فإن أصغر الأشياء التي يمكن أن ترى بالمجهر الضوئي يجب أن تكون على الأقل ٢٠٠ نانومتر (٠.٢ ميكرومتر). ولأن أغلب البكتيريا يكون

قطرها ما بين ٠,٣ – ١ ميكرون لذلك فإن المجهر الضوئي لا يقدر على توضيح التراكيب الداخلية للبكتيريا، من هنا فإنها تستخدم أساساً في رؤية أشكال الخلايا وتفاعلاتها مع الطبقات المختلفة. ويوضح الجدول رقم (٦) مقارنة بين أنواع المجاهر المختلفة وقدرتها على التكبير وتوضيح أشكال تراكيب الأحياء الدقيقة المختلفة.

الجدول رقم (٦) مقارنة بين أنواع المجاهر المختلفة.

نوع المجهر	أعلى قوة تكبير مفيدة	مظهر العينة	التطبيقات المفيدة
١- المجال المبهر Bright Field	١٠٠٠ — ٢٠٠٠	العينات مصبوغة أو غير مصبوغة أو عادة تصبغ البكتيريا وتظهر بلون الصبغة	لفحص الشكل الظاهري المكبر للبكتيريا والخمائر والأعفان والطحالب والأوليات
٢- المجال المظلم Dark Field	١٠٠٠ — ٢٠٠٠	عادة غير مصبوغة تظهر مبهرة أو مضاءة في مجال مظلم	الأحياء الدقيقة تُظْهر بعض الملامح المورفولوجية المميزة في الحالة الحية وفي المعلق السائل مثل البكتيريا الحلزونية "سبيروكيت"
٣- الوميض Fluorescence	١٠٠٠ — ٢٠٠٠	لامعة وملونة، اللون هو الخاص بالصبغة الفلوريسينية (الوميضة)	تقنيات التشخيص والتي تكون فيها الصبغة الوميضة المثبتة للكائن موضّحة لطبيعة وتكوين الكائن
٤- تباين الأطوار PhaseContrast	١٠٠٠ — ٢٠٠٠	درجات مختلفة من الإظلام	لفحص التراكيب الخلوية في الخلايا الحية للأحياء الدقيقة الكبيرة مثل: الخمائر والطحالب والأوليات، وبعض البكتيريا
٥- الإلكترون Electron	٢٠٠,٠٠٠–١٠٠,٠٠٠ إلى ٧٥٠٠٠٠	ترى على شاشة وميض	فحص الفيروسات والتراكيب العالية ultrastructures للخلايا الميكروبية

٢– مجهر المجال المظلم Dark field microscope

يعد مجهر المجال المظلم مفيداً للكشف عن البكتيريا غير المصبوغة خاصة الموجودة في السوائل كما أنه يعد ثميناً خاصة في فحص البكتيريا الحلزونية (إسبيروكيت spirochetes) مثل الكائن المسبب لمرض الزهري syphilis وهو تريبونيما بالليدام *Trepomema pallidum*، فباستخدام مجهر المجال المظلم يمكن للفاحص أن يرى خلفية سوداء فيها تبدو البكتيريا المعلقة لامعة bright . ويستخدم مكثفاً في نوع خاصفي مجهر المجال المظلم condenser والذي يضيء العينة بمخروط من الضوء بطريقة يكون فيها الضوء غير موجه مباشرة على العدسة الشيئية. وإذ إن الضوء الذي يدخل إلى العدسة يكون فقط ذلك المنعكس من العينة فإن هذا يوضح شكل العينة. كما يعد هذا النوع من المجاهر مفيداً في فحص الكائنات الدقيقة غير المصبوغة خاصة تلك المعلقة في السوائل أو المحمّلة رطبة wet mount أو في تحضيرات النقطة المعلقة hanging drop المعدّة لفحص حركة البكتيريا ويبين الشكل رقم (١٥) كيفية عمل مجهر المجال المظلم وفحص العينات.

الشكل رقم (١٥). كيفية عمل مجهر المجال المظلم وفحص العينات. بسبب حلقة المجال المظلم في المكثف فإن الضوء الوحيد الذي يصل إلى عين المشاهد هو الضوء المبعث بواسطة العينة. وتوضح الصورة الضوئية في الدائرة السوداء العليا تريونيما بالليدام. وهي البكتيرة التي تسبب الزهري. (عن: Mckane. *et al.*, 1996).

٣– مجهر الوميض (الفلوريسيني) fluorescence microscope

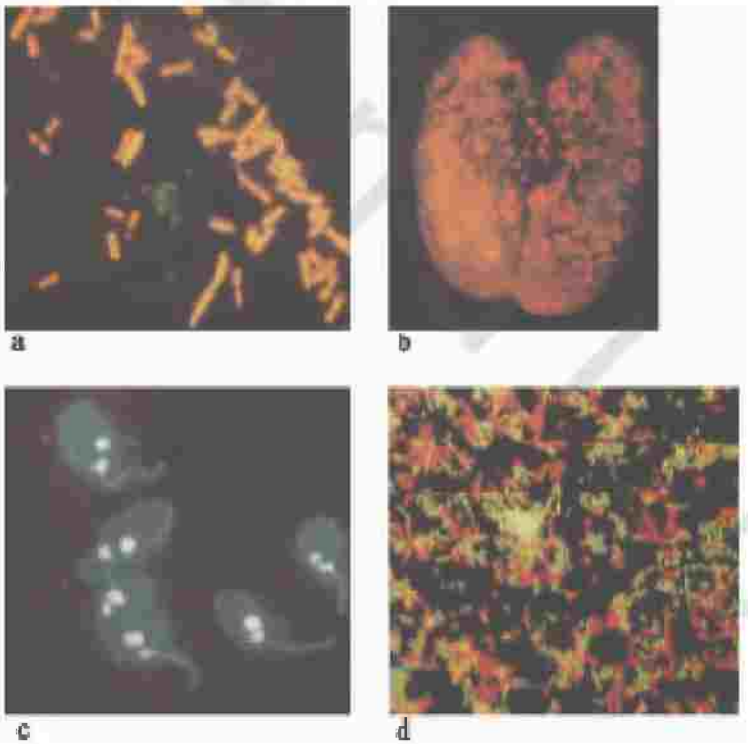
إن العديد من المواد الكيميائية تمتص الضوء وبعد امتصاص الضوء ذو الطاقة والأطوال الموجية المعينة فإن بعض هذه المواد يمكنها أن تبعث emit الضوء ذو الموجات الطويلة ذات المحتوى الأقل من الطاقة. وتعرف هذه المواد بالمواد الوميضة (الفلوريسينية) fluorescent ، ويطلق على هذه الظاهرة الوميض fluorescence. وتطبيق هذه الظاهرة هو الأساس في مجهر الوميض. وعملياً ، فإن الأحياء الدقيقة تصبغ بصبغة ذات وميض (فلوريسينية) ثم بعد ذلك تضاء بالضوء وبعد امتصاص الضوء الأزرق فإن ضوءاً أخضر ينبعث من الصبغة فيتضح الشكل الذي تحيطه الصبغة الوميضة.

