جامعـــــة ميسان

كليـــــة العلوم

قســم علوم الحياة

استخدام الصبغات النباتية بدلا عن صبغة غرام و الاصباغ الاخرى في تصبيغ الأحياء المجهرية

بحث مقدم إلى

كلية العلوم / قسم علوم الحياة

كجزء من متطلبات قبل درجة بكالوريوس علوم في علوم الحياة

من قبل الطالبة

طيبة سمير عبود

إشراف

أ.د. زهرة عدنان داخل

1446هـ 2025م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَٰنِ الرَّحِيمِ

يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ

صدق الله العظيم

(سورة المجادلة: اية 11)

توصية الأستاذ المشرف

المهد أن أعداد البحث الموسوم (استخدام الصبغات المالية بديلة لصبغة غرام في تصبيغ الاحياء المجهرية) قد جرى تحت إشرافي وهو جزء من متطلبات نيل درجة بكالوريوس علوم في علوم الحياة.

الاسم: أ.د. زهرة عدنان داخل.

اللقب العلمي:

العنوان: كلية العلوم/ جامعة ميسان.

التوقيع:

التاريخ:

توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة إلى التوصية المقدمة من قبل أ.د. زهرة عدنان داخل أحيل هذا البحث إلى لجنة المناقشة لدراسته وبيان الرأي فيه.

رئيس القسم: أ. د. صالح

المرتبة العلمية:

التوقيع:

التاريخ:

الاهداء

بسم الله الرّحمن الرّحيم

الحمدُ لله الّذي جعل من اللّيل سكنًا، ومن القُلوب مأوى للّين والمودّة أهدي هذا الجُهد المُتواضع إلى من هم نُور دربي، وحصن أماني، وسُرُور روحي...

إلى أمّي

يا نُور عُمري، يا من سهرت اللّيالي لتُضيء أيّامي، وبذلت الغالي لتكُون أحلامي حقيقة أنت الوجدان الّذي لا يخبُو، والشّمس الّتي لا تغيبُ. لك في أعماق قلبي مقام القُدس، فلن تُجازيك الكلمات، ولن توفيك الحُرُوفُ. جعل اللّهُ عُمرك سلسبيل بركة، وقلبك روضة رضًا، فأنت أولى النّعم وأجلها.

إلى أبي

يا صخرتي الأولى، يا من علّمني أن أحمل الصّبر سيفًا، وأن أنحت بالحرف مجدًا لك في فؤادي مكانة النُّجُوم الهادية، تهديني في ظُلُمات الغيب، وتُذكّرني أنّ الجبال لا تتزعزعُ أنت البحرُ الّذي تعلّمتُ منهُ أن أُعطي بلا حُدُود، فحفظك الله ذُخرًا للأيّام، وجعل خُطاك تُسابقُ الآمال.

إلى إخوتي

يا رُفقاء الدّرب، يا من تحمّلتُم زلّاتي، وكانتُم سندي في كُلّ مُحنة أشكُرُكم صمتكم الحنُون حين تعتلجُ أفكاري، وضحكتكم الّتي تمحُو همُومي. أنتُم جُذُوري الّتي تعصفُ بها الرّياحُ فلا تنكسرُ، وظلّي الّذي لا يُفارقني حتّى في لظى الشّمس دُومُوا لي عزًا وسلامًا.

إلى صديقاتي

يا جناحي الآخر يا من جعلتني أرى في نفسي ما لا أراه أشكركن على الوقفات التي صاغت مني إنسانًا، وعلى الكلمات التي كانت شفاءً لأوجاعي أنتن الورود التي تعطر روضة عمري، والنجوم التي تهديني إلى بر الأمان أبقاكن الله لي قرة عين، وجعل أواصرنا سلسبيلًا إلى الخير أبدًا.

ختامًا

هذا العمل قطرة من بحر فضلكم، فاقبلوها شاهدًا على أن القلوب إذا أحبت أبدعت، وإذا امتلأت شكرًا أثمرت فليس الجميل إلا منكم، وليس النور إلا بكم.

دمتم في رعاية الرحمن، لغة القلب أصدق من حرف، فاقبلوا هذه الكلمات نورًا من شموع الود

خطاب الشكر والتقدير

بسمِ اللهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

والصَّلَاةُ وَالسَّلَامُ عَلَى مَنْ أَرْسِلَ رَحْمَةً لِلْعَالَمِينَ،

أمَّا بَعْدُ..

الحمدُ لله الذي ألهم العقولَ سُبُلَ الِارْتِقَاءِ، وَفَتَحَ لَنَا بِمَعَارِفِهِ أَبْوَابَ السَّمَاءِ، فَهُوَ المُنعِمُ بِجَلَالِ العِلمِ، وَالمُتَفَضِّلُ بِإِشْرَاقَةِ الفَهمِ وَالإِبْدَاعِ.

أَمَامَكِ يَا جَامِعَتِي الفَذْةُ

يَا حِصْنَ الحِكْمَةِ، وَيَا رَوْضَةَ العُلُومِ المُزْهِرَةَ ، لَقَدْ كُنتِ لِي مَشْهَداً لِلسَّمَاءِ تَحْتَ الأَرْضِ، أَتَنَفَّسُ فِيكِ عَبِقَ المَعَانِي، وَأَرْتَوِي مِنْ نَهْرِكِ الخَضِمُ العِلْمَ النَّقِي فِيكِ تَعَلَّمْتُ أنّ الحُرُوفَ تَصْنَعُ عَالَماً، وَأَنَّ الْأَرْقَامَ تَبَنِي مَجْداً. جَزَاكِ اللَّهُ عَنْ كُلِّ طَالِبٍ خَيْرَ مَا جَزَى صَرْحاً يَحْمِلُ أَمَانَةَ التَّرْبِيَةِ، وَيُعَانِقُ سَحَابَ الأمل.

وَإِلَى أَسَاتِذَتِي الْكِرَامِ

يَا مَنَارَاتِ الدَّرْبِ، وَيَا نُجُومَ السَّمَاءِ العِلْمِيَّةِ، لَكُمْ فِي أَعْمَاقِ القَلْبِ مَنَازِلُ لَا تَزُولُ، وَفِي سَاحَاتِ الْفِكْرِ بُصَمَاتُ لَا تُمحَى. أَشْكُرُ لَكُمْ حَرْفَكُمُ الذَّهَبِيَّ الَّذِي كَانَ نُوراً يَهْدِينِي، وَصَبْرَكُمُ الأَشِبَّ الَّذِي احْتَمَلَ تَلَوْنَاتِ العَقْلِ وَارْتِدَادَاتِ الفهم. أَنْتُمْ سَحَابَةُ الرَّحْمَةِ فِي فَلَاةِ الجَهْلِ، وَأَنْتُمْ البَحْرُ الَّذِي لَا يَنْضُبُ عَطَاؤُهُ، فَجَزَاكُمُ اللهُ عَنْ زَرْعِكُمْ خَيرَ مَا يُجْزَى الزَّارِعُونَ.

إِلَى رُفَقَاءِ الرَّحْلَةِ

يَا أَصْدِقَاءَ العُمْرِ الوَضَاءِ، شُكراً لِقُلُوبِكُمُ الظَّاهِرَةِ الَّتِي صَاحَبَتْنِي فِي مَسَافَاتِ، دُمْتُمْ لِي أَخُوَّةً تَسْكُنُهَا المَوَدَّةُ، وَأَمَاناً يَلُوذُ بِهِ القَلْبُ.

ختاماً

هَذِهِ الكَلِمَاتُ تَتَهَافَتْ خَجْلَى أَمَامَ جُودِكُمْ، وَتَخْشَى أَلَّا تُوفِيَكُمْ حَقَّكُمْ، لَكِنَّهَا تَخْرُجُ مِنْ أَعْمَاقِ رُوحٍ وَعَتْ أَنَّ الفَضْلَ بَعْدَ فَضْلِ اللهِ هُوَ فَضْلُكُمْ. فَإِذَا كَانَ التَّخَرُجُ غَايَةَ المَسَارِ، فَإِنْ ذِكْرَاكُمْ هِيَ النَّجْمَةُ الَّتِي سَتُزَيِّنُ سَمَائِي أَيْنَمَا حَلَلْتُ.

وَسَلَامٌ عَلَى أَرْضٍ كَانَتْ لِي أَماً ثَانِيَةً،

وَعَلَى نُفُوسٍ كَرِيمَةٍ عَلَّمَتْنِي أَنْ أَكُونَ....

والسلام.

الطالبة

(طيبة سمير عبود)

كلية العلوم قسم علوم الحياة

الفهرست

ت	العنوان	رقم الصفحة
.1	الاية القرانية	II
.2	توصية الأستاذ المشرف	III
.3	الاهداء	IV
.4	الشكر والتقدير	VI
.5	الفهرست	VIII
.6	فهرسة الجداول	IX
.7	فهرسة الاشكال	X
.8	**الفصل الاول** **المقدمة**	**1**
.9	اهداف البحث	5
.10	**الفصل الثاني** **استعراض المراجع**	**6**
.11	استعراض المراجع	7
.12	الاستخدامات الرئيسية	9
.13	مزايا الصبغات النباتية	10
.14	العيوب والمخاطر	11
.15	التأثيرات الهامة للصبغات النباتية على الخلايا والمركبات البيولوجية	12
.16	طرق استخراج الصبغات النباتية	13
.17	تفاعل التركيب الكيميائي للصبغات النباتية مع التركيب الكيميائي لجدران خلايا البكتيريا والفطريات هناك بعض النقاط الرئيسية	14
.18	التركيب الكيميائي لجدران الاحياء المجهرية	15
.19	التراكيب الكيميائية للصبغات المستخدمة	22

.20	**الفصل الثالث** **المواد وطريقة العمل**	**31**
.21	المواد وطريقة العمل	32
.22	استخدام صبغة السبانخ في صبغ الكائنات الحية الدقيقة	34
.23	استخدام صبغة الشونذر في صبغ الكائنات الحية الدقيقة	37
.24	استخدام صبغة الكركديه في صبغ الكائنات الحية الدقيقة	39
.25	استخدام صبغة الكركم في صبغ الكائنات الحية الدقيقة	42
.26	استخدام صبغة الملفوف الاحمر في صبغ الاحياء المجهرية	45
.27	**الفصل الرابع** **النتائج**	**46**
.28	أولاً : نتائج تصبيغ البكتريا موجبة وسالبة غرام	47
.29	ثانياً: نتائج تصبيغ الفطر Aspergillus niger	55
.30	ثالثاً: نتائج تصبيغ خميرة Candida spp	59
.31	**الفصل الخامس** **مناقشة النتائج**	**62**
.32	النتائج	63
.33	المناقشة	65
.34	الاستنتاج العام	67
.35	التوصيات المستقبلية	67
.36	الختام العلمي	68
.37	المصادر	69

فهرسة الجداول

ت	العنوان	رقم الصفحة
.1	مقارنة بين الصبغات النباتية وصبغة غرام	9
.2	تأثير الصبغات النباتية على الأحياء المجهرية	64

فهرسة الاشكال

ت	العنوان	رقم الصفحة
.3	تركيب جدار البكتريا موجبة غرام	16
.4	تركيب جدار البكتريا سالبة غرام	18
.5	تركيب جدار البكتريا سالبة غرام	18
.6	تركيب جدار الفطريات	20
.7	تركيب جدار الخميرة	21
.8	Spinacia oleraceae	23
.9	Beta vulgaris	25
.10	Hibiscus sabdariffa	27
.11	Curcuma longa	28
.12	Red cabbage	30
.13	مستخلص السبانخ المُحضر	33
.14	طريقة تحضير الصبغات النباتية	34
.15	مستخلص الشمندر المحضر	36
.16	مستخلص الكركديه المُحضر	38
.17	مستخلص نبات الكركم المحضر	41
.18	تحضير الصبغات النباتية	42
.19	مستخلص الملفوف الأحمر المحضر	43
.20	الصبغات النباتية المحضرة مختبرياً	44
.21	Gram positive *Staphylococcus aureus* 100X	48
.22	Gram negative *Pseudomonas oryzihabitans* 100X	48
.23	*Staphylococcus aureus*10X باستخدام صبغة الكركديه	49
.24	*Pseudomonas oryzihabitans* 10X بأستخدام صبغة الكركديه	50
.25	*Pseudomonas oryzihabitans*10X بأستخدام صبغة الشمندر	50

.26	بأستخدام صبغة الشمندر *Pseudomonas oryzihabitans*10X	51
.27	باستخدام صبغة السبانخ*Staphylococcus aureus* 10X	51
.28	باستخدام صبغة السبانخ *Pseudomonas oryzihabitans* 10X	52
.29	باستخدام صبغة الملفوف *Staphylococcus aureus* 10X الاحمر	52
.30	باستخدام صبغة الملفوف *Pseudomonas oryzihabitans* 10X الاحمر	53
.31	باستخدام صبغة الكركم *Staphylococcus aureus*10X	54
.32	*Aspergillus niger* 40X	55
.33	باستخدام صبغة الكركم *Aspergillus niger* 40X	56
.34	باستخدام صبغة الكركديه *Aspergillus niger* 40X	57
.35	بأستخدام صبغة الشمندر *Aspergillus niger* 40X	57
.36	باستخدام صبغة السبانخ *Aspergillus niger* 40X	58
.37	باستخدام صبغة الملفوف الأحمر *Aspergillus niger* 40X	58
.38	*Candida spp*. 40X	59
.39	بإستخدام صبغة السبانخ *Candida spp* 10X	59
.40	بإستخدام صبغة الملفوف الأحمر *Candida spp* 10X	60
.41	بإستخدام صبغة الكركم *Candida spp* 10X	60
.42	بإستخدام صبغة الكركديه *Candida spp* 10X	61
.43	باستخدام صبغة الشمندر*Candida spp*. 10X	61

الفصل الأول

المقدمة

المقدمة:

تعتبر الصبغات جزءًا مهما من علم الأحياء الدقيقة، حيث تُستخدم لتحديد نوع البكتيريا وفهم خصائصها. تعتبر صبغة غرام من أكثر الطرق شيوعًا لتصنيف البكتيريا استنادًا إلى خصائص جدران خلاياها. ومع ذلك، تزيد المخاوف الحديثة حول الاستخدام المستدام للمنتجات الكيميائية والحد من المواد الضارة، مما يجعل من الضروري البحث عن بدائل طبيعية. في هذا البحث، نستعرض استخدام الصبغات النباتية كمصدر بديل لتصبيغ الأحياء المجهرية.

تُعرف الأصباغ بأنها مجموعة من المركبات التي لها لون كثيف وتستخدم في تلوين المواد الأخرى. تسمى هذه المواد الملونة أيضًا بالأصباغ البيولوجية أو الكروم الحيوية، والتي تشير بشكل أساسي إلى الأصباغ الحقيقية . والأصباغ النباتية هي مركبات عضوية تستخلص من النباتات، وتعتبر جزءًا هامًا من علم الكيمياء الحيوية [1] تلعب الأصباغ النباتية دورًا حيويًا في العديد من العمليات البيولوجية، مثل التمثيل الضوئي، كما أنها تتمتع بخواص مختلفة تجعلها مفيدة في مجموعة واسعة من التطبيقات، بما في ذلك استخداماتها كصبغات في الأحياء المجهرية.

تُستخدم الأصباغ النباتية كوسيلة لتلوين الأنسجة الخلوية، مما يسهل دراسة المكونات الخلوية المختلفة تحت المجهر. تُستخدم أنواع مختلفة من الأصباغ، مثل الكلوروفيل والأنثوسيانين، لتحديد الهياكل الخلوية والتفاعل مع العينات المجهرية بشكل دقيق. تتميز هذه الأصباغ بمزايا عديدة، مثل كونها غير سامة وقابلة للتحلل، مما يجعلها بديلًا آمنًا عن الأصباغ الاصطناعية [2].

تساعد الأصباغ النباتية الباحثين في فهم التفاعلات البيولوجية والتشخيص الدقيق للأنسجة والأمراض، مما يساهم في تقدم الأبحاث في مجال الأحياء المجهرية والطب الحيوي بفضل خصائصها الفريدة. وتعتبر الصبغات النباتية من العناصر الطبيعية التي استخدمت منذ العصور القديمة لأغراض متعددة، بدءًا من تلوين الأقمشة والطعام، وصولاً إلى استخدامها في الفنون والحرف اليدوية. ومع تقدم العلوم والتكنولوجيا، بدأت الأبحاث تتجه نحو استكشاف تطبيقات جديدة لهذه الصبغات، بما في ذلك استخدامها كوسيلة لتلوين الأحياء المجهرية.

يُعد استخدام الصبغات النباتية في مجال الأحياء المجهرية موضوعا مثيرا للاهتمام، حيث يجمع بين علم الأحياء، الكيمياء، والبيئة.

تتميز الصبغات النباتية بتنوعها الكبير، حيث تشمل مجموعة واسعة من المركبات الكيميائية مثل الأنثوسيانين الكاروتينات والكلوروفيل وكل منها يمتلك خصائص فريدة تؤثر على اللون والخصائص الفيزيائية والكيميائية [3].

يعد هذا التنوع مصدرا غنيا للابتكار في تطبيقات الأحياء المجهرية، حيث يمكن استخدام هذه الصبغات كمواد ملونة لتعزيز الرؤية والتعرف على الكائنات الحية الدقيقة في الدراسات الميكروبيولوجي.

تتمتع الصبغات النباتية بخصائص مضادة للميكروبات ، مما يجعلها خيارًا واعدا في مكافحة البكتيريا والفطريات فقد أظهرت العديد من الدراسات أن بعض الصبغات النباتية تمتلك نشاطا مضادا للميكروبات [4] يمكن أن يكون فعالا ضد مجموعة متنوعة من الكائنات الحية الدقيقة، مما يشير إلى إمكانية استخدامها كبديل طبيعي للمضادات الحيوية التقليدية.