ومن الملامح الخاصة في مجهر الوميض أن مصدر الضوء الأبيض ينبعث من مصباح قوسي من الزئبق يمر على مرشّح filter حيث يمنع مرور كل الأمواج الضوئية عدا اللون الأزرق الذي يمر بمرآة تعكس هذه الأشعة الفلوريسينية على الشيء المفحوص المصبوغ بالصبغة الفلوريسينية. أما المرشح العائق barrier filter فإنه يصد خروج الضوء الأزرق ويسمح فقط للضوء الأخضر (أو أي ضوءٍ آخر منبعثٍ من العينة) بالمرور من خلاله ليصل إلى العين الفاحصة. ويتم اختيار مرشحات العوائق على أساس نوع الصبغة ذات الوميض.

ومن التطبيقات العملية، مثلاً أن بكتيريا الدرن العصوية *Mycobacterium tuberculoss* tubercle bacillus سوف تمتص انتخابياً صبغة أورامين auramine الوميضة وبذلك تظهر لامعة على خلفية سوداء. ويستخدم مصباح أشعة فوق بنفسجية كمصدرٍ للضوء في هذا المجهر.

تقنية الأجسام المضادة الوميضة The fluorescent technieque

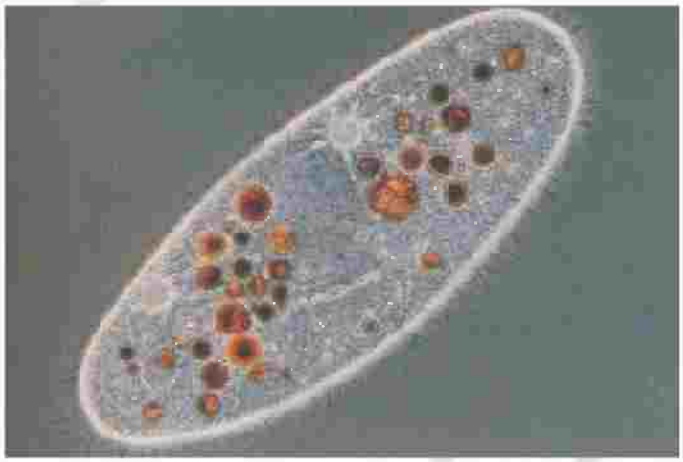
الوميض المناعي Immuneofluorescence: إنه من الممكن أن نربط combine الصبغات الفلوريسينية (الوميضة) بالأجسام المضادة antibodies بتلك الأجسام التي ترتبط نوعياً بالأحياء الدقيقة المسؤولة عن تكوينها في الإنسان أو الحيوان. ويطلق على الأجسام المضادة المربوطة مع الصبغة الوميضة بالأجسام المضادة المعلّمة labeled antibodies. ولذلك يمكن أن تحضر الأجسام المضادة المعلّمة مع معلق من البكتيريا أو غيرها ويفحص هذا التحضير تحت مجهر الوميض وسوف تكون الخلايا البكتيرية التي ارتبطت مع الأجسام المضادة المعلّمة مرئية visible في التحضير المجهري. وتسمى هذه الطريقة تقنية الأجسام المضادة الوميضة، وأما الظاهرة نفسها فتسمى الوميض المناعي. ونظرياً فإنه يمكن التعرف على خلية ميكروبية واحدة بهذه الطريقة وتستخدم هذه التقنية على نطاق واسع في التعرف على الأحياء الدقيقة المسببة للأمراض وللأغراض العلمية الأخرى (انظر الشكل رقم ١٦) عن بريسكوت وزملائه، ١٩٩٩م.



الشكل رقم (١٦). أمثلة من فحص الأحياء الدقيقة بالمجهر الوميض (الفلوريسيني): أ) إيشيريشيا كولاي مصبوغة بالأجسام المضادة الوميضة. ب) باراميسيام تيتراوريليا *Paramcium tetraurelia* مصبوغاً بأكريدين البرتقالي. ج) كريثيديا لوسيلي *Crithidia lucilae*، من الأوليات مصبوغاً بالأجسام المضادة الوميضة. د) خليط من ميكروكوكاس لوتياس *Micrococcus luteus* وباسيللاس سيريس *Bacillus cereus*، (العصوي). الخلايا البكتيرية الحية توميض باللون الأخضر والميتة باللون الأحمر.

٤- مجهر تباين الطور Phase-contrast microscope

يعد مجهر تباين الطور غاية في الأهمية لدراسة الخلايا الحية غير المصبوغة، ويستخدم على نطاق واسع في الدراسات التطبيقية والنظرية في علم الأحياء. ويستخدم لذلك المجهر الضوئي العادي المعد fitted بعدسة شيئية متباينة الطور ومكثف لتباين الطور. وهذا النظام الضوئي الخاص يجعل من الممكن تمييز التراكيب غير المصبوغة داخل الخلايا والتي تختلف فقط في معدلات كسرها للضوء أو سمكها. وفي الحقيقة فإن هذه التقنية مبنية على أساس أن الضوء المار من خلال مادة واحدة إلى مادة أخرى ذات معدل انكسار مختلف قليلاً، أو في السمك، فإنها سوف تتغير في الطور phase، وهذا الاختلاف في الطور أو عدم الانتظام في حواف الموجات، يمكن أن يترجم إلى إختلافات في الوضوح brightness لهذه التراكيب ومن ثم يمكن أن تكتشف بالعين (انظر الشكل رقم ١٧).