هذا الاستخدام لا يساهم فقط في الحفاظ على البيئة وتقليل الاعتماد على المواد الكيميائية الصناعية الضارة، بل يعزز أيضا من مفهوم الاستدامة في العلوم الحيوية.

علاوة على ذلك، فإن استخدام الصبغات النباتية في الأحياء المجهرية يمكن أن يسهم في تطوير تقنيات جديدة للتلوين والتشخيص. على سبيل المثال، يمكن استخدام الصبغات لتحديد وتصنيف الكائنات الحية الدقيقة في العينات البيئية أو السريرية، مما يسهل عملية التعرف على الأنواع ودراسة تأثيراتها البيئية والصحية. كما أن هذه الصبغات يمكن أن تلعب دورا هاما في تطوير أنظمة جديدة للتصوير المجهري، مما يعزز من دقة وفعالية الدراسات المجهرية.

وفي هذا السياق، تركز الدراسة الحالية على تقييم فعالية صبغات نباتية طبيعية مستخلصة من الكركم (*Curcuma longa*، الكركديه ,(*Hibiscus sabdariffa*)السبانخ ,*(Spinacia oleraceae)* الشمندر ,(*Beta vulgaris*)والملفوف الأحمر *(Brassica oleracear capitata f. rubra)*، في تصبيغ طيف متنوع من الكائنات المجهرية شملت البكتيريا سالبة غرام.*(Pseudomonas or habitants)* وموجبة غرام

,*(Staphylococcus aureus)*بالإضافة إلى الخميرة (*Candida spp*) والفطر الخيطي *Aspergillus* (*niger*) وقد تم اختيار هذه الأنواع الأهميتها الطبية والبيئية، فضلا عن تنوعها في التركيب الجدار الخلوي، وهو ما يشكل عاملا حاسة في استجابة الكائن الحي للصبغات.

تتميز البكتيريا سالبة غرام مثل*Pseudomonas oryzihabitans* بجدار خلوي يتضمن غشاء خارجي غني بالليبوبوليسكاريد(LPS) ، وطبقة رقيقة من الببتيدوغليكان، ما يُصعب من امتصاص الصبغات، مقارنة بالبكتيريا موجبة غرام مثل .*Staphylococcus aureus* التي تمتلك جدارًا سميكا من الببتيدوغليكان دون وجود غشاء خارجي، مما يجعلها أكثر تفاعلًا مع بعض أنواع الصبغات [5]& [6] من ناحية أخرى، فإن الفطريات مثل *Aspergillus niger* تمتلك جدارًا خلونا غنيا بالكيتين والجلوكائيات، وهي مكونات تمتلك مواقع ارتباط متعددة للمركبات الفينولية والملونة في الصبغات النباتية، مما يسهل تفاعلها مع الأصباغ [7].

ظهرت نتائج أولية في هذه الدراسة أن الصبغات المستخلصة من الكركديه والملفوف الأحمر كانت الأكثر فعالية في تصبيغ الفطريات، بينما كانت نتائج التصبيغ في البكتيريا والخمائر محدودة وذات وضوح منخفض، فعلى سبيل المثال، لوحظ أن صبغة الشمندر نجحت في إظهار جدران خلايا *A. niger* بشكل واضح، بينما كانت نتائجها ضعيفة وغير منتظمة مع *P. oryzihabitans* و *Candida spp*.، ويرجع ذلك إلى البنية الجدار الخلوي المقاومة والاختلافات في النفاذية الغشائية والقدرة على التفاعل مع المركبات الطبيعية [8].

وفيما يُظهر الكركم فعالية تصبيغ متوسطة نتيجة لاحتوائه على مركب الكركومين، إلا أن طبيعته الكارهة للماء تقلل من فعاليته مع الكائنات التي تملك جدرانا خارجية غير منفذة. وفي المقابل أظهرت صبغات الكركديه والسبانخ فعالية منخفضة خاصة مع البكتيريا والخمائر، على الرغم من احتوائها على مركبات أنثوسيانينية وكلوروفيلية، مما يشير إلى أهمية طبيعة المركب الصايغ وليس فقط مصدره النباتي.

تسلط هذه الدراسة الضوء على الإمكانات المستقبلية لاستخدام الصبغات النباتية في الأغراض الميكروبيولوجية، مع توجيه خاص نحو القطريات التي أظهرت تجاوبا عاليا مقارنة بالبكتيريا والخمائر. كما تفتح المجال أمام تحسين تقنيات الاستخلاص والتهيئة الكيميائية للصبغات النباتية بهدف رفع كفاءتها، خصوصاً في التطبيقات التعليمية أو البيئية التي تتطلب بدائل آمنة ومستدامة.

اهداف البحث

أهمية الدراسة البحثية :

تتجلى أهمية هذه الدراسة في سعيها لاستخدام مستخلصات نباتية كبدائل صديقة للبيئة في تصبيغ الكائنات المجهرية، وخاصة الفطريات الخمائر والبكتيريا.

كما تهدف إلى تقييم مدى فعالية هذه الصبغات الطبيعية مقارنة بالصبغات الكيميائية التقليدية مثل صبغة غرام، مع فهم العوامل المؤثرة على تفاعل الصبغة مع التركيب الجداري لهذه الكائنات من خلال هذه الدراسة، يمكن تطوير تقنيات تصبيغ طبيعية آمنة تستخدم في المختبرات التعليمية الطبية، والصناعية، خاصة في الدول التي تسعى لتقليل الاعتماد على المستوردات الكيميائية عالية التكلفة والخطورة.

أهداف البحث :

1-استخلاص صبغات نباتية طبيعية باستخدام الكحول من مصادر نباتية متوفرة محليا تشمل الكركم الشمندر السبانخ، الكركديه والملفوف الأحمر.

2-تقييم فعالية الصبغات النباتية في تصبيغ الكائنات المجهرية من ثلاثة أنماط مختلفة هي: الفطريات البكتيريا موجبة غرام، والخمائر.

3-تحليل تأثير التركيب الجدار الخلوي لكل نوع من هذه الكائنات على قابليته لامتصاص الصبغات النباتية الطبيعية.

4-مقارنة فعالية الصبغات النباتية مع الصبغات الاصطناعية الشائعة مثل صبغة غرام، من حيث القدرة على التمييز البصري والوضوح تحت المجهر.

5-اقتراح تحسينات مستقبلية على طرق التصبيغ النباتية بناءً على النتائج المعملية، وفتح المجال لاستخدامها في التطبيقات التعليمية والبحثية.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

استعراض المراجع

تناولت العديد من الدراسات العلمية على مدار العقدين الأخيرين إمكانيات استخدام الصبغات النباتية الطبيعية كبدائل لصبغات المختبر الكيميائية، خاصة في مجالات الميكروبيولوجيا، علوم الأنسجة، والصناعات الصيدلانية. وقد اثبتت هذه الدراسات فعالية بعض المستخلصات النباتية في تصبيغ مكونات خلوية معينة، إلا أن استجابة الكائنات المجهرية لهذه الصبغات تباينت بشكل ملحوظ وفقا لنوع الكائن وتركيب جدرانه الخلوية.

1-دراسات على الكركم(*Curcuma longa*)

هدفت دراسة (9) (2015) *Gul & Bakht* إلى تقييم النشاط المضاد للميكروبات لمستخلص الكركم Curcuma (longa) واستكشاف إمكانية استخدامه كمادة حافظة طبيعية في الصناعات الغذائية تم تحضير المستخلص باستخدام مذيبات مختلفة، من ضمنها الإيثانول والماء، تم اختبرت فعاليته ضد مجموعة من البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام مثل *Staphylococcus aureus Pseudomonas aeruginosa Escherichia coli*، وذلك باستخدام طريقة قرص الانتشار أظهرت النتائج أن المستخلص خصوصا الإيثانولي، يمتلك نشاطا مضادًا للميكروبات، وكان تأثيره أكبر على البكتيريا الموجبة لصبغة غرام. وقد غزي هذا النشاط إلى وجود مركبات فعالة كيميائيا، وأهمها الكركومين خلصت الدراسة إلى أن الكركم يعد خيارا واعدا كمادة طبيعية مضادة للميكروبات ويمكن إدراجه ضمن مكونات الأغذية بهدف تعزيز سلامتها وجودتها دون الحاجة إلى المواد الحافظة الكيميائية.

2-دراسات على الكركديه(*Hibiscus sabdariffa*):

في دراسة (10) (2013) ، *Jung et al*, تم التركيز على الكركديه (*Hibiscus sabdariffa L*) من خلال تحليل خصائصه الفيزيائية والكيميائية، بالإضافة إلى اختبار نشاطه المضاد للميكروبات.

نشاطا مضادا للأكسدة عال بسبب غناه بالمركبات الفينولية وتأثيراً مثبطا لنمو بعض البكتيريا، مما يشير إلى إمكانية استخدامه كمضاد ميكروبي طبيعي حيث يحتوي الكركديه على مركبات طبيعية فعالة لها خصائص مضادة للميكروبات ومضادة للأكسدة، ما يجعله مرشحًا جيدا للاستخدام في المجالات الغذائية والصحية.

3-دراسات على الملفوف الأحمر والشمندر

تستعرض دراسة (11) (2021). *Hartika et al* استخدام الصبغات الطبيعية كمكونات بديلة للصبغات الكيميائية في تقنيات التلوين النسجي (*Histological Staining*) بهدف البحث إلى تلخيص أنواع المواد الطبيعية المستخلصة من النباتات، والتي يمكن استخدامها لتلوين الأنسجة الحيوية، وتقييم فعاليتها وخصائصها التلوينية من حيث الثبات، التباين، والأمان البيئي والصحي.

وتتضمن الدراسة أيضا الإشارة إلى:-

الشمندر (*Beetroot*) كمصدر لمركب البيتالين (*betalain*) وهو صبغة حمراء طبيعية فعالة.

الملفوف الأحمر (*Red cabbage*) كمصدر غني بمركبات الانثوسيانين، والتي تظهر خصائص تلوينية جيدة تعتمد على درجة الحموضة.

تشير المراجعة إلى أن الصبغات النباتية الطبيعية، بما في ذلك الشمندر والملفوف الأحمر، تعد بدائل واعدة لصبغات الأنسجة التقليدية، نظرًا لخواصها الحيوية والبيئية الإيجابية، وإمكان تعديل لونها بحسب pH الوسط.

4-الدراسات المقارنة الصبغة غرام:

بينت أبحاث متعددة، مثل دراسة (12) (2001) ,*Beveridge*، أهمية الخصائص الكيميائية والفيزيائية لصيغة غرام في التصبيغ الفعال للبكتيريا، خصوصاً دور اليود كعامل تثبيت في الحفاظ على الصبغة البنفسجية داخل جدار البيتيدوغليكان السميك.

تظهر هذه الدراسة كيف أن الصبغات النباتية تفتقر إلى هذه الخاصية، مما يجعلها غير فعالة في تصبيغ البكتيريا دون تعديل كيميائي.

جدول رقم (1): مقارنة بين الصبغات النباتية وصبغة غرام

صبغات نباتية	صبغة غرام	الخاصية	
متوسطة، تتفاوت حسب نوع الصبغة	عالية – خاصة للتشخيص	الكفاءة	.1
تحدها مكونات الجدار	تعتمد على تركيب الجدار	القابلية للاختراق	.2
آمنة غير سامة	تحتوي على مكونات سامة نسبياً	الأمان البيئي	.3
منخفضة مواردها متوفرة	اعلى نسبياً	التكلفة	.4
استخدامات تشخيصية/ علاجية / تجميلية	تصنيف بكتريا موجبة/ سالبة غرام	الهدف	.5
متنوع ، اصفر، احمر ، ازرق حسب لون النبات	بنفسجي لموجب غرام / وردي– احمر لسالب غرام	اللون	.6
انثوسيانين، كركمين ، فلافونويد ، بيتالين	كريستال فايوليت اليود، سفرانين	التركيب الكيميائي	.7
يتفاعل كيميائياً / فيزيائياً مع الجدار والبروتينات	يرتبط بالببتديوغليكان الكثيف	طريقة التفاعل	.8

الاستخدامات الرئيسية

1–تلوين الخلايا: استخدم الأصباغ النباتية، مثل الأنثوسيانين والبيتالين التلوين الخلايا، مما يسهل رؤية التفاصيل الدقيقة عند استخدامها تحت المجهر.

2–تحديد الهياكل الخلوية: تعمل بعض الأصباغ على تلوين أجزاء محددة من الخلايا، مثل النواة أو الجدار الخلوي، مما يتيح للباحثين تحديد مكونات مختلفة.

3–فحص الكائنات الحية الدقيقة: تستخدم الأصباغ النباتية في تحليل الكائنات الحية الدقيقة، مثل البكتيريا والفطريات، حيث يمكن استخدامها لتسهيل التمييز بين الأنواع المختلفة.

4-الدراسات الطبية: تستخدم الأصباغ النباتية في الأبحاث الطبية لدراسة تغيرات الخلايا المرتبطة بالأمراض مثل السرطان، حيث تساعد في رؤية التغيرات في البنية الخلوية(13).

5-صديقة للبيئة: كونها مستخلصة من مصادر طبيعية، فإن الأصباغ النباتية تعتبر أقل سمية وأقل تأثيرا على البيئة مقارنة بالأصباغ الاصطناعية (14).

6-تطبيقات التعليمية: أستخدم الأصباغ النباتية في المختبرات التعليمية التعليم الطلاب عن الهياكل الخلوية، مما يسهل الفهم من خلال التجارب العملية.

مزايا الصبغات النباتية

1-الطبيعة الطبيعية: الصبغات النباتية تستخرج من مصادر طبيعية، مما يجعلها أكثر أمانا في بعض التطبيقات مقارنة بالصبغات الصناعية.

2-تعدد الاستخدامات: يمكن أن تستخدم الصبغات النباتية لتصبيغ مجموعة واسعة من الخلايا، سواء كانت فطرية أو نباتية، بينما تستخدم صبغة غرام بشكل رئيسي للبكتيريا.

3-التحسس والانتقائية بعض الصبغات النباتية يمكن أن تقدم طيفًا أوسع من التفاعلات مع مكونات الخلية، مما يساعد في الكشف عن مكونات أو بنى معينة داخل الخلايا.

4-الأمان البيئي: الصبغات النباتية غالباً ما تكون أقل تأثيراً على البيئة، مما يجعل استخدامها مفضلا في بعض التطبيقات البينية أو التعليمية.

5-التفاعل مع الترسبات: الصبغات النباتية قد ترتبط بشكل أقوى مع بعض الترسبات أو المركبات في الخلايا، مما يساعد في تعزيز وضوح الأجزاء المختلفة.

6-تنوع الألوان: توفر الصبغات النباتية مجموعة متنوعة من الألوان، مما يمكن أن يساعد في دراسة الأنسجة المختلفة وتمييز مكونات مختلفة داخل العينة.

7-البساطة في الاستخدام: في بعض الحالات قد تكون عملية التحضير والتطبيق للصبغات النباتية أبسط مقارنة بطريقة صبغة غرام، خاصة في بيئات التعليم.

العيوب والمخاطر:

1-التأثيرات السلبية على الخلايا: قد تسبب بعض الصبغات النباتية سمية للخلايا، مما يؤدي إلى تغيير في نشاطها أو موتها عند تعرضها لتركيزات عالية.

2-تفاعل مع المركبات الخلوية: يمكن أن تتفاعل الصبغات مع مكونات الخلايا مثل البروتينات أو الأحماض النووية، مما قد يؤثر على النتائج ويشوه صورة هياكل الخلايا.

3-غير محددة في التلوين: بعض الصبغات قد لا تكون نوعية جداً، مما يؤدي إلى تلوين الخلايا أو الهياكل غير المستهدفة، مما يصعب تحليل البيانات.

4-الإشارة غير المتكررة: قد تختلف نتائج التلوين من تجربة الأخرى بناءً على الظروف، مما يجعل التكرار وتحقيق الشفافية في النتائج تحدياً.

5-صعوبة التقييم الكمي: بعض الصبغات قد لا تسمح بتقييم كمي دقيق، مما يصعب قياس تأثيرات معينة بشكل موضوعي.

6-الاحتياج لمهارات خاصة: يتطلب الاستخدام الفعال للصبغات مهارات فنية وتجريبية، مما قد يزيد من تعقيد العملية.

7-الحاجة إلى التثبيت: بعض الصبغات تحتاج إلى خلايا مثبتة مسبقاً مما قد يؤثر على جودة العينة ويغير من الخصائص الخلوية المرغوبة.

8-تأثيرات على التركيب الكيميائي: في بعض الأحيان يمكن أن تتسبب الصبغات في تغيير التركيب الكيميائي للعينات، مما يؤثر على النتائج المستخلصة من التجارب.

التأثيرات الهامة للصبغات النباتية على الخلايا والمركبات البيولوجية

1-التلوين والتحليل

-تمييز الخلايا تساعد الصبغات النباتية في تمييز الهياكل الخلوية المختلفة (مثل النواة ، السيتوبلازما الخ.)، مما يسهل الفحص تحت المجهر.

-تحليل التركيب يمكن استخدام الصبغات للكشف عن المكونات الكيميائية الحيوية في الخلايا مثل البروتينات والأحماض النووية.

2-تأثيرات سامة:

-التأثيرات السلبية: بعض الصبغات النباتية قد تكون لها تأثيرات سامة على الخلايا عند استخدامها بتركيزات عالية مما يؤدي إلى تلف الخلايا أو موتها.

-التأثيرات على النشاط الخلوي يمكن أن تؤثر الصبغات أيضًا على العمليات الحيوية مثل النمو والانقسام الخلوي.