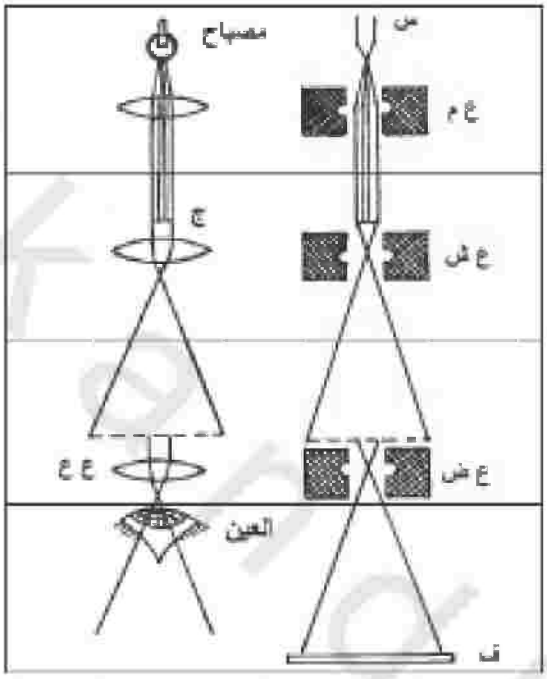
الشكل رقم (١٧). الفحص بمجهر تباين الطور. وفحص هذا الكائن من الأوليات وهو حي باستخدام مجهر تباين الطور يوضح العضيات والحركة بما فيها ضرب الأسواط (عن: Mckane. *et al*., 1996).

أنواع المجاهر الإلكترونية

١- المجهر الإلكتروني النافذ Transmission Electron Microscope (T.E.M.)

يختلف المجهر الإلكتروني بشدة في نواح كثيرة عن المجاهر الضوئية. إذ يعطي المجهر الإلكتروني تكبيرات ضخمة مفيدة، ويرجع ذلك إلى قدرة التوضيح العالية التي يمكن الحصول عليها من خلال أطوال موجية قصيرة جداً منبعثة من حزمة الإلكترونات electron beam والتي تستخدم في تكبير العينة. ويستخدم المجهر الإلكتروني حزماً من الإلكترونات ومجالات مغناطيسية لإنتاج الصورة، في حين يستخدم المجهر الضوئي الموجات الضوئية والعدسات الزجاجية (انظر للمقارنة الشكل رقم ١٨)، وعندما يستخدم المجهر الإلكتروني إلكترونات قدرها ٦٠-٨٠ كيلو فولت (KV) فإن

طولها الموجي يكون ٠,٥٠ أ° (حيث ٨ = أ = أنجستروم = ١ × ١٠^-٨ سم أو ١ × ١٠^-٤ ميكرومتر)، وبهذا فإنه يمكن توضيح أي شيء مهما كان صغيراً ولو تدنى قطره إلى ١٠ أ°. ومن ثم فإن قوة توضيح المجهر الإلكتروني تكون ١٠٠ مرة أكبر من المجهر الضوئي كما أنه يعطي قوة تكبيرة مفيدة للغاية وقد تصل إلى ٤٠٠٠٠٠ × أو ٧٥٠٠٠٠ × في المجاهر الحديثة.



الشكل رقم (١٨). المجهر الضوئي ذو الموجات الضوئية والعدسات الزجاجية.

ولفحص عينة بالمجهر الإلكتروني فإنه يلزم تحضيرها كغشاء جاف غاية في الرقة ultrathin يوضع على شبكة غربالية screen من النحاس copper grid وتوضع في الجهاز عند نقطة بين المكثف المغناطيسي magnetic condenser والعدسة الشيئية المغناطيسية magnetic objective وهذه النقطة تناظر منضدة stage المجهر الضوئي (الشكل رقم ١٩).

الشكل رقم (١٩). صورة ضوئية للمجهر الإلكتروني الحديث والذي يجمع وظائف كلاً من المجهر الإلكتروني النفّاذ والمسّاح (عن: Madigan, et al., 1997).

ويمكن مشاهدة الصورة المكبرة على شاشة وميضة (فسفورية) fluorescent screen من خلال نافذة غير منفذة للهواء أو أنها تسجل على شريحة فوتوغرافية بواسطة كاميرا مبنية داخل الجهاز، وتوجد عدة تقنيات متاحة لاستخدام المجهر الإلكتروني والتي تعمم فائدتها في توصيف التركيب الخلوي. وفيما يلي وصفاً لبعض هذه التقنيات:

أ) **قالب الظل Casting-shadow**: وتشمل هذه التقنية ترسيب طبقة رقيقة جداً من معدن ثقيل (مثل البلاتين) بزاوية مائلة على الكائن، ومن ثم فإن هذه الكائنات تعطي ظلاً يشكلها على الجانب المقابل غير المغطى. وتعطي العينة المفحوصة بتقنية قالب الظل تمثيلاً للمرتفعات topological representation الموجودة على سطح العينة.

ب) **الصبغ السالب Negative staining**: تستخدم مادة كثيفة الإلكترون electron-dense مثل حامض الفوسفوتانجستيك phosphotungstic acid أو خلات اليورانيوم uranyl acetate كصبغة stain لتحدد الإطار الخارجي outline للعينة فالفوسفوتنجستات المعتمة opaque للإلكترونات (أي غير منفذة لها) لا تتخلل التراكيب ولكنها تكوّن ترسيبات deposits سميكة في شقوق crevices العينة، ويمكن مشاهدة التفاصيل الدقيقة للأشياء كالفيروسات وأسواط البكتيريا بإستخدام هذه الطريقة.

ج) **القطع فائق الرقة Ultra thin sectioning**: إنه يتطلب من أجل ملاحظة التراكيب الخلوية الداخلية أن تكون العينة عالية في الرقة. فالخلية الميكروبية السليمة تكون سميكة جداً بحيث لا يسمح هذا بالفحص المميّز لتراكيبها الدقيقة وذلك عند فحصها بالمجهر الإلكتروني. ومع ذلك، فتوجد عدة طرق وتقنيات متاحة للقطع sectioning في الخلايا البكتيرية وغيرها من الأحياء الدقيقة. فمثلاً، تطمر embedded في مادة بلاستكية أو راتنجية resin يشكل منها قالباً block يمكن عمل قطاعات فائقة الرقة فيه بحيث يصل حجمها إلى ٦٠ نانومتر. وبعد ذلك تجهز هذه القطاعات للفحص

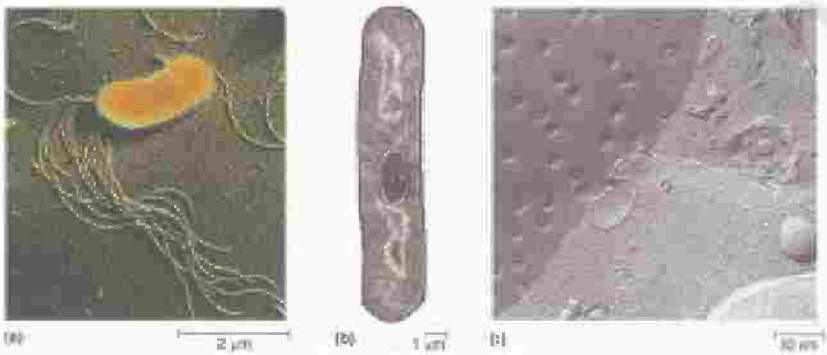
obeikandi.com

بالمجهر الإلكتروني. وكما هو متوقع فإن هذه القطاعات سوف تبين الخلايا المقطوعة على مستويات مختلفة وعلى زوايا مختلفة. ويمكن تحسين تباين contrast التراكيب من خلال استخدام صبغات للمجهر الإلكتروني مثل أملاح اليورانيوم وخلات اليورانيوم uranyl acetate أو اللانثانام lanthanum، أو سترات الرصاص lead citrate وغيرها.

د) **كشط (خدش) التجمد Freeze – etching**: أعدت طريقة كشط التجمد لتحضير قطاعات في العينة بدون الحاجة لمعاملتها بالكيماويات المستخدمة في عمليات التثبيت لأنها تؤدي إلى تكوين مغالطات artifacts. وبهذه الطريقة تقطع العينة إلى قطاعات رقيقة بينما تكون في قوالب مجمدة. ويعمل تكرارات replicates من أغشية الكربون الرقيقة المرسبة على سطوح في هذه القوالب المجمدة ثم كشطها أو سلخها حيث إنها تحمل معها طبقات رقيقة من سطوح هذه العينة، ثم تجهز بحيث يمكن رؤية وتوضيح التراكيب الدقيقة للخلايا أو الفيروسات أو غيرها.

هـ) **تحديد موضع مكونات الخلية Localization of cell constituents**: لقد تم تطوير العديد من التقنيات والتي بها أصبح من الممكن تحديد موضع المكونات الخلوية، فعلى سبيل المثال، يمكن معاملة قطاعات الخلية فائقة الرقة بالأجسام المضادة المعلّمة بالفريتين ferretin labeled antibodies. والفريتين مادة تحتوي على الحديد ذات كثافة عالية والتي تؤثر بشدة على مرور حزمة الإلكترونات وارتباط الأجسام المضادة المعلّمة بالفريتين مع الجسم الغريب (الأنتيجين antigen) للخلية تؤدي إلى تكوين معقد complex والذي يعبر عن تباين عالي في صورة المجهر الإلكتروني.

تحديد موضع الإنزيمات في القطاعات الرقيقة Localization of enzymes in thin sections: باستخدام تقنية معينة يمكن تحديد موضع الإنزيمات الموجودة داخل الخلية عند فحصها بالمجهر الإلكتروني. وفي الصورة المأخوذة بالمجهر الإلكتروني أمكن بهذه التقنية تحديد إنزيم أيزوسترات ديهيدروجينيز isocitrate dehydrogenase في بكتيريا إيشيريشيا كولاي *Escherichia coli*. ويتم ذلك أولاً بعمل قطاعات عالية الرقة للخلايا البكتيرية يليه استخدام طريقة تعتمد على تقنية كيمياء مناعية immunochemical يكون فيها الذهب الغروي مربوطاً نوعياً مع إنزيم أيزوسترات ديهيدروجينيز. ويوضح الشكل رقم (٢٠) صوراً بالمجهر الإلكتروني الماسح باستخدام تقنيات مختلفة.



الشكل رقم (٢٠). صور بالمجهر الإلكتروني النقّال باستخدام تقنيات مختلفة a) قالب الظل shadowcast، b) قاع عالي الرقة في خلية بكتيرية، c) خدش التجمد freezeetching خلية حقيقية النواة (عن: McKane. *et al.*, 1996).

رسم الإشعاع الذاتي Autoradiography: يعد رسم الإشعاع الذاتي طريقة كيموخلوية cytochemical والتي بها يمكن تحديد موضع أي مكوّن كيميائي للعينة عن طريق ملاحظة مكان المادة الكيميائية المشعة radioactive. وفيها تُعرَّض الخلايا أولاً إلى مادة ذات نشاط إشعاعي (مادة مشعة نظيرة isotope) حتى تمتصها. وعملياً فإن العينات المحضَّرة للفحص المجهري تغطى بطبقة من معلق فوتوغرافي وتخزن في الظلام لفترة من الزمن. وتقوم الأشعة المؤينة ionizing radiation المنبعثة أثناء تحلل المادة المشعة بإنتاج صوراً كامنة latent في المعلق، وبعد عمليات التصوير، فإن الصورة الناتجة يمكن مشاهدتها كحبات grains من الفضة في التحضير.