3-تأثيرات على التفاعلات البيوكيميائية

-التداخل مع التفاعلات يمكن أن تتداخل الصبغات مع تفاعلات الإنزيمات أو البروتينات، مما يؤدي إلى تغيير نشاطها.

-الارتباط مع المكونات الخلوية قد ترتبط الصبغات بالمكونات الخلوية مما يغير من خصائصها أو فعاليتها.

4-تأثيرات مضادة للبكتيريا

-بعض الصبغات النباتية تمتلك خصائص مضادة للبكتيريا أو مضادة للفطريات، مما يساعد في دراسات الأمراض والمسببات المرضية (15).

5-تطبيقات في العلوم الحيوية

-الصبغات النباتية تستخدم في الأبحاث الطبية (16) ، وتساعد في فهم العمليات الحيوية، مثل تفاعل الأدوية مع الخلايا أو كيفية استجابة الخلايا للمنبهات المختلفة.

طرق استخراج الصبغات النباتية:

1-الاستخراج بالماء (الغليان):

تستخدم هذه الطريقة مع النباتات التي تحتوي على صبغات قابلة للذوبان في العام يتم على الأجزاء النباتية (مثل الأوراق أو الأزهار) في الماء لفترة معينة، ثم يتم تصفية السائل لاستخراج الصيغة.

2-الاستخراج بالكحول:

استخدم هذه الطريقة لاستخراج الصبغات من النباتات التي تحتوي على مركبات غير قابلة للذوبان في الماء. يتم نقع الأجزاء النباتية في كحول (مثل الايثانول) لفترة معينة، ثم يتم تصفية السائل (17).

3-الاستخراج بالزيوت:

يمكن استخدام الزيوت النباتية لاستخراج الصبغات من النباتات الزيتية يتم تسخين الزيت مع الأجزاء النباتية لفترة معينة، مما يسمح للصبغات بالانتقال إلى الزيت

4-الاستخراج بالمذيبات العضوية:

تستخدم مذيبات مثل الأسيتون أو الإيثيل أسيتات لاستخراج الصبغات من النباتات يتم نقع الأجزاء النباتية في المذيب، ثم يتم تصفية السائل.

5-الاستخراج بالتسريب (النقع):

يتم نقع الأجزاء النباتية في سائل مثل الماء أو الكحول) لفترة زمنية طويلة، مما يسمح للصبغات بالانتقال إلى السائل.

6-الاستخراج بالتبخير:

بعد استخراج الصبغة باستخدام إحدى الطرق السابقة، يمكن تبخير السائل الإزالة المذيبات مما يترك وراءه الصبغة المركزة.

7-استخدام الضغط (الضغط البارد):

في بعض الحالات، يمكن استخدام الضغط لاستخراج الزيوت والصبغات من النباتات يتم تطبيق الضغط على الأجزاء النباتية، مما يسمح للصبغات بالخروج

8-التقنيات الحديثة:

هناك أيضا تقنيات حديثة مثل الاستخراج بالموجات فوق الصوتية أو الاستخراج باستخدام ثاني أكسيد الكربون فوق الحرج، والتي توفر كفاءة أعلى في استخراج الصبغات (18).

تفاعل التركيب الكيميائي للصبغات النباتية مع التركيب الكيميائي لجدران خلايا البكتيريا والفطريات هناك بعض النقاط الرئيسية

1-الصفات النباتية: الصبغات الأكثر شيوعا في النباتات هي الكلوروفيل المسؤول عن عملية التمثيل الضوئي) والانثوسيانينات والكاروتينات. هذه الصبغات تشمل مجموعات كيميائية مثل الكربون الهيدروجين والأكسجين، بالإضافة إلى تركيبها المعقد الذي يربطها بالعضيات السيتوبلازمية.

2-جدران الخلايا البكتيرية: تتكون جدران الخلايا في البكتيريا أسانا من الببتيدوعليكان هذا التركيب الكيميائي له خصائص تفاعلية خاصة يمكن أن تتفاعل مع المركبات العضوية وبالتالي تستطيع تحديد البكتريا الموجبة لغرام والسالبة (19).

الصبغات النباتية يمكن أن تتفاعل مع مكونات الجدار البكتيري، مما يؤثر على الحواجز الخلوية وقدرتها على النفاذية. بعض الدراسات تشير إلى أن الصبغات قد تؤثر على قدرة البكتيريا على النمو أو حتى أن تكون لها تأثيرات مضادة للبكتيريا.

3-جدران الخلايا الفطرية: جدران الخلايا الفطرية تتكون بشكل رئيسي من الكايتين والبيتا- غلوكان. هذه التركيبة الكيميائية تجعلها قادرة على التفاعل مع الصبغات عن طريق الربط الكيميائي أو التفاعل الفيزيائي، مما قد يؤدي إلى تغيير خصائص الصبغات أو التأثير على اللون أو القابلية للذوبان.

4-التفاعلات الكيميائية: الالتصاق والامتصاص الصبغات قد تلتصق بالجدران الخلوية أو تمتص في بنيتها، مما قد يؤدي إلى تغيرات في لون الجدار أو الخصائص الوظيفية.

التأثير على النشاط الحيوي بعض الصبغات، مثل المركبات الفينولية، قد تؤثر على النشاط الحيوي للبكتيريا أو الفطريات من خلال التأثير على إنزيماتها أو عملياتها الأيضية (20) & (21).

5-أهمية الصبغات: قد يكون للصبغات النباتية أهمية كبيرة في تطوير المضادات الحيوية أو المكافحات الحيوية ضد الفطريات والبكتيريا (22).

التركيب الكيميائي لجدران الاحياء المجهرية:

أولاً: جدار الخلايا البكتيرية يختلف بين البكتيريا الموجبة غرام والبكتيريا السالبة غرام، وهذا الاختلاف يتسبب في اختلاف الخصائص الفيزيائية والكيماوية لكل نوع:

التركيب الكيميائي لجدار الخلايا:

1-البكتيريا الموجبة غرام(*Gram-positive Bacteria*)

"Staphylococcus aureus":

تعد *Staphylococcus aureus* واحدة من أكثر أنواع البكتيريا المسببة للأمراض شيوعا في الإنسان، وتوجد بشكل طبيعي على الجلد وفي الممرات الأنفية تتمتع هذه البكتيريا بتركيب جدار خلوي فريد يجعلها من النوع موجب غرام، وقد جذبت اهتمامًا بحثيا واسعاً لدراسة تأثير الصبغات النباتية عليها كوسيلة بديلة أو متممة للمضادات الحيوية خاصة في ظل مقاومة الأدوية المتزايدة.

التركيب الجداري لبكتيريا*Staphylococcus aureus* جدار خلية *S.aureus* يتكون بشكل رئيسي من:

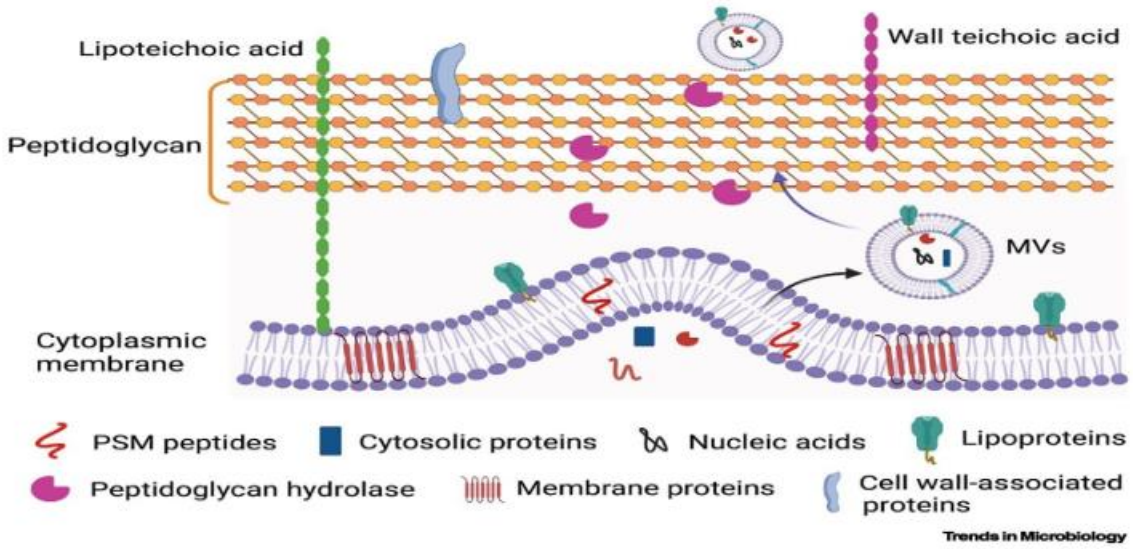
1-الببتيدوغليكان ***(Peptidoglycan)*** : يشكل أكثر من 50% من وزن الجدار، ويمنحه القوة والصلابة.

2-التيكويك أسيد *(Teichoic acid)* : مكون سطحي يساهم في التفاعل مع الصبغات والمضادات الحيوية.

3-الليبوتيكويك أسيد *(Lipoteichoic acid)*: يربط الغشاء السيتوبلازمي بالجدار الخلوي.

4-البروتينات السطحية *(Surface proteins)*: مثل بروتين A الذي يساعدها في تجنب الاستجابة المناعية.

هذا التركيب يجعل الجدار أكثر سمكا من البكتيريا سالبة غرام، وبالتالي يظهر لونا أزرق – بنفسجياً في صبغة غرام.



صورة رقم (1) : تركيب جدار البكتريا موجبة غرام

2-البكتيريا السالبة غرام(*Gram-negative Bacteria*)

"Pseudomonas oryzihabitans":

تعد *Pseudomonas oryzihabitans* من البكتيريا الهوائية سالبة غرام، تنتمي لعائلة *Pseudomonadaceae* اكتشفت لأول مرة في نباتات الأرز، لكن وجد لاحقا أنها قد تسبب عدوى في البشر، خصوصا لدى مرضى نقص المناعة. تتسم هذه البكتيريا بلون أصفر ليموني مميز عند نموها في المزارع، كما أنها مقاومة للعديد من المضادات الحيوية.

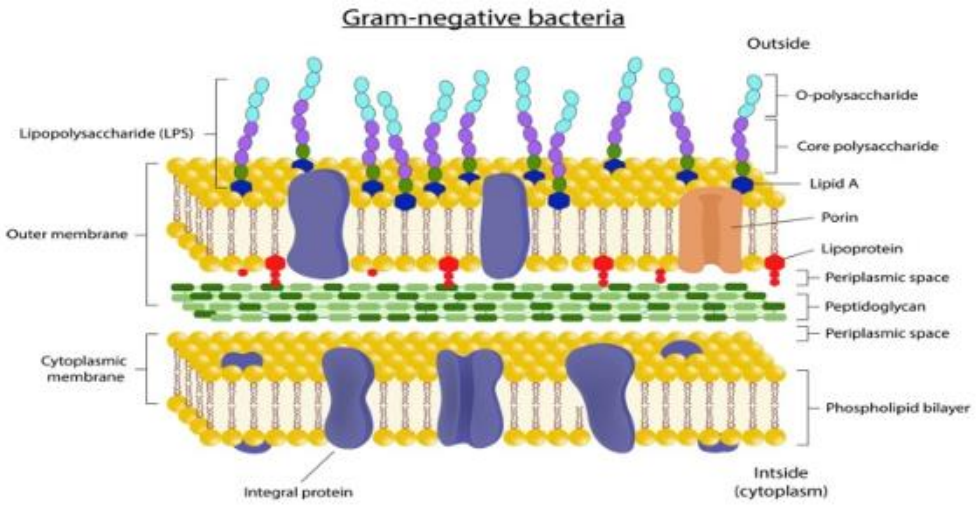
تركيب جدار الخلية في*P.oryzihabitans*

يتكون جدار الخلية في البكتيريا سالبة غرام مثل *P.oryzihabitans* من طبقة رقيقة من الببتيدو غليكان، تقع بين غشاءين دهنيين (داخلي وخارجي). يحتوي الغشاء الخارجي على بروتينات غشائية وليبوبوليسكاريدات (LPS) ، التي تعمل كحاجز أمام الصبغات والمضادات الحيوية.

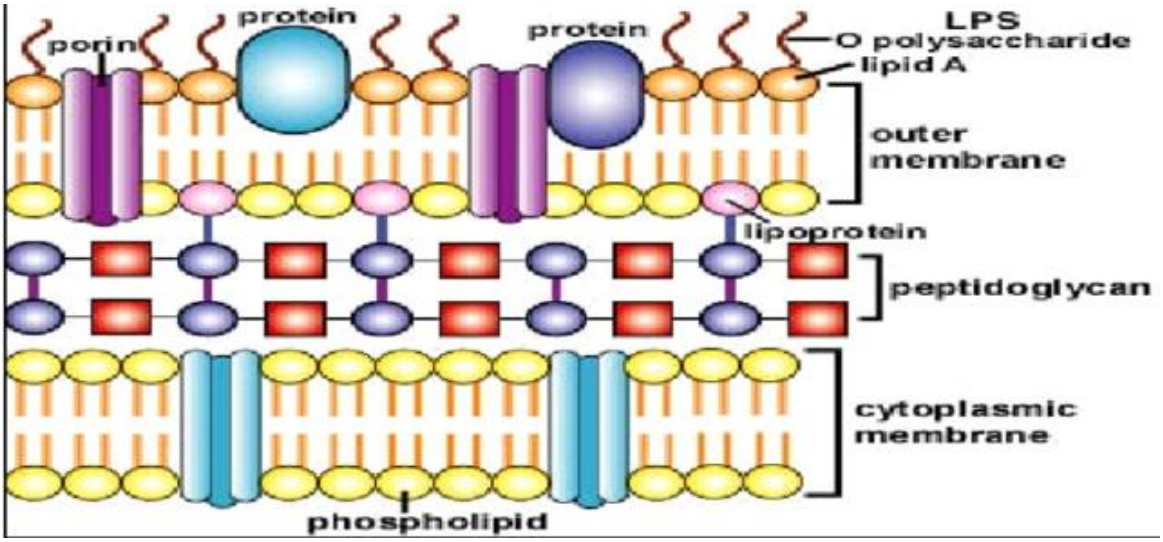
الطبقة الخارجية (*Outer Membrane*) :تحتوي على LPS المسؤول عن مقاومة البكتيريا للعوامل البيئية والصبغات.

الطبقة الوسطى (*Peptidoglycan*) :أقل سمكاً من نظيرتها في البكتيريا موجبة غرام.

الغشاء الداخلي: يحافظ على الوظائف الأيضية داخل الخلية.



صورة رقم (2) تركيب جدار البكتريا سالبة غرام



صورة رقم (3) تركيب جدار البكتريا سالبة غرام

ثانياً: جدار الخلايا الفطرية يتميز بتركيبه الكيميائي الفريد الذي يختلف عن جدران خلايا كل من البكتيريا والنباتات:

التركيب الكيميائي لجدار الفطر *Aspergillus niger* :

يُعد فطر *Aspergillus niger* أحد أكثر الفطريات شيوعًا في البيئة، وهو فطر خيطي من فصيلة الأسبرجلسات(*Aspergillaceae*) ، ويتميز بقدرته العالية على النمو في البيئات المتنوعة، إضافة إلى أهميته البيوتكنولوجية الكبيرة في مجالات الصناعة والطب. تتضمن خصائصه الفريدة تركيبا جداريًا مميزًا يُمكنه من التفاعل مع الصبغات النباتية ما جعله محورًا للعديد من الدراسات الحديثة.

التركيب الجداري لفطر*Aspergillus niger*

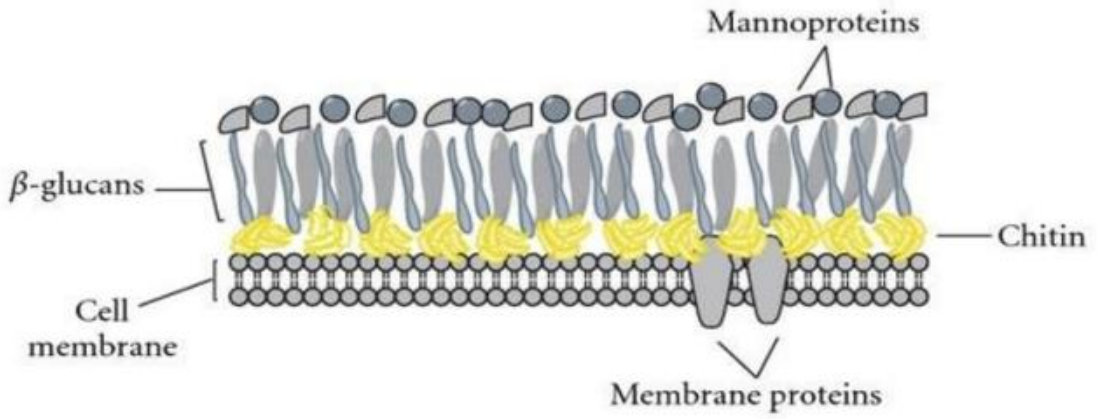
يتكوّن جدار الخلية في *Aspergillus niger* من عدة طبقات، أهمها:

1-الكيتين (*Chitin*) وهو بوليمر من*N-acetylglucosamine* ، يوفر صلابة هيكلية.