٢– المجهر الإلكتروني الماسح Scanning electron microscope

تتعرض العينة المجهزة للفحص بالمجهر الإلكتروني الماسح إلى حزمة ضيقة من إلكترونات التي تتحرر بسرعة (تمسح) على سطح العينة، ويؤدي ذلك إلى تحرير فيض shower من الإلكترونات الثانوية مصحوبة بأنواع أخرى من الإشعاعات الناتجة من سطح العينة. وتتوقف كثافة intensity (شدة) هذه الإلكترونات على الشكل والتركيب الكيميائي للشيء المشع. وتجمع هذه الإلكترونات الثانوية بواسطة كشاف detector يولد إشارة إلكترونية electronic signal. وتمسح scanned وترصد هذه الإشارات بنفس التليفزيون بإنتاج صورة على أنبوبة مهبط cathode ray tube.

وينقص المجهر الإلكتروني الماسح قوة التوضيح resolving power التي يتحصل عليها من المجهر الإلكتروني النقال، ولكنه ذو ميزة في توضيح الصورة ثلاثية الأبعاد – three dimensional. ويمكن توضيح الشكل التضاريسي surface topography لسطح العينة بمزيد من الوضوح والعمق بما لا يمكن التوصل إليه بأية طريقة أخرى. يوضح الشكل رقم (٢١) صورة بالمجهر الإلكتروني الماسح (صورة دقيقة micrograph أي صورة بالمجهر الإلكتروني).

الشكل رقم (٢١). صورة دقيقة بالمجهر الإلكتروني الماسح بين خلايا بكتيرويدز *Bacteroides*، إحدى أنواع البكتريا التي تسكن الأمعاء (عن: Mekane. *et al.*, 1996).

قصور المجهر الإلكتروني Limitations of the Electron Microscope

على الرغم من الميزة العظيمة للتوضيح الضخم والتكبير العالي، فإنه يوجد بعض القصور في المجهر الإلكتروني. على سبيل المثال، فإن العينة المفحوصة توضع في غرفة وتكون تحت تفريغ هواء vacuum عالي. وبذلك فإنه لا يمكن أن تفحص الخلايا في الحالة الحية. علاوة على ذلك، فإن عملية التجفيف قد تغير من بعض الصفات الشكلية المميزة للعينة. وهناك قصور آخر في هذه التقنية ينحصر في قلة قدرة النفاذية لحزمة الإلكترونات، مما يستلزم عمل قطاعات غاية في الرقة لتوضح التراكيب الداخلية للخلية.

إن المشكلة الحقيقة التي تواجه الباحث الذي يحاول أن يكشف عن التراكيب الداخلية للخلية الميكروبية تنحصر في تعريف المادة الداخلية للخلية. وغالباً، فإنه من الضروري أن تربط وتقارن النتائج المتحصل عليها لنفس الكائن بمشاهدات من تقنيات مجهرية مختلفة مثل: مجهر قياس الأطوال والمجال المبهر ومحضيرات مصبوغة. فكل طريقة تسهم بأنواع مختلفة من المعلومات. خاصة وتفسير هذه المعلومات ومقارنتها بتلك الموضحة بالتقنيات الأخرى، بحيث أنها تجعل من الممكن التعرف على التراكيب الخلوية. ولكن هذا يتطلب قدراً ما من الخبرة بالمجاهر للباحث قبل أن يستطيع أن يفسر النتائج تفسيراً صحيحاً.

التحضيرات الخاصة بالمجهر الضوئي 4- Preparations for Light Micrscope Examination

تستعمل بصفة عامة تقنيتين لتحضير العينات للفحص بالمجهر الضوئي. الأولى: تعلق suspend فيها الكائنات في سائل (طريقة التحضير الرطب wet mount وطريقة القطرة المعلقة (hanging drop))، والثانية: تجفف dry وتثبت fix وتصبغ stained أغشية films أو مسحات smears من العينة.

طريقتي: التحضير الرطب Wet-mount والقطرة المعلقة Hanging drop

تسمح التحضيرات الرطبة بفحص الكائنات وهي في ظروفها الحية العادية. وبعد التحضير الرطب بوضع قطره من السائل المحتوي على الكائنات على شريحة زجاجية وتغطية هذه القطرة بغطاء شريحة cover slip. ولتقليل معدل البخر واستبعاد تأثير التيارات الهوائية فإنه يمكن تحليق ringing القطرة بالهلام البترولي petroleum jelly (الفازلين) أو أي مادة مماثله لتقفل seal بين الشريحة الزجاجية والغطاء. كما أن هناك شريحة خاصة بها انخفاض دائري مقعر يمكن أن تستخدم أحياناً في فحص التحضيرات الرطبة. ويتم ذلك بوضع قطرة من العينة الميكروبية على غطاء الشريحة، ثم بعد ذلك تقلب على الانخفاض المقعر لتعطي قطرة معلقة من العينة، ويفضل فحص الأحياء الدقيقة في التحضير الرطب في الحالات التالية:

١- إن الشكل الظاهري للبكتيريا الحلزونية spiral يتشوه بشدة عندما تجفف هذه البكتيريا وتصبغ، لذلك فإنها يجب أن تفحص في الحالة الحية. مثلاً، فحص إفرازات خطيرة يتوقع أن تحتوي على البكتيريا الحلزونية

"سبيروكيت spirochete" المسببة لمرض الزهري syphilis حيث إن التحضيرات الرطبة تفحص بمجهر المجال المظلم. وهذا يتيح تبايناً دقيقاً sharp contrast بين الكائنات والأرضية المظلمة.

٢- إن فحص البكتيريا لتحديد ما إذا كانت متحركة motile أم لا، يحتاج بداهة إلى تعليقها في وسط سائل لتستطيع أن تتحرك فيه بحرية.