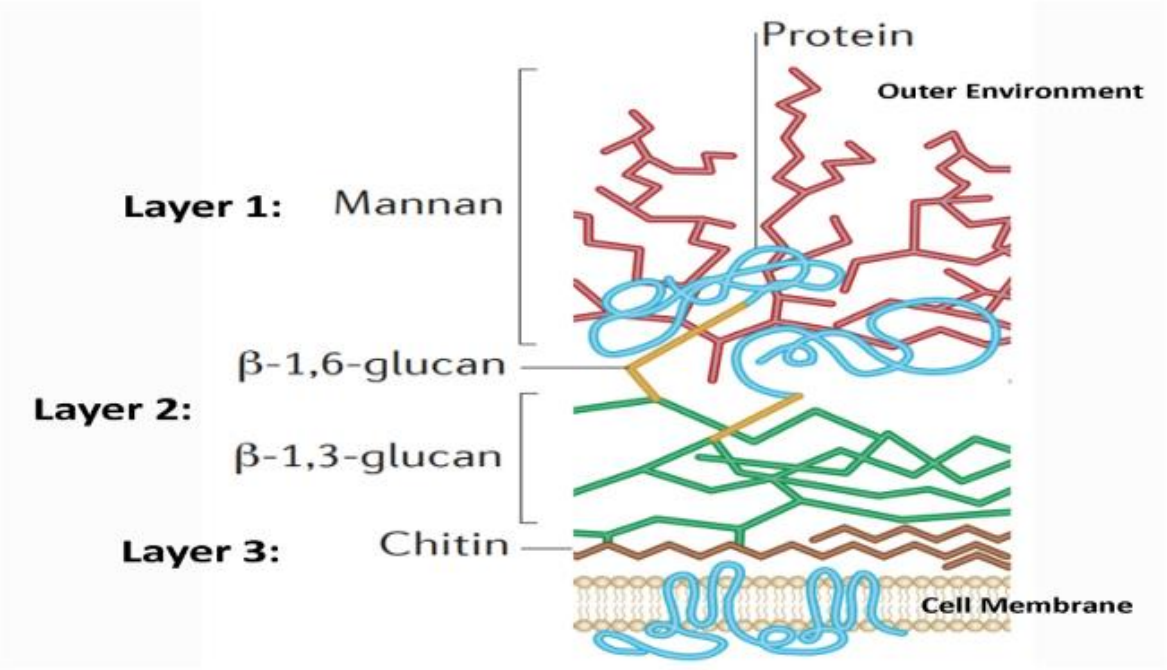
2-البيتا- غلوكان :(*B-glucans*) تساهم في المرونة والدعم البنيوي للجدار.

3-المانان والبروتينات السكرية (*Glycoproteins*) :تلعب دورًا مهمًا في التفاعلات البيئية والاستجابة المناعية.

4-الميلانين (*Melanin*) :صبغة طبيعية توجد في الجدار الخارجي، تعزز من مقاومة الفطر للعوامل البيئية.



صورة رقم (4) تركيب جدار الفطريات



صورة (5) تركيب جدار الفطريات

التركيب الكيمائي لجدار الخميرة*Candida spp* :

تُعد خميرة *Candida* من الفطريات الانتهازية التي توجد بشكل طبيعي في الجهاز الهضمي والفموي والبولي للإنسان، ولكنها قد تسبب التهابات خطيرة عند ضعف المناعة من أكثر أنواعها شيوعاً Candida *albicans*. تتميز هذه الخميرة بتركيب خلوي فريد يؤهلها للتفاعل مع الصبغات النباتية الطبيعية، ما يُعد موضوعاً هاماً في أبحاث الألوان الحيوية والتطبيقات الطبية والدوائية.

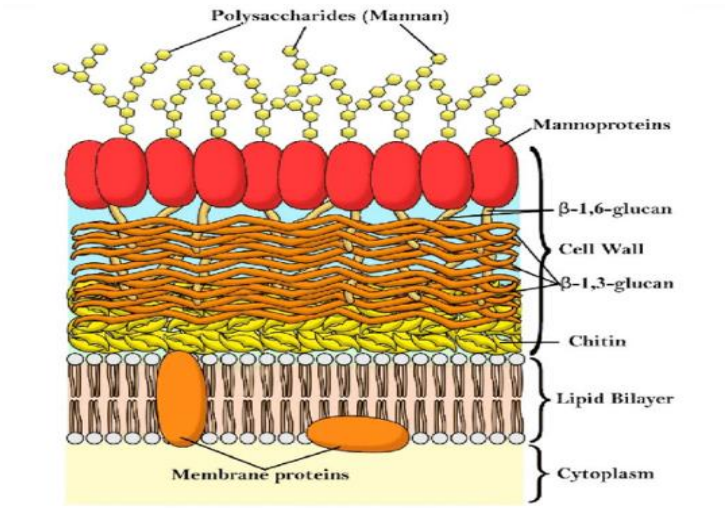
التركيب الجداري الخميرة*Candida*

يتكون جدار خلية Candida من عدة طبقات مركبة توفر الحماية والدعم الهيكلي، وتلعب دوراً أساسياً في التفاعل مع الوسط الخارجي:

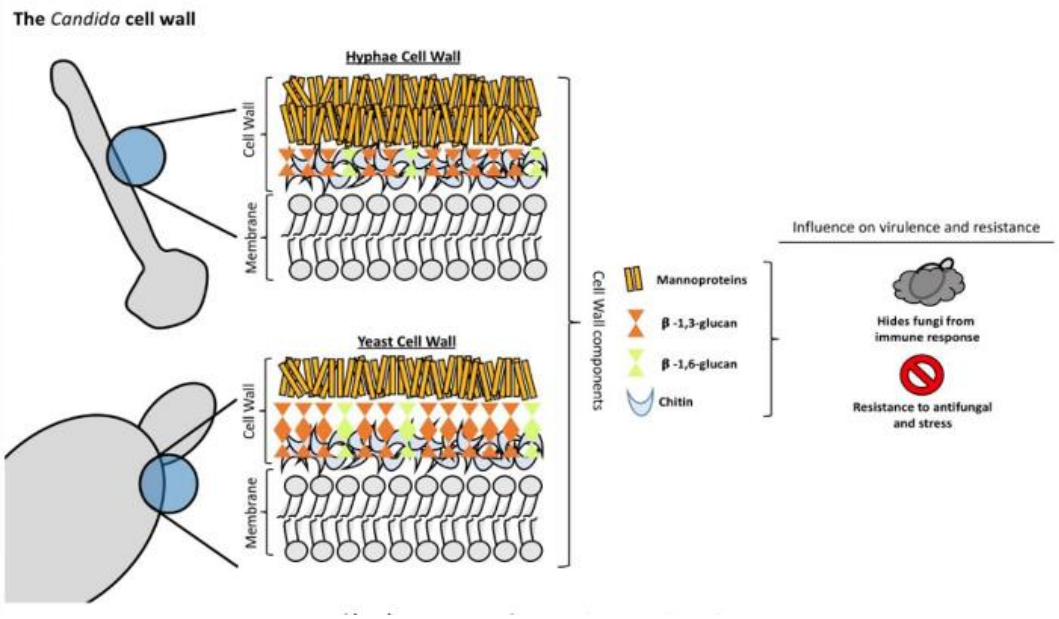
1-الطبقة الداخلية: تتكون أساساً من الكيتين (*Chitin*) والبيتا-غلوكان(*B-1,3-glucan*).

2-الطبقة الوسطى : غنية بالبيتا - غلوكان (*B-1,6-glucan*) والمانان(*Mannan*).

3-الطبقة السطحية : مغطاة بالبروتينات السكرية(*Glycoproteins*) التي تسهم في التصاق الفطر بالخلايا المضيفة.



صورة رقم (6) تركيب جدار الخميرة



صورة رقم (7) تركيب جدار الخميرة

التراكيب الكيميائية للصبغات المستخدمة

اولاً: صبغة السبانخ:

هي صبغة طبيعية تستخرج من أوراق تبات السبانخ وتستخدم في التطبيقات العلمية مثل صبغ الكائنات الحية الدقيقة أو الأنسجة النباتية. اللون الأخضر المميز للسبانخ يرجع إلى وجود مركبات الكلوروفيل (*Chlorophyll*)، وهي صبغات ضوئية أساسية في عملية التمثيل الضوئي، بالإضافة إلى مركبات ثانوية مثل الكاروتينات (مثل بيتا– كاروتين).

الاسم العلمي:

- الاسم العلمي للنبات: *Spinacia oleracea*
- الاسم العلمي المركب الرئيسي:
- الكلوروفيل أ: (*Chlorophyll a (Css Hr MgN4O5*
- الكلوروفيل ب:(*Chlorophyll b (CasHoMgN4O6*

التركيب الكيميائي أ. الكلوروفيل:

1-الكلوروفيل"أ" (*C55H7MN405*) "

- يتكون من حلقة ماكروسيكل تتضمن ذرة مغنيسيوم في مركزها.
- له مجموعة ميتيل (CH_3) في الموضع الثالث من الحلقة.
- تركيبته تعكس ضوء الشمس بشكل فعال، مما يجعله فعالا في عملية التمثيل الضوئي

2-الكلوروفيل "ب" (*C55H70MgN406*) :

- يتكون أيضا من حلقة ماكروسيكل مشابهة، لكنه يحتوي على ذرة أكسجين إضافية، مما يختلف في التركيب عن الكلوروفيل "أ."
- له مجموعة فورميل (CHO) بدلا من الميثيل في الموضع الثالث.
- يمتص الضوء بأطوال موجية مختلفة، مما يعزز كفاءة التمثيل الضوئي.

ب-الكاروتينات:

-مثل بيتا كاروتين($C_{40}H_{56}$) ، وهي مركبات هيدروكربونية تعطي ألوانا صفراء أو برتقالية.

ج- فيتامينات (K,C) وفلافونويدات مثل سبيناسين(*Spinacetin*) .

صورة رقم (8) *Spinacia oleraceae*

ثانياً: صبغة الشمندر:

هي صبغة طبيعية تستخرج من جذور نبات الشمندر تستخدم هذه الصبغة في العديد من التطبيقات، بما في ذلك تلوين الأغذية، وفي المجالات العلمية مثل صبغ الكائنات الحية الدقيقة. اللون الأحمر المميز الشمندر يرجع إلى وجود مركبات بيتالين(*Betalains*) ، وهي مجموعة من المركبات الكيميائية التي تعطي اللون الأحمر والأصفر.

الاسم العلمي:

الاسم العلمي للنبات: *Beta vulgaris*

الاسم العلمي المركب الرئيسي: بيتالين(*Betalains*) ، ويتضمن:

-بيتاسيانين (*Betalain*) :المسؤول عن اللون الأحمر.

-بيتاكزانثين (*Betaxanthin*): المسؤول عن اللون الأصفر.

التركيب الكيميائي:

تشتق صبغة الشونذر بشكل رئيسي من البيتالين(*Betalains*) ، وهي اصباغ قابلة للذوبان في الماء تنقسم إلى فئتين:

1. البيناسيانين :(*Betacyanins*) المسؤولة عن اللون الأحمر إلى البنفسجي.
2. بيتاكزانثين (*Betaxanthins*) المسؤولة عن اللون الأصفر إلى البرتقالي.

ب-بيتانين Betanin يعرف أيضا باسم(E162)

- الصيغة الكيميائية: $H_{26}\ C_{24}N_2O_{13}$
- البنية: جزيء يتكون من بيتاليدين (*Betanidin* ، الجزء غير السكري) مرتبط بجزيء جلوكوز.
- الخصائص: صيغة حمراء قرمزية مستقرة في نطاق 6-4 PH، لكنها تتحلل بالحرارة العالية أو الضوء الشديد.

مركبات أخرى موجودة في الشوندر:

فولغاكزانثين (*Vulgaxanthin*): من البيتاكزانثين، يمنح لولا أصفر.

-احماض فينولية (مثل حمض الكلوروجينيك).

فلافونويدات (مثل الكيرسيتين).

فيتامينات (مثل فيتامين C) ومعادن (البوتاسيوم، المغنيسيوم).

صورة رقم (9)*Beta vulgaris*

ثالثاً: صبغة الكركديه:

صبغة الكركديه هي صبغة طبيعية تُستخرج من الأجزاء الزهرية لنبات(*roselleأو Jamaican sorrel* ، *أوjava jute*)، وتُستخدم في التطبيقات الغذائية والدوائية، بالإضافة إلى استخدامها كصبغة طبيعية في المجالات العلمية مثل صبغ الكائنات الحية الدقيقة أو الأنسجة النباتية اللون الأحمر المميز للكركديه يعود إلى وجود مركبات الأنثوسيانين(*Anthocyanins*) ، وهي صبغات قابلة للذوبان في الماء، بالإضافة إلى أحماض عضوية مثل حمض الستريك وحمض الهيبسكوس(*Hibiscus acid*).

الاسم العلمي:

-الاسم العلمي للنبات: *Hibiscus sabdariffa*

-الاسم العلمي للمركب الرئيسي:

-الأنثوسيانين (مثل دلفينيدين – 3- جلوكوسيد وسيانيدين-3- جلوكوسيد).

-حمض الهيبسكوس.(*Hibiscus acid*)

التركيب الكيميائي:

1-الأنثوسيانين:

-الصيغة الكيميائية العامة : $C_{15}H_{11}O_6$ (تختلف حسب نوع الجليكوسيد).

-البنية : تتكون من حلقة فلافونويد مرتبطة بسكر (مثل الجلوكوز).

-اللون: تظهر ألوانًا حمراء أو أرجوانية حسب درجة الحموضة.(pH)

2-الأحماض العضوية

-حمض الستريك ($C_6H_8O_7$).

-حمض الهيبسكوس (حمض عضوي فريد في الكركديه).

3-الفلافونويدات

-مثل الكيرسيتين (*Quercetin*) والروتين.(*Rutin*)

4- فينولات : بروتوكاتشويك أسيد (*Protocatechuic acid*).

صورة رقم (10) ***Hibiscus sabdariffa***

رابعاً: صبغة الكركم:

هي صبغة طبيعية تُستخرج من جذور نبات الكركم، وهي تُستخدم على نطاق واسع في التلوين الطبيعي للأغذية والمنسوجات، وفي المجالات العلمية مثل صبغ الكائنات الحية الدقيقة الكركم يحتوي على مركبات كيميائية نشطة بيولوجيا ، أهمها الكركمين(*Curcumin*) ، وهو المسؤول عن اللون الأصفر المميز للكركم.

الاسم العلمي:

-الاسم العلمي للنبات: *Curcuma longa*

-الاسم العلمي للمركب الرئيسي الكركمين:(*Curcumin*)

التركيب الكيميائي:

الكركمين هو المركب الرئيسي في الكركم، وتركيبه الكيميائي هو:

-الصيغة الكيميائية: $C_{21}H_{20}O_6$.

-البنية الكيميائية: يتكون الكركمين من مجموعتين من الهيدروكسي فينيل مرتبطتين بمجموعة دايكيتون (*diketone*)عبر سلسلة كربونية.

-مركبات أخرى*Demethoxycurcumin* :

.Bisdemethoxycurcuming

صورة رقم (11)*Curcuma longa*

خامساً: صبغة الملفوف الأحمر:

الاسم العلمي*Brassica oleracea var. capitata f. rubra* :

التركيب الكيميائي:

الصبغة الأساسية في الملفوف الأحمر هي الأنثوسيانين

(*Anthocyanins*)، وهي مجموعة من المركبات الفينولية القابلة للذوبان في الماء. أشهرها في الملفوف الأحمر:

1-سيانيدين-3- جلوكوزيد.(*Cyanidin-3-glucoside*).

2-سيانيدين-3-ديجلوكوزيد.(*Cyanidin-3-diglucoside*).

3-مشتقات أخرى مثل بيونيدين (*Peonidin*) ودلفينيدين(*Delphinidin*).

التركيب الجزيئي العام للأنثوسيانين:

-هيكل أساسي: الفلافيليوم(*Flavylium ion*) ، وهو حلقة أروماتية تحتوي على مجموعة أوكسونيوم(O+).

-ترتبط به مجموعات هيدروكسيل (OH−) وجليكوسيدات (سكريات مثل الجلوكوز)، والتي تحدد لون الصبغة واستقرارها.

مزايا صبغة الملفوف الأحمر:

1-طبيعية وغير سامة:

-تُستخلص من نبات ،آمن مما يجعلها مثالية للاستخدام في التجارب المدرسية أو المنزلية دون مخاطر صحية.

2-تطبيقات مجهرية واسعة

-تبرز تفاصيل الخلايا (مثل الجدار الخلوي في النباتات أو أغشية البكتيريا) بسبب تفاعلها مع مكونات الخلايا.

-تُظهر تباينا لونيًا بين الخلايا الحية والميتة.

3-حساسية لدرجة الحموضة:(*pH Indicator*)

- تغير لونها وفقًا للوسط الكيميائي
- أحمر/ وردي في الوسط الحمضي(PH<7).
- بنفسجي في الوسط المتعادل (PH=7).
- أزرق / أخضر في الوسط القلوي(PH>7).
- تُستخدم كمؤشر طبيعي لاختبار الأحماض والقواعد.

4-خصائص مضادة للأكسدة:

-تحتوي الأنثوسيانين على خصائص مضادة للالتهابات والأكسدة، مما قد يفيد في الدراسات البيولوجية المتقدمة.

5-سهولة الاستخلاص والتخزين:

-تُستخلص باستخدام ماء أو كحول دون حاجة إلى معدات معقدة.

-تُخزن في الثلاجة لأسابيع دون فقدان الفعالية.

6-صديقة للبيئة:

-بديل آمن للصبغات الصناعية (مثل صبغة الغرام) التي تحتوي على مواد كيميائية ضارة.

7- تكلفة منخفضة

صورة رقم (12)*Red cabbage*

الفصل الثالث

المواد وطريقة العمل

المواد وطريقة العمل:

المواد والأجهزة المستعملة:

أولاً: المواد النباتية المطلوب استخلاص صبغتها وتشمل (الكركم، الشمندر، الكركديه السبانخ، والملفوف الأحمر).

ثانياً: الكحول الاثيلي تركيز 70% بحجم 500ml.

ثالثاً: دوارق زجاجية معقمة *flask* و اوراق ترشيح معقمة وعلب زجاجية داكنة لحفظ الصبغات

رابعاً: عينات للبكتريا والفطريات مُحضرة مُسبقاً او جاهزة.

خامساً: شرائح زجاجية *Slides* و *Cover slides* .

سادساً: الكابينة المعقمة *Hood* و مجهر ضوئي لفحص الصبغات*Microscopy* .

طريقة العمل:

1-طريقة استخراج صبغة السبانخ باستخدام الكحول:

أ. مواد العمل:

-أوراق سبانخ طازجة.

-كحول إيثيلي 70%.

-سكين تقطيع، خلاط كهربائي.

-ورق ترشيح

-دورق زجاجي.

-شرائح زجاجية.

-عينات لإحياء مجهرية.

صورة رقم (13): مستخلص السبانخ المُحضر

ب-الخطوات:

1-تحضير الأوراق:

- تغسل أوراق السبانخ جيدا بالماء لإزالة الأتربة.
- تقطع الأوراق إلى قطع صغيرة لزيادة سطح التلامس مع الكحول

2-طحن الأوراق

لطحن الأوراق باستخدام خلاط كهربائي حتى تصبح معجوناً ناعماً.

-تضاف كمية صغيرة من الكحول أثناء الطحن لتحسين استخلاص الصبغة.

3-نقع العجينة في الكحول

-يوضع المعجون في وعاء زجاجي ويضاف الكحول الإيثيلي (بنسبة 3:1من الكحول إلى كتلة السبانخ).

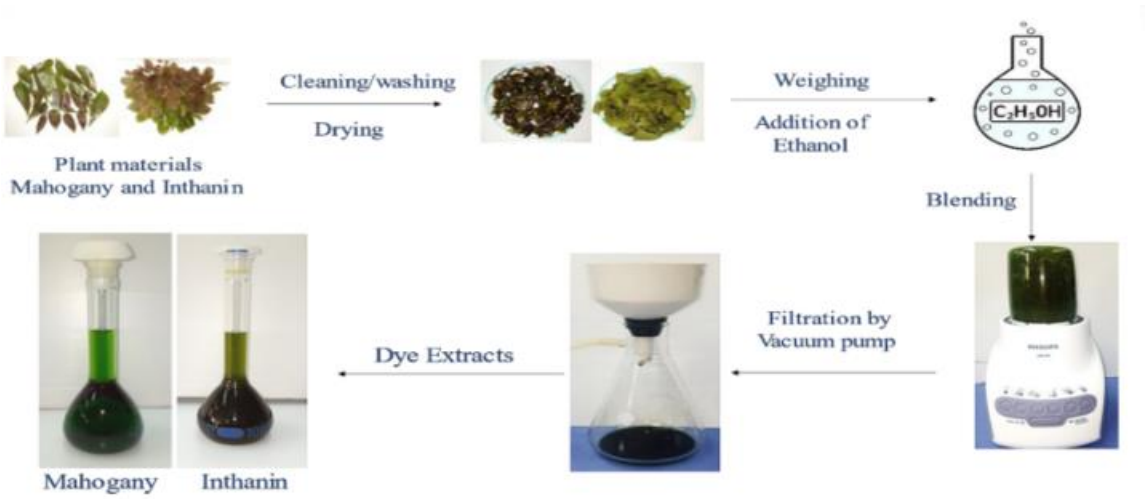
-يتم تغطية الوعاء بإحكام لمنع تبخر الكحول.

4-التحريك والاستخلاص:

يترك الخليط لمدة 24-48 ساعة في مكان مظلم مع التحريك كل 6-8 ساعات (يساعد الكحول على إذابة الكلوروفيل والكاروتينات من الخلايا النباتية).

5-الترشيح:

-يصفى الخليط عبر ورق الترشيح لإزالة المواد الصلبة.



صورة رقم (14) : طَريقة تَحضير الصبغات النباتية

ج. حفظ الصبغة:

-يتم حفظ الصبغة في زجاجة داكنة اللون لحمايتها من الضوء الذي يحطم الكلوروفيل).

استخدام صبغة السبانخ في صبغ الكائنات الحية الدقيقة:

-تحضير العينة

1-تحضر شريحة مجهرية تحتوي على الكائنات الدقيقة المراد صبغها في حالة البكتريا الموجبة لصبغة غرام *Staphylococcus aureus* وفي حالة البكتريا السالبة لصبغة غرام*Pseudomonas oryzihabitans* .

-تخلط المسحة البكتيرية بواسطة ال *loop* مع قطرة من الماء المقطر المعقم ثم تترك لتجف في الهواء.

-تضاف بضع قطرات من صبغة السبانخ إلى العينة وتتركها لمدة 2-3 دقائق لكي تجف وبعد ذلك تغطى بال *Cover slide* وتحضر للفحص المجهري.

2-في حالة الفطريات والخمائر تضاف الصيفة أولاً للشريحة الزجاجية ثم تضاف المسحة من الفطر *Aspergillus niger*بواسطة ال *loop* وتترك لتجف بعد ذلك نضع ال *Cover slide* على العينة وتجهيزها للفحص المجهري.

والخمائر تضاف قطرة من صيغة السبانخ وبعد ذلك باستخدام ال*loop* تضاف مسحة من خميرة ال *Candida spp*وتترك لتجف ونضع ال *Cover slide* وتجهز الفحص المجهري.

-الفحص المجهري:

-تفحص العينة تحت المجهر الضوئي تحت قوى المجهر 40X بالنسبة لعينات القطريات و100 X بالنسبة لعينات البكتريا.

2-طريقة استخراج صبغة الشمندر باستخدام الكحول:

1-مواد العمل:

-جذور الشمندر الطازجة.

-كحول إيثيلي إيتانول 70%.

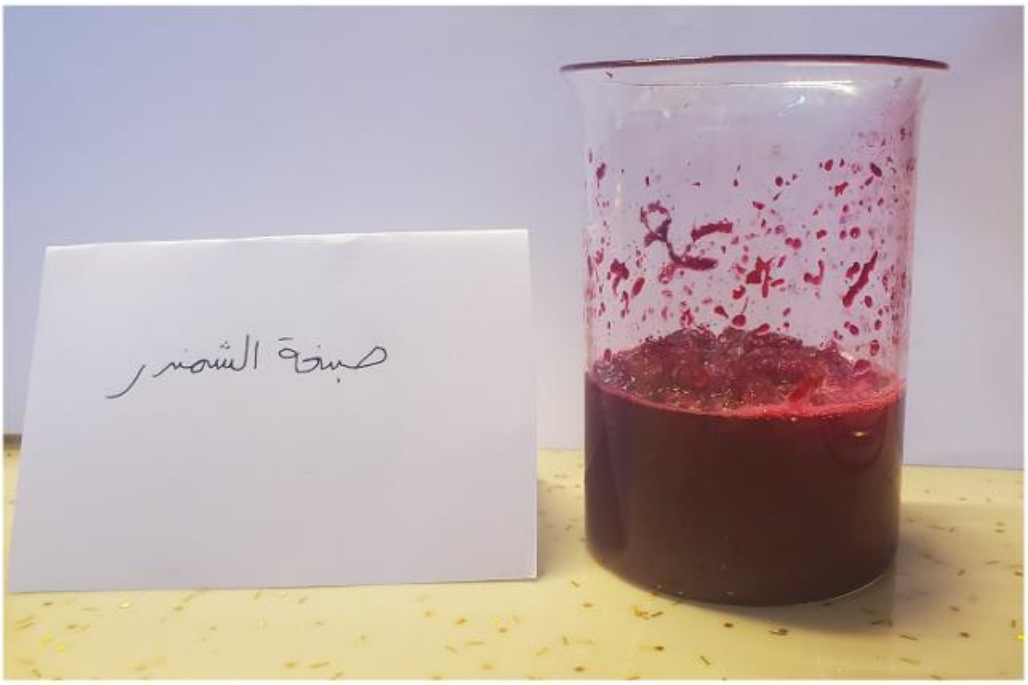
-مبرشة بدوية.

-ورق ترشيح.

-وعاء زجاجي نظيف.

-شرائج مجهرية.

- عينات لإحياء مجهرية.



صورة رقم (15): مستخلص الشمندر المُحضر

2-خطوات الاستخراج

أ-تحضير الشمندر: تُقطع جذور الشمندر الطازجة إلى قطع صغيرة.

ب-طحن الشمندر: تُستخدم مبرشة يدوية حتى يصبح معجونا ناعمًا.

ج -نقع الشمندر في الكحول: يُوضع المعجون في وعاء زجاجي ويُضاف إليه الكحول الإيثيلي بحيث يغطي المعجون تمامًا. وبعد ذلك يُغطى الوعاء بإحكام.

د-التحريك والخلط: يُترك الخليط لمدة 24-48 ساعة مع التحريك بين الحين والآخر لضمان استخلاص المركبات الفعالة.

هـ-الترشيح: بعد انقضاء المدة، يتم ترشيح الخليط باستخدام ورق الترشيح لإزالة الشوائب والمواد الصلبة. السائل الناتج هو صبغة الشمندر المركزة.

3-حفظ الصبغة:

-تُخزن الصبغة في زجاجة داكنة اللون (لحمايتها من الضوء) وفي مكان بارد وجاف.

استخدام صبغة الشونذر في صبغ الكائنات الحية الدقيقة:

1-تحضير العينة

1-تحضر شريحة مجهرية تحتوي على الكائنات الدقيقة المراد صبغها في حالة البكتريا الموجبة لصبغة غرام Staphylococcus aureus وفي حالة البكتريا السالبة لصبغة غرامPseudomonas oryzihabitans .

-تخلط المسحة البكتيرية بواسطة ال loop مع قطرة من الماء المقطر المعقم ثم تترك لتجف في الهواء.

-تضاف بضع قطرات من صبغة الشمندر إلى العينة وتتركها لمدة 32 دقائق لكي تجف وبعد ذلك تغطى بال Cover slide وتحضر للفحص المجهري.

2-في حالة الفطريات والخمائر تُضاف الصبغة اولاً للشريحة الزجاجية ثم تضاف المسحة من الفطر Aspergillus nigerبواسطة ال loop ويترك لتجف.

-بعد ذلك نضع ال Cover slider على العينة وتجهيزها للفحص المجهري.

-والخمائر تضاف قطرة من صبغة الشمندر وبعد ذلك باستخدام الloop تضاف مسحة من خميرة ال .Candida sppوتترك لتجف ونضع ال Cover slide وتجهز للفحص المجهري.

-الفحص المجهري

-تفحص العينات البكتيرية تحت المجهر الضوئي تحت قوى المجهر 100Xوعينات الفطريات40X.

3-طريقة استخراج صبغة الكركديه باستخدام الكحول:

مواد العمل:

- أزهار الكركديه المجففة.
- كحول إيثيلي (إيثانول 70%).
- مطحنة كهربائية.
- ورق ترشيح.
- وعاء زجاجي معتم.
- شرائح مجهرية.
- عينات لإحياء مجهرية

صورة رقم (16): مستخلص الكركديه المُحضر

الخطوات:

1-تحضير المواد:

-تطحن أزهار الكركديه المجففة إلى مسحوق ناعم باستخدام المطحنة.

2-نقع المسحوق في الكحول

-يوضع المسحوق في وعاء زجاجي ويُضاف الكحول بنسبة 1:5 (وزن الكركديه إلى حجم الكحول).

-أغلق الوعاء بإحكام لمنع تبخر الكحول.

3-الاستخلاص:

يترك الخليط في مكان مظلم لمدة 24-48 ساعة مع التحريك كل 6-8 ساعات (يساعد الكحول على استخلاص الأنثوسيانين والأحماض العضوية بكفاءة).

4-الترشيح:

-يتم تصفية السائل عبر ورق الترشيح لإزالة المواد الصلبة.

حفظ الصبغة:

-تحفظ الصبغة في زجاجة زجاجية معتمة (لحمايتها من الضوء الذي يفكك الأنثوسيانين).

استخدام صبغة الكركديه في صبغ الكائنات الحية الدقيقة:

1-تحضير العينة:

1-تحضر شريحة مجهرية تحتوي على الكائنات الدقيقة المراد صبغها في حالة البكتريا الموجبة لصبغة غرام Staphylococcus aureus وفي حالة البكتريا السالبة لصبغة غرامPseudomonas oryzihabitans .

-تخلط المسحة البكتيرية بواسطة ال loop مع قطرة من الماء المقطر المعقم ثم تترك لتجف في الهواء.

-تضاف بضع قطرات من صبغة الكركديه إلى العينة وتتركها لمدة 2-3 دقائق لكي تجف وبعد ذلك تغطى بال *Cover slider* وتحضر للفحص المجهري.

2- في حالة الفطريات والخمائر تضاف الصبغة اولاً للشريحة الزجاجية ثم تضاف المسحة من الفطر *Aspergillus niger*بواسطة ال *loop* وتترك لتجف.

-بعد ذلك نضع ال Cover slide على العينة وتجهيزها للفحص المجهري.

والخمائر تضاف قطرة من صبغة الكركديه وبعد ذلك باستخدام الloop تضاف مسحة من خميرة ال *Candida spp* وتترك لتجف ونضع ال *Cover slide* وتجهز للفحص المجهري.

-الفحص المجهري:

-تفحص العينات البكتيرية تحت المجهر الضوئي تحت قوى المجهر 100Xوعينات الفطرياتX 40.

4-طريقة استخراج صبغة الكركم باستخدام الكحول

مواد العمل:

-مسحوق الكركم

-كحول إيثيلي (إيثانول 70%).

-مرشح ورق ترشيح.

-وعاء زجاجي نظيف.

-شرائح مجهرية.

-عينات لإحياء مجهرية .

صورة رقم (17): مستخلص نبات الكركم المُحضر

-خطوات الاستخراج:

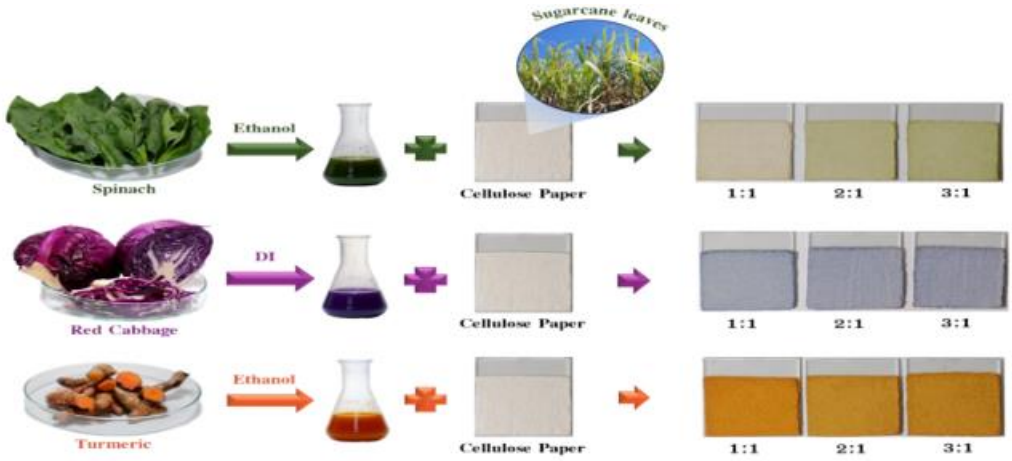
1-نقع مسحوق الكركم في الكحول : يُوضع المسحوق في وعاء زجاجي ويُصاف إليه الكحول الإيثيلي بحيث يغطي المسحوق تمامًا ويتم تغطية الوعاء بإحكام.

2-التحريك والخلط : يُترك الخليط لمدة 24-48 ساعة مع التحريك بين الحين والآخر لضمان استخلاص المركبات الفعالة.

3-الترشيح: بعد انقضاء المدة، يتم بترشيح الخليط باستخدام ورق الترشيح لإزالة الشوائب والمواد الصلبة والسائل الناتج هو صبغة الكركم المركزة.

حفظ الصبغة:

-تخزن الصبغة في زجاجة داكنة اللون (لحمايتها من الضوء) وفي مكان بارد وجاف.



صورة رقم (18) : تحضير الصبغات النباتية

استخدام صبغة الكركم في صبغ الكائنات الحية الدقيقة:

1-تحضير العينة

1-تُحضر شريحة مجهرية تحتوي على الكائنات الدقيقة المراد صبغها في حالة البكتريا الموجبة لصبغة غرام *Staphylococcus aureus* وفي حالة البكتريا السالبة لصبغة غرام*Pseudomonas oryzihabitans* .

-تخلط المسحة البكتيرية بواسطة ال loop مع قطرة من الماء المقطر المعقم ثم تترك لتجف في الهواء.

-تضاف بضع قطرات من صبغة الكركم إلى العينة وتتركها لمدة 2-3 دقائق لكي تجف وبعد ذلك تغطى بال Cover slider وتحضر للفحص المجهري.

2-في حالة الفطريات والخمائر تُضاف الصبغة اولاً للشريحة الزجاجية ثم تضاف المسحة من الفطر *Aspergillus niger*بواسطة ال loop وتترك لتجف.

-بعد ذلك نضع ال *Cover slide* على العينة وتجهيزها للفحص المجهري.

-والخمائر تضاف قطرة من صبغة الكركم وبعد ذلك باستخدام ال*loop* تضاف مسحة من خميرة ال *Candida spp.* وتترك لتجف ونضع ال *Cover slide* وتجهز للفحص المجهري.