٣- بملاحظة التغيرات الخلوية cytological التي تجري أثناء الانقسام الخلوي ولتحديد المعدل rate الذي يحدث به هذا الانقسام فإن هذا يتطلب ضرورة فحص هذه الكائنات في حالتها الحية (أي: أن يكون تحضيراً رطباً). كما أن تكوين الجراثيم spores وإنباتها germination لابد أن يدرس أيضاً في الخلايا الحية.

وعند فحص التحضيرات بمجهر المجال المبهر فمن الضروري جداً التحكم في مصدر الضوء. ويرجع السبب في ذلك إلى أن نقص الصبغة يجعل رؤية هذه الخلايا أقل تحديداً، لذلك فإن ضبط شدة مصدر الضوء يمكن أن تحسن من الرؤية. ويساعد القفل الجزئي للحجاب الحاجز diaphragm للمكثف condenser الموجود أسفل المتضدة stage في زيادة التباين contrast. ومع ذلك، فإن بعض قوة التوضيح resolving power تفقد. لذلك فإن مجهري المجال المظلم وتباين الطور يقدمان ميزة واضحة في إعطائهما كلاً من التباين العالي وقوة الإيضاح العالية عند فحص التحضيرات غير المصبوغة.

الأغشية المثبتة المصبوغة Fixed Stained Smears

تستخدم في معظم الأحيان الأغشية المثبتة المصبوغة في فحص المميزات الشكلية للبكتيريا وغيرها من الأحياء الدقيقة. ومن مميزات هذه الطريقة: أ) تمكن من رؤية الخلايا أكثر وضوحاً بعد صبغها. ب) تمكن من تباين الاختلافات بين الخلايا للأنواع المختلفة وحتى بين النوع الواحد، وذلك باستخدام محاليل الصبغ المناسبة (الصبغ التفاضلي differential أو الانتخابي selective).

وتشتمل الخطوات الأساسية في تحضير الأغشية المثبتة والمصبوغة على:

١- تحضير الغشاء أو المسحة. ٢- التثبيت. ٣- استخدام واحد أو أكثر من محاليل الصبغات.

صبغات الأحياء الدقيقة
Microbiological Stains

يمكن صبغ شرائح التحضيرات البكتيرية بطريقة الصبغ السالب negative staining وذلك باستخدام صبغة نيجروسين negrosine السوداء أو الحبر الصيني china ink حيث تحيط الصبغة بمحيط الخلايا دون أن تصبغها. ويمكن فحص الغشاء بالعدسة الزيتية حيث تظهر أشكال الخلايا الشفافة على خلفية الصبغة السوداء التي تحيط بها.

يوجد عدد كبير متاح من المركبات العضوية الملونة (الصبغات dyes) والتي تستخدم في صبغ staining الأحياء الدقيقة. وتتميز هذه المركبات عادة بالتعقيد نوعاً ما فيما يختص بالتركيب الجزيئي. وعلى هذا الأساس فإنه من

الممكن أن تقسم إلى مجموعات مثل صبغات ثلاثي فينيل الميثان triphenyl methane وصبغات أوكسازين oxazines وصبغات ثيازين thiazine، وهناك مزيد من التقسيمات العملية لعالم الخلية ذلك الذي يعتمد على السلوك الكيميائي للصبغة والمسمى: حامضي acidic ، وقلوي basic ومتعادل neutral. والصبغة الحامضية (أنيونية anionic) هي تلك التي تحمل شحنة سالبة على أيون الصبغة والصبغة القلوية (أو الكاتيونية cationic) هي تلك التي تحمل شحنة موجبة على أيون الصبغة. أما الصبغة المتعادلة فهي ملح معقد لصبغة حامضية مع صبغة قاعدية، مثل أيوسينات أزرق المثيلين eosinate methylene blue. وبصفة عامة فإن الصبغات الحامضية تصبغ مكونات الخلية القاعدية، على حين آخر تصبغ الصبغة القاعدية بصفة عامة مكونات الخلية الحامضية.

وقد تشتمل عملية الصبغ على تفاعلات التبادل الأيوني ion exchange بين الصبغة ومواقع نشطة على السطح أو داخل الخلية فمثلاً، فإن الأيونات الملونة للصبغة قد تحل محل إيونات أخرى للمكونات الخلوية. وقد تدخل بعض المجموعات الكيميائية لبروتينات الخلية أو أحماضها النووية في تكوين ملح به أيونات موجبة الشحنة مثل الصوديوم Na^+ أو البوتاسيوم K^+. ومن ثم فإنه يمكننا أن ننظر إلى المساحات السطحية من الخلية على أنها تحمل شحنة سالبة في حالة الارتباط مع الأيونات موجبة الشحنة.

وفي الصبغة القاعدية مثل أزرق الميثيلين، فإن الأيون الملوّن يكون ذو شحنة موجبة: (كاتيون)، وإذا مثلنا هذا الأيون بالرمز MB، فإن الصبغة التي تتكون فعلاً من كلوريد أزرق المثيلين، يمكن تمثيلها كالتالي: MB^+Cl^-

والتبادل الأيوني الذي يحدث يمكن أن يمثل بالمعادلة التالية حيث يحل كاتيون MB^+ محل كاتيون Na^+ في الخلية

(الخلية البكتيرية) $[Na^+]$ + $(MB^+)(Cl^-)$ ⟵ الخلية البكتيرية — $(MB^+)]$ + $(Na^+ Cl^-)$.

الصبغ البسيط Simple Staining

يطلق على تلوين البكتيريا باستخدام محلول صبغة واحدة مع غشاء مثبّت fixed film مصطلح الصبغ البسيط. ويغمر الغشاء المثبّت بمحلول الصبغة لفترة زمنية محددة، بعدها يغسل هذا المحلول بالماء وتجفف الشريحة بورق الترشيح blotted. وتصبغ عادة الخلايا بانتظام، ومع ذلك فإن بعض الكائنات، خاصة عندما تستخدم أزرق الميثيلين، قد تصبغ أعمق بعض الحبيبات granules في التركيب الداخلي للخلايا عن باقي الخلية، وهذا يبين الاختلاف في نوع المادة الكيميائية لهذه المكونات.