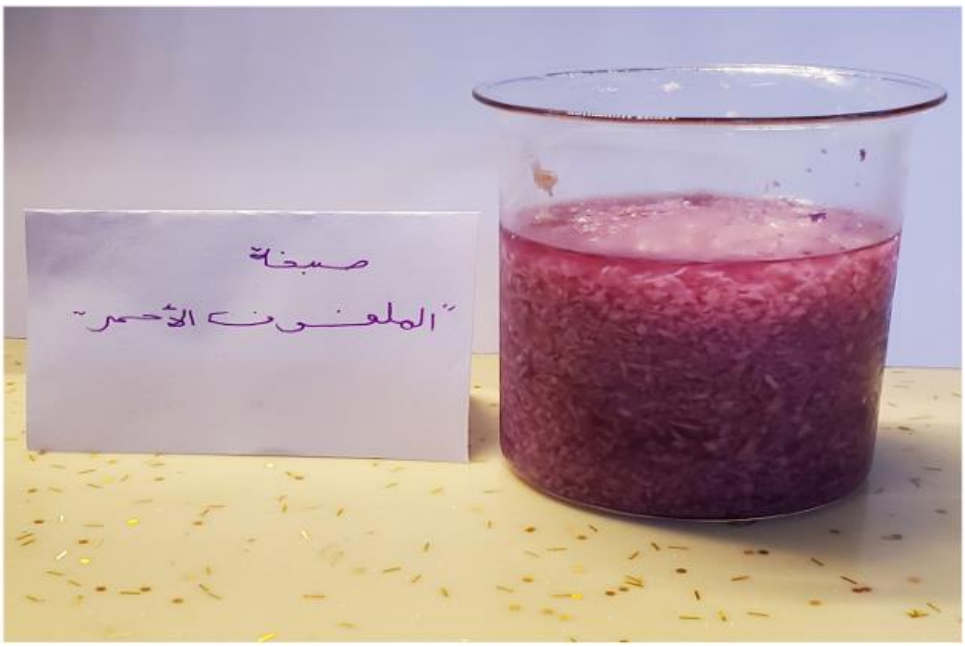
-الفحص المجهري:

-تفحص العينات البكتيرية تحت المجهر الضوئي تحت قوى المجهر X100وعينات الفطرياتX 40.

5-طريقة استخراج صبغة الملفوف الأحمر بالكحول:

المواد العمل:

1. أوراق ملفوف أحمر طازجة.
2. كحول إيثيلي 70.%
3. مبرشة يدوية.
4. ورق ترشيح.
5. وعاء زجاجي معتم.
6. قارورة تخزين معتمة.
7. شرائح مجهرية وغطاءات.



صورة رقم (19) : مستخلص الملفوف الأحمر المُحضر

الخطوات:

1-تبرش اوراق الملفوف بالمبرشة اليدوية مع كمية قليلة من الكحول 70%حتى تصبح عجينة ناعمة مع إضافة الكحول (نسبة 1:5 الملفوف الى الكحول).

2-يُنقل الخليط إلى وعاء زجاجي معتم، ويُغلق بإحكام.

3-يُترك الخليط ينقع لمدة 24-48 ساعة مع رجّ الوعاء عدة مرات يوميًا لتعزيز استخلاص الأنثوسيانين.

4-يتم تصفية الخليط جيدًا باستخدام ورق الترشيح لإزالة الشوائب.

حفظ الصبغة: تُخزن الصبغة في قارورة معتمة في الثلاجة.

صورة رقم (20): الصبغات النباتية المحضرة مُختبرياً

استخدام صبغة الملفوف الاحمر في صبغ الاحياء المجهرية:

1-تحضير العينة

1-تُحضر شريحة مجهرية تحتوي على الكائنات الدقيقة المراد صبغها في حالة البكتريا الموجبة لصبغة غرام *Staphylococcus aureus* وفي حالة البكتريا السالبة لصبغة غرام*Pseudomonas oryzihabitans*

-تخلط المسحة البكتيرية بواسطة ال *loop* مع قطرة من الماء المقطر المعقم ثم تترك لتجف في الهواء.

-تضاف بضع قطرات من صبغة الملفوف إلى العينة وتتركها لمدة 2-3 دقائق لكي تجف وبعد ذلك تغطى بال Cover slider وتحضر للفحص المجهري.

2-في حالة الفطريات والخمائر تُضاف الصبغة اولاً للشريحة الزجاجية ثم تضاف المسحة الفطر *Aspergillus niger*بواسطة ال *loop* وتترك من لتجف.

-بعد ذلك نضع ال *Cover slide* على العينة وتجهيزها للفحص المجهري.

-والخمائر تضاف قطرة من صبغة الملفوف وبعد ذلك باستخدام ال*loop* تضاف مسحة من خميرة ال *Candida spp.*وتترك لتجف ونضع ال *Cover slide* وتجهز للفحص المجهري.

-الفحص المجهري:

-تفحص العينات البكتيرية تحت المجهر الضوئي تحت قوى المجهر100X وعينات الفطريات40X.

الفصل الرابع

النتائج

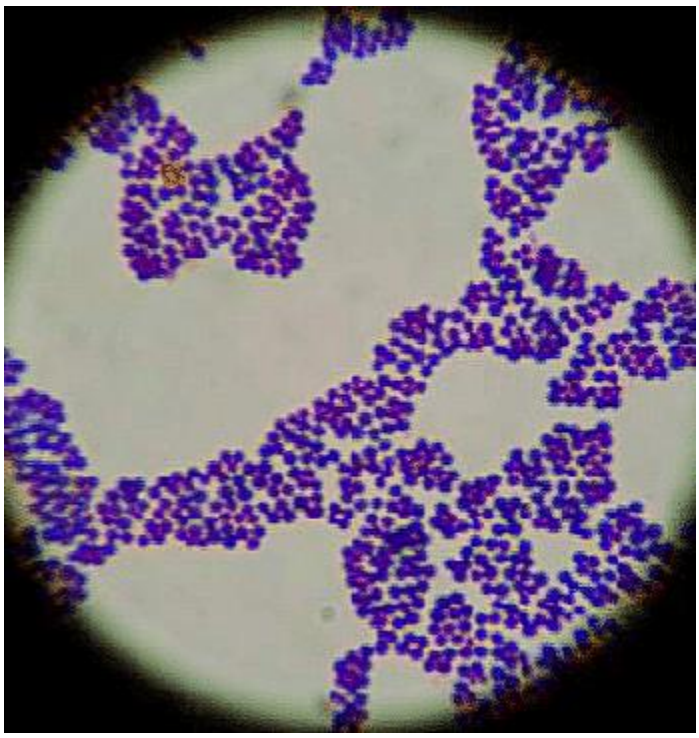
أولاً : نتائج تصبيغ البكتريا موجبة وسالبة غرام:

العينات المقارنة:

تم تصبيغ العينات المقارنة بصبغة Gram المعتادة حسب الخطوات:

- تثبيت العينة على الشريحة بواسطة التمرير على اللهب.
- صبغ العينة بصبغة الكريستال البنفسجي (Crystal Violet) لمدة دقيقة.
- غسل الشريحة بالماء بلطف.
- إضافة محلول اليود (Lugol's Iodine) لمدة دقيقة لتثبيت الصبغة.
- غسل الشريحة بالماء مرة أخرى.
- إزالة اللون باستخدام الكحول أو الأسيتون لمدة 10–30 ثانية (المرحلة التفريقية).
- غسل الشريحة فوراً بالماء لإيقاف تأثير الكحول.
- صبغ العينة بصبغة السافرانين (Safranin) لمدة دقيقة (صبغة تباين).
- غسل الشريحة بالماء وتجفيفها بلطف.
- الفحص بالمجهر باستخدام عدسة الزيت المكبرة.

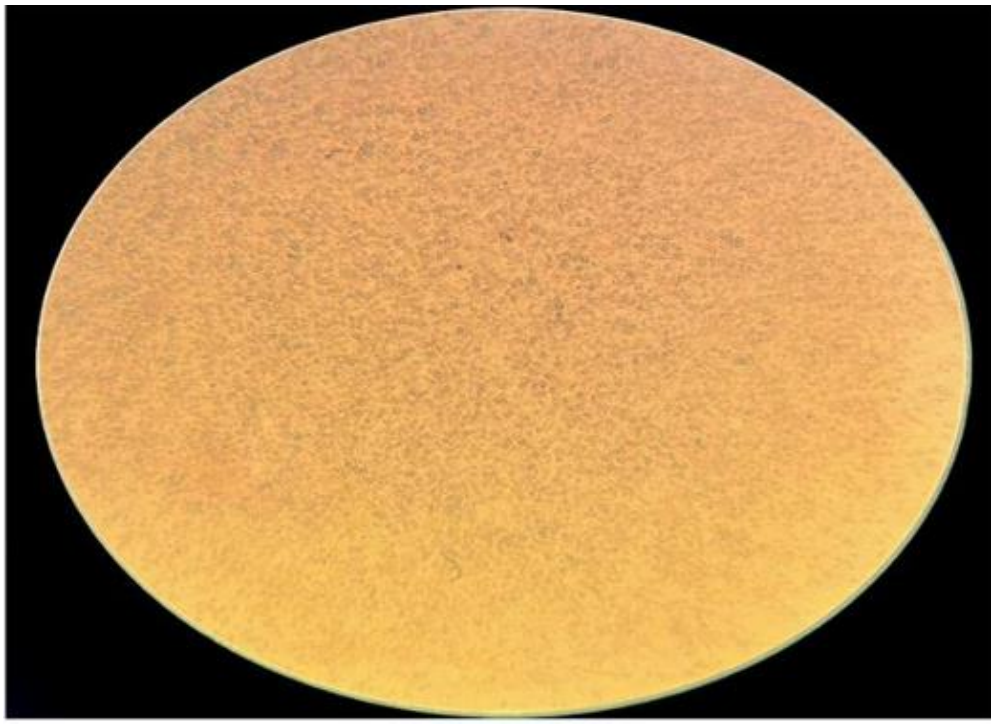
ويمكن ملاحظة فعالية صبغة غرام في تصبيغ Staphylococcus aureus و Pseudomonas oryzihabitansكونها صبغة تشخيصية وتفريقية بين نوعي البكتريا الموجبة والسالبة لهذه الصبغة.



Gram positive Staphylococcus aureus 100 X (21) صورة رقم

Gram negative Pseudomonas oryzihabitans 100X (22) صورة رقم

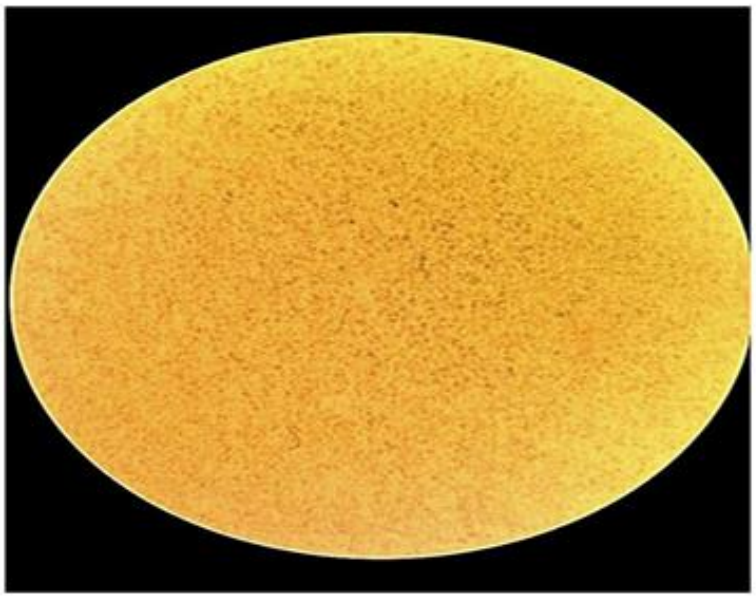
العينات المصبغة بالصبغات النباتية:



صورة رقم (23) باستخدام صبغة الكركديه *Staphylococcus aureus10 X*

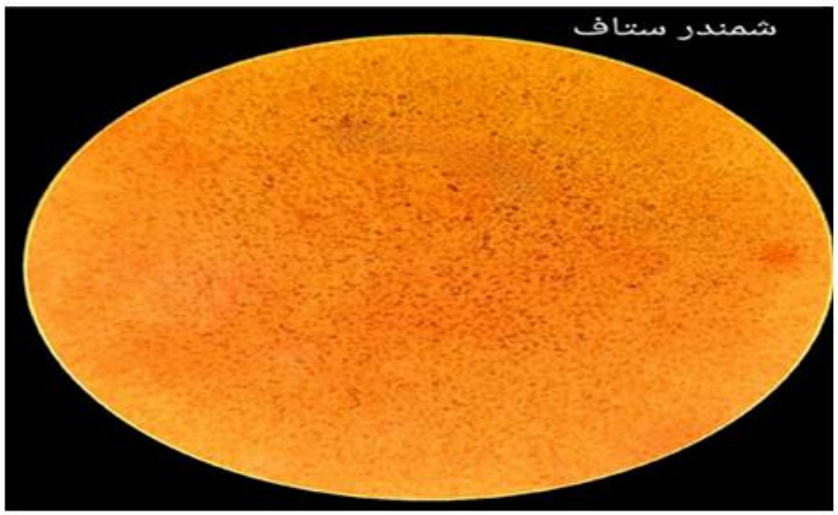
لم تنجح بتصبيغ البكتريا حيث تجمعت الصبغة حول الخلايا ولم تخترق الجدران.

ملاحظة : تعذر الحصول على نتائج باستخدام العدسة الزيتية X 100 والعدسةX 40.



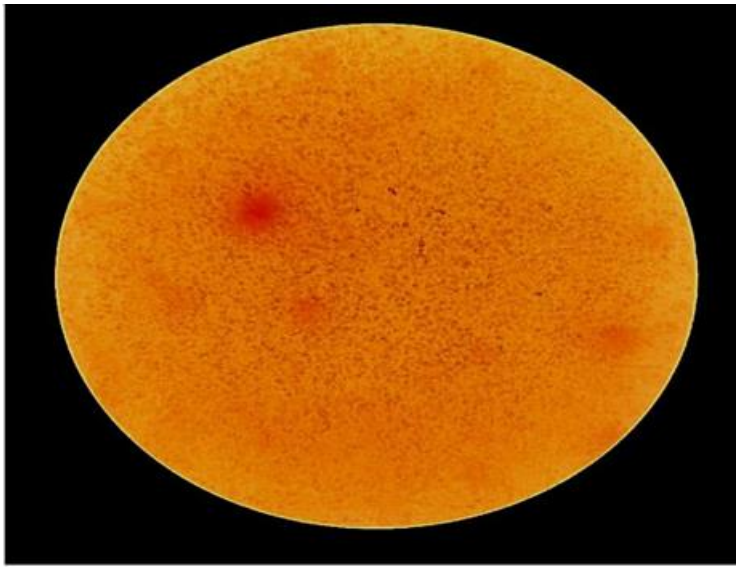
صورة رقم (24) بأستخدام صبغة الكركديه*Pseudomonas oryzihabitans 10X*

لم تنجح بتصبيغ البكتريا حيث تجمعت الصبغة حول الخلايا ولم تخترق الجدران.



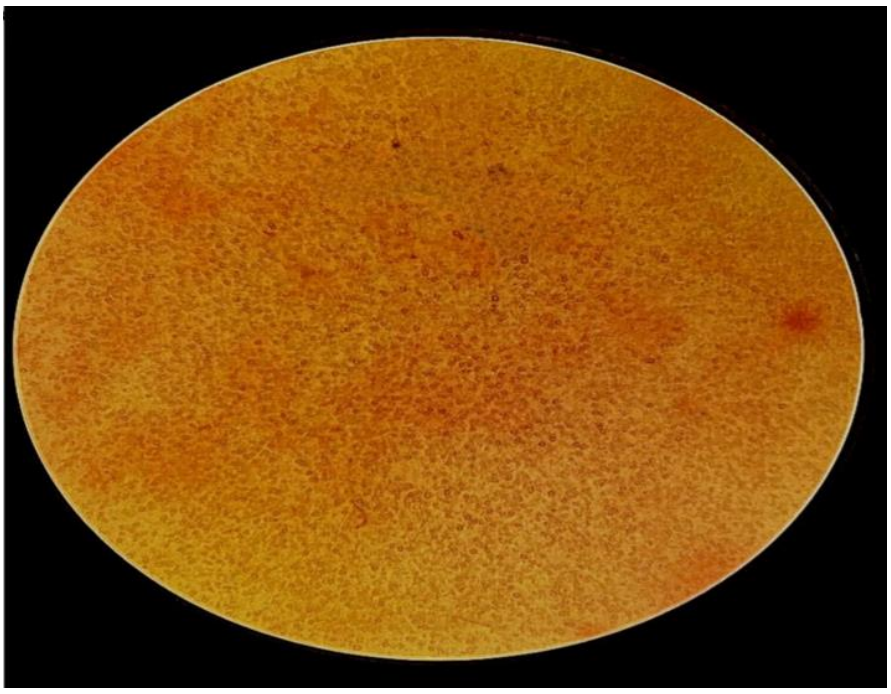
صورة رقم (25) بأستخدام صبغة الشمندر*Pseudomonas oryzihabitans10X*

لم تنجح بتصبيغ البكتريا حيث تجمعت الصبغة حول الخلايا ولم تخترق الجدران.



صورة رقم (26) بأستخدام صبغة الشمندر*Pseudomonas oryzihabitans10X*

لم تنجح بتصبيغ البكتريا حيث تجمعت الصبغة حول الخلايا ولم تخترق الجدران.



صورة رقم (27) باستخدام صبغة السبانخ *Staphylococcus aureus 10X*

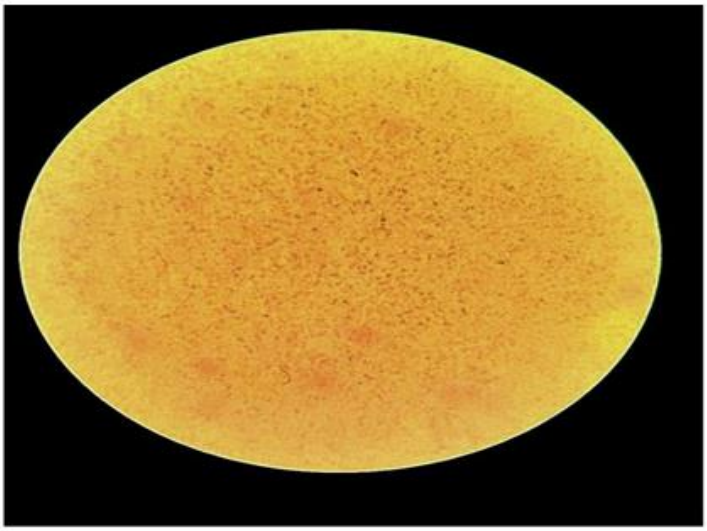
لم تنجح بتصبيغ البكتريا حيث تجمعت الصبغة حول الخلايا ولم تخترق الجدران

صورة رقم (28) باستخدام صبغة السبانخ*Pseudomonas oryzihabitans 10X*

لم تنجح بتصبيغ البكتريا حيث تجمعت الصبغة حول الخلايا ولم تخترق الجدران.

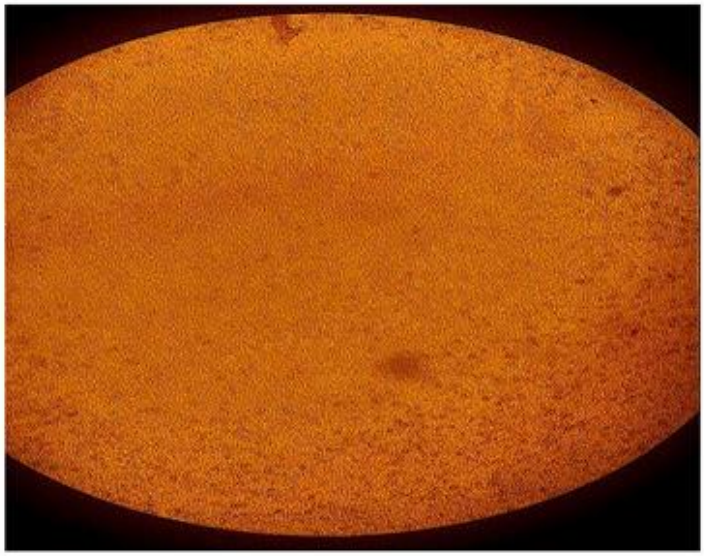
صورة رقم (29) باستخدام صبغة الملفوف الاحمر*Staphylococcus aureus 10X*

لم تنجح بتصبيغ البكتريا حيث تجمعت الصبغة حول الخلايا ولم تخترق الجدران.



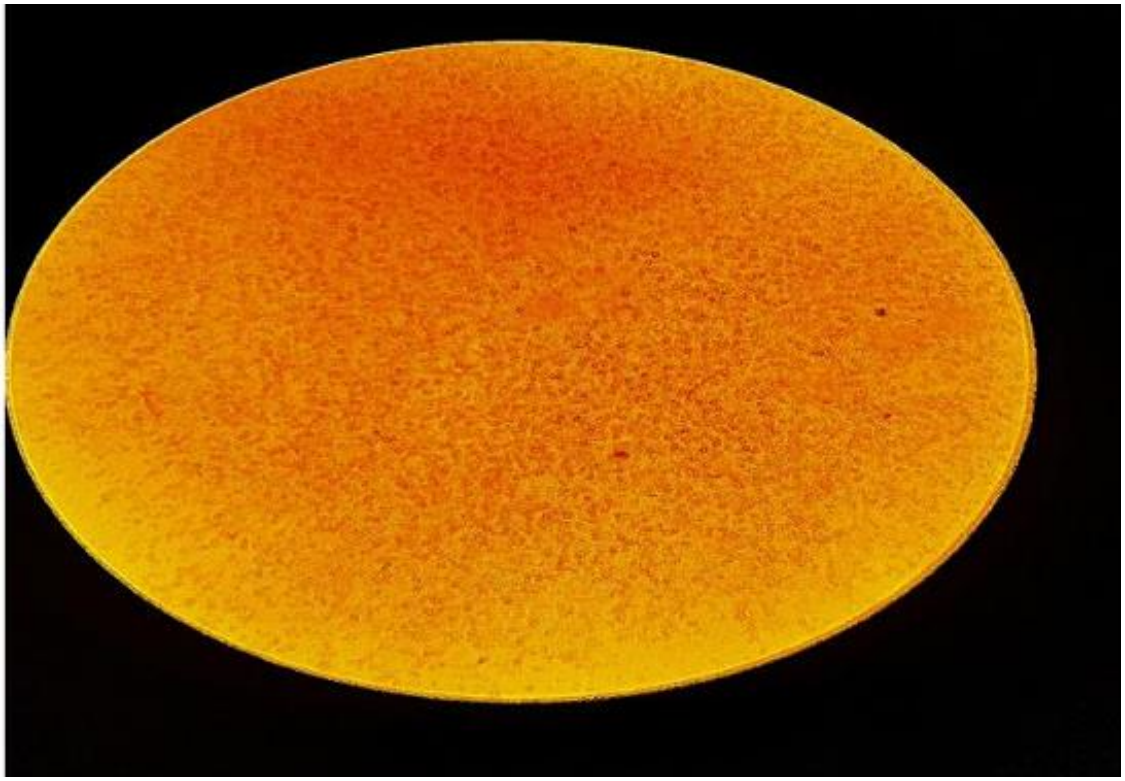
صورة رقم (30) باستخدام صبغة الملفوف الاحمر*Pseudomonas oryzihabitans 10X*

لم تنجح بتصبيغ البكتريا حيث تجمعت الصبغة حول الخلايا ولم تخترق الجدران.



صورة رقم (31) باستخدام صبغة الكركم*Staphylococcus aureus10X*

لم تنجح بتصبيغ البكتريا حيث تجمعت الصبغة حول الخلايا ولم تخترق الجدران.

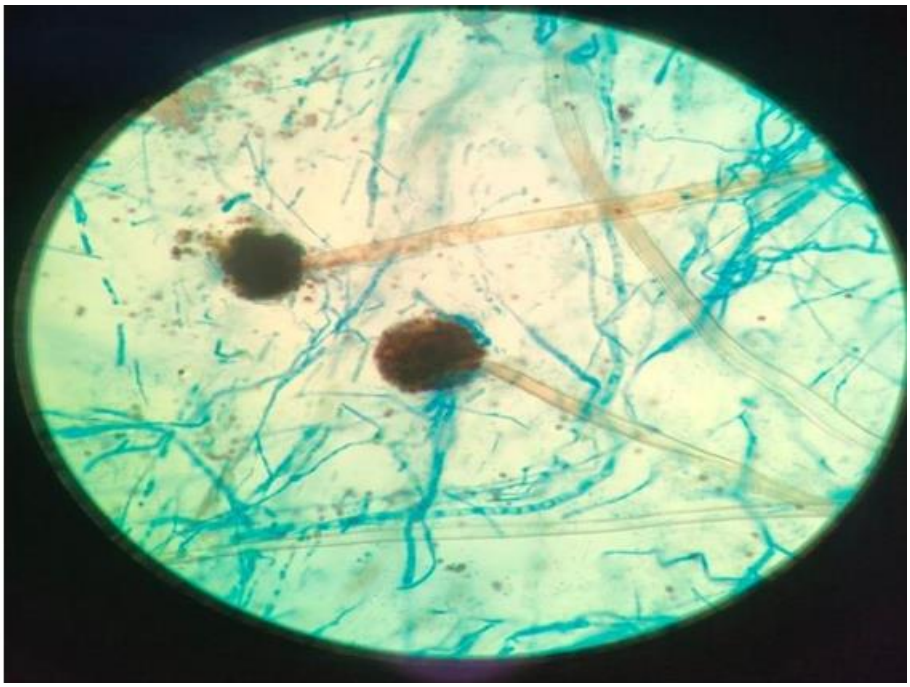


صورة رقم (32) استخدام صبغة الكركمX10Staphylococcus aureus

لم تنجح بتصبيغ البكتريا حيث تجمعت الصبغة حول الخلايا ولم تخترق الجدران.

ثانياً: نتائج تصبيغ الفطر *Aspergillus niger*

العينة المقارنة:



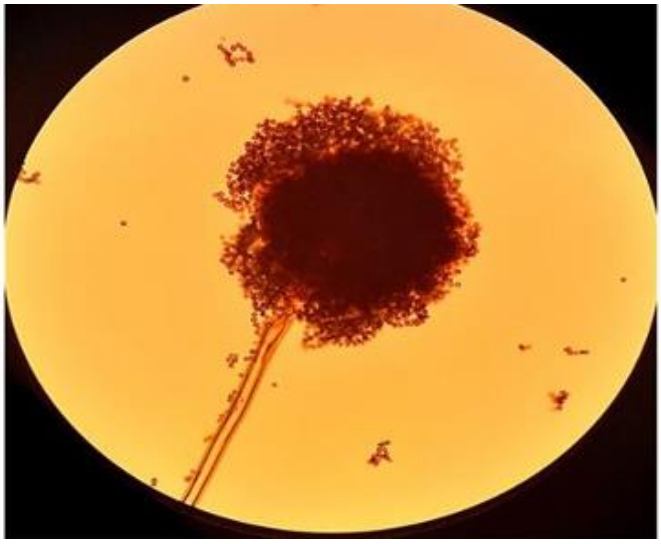
صورة رقم (33) *Aspergillus niger 40X*

تم تصبيغ العينات المقارنة باستخدام صبغة(*Lactophenol Cotton Blue*).

وكانت طريقة التصبيغ بأن توضع الصبغة اولاً وبعد ذلك المسحة الفطرية عن طريق اللوب .

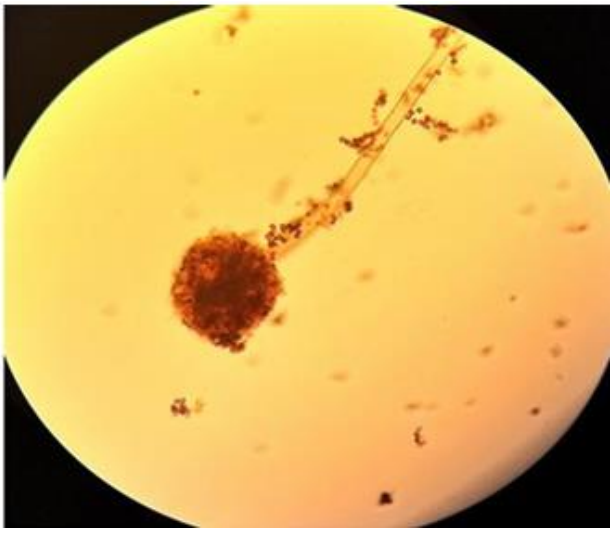
صورة رقم (34) باستخدام صبغة الكركم*Aspergillus niger40X*

نجحت صبغة الكركم نجاح قياسي بتصبيغ الفطر حيث قامت بتوضيح الكونيدات والهايفات.



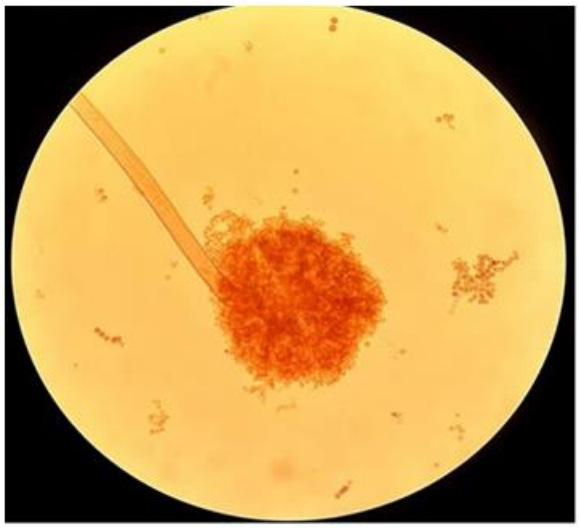
صورة رقم (35) باستخدام صبغة الكركديه*Aspergillus niger40X*

نجحت صبغة الكركديه نجاح جيد بتوضيح أجزاء الفطر.



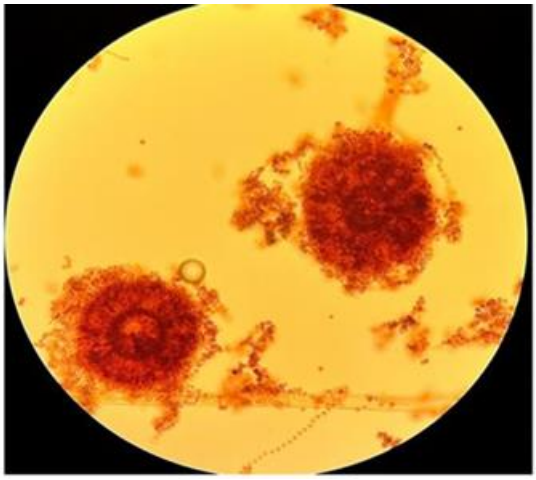
صورة رقم (36) بأستخدام صبغة الشمندرAspergillus niger40X

نجحت صبغة الشمندر بتوضيح أجزاء الفطر ولكن اقل من سابقتيه.



صورة رقم (37) باستخدام صبغة السبانخ*Aspergillus niger40X*

نجحت صبغة السبانخ ولكن بدرجة خفيفة بتوضيح أجزاء الفطر.

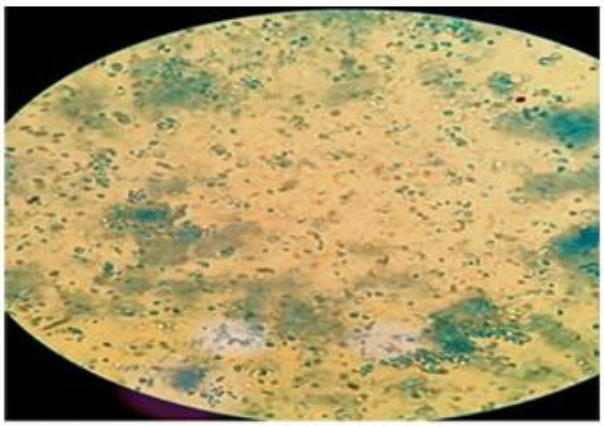


صورة رقم (38) باستخدام صبغة الملفوف الأحمر*Aspergillus niger40X*

نجحت صبغة الملفوف الاحمر نجاح قياسي بتصبيغ وتوضيح اجزاء الفطر.

ثالثاً: نتائج تصبيغ خميرة *Candida spp* :

العينة المقارنة :



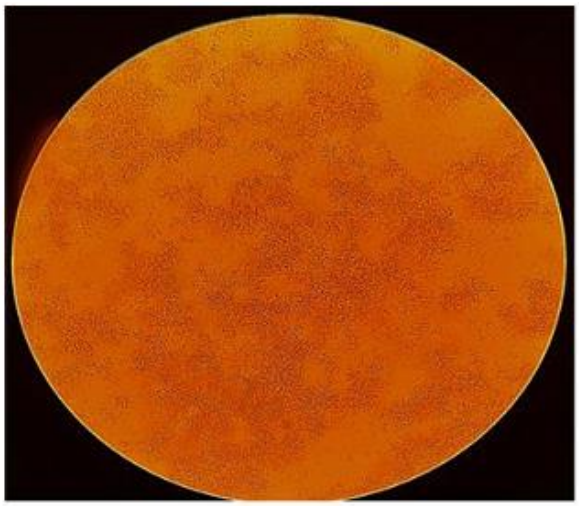
صورة رقم (39) *Candida spp. 40X*

تم تصبيغ الخميرة بنفس طريقة تصبيغ الفطر *Aspergillus niger* باستخدام صبغة (*Lactophenol Cotton Blue*).

صورة رقم (40) بإستخدام صبغة السبانخ *Candida spp10X*

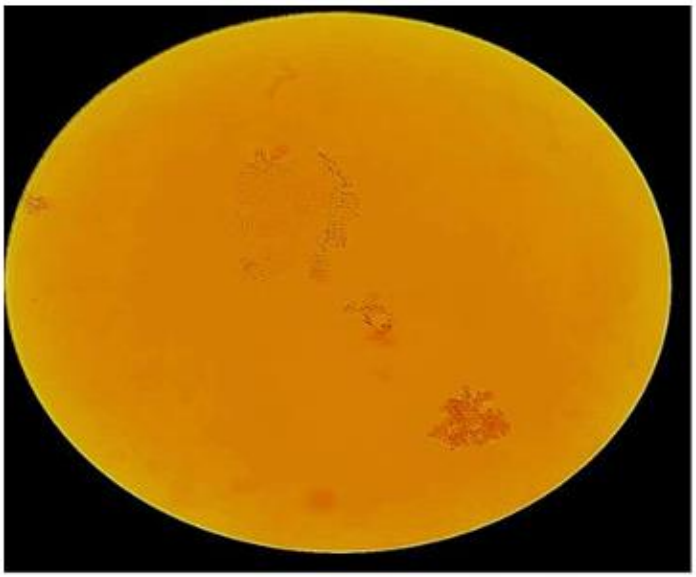
فشلت صبغة السبانخ بتصبيغ خلايا الخميرة حيث كانت تحيط بالخلايا فقط.

ملاحظة: تعذر الحصول على نتائج باستخدام العدسة X 40.