الصبغ التفاضلي Differential Staining

يطلق على طرق الصبغ التي تمكن من رؤية الفروق بين أنواع الخلايا البكتيرية أو أجزاء من الخلية البكتيرية بطرق الصبغ التفاضلي. وهي أكثر تطوراً عن طريقة الصبغ البسيط، بمعنى أن الخلايا قد تتعرض لأكثر من محلول صبغة أو كاشف صبغ staining reagent.

صبغة جرام Gram staining

تعد صبغة جرام واحدة من أهم طرق الصبغات التفاضلية وأكثرها انتشاراً في علم الأحياء الدقيقة. ويرجع الفضل في تقديم هذه الصبغة إلى كريستيان جرام Christian Gram عام ١٨٨٤. وفي هذه الطريقة يعرض الغشاء البكتيري المثبت إلى محاليل الصبغ التالية بنفس الترتيب: بنفسجي الكريستال (كريستال فيوليت crystal violet)، ومحلول اليود Iodine، والكحول كعامل مزيل للون decolorizing agent، وصبغة السفرنين safranin أو بعض الصبغات المضادة counter stains الأخرى المناسبة. وتقع البكتيريا المصبوغة بطريقة جرام في مجموعتين: البكتيريا الموجبة لجرام Gram positive bacteria، وهي تلك التي تحتفظ بلون بنفسجي الكريستال ومن ثم تظهر بلون بنفسجي غامق، والبكتيريا السالبة لجرام Gram negative، وهي تلك التي تفقد لون بنفسجي الكريستال، والتي تصبغ بصبغة السفرانين المضادة، ومن ثم تظهر حمراء اللون. إذن لماذا تصبغ هذه الطريقة بعض البكتيريا باللون الأرجواني — البنفسجي purple-violet والبعض الآخر باللون الأحمر؟

إن أقوى التفسيرات لهذه الظاهرة تكون مرتبطة بتركيب وتكوين الجدار الخلوي (انظر إلى الفصل الخامس لمناقشة الفروق النسبية بين الجدار الخلوي للبكتيريا السالبة والموجبة). وقد تكون الفروق في السمك بين جدر هذه الخلايا لهاتين المجموعتين ذات أهمية، فجدر خلايا البكتيريا السالبة لجرام تكون عادة أرق من تلك البكتيريا الموجبة لجرام. كما أن البكتيريا السالبة لجرام قد تحتوي على نسبة مئوية عالية من الدهون عما هو عليه في البكتيريا الموجبة لجرام. ويفترض من الدليل التجريبي على أن صبغ البكتيريا السالبة لجرام تؤدي فيه المعاملة بالكحول إلى استخلاص الدهون وبالتالي يؤدي ذلك إلى زيادة المسامية porosity أو النفاذية permeability للجدار الخلوي. بناء عليه ، فإن معقد الكريستال البنفسجي — واليود (CV-I complex) يمكن أن يستخلص فيصبح الكائن السالب لجرام متزوعاً منه اللون decolorized. ولذلك، فإن هذه الخلايا تكتسب لون صبغة السفرانين المضادة. وبسبب اختلاف التركيب (محتوى الدهن المنخفض) في جدر خلايا البكتيريا الموجبة لجرام، فإنها تصبح جافة أثناء معاملتها بالكحول ويصغر حجم الثقوب وتختزل النفاذية، ومن ثم فإن معقد الكريستال البنفسجي واليود (CV-I complex) لا يمكن أن يستخلص. بناء عليه، فإن هذه الخلايا تظل باللون الأرجواني البنفسجي purple-violet.

وثمة تفسير آخر، مشابه إلى حد ما، يبنى أيضاً على اختلاف النفاذية بين مجموعتي البكتيريا. إذ يصطاد معقد الكريستال البنفسجي واليود على جدر الخلايا البكتيرية الموجبة لجرام عقب المعاملة بكحول الإيثانول، والذي يعتقد أن يسبب نقصاً في قطر بيتيدوجليكان peptidoglycan المكوّن للجدار الخلوي، أما جدار البكتيريا سالبة لجرام

فإنها تحتوي على كمية أقل بكثير من البيبتيدوجليكان، والذي لا يتشابك بشدة كما هو الحال في جدار البكتيريا الموجبة لجرام، وتظل ثقوب البيبتيدوجليكان للبكتيريا السالبة لجرام كبيرة بدرجة أكبر حتى بعد المعاملة بالكحول، ومن ثم فإنها تسمح لمعقد الكريستال البنفسجي واليود بالاستخلاص. ومع ذلك فإن هذين التفسيرين ليسا شاملين، أي من المحتمل أن كليهما معاً قد يساهما في تفسير آلية mechanism صبغة جرام — إضافة إلى ذلك فإن معاملة الخلايا الموجبة لجرام بإنزيم محلل lysozyme لإزالة الجدار الخلوي، حيث إن التراكيب الناتجة والمسماة بروتوبلاستات protoplasts (الخلايا بدون الجدار الخلوي) تصبغ بمعقد الكريستال البنفسجي — واليود. ومع ذلك، فإنه من السهل إزالة اللون منها بالكحول. وهذا الدليل يشير إلى أن تركيب الجدار الخلوي في البكتيريا الموجبة لجرام إنما هو مكان الاحتفاظ retention بالصبغة الابتدائية.

وعلى الرغم من أن الكائنات السالبة لجرام تفشل بصفة دائمة في الاحتفاظ بصبغة الكريستال البنفسجي، فإن الكائنات الموجبة لجرام قد تبدي تبايناً في هذا المضمار وبمعنى إعطائها تفاعلاً متبايناً لجرام Gram-variable reaction. فمثلاً، تفقد المزارع القديمة من البكتيريا الموجبة لجرام قدرتها على الاحتفاظ بالكريستال البنفسجي ومن ثم تصبغ بالسفرانين. كما أن تأثيراً مشابهاً يمكن أن يحدث أحياناً كنتيجة لتغير بيئة environment الكائن أو قد يعود إلى تحوير طفيف في طريقة الصبغ.