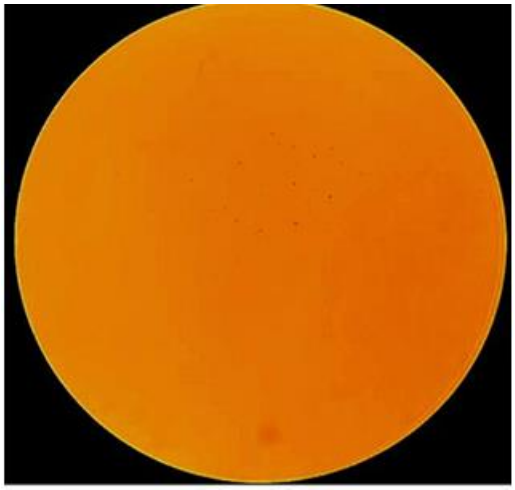
صورة رقم (41) بإستخدام صبغة الملفوف الأحمر*Candida spp10X*

لم تتمكن صبغة الملفوف الاحمر من تصبيغ الخلايا حيث كانت تحيط بالخلايا فقط.



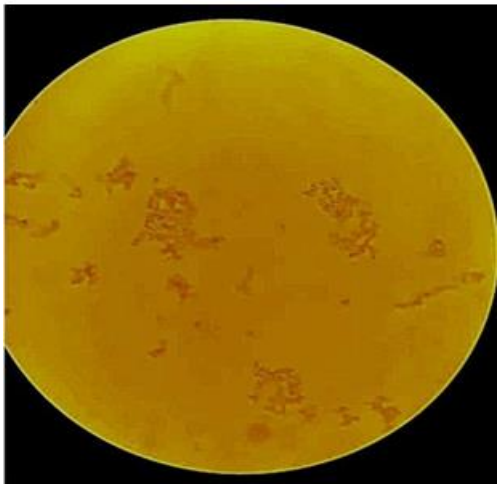
صورة رقم (42) بإستخدام صبغة الكركمCandida spp10X

قامت صبغة الكركم بعمل تصبيغ خفيف لبعض خلايا الخميرة.



صورة رقم (43) بإستخدام صبغة الكركديه*Candida spp10X*

هنالك عدد من الخلايا القليلة جداً الي تصبغت بشكل خفيف بواسطة صبغة الكركديه.



صورة رقم (44) باستخدام صبغة الشمندر*candida spp. 10X*

يمكن ملاحظة نجاح صبغة الشمندر بعمل تصبيغ طفيف جداً لخلايا الخميرة.

الفصل الخامس

مناقشة النتائج

النتائج

أسفرت الدراسة عن مجموعة من الملاحظات والنتائج النوعية التي توضح تباين استجابة الكائنات المجهرية الثلاثة (الفطريات البكتيريا، الخمائر) للصبغات النباتية المستخلصة بالكحول. تم تسجيل النتائج كما يلي:

1-استجابة الفطريات(*Aspergillus niger*):

جميع الصبغات النباتية أظهرت قدرة تصبيغ جيدة إلى ممتازة للفطريات. تم تلوين الجدران الخلوية والخيوط الفطرية بشكل واضح تحت المجهر. كانت أكثر الصبغات فاعلية بالترتيب الكركم (الملفوف الأحمر >الكركديه > الشمندر > السبانخ.

الصور المجهرية أظهرت تبايناً لونياً جيداً يتيح التمييز البصري الواضح بين الهياكل الفطرية.

2-استجابة البكتيريا(*Staphylococcus aureus*):

فشل نسبي إلى تام في تصبغ البكتيريا بواسطة جميع الصبغات النباتية. ظهرت بعض التلوينات الضعيفة والمنقطعة مع صبغة الكركديه والشمندر فقط، وكانت غير كافية للتمييز البصري.

-الصبغة الصناعية (غرام) أظهرت نتائج ممتازة، حيث تميزت البكتيريا بلون بنفسجي واضح، مما يؤكد تفوق الصبغات الاصطناعية في حالة البكتيريا موجبة غرام.

3-استجابة الخمائر(*Candida*) :

كانت النتائج مشابهة للبكتيريا، حيث لوحظ ضعف شديد في التصبيغ أو عدم ظهور لون على الإطلاق.

فشلت معظم الصبغات في اختراق الجدار الخلوي للخلايا الخميرية.

الكركديه والشمندر أظهرا تلوناً باهتاً جداً حول جدران بعض الخلايا لكنه غير منتظم.

جدول رقم (2) : يوضح تأثير الصبغات النباتية على الأحياء المجهرية

الصبغة النباتية	الفطريات	الخمائر	البكتيري
كركم	ممتاز	ضعيف	فشل
شمندر	جيد	جيد	فشل
سبانخ	متوسط	ضعيف جداً	فشل
ملفوف أحمر	ممتاز	ضعيف جداً	فشل
كركديه	جيد جداً	ضعيف	فشل

المناقشة:

أظهرت نتائج الدراسة تبايناً ملحوظاً في استجابة الكائنات المجهرية الثلاثة للصبغات النباتية المستخلصة بالكحول، حيث نجحت هذه الصبغات في تصبيغ الفطريات بشكل واضح، بينما كانت غير فعالة إلى حد كبير في تصبيغ كل من البكتيريا والخمائر ويمكن تفسير هذه النتائج من خلال الفروقات البنيوية والكيميائية في تركيب الجدار الخلوي لهذه الكائنات الدقيقة، إضافة إلى الخصائص الفيزيائية والكيميائية للصبغات النباتية نفسها.

1-تأثير تركيب الجدار الخلوي:

الفطريات مثل (*Aspergillus niger*) تمتلك جداراً خلوياً غنيا بالكيتين والبوليسكريات، وهو جدار ذو طبيعة مسامية نسبياً، مما يسهل نفاذ الصبغات النباتية واستقرارها على الخيوط الفطرية. هذا ما يفسر فعالية التصبيغ العالية، خاصة مع صبغات غنية بالأحماض العضوية أو الأصباغ الحمضية مثل الكركديه والملفوف الأحمر .

الخمائر (مثل *Candida*) تملك جدارًا خلوياً أكثر تعقيداً، يتكون من طبقات من الجلوكومانان والبروتينات، ويعد أقل مسامية من الجدار الفطري، بالإضافة إلى ذلك، فإن الجدار الخميري أكثر سمكاً، ما يضعف قدرة الصبغات النباتية على اختراقه والتفاعل مع مكوناته.

البكتيريا موجبة غرام (مثل *Staphylococcus aureus*) تحتوي على طبقات سميكة من الببتيدو غليكان الغني بالمجموعات الأمينية، والتي تظهر تفاعلاً انتقائياً مع الصبغات الكاتيونية فقط، مثل صبغة غرام البنفسجية.

البكتيرية سالبة غرام (مثل *Pseudomonas oryzihabitans*) تمتلك جدازا خلونا رقيقا يحتوي على طبقة رقيقة من الببتيدوغليكان محاطة بغشاء خارجي غني بالدهون والليبوبوليسكاريدات. هذه البنية تقلل من ارتباط الصبغات الكاتيونية بشكل فعال، ما يجعلها لا تحتفظ بصبغة غرام البنفسجية بعد معالجتها بالكحول، وتكتسب بدلاً من ذلك اللون الوردي عند استخدام الصبغة الراجعة مثل السافرانين.

وتعد الصبغات النباتية بطبيعتها أنيونية أو متعادلة الشحنة، مما يضعف ارتباطها بالجدار البكتيري ويقلل من قدرتها على التصبيغ.

2-خصائص الصبغات النباتية:

الكركديه والملفوف الأحمر يحتويان على أنثوسيانينات وهي أصباغ مائية حمضية قابلة للذوبان، لها قابلية على التفاعل مع السكريات العديدة والبروتينات ما يفسر نجاحها النسبي في تصبيغ الفطريات.

الشمندر يحتوي على البيتالين وهي أصباغ قابلة للتأكسد وقد تفقد فعاليتها في الوسط الكحولي أو عند ملامسة الضوء، ما يفسر ضعف ثباتها مع بعض الكائنات.

الكركم يحتوي على الكركمين، وهو صبغة ذات خصائص دهنية وغير قطبية نسبياً، قد تكون أقل قدرة على الانتشار في بيئة خلوية مائية.

السبانخ يحتوي على الكلوروفيل وهو صبغة غير قطبية وغير ثابتة ضوئياً، وقد يكون امتصاصه الخلوي ضعيفاً خاصة في الأوساط غير العضوية.

3-المقارنة مع الصبغات الاصطناعية:

أظهرت صبغة غرام الاصطناعية تفوقاً واضحاً في تصبيغ البكتيريا موجبة غرام، وذلك بسبب تصميمها الكيميائي المتخصص في التفاعل مع طبقة الببتيدوغليكان، وقدرتها على التثبيت عبر خطوات دقيقة (التلوين التثبيت، إزالة اللون، التلوين الثانوي). بالمقابل لا تمتلك الصبغات النباتية نفس الخصائص اللازمة للتثبيت داخل الجدار البكتيري أو الخميري.

الاستنتاج العام

تعزز هذه النتائج من الفرضية القائلة بأن نجاح الصبغات النباتية في التصبيغ يعتمد بشكل كبير على نوع الجدار الخلوي للكائن الدقيق، وطبيعة الصبغة النباتية المستخلصة، وآلية الامتصاص والتثبيت داخل الخلية. وهي تشير إلى إمكانية استخدام هذه الصبغات بشكل فعال في تصبيغ الفطريات، لكنها تظل غير ملائمة حتى الآن لتصبيغ البكتيريا والخمائر دون تطوير تقنيات تثبيت أو تعديل كيميائي

كما تؤكد النتائج أن الصبغات النباتية لا تعد بديلاً مباشراً لصبغة غرام في ما يخص البكتيريا، لكنها تعد بديلاً بيئياً أمناً وواعداً في مجال تصبيح الفطريات.

التوصيات المستقبلية

1-تحسين طرق استخلاص الصبغات:

استخدام مذيبات مختلفة أو مركبة (مثل الماء + الكحول) لاستخلاص مجموعة أوسع من المركبات الفعالة.

الاستفادة من تقنيات حديثة مثل الاستخلاص بالموجات فوق الصوتية لرفع كفاءة الاستخلاص.

2-تعديل الصبغات النباتية كيميائياً:

إدخال مجموعات كاتيونية أو مُثبتات حيوية إلى تركيب الصبغة لزيادة قدرتها على التفاعل مع الجدران الخلوية للبكتيريا والخمائر.

3-استخدام تقنيات تثبيت إضافية:

تجربة إضافة مثبتات مثل الشب أو أملاح الحديد لتثبيت الصبغة داخل الخلايا، خصوصاً للبكتيريا والخمائر.

4-توسيع التجربة على كائنات دقيقة متنوعة:

اختبار فاعلية الصبغات على سلالات بكتيرية سالبة غرام، وفطريات وخمائر أخرى لمقارنة الاستجابة.

5-إجراء تحليل طيفي للصبغات:

لتحديد الأطوال الموجية المثلى لكل صبغة ومقارنتها بكفاءة الامتصاص لدى الكائنات المختلفة.

6-دعم التوجهات البيئية في المختبرات:

التوصية باستخدام الصبغات النباتية في المختبرات التعليمية أو كمكملات للصبغات الاصطناعية في الدراسات البيئية والفيزيولوجية.

الختام العلمي:

تشير نتائج الدراسة إلى أن الصبغات النباتية المستخلصة باستخدام الكحول، رغم فعاليتها في تصبيغ الفطريات تظهر محدودية واضحة في تصبيغ البكتيريا والخمائر. ويمكن إرجاع هذا التباين في الأداء إلى الاختلافات البنيوية والبيوكيميائية في تركيب الجدار الخلوي لكل من الكائنات المدروسة فالخصائص المسامية والتركيب الكيميائي لجدار الفطريات يمكن الصبغات النباتية من التفاعل والتثبيت بسهولة، في حين أن الجدران الخلوية للبكتيريا والخمائر تُشكل حواجز كيميائية وفيزيائية تحد من نفاذية الصبغات.

تسلط هذه النتائج الضوء على أهمية فهم التكوين البنيوي للكائنات المجهرية عند تطوير أو اعتماد صبغات بديلة طبيعية لأغراض البحث والتعليم والتشخيص. كما أن هذه النتائج تفتح آفاقاً مستقبلية لتعديل هذه الصبغات النباتية، سواء من خلال استخدام مذيبات مختلفة، أو دمجها مع عوامل مثبتة(*mordants*)، أو تحسين تركيزها بما يتوافق مع خصائص الجدار الخلوي للكائنات غير الفطرية.

توصي هذه الدراسة بإجراء أبحاث إضافية لاختبار أنواع أخرى من المستخلصات النباتية وطرق الاستخلاص، ودراسة التأثير التفصيلي للصبغات على المستوى الجزيئي باستخدام أدوات تصوير متقدمة مثل المجهر الإلكتروني والمجهر الفلوري، لضمان فهم أعمق لأسباب الاختلاف في قابلية التصبيغ.

في ضوء ذلك، يُعد هذا البحث خطوة أولى مهمة في اتجاه تطوير أدوات تصبيغ طبيعية وصديقة للبيئة تدعم الأبحاث الميكروبيولوجية والتعليمية دون الاعتماد الحصري على الصبغات الصناعية.

المصادر

1. *Al-Wahaibi, M. B. H. (2023). The Comprehensive Reference in: Plant Dyes. The Comprehensive Agricultural Library " in Arabic " https://www.agro-lib.site/2023/11/blog-post_13.html?m=1*
2. *Adeyemoj 5, Akinlaye, A, & Adekasi, G. (2018. The use of plant for microbial identification: An eco-friendly and non-active method. J. Ads Bel Bistech141-10.*
3. *Tanaka, Y. Sasaki, N, 8 (2008 of plant pigments: anthocyanins, bet 753-749 and carstens. The Plant Journal.*
4. *Shaker, A, Shell, V., Karimi, M, S., & Fay Baza RS.2018 Bogical activities of the natural plant pigments and the health benefits Journal of Food and Characterization 12 356-361.*
5. *Майдан, M. T. Martinka, 1. M. B. P. 1. (1997) Brock begy of 11 Upper.*
6. *Nikaido, H. (2003). Melecular basis of bacterial outer brane permblity revised molecular biology reviews, 674, 595-656.*
7. *Bowman, SM, & Free. 5. (2000). The structure and synthesis of the fungal c 799-808.*
8. *Bada R. A. D., Cana, J.L., Collants, J.C. Loja, D. R. Ocampe. 5. M, Ursu, R., & Bercede, D.H (2022) Saning capability of plants for the fication frangative and gram-negativ bacteria A systematic review Asian Life Sci 112 277-284.*
9. *V-Gad, P., & Bakht, J. (2015) activity of turmeric extract and its potential use in food industry. Journal of food science and technology 52,2272-2279.*
10. *Jung, E, Kim, Y, & Jo, N. (2013) Physicochemical properties and anticabul activity of Reseller sabarta L. Journal of the Scene of Food Agriculture, 93115374-3776.*
11. *Harika Ghata,2,Asa, R. (2021) Utiation of natural dyes substances for histological staining review Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development, 911, 149-158.*
12. *Beveridge, T. J. (2001). Use of the Gram stain in microbiology. Biotechnic & Histochemistry, 76(3), 111-118.*
13. *Lila, M. A. (2009). Plant pigments and human health. Plant pigments and their manipulation, 3, 248-274.*

14. *Affat, S. S. (2021). Classifications, advantages, disadvantages, toxicity effects of natural and synthetic dyes: a review. University of Thi-Qar Journal of Science, 8(1), 130-135.*
15. *Boo, H. O., Hwang, S. J., Bae, C. S., Park, S. H., Heo, B. G., & Gorinstein, S. (2012). Extraction and characterization of some natural plant pigments. Industrial Crops and Products, 40, 129-135.*
16. *Chengaiah, B., Rao, K. M., Kumar, K. M., Alagusundaram, M., & Chetty, C. M. (2010). Medicinal importance of natural dyes-a review. International Journal of PharmTech Research, 2(1), 144-154.*
17. *Shrivastava, A., Dedhia, E. M., Daniel, M., Bhattacharya, S., & Arya, A. (2006). Extraction and dyeing methods for natural dyes. Natural dyes: scope and challenges, 67-80.*
18. *Kumar, G., Upadhyay, S., Yadav, D. K., Malakar, S., Dhurve, P., & Suri, S. (2023). Application of ultrasound technology for extraction of color pigments from plant sources and their potential bio-functional properties: A review. Journal of Food Process Engineering, 46(6), e14238.*
19. *19- Badar, R. A. D., Carmona, J. L. R., Collantes, J. G. C., Lojo, D. R., Ocampo, S. M., Ursua, R. L., & Bercede, D. H. (2022). Staining capability of plant extracts for the identification of gram-positive and gram-negative bacteria: A systematic review. Asian J Biol Life Sci, 11(2), 277-284.*
20. *Martins, N., Barros, L., Henriques, M., Silva, S., & Ferreira, I. C. (2015). Activity of phenolic compounds from plant origin against Candida species. Industrial Crops and Products, 74, 648-670.*
21. *Cueva, C., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J., Bills, G., Vicente, M. F., Basilio, A., ... & Bartolomé, B. (2010). Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. Research in microbiology, 161(5), 372-382.*
22. *Baraka, A., Dickson, S., Gobara, M., El-Sayyad, G. S., Zorainy, M., Awaad, M. I., ... & Tawfic, A. F. (2017). Synthesis of silver nanoparticles using natural pigments extracted from Alfalfa leaves and its use for antimicrobial activity. Chemical Papers, 71, 2271-228*
23. *Swoboda, J. G., Campbell, J., Meredith, T. C., & Walker, S. (2010). Wall teichoic acid function, biosynthesis, and inhibition. Chembiochem: a European journal of chemical biology, 11(1), 35.*

24.Ramachandran, G. (2014). Gram-positive and gram- negative bacterial toxins in sepsis: a brief review. Virulence, 5(1), 213-218.