وداخل بعض مجموعات البكتيريا مثل البكتيريا الأثرية Archaeo bacteria (القديمة = أركيا Archea) (انظر الفصل الخامس)، فإن بعضها يكون موجباً لجرام والبعض الآخر سالباً لجرام، ومع ذلك فإن تركيب الجدار الخلوي والتكوين الكيميائي يكونان مختلفين تماماً عما هو في المجموعات الأخرى للبكتيريا الموجبة والسالبة لجرام.

وتختلف البكتيريا الموجبة لجرام عن السالبة لجرام في مميزات أخرى علاوة على تفاضل الصبغ. فالبكتيريا الموجبة لجرام تكون عادة أكثر حساسية susceptible بالمعاملة الميكانيكية أو التعرض لبعض الإنزيمات مقارنة بالبكتيريا السالبة لجرام، على حين تكون البكتيريا السالبة لجرام أكثر حساسية للمضادات الحيوية الأخرى مثل ستربتومايسين strptomycin. كما أنه لا تزال هناك فروق أخرى بين هاتين المجموعتين من البكتيريا.

وتستخدم صبغة جرام على نطاق واسع في توصيف characterizing البكتيريا، إلا أن تقنية الصبغ هذه لا تطبق على المجموعات الأخرى من الأحياء الدقيقة مثل الأوليات أو الفطريات، على حين أن الخمائر تكون موجبة لجرام دائماً.

صبغات تفاضلية أخرى

يوجد العديد من طرق الصبغ الأخرى والمصممة للتعرف على بعض الملامح المحددة في تركيب الخلية أو تكوينها. وتلخص فيما يلي هذه التقنيات (الجدول رقم ٧).

الجدول رقم (٧). أنواع الصبغات وتطبيقاتها.

إسم تقنية الصبغة	التطبيق
١- الصبغ المقاوم للحامض Acidfast stain	تميز بين البكتيريا المقاومة للحامض acid fast مثل أنواع الميكوباكتيريام *Mycobacterium spp* عن الأنواع الأخرى من البكتيريا غير المقاومة للحامض non acid fast.
٢- صبغ الجراثيم الداخلية (الأبواغ) Endospore stain	تميز تركيب الجرثومة الداخلية في البكتيريا وكذلك أيضاً كجراثيم حرة.
٣- صبغ المحفظة (العلبة) Capsule stain	تبين وجود المحافظ حول الخلايا.
٤- صبغ الأسواط Flagella stain	تبين وجود وترتيب الأسواط.
٥- صبغات المحتويات السيتوبلازمية Cytoplasmic inclusions	تعرّف الترسيبات داخل الخلية من النشا، الجليكوجين، عديد الفوسفات، هيدروكسي بيوتيرات والمواد الأخرى.
٦- صبغة جيمسا Giemsa stain	تطبق خاصة لصبغ الريكيتسيا وبعض الأوليات.

تقنيات مجهرية جديدة

New Microscopy Techniques

١- مجهر الحيود المتداخل Diffraction Interference Microscope (DIM)

ويشمل تقنية مجهرية حديثة للمجهر الضوئي، حيث يستخدم لفحص الأحياء الدقيقة الشفافة. ويستخدم منشور prism الذي يسمح بإنفصال (حيود) أشعة الضوء ثم اتحادها بآلية محددة، مما يؤدي لظهور العينة بصورة ثلاثية الأبعاد three-dimensional (مجسّمة).

٢- مجهر الفيديو مُحَسِّن التباين Video-Enhanced Contrest Microscopy

وهي تقنية تستخدم المجهر الضوئي حيث تظهر تفاصيل أكثر عما يظهره المجهر الضوئي العادي بسبب الصور المتعددة التي يتم اصطيادها على شريط فيديو videotape بعد ذلك يقوم الكمبيوتر computer بتحسين التباين contrast يدمج هذه الصور بعد استبعاد "المعلومات" غير الضرورية الموجودة بالعينة.

٣- مجهر الجرعة الضوئية المنخفضة Low Light Dose Microscopy

حيث يستخدم صبغات فلوريسينية (وميضة) ضعيفة كعلامات markers والتي تتصل بأجزاء محددة (نوعية) بالخلية، ويقوم الكمبيوتر بتحسين الإشارات signals الفلوريسينية كعمليات كيموحيوية تحدث في الخلية، مثلما يحدث عند تغير الأس الهيدروجيني.

٤- المجهر الإلكتروني المناعي Immunoelectron Microscopy

وقد تمت فيه استعارة بعض التقنية من طريقة الجسم المضاد الوميض. حيث يتم ربط الأجسام المضادة antibodies بالذهب ثم تخلط مع الخلية، فإذا ما تم اتصالها إما بسطح الخلية أو بأجسام مضادة أخرى مثبتة على الخلية، فإن رقائق الذهب تظهر كنقط سوداء على سطح الخلية أو بداخلها عندما يتم فحصها بالمجهر الإلكتروني.

٥- المجهر الماسّح النفقي Scanning-Tunneling Microscope

وفي هذا المجهر أيضاً يتم استخدام الإلكترونات وليس الضوء، ولكنها تستخدم على اختلاف إلى حد ما عن تلك المستخدمة في المجهر الإلكتروني النفّال والماسّح. حيث تدار إبرة حادة فوق السطح المراد مسحه، مثل إبرة الفونوغراف phonograph على الإسطوانة. وتتحرك الإلكترونات بين السطح والإبرة، حيث يمكن للباحثين الحصول على صورة عن طريق قياس التيار اللازم لإبقاء الإبرة على ارتفاع ثابت فوق العينة. وهي لا تعطي صورة كاملة عن الكائن الحي الدقيق لكنها تحدد ذرات atoms مفردة على السطوح. وينتمي إلى هذا النوع من المجاهر ما يسمى بمجهر القوة الذرية Atomic-Force Microscope الذي يطبق قوة بين الإبرة والسطح.

٦- مجهر البوزيترون النفّال Transmission Positron Microscope

وهو مجهر يستخدم حزمة من البوزيترونات positrons (دقائق ذرية منبعثة من بعض المواد النشطة إشعاعياً).