المختبر الثاني -2-

تصبيغ البكتريا Bacteria Staining

الخلية البكتيرية الحية بطبيعتها عديمة اللون (شفافة) ولايمكن رؤيتها بوضوح في الوسط المائي إلا بعد تصبيغها، إذ ان صبغ البكتريا يجعلها تتباين في اللون عن الوسط الموجودة فيه وبذلك تصبح مرئية ويسهل تمييزها. ولتصبيغ البكتريا مزايا هي :

1) توفير الاختلاف بينها وبين الخلفية background الموجودة فيها، مما يسمح بالتعرف على الاشكال المختلفة للبكتريا.
2) دراسة تراكيب الخلية البكتيرية كالجدار الخلوي Cell Wall والاسواط Flagella والكبسول Capsule بالاضافة الى الابواغ Spores .

وتستعمل انواع مختلفة من الصبغات dyes من قبل العاملين في مجال البكتريولوجي وتقسم لنوعين وهي الصبغات البسيطة والصبغات المركبة او التفريقية والتى سوف نوضحها لاحقاً.

اولاً: تحضير مسحة Smear preparation الخلايا البكتيرية

قبل اجراء عملية التصبيغ يجب اولاً تحضير مسحة من الخلايا البكتيرية المراد صبغها وعملية تحضير المسحة هي بالاساس تثبيت الخلايا البكتيرية على الشريحة Slide (اي التصاق الخلايا بسطح الشريحة لضمان عدم زوال غشاء Film البكتريا بالغسل اثناء عملية التصبيغ). وتحضر المسحة كالآتي :

1- أغسل الشريحة بالماء والصابون (حتى الشريحة الغير مستعملة تغسل لانها مطلية بمواد حافظة).
2- جفف الشريحة ثم ارسم مربع مساحته 1سم^2 وسط الشريحة.
3- انقل بواسطة اللوب Loop قطرة من ماء وضعها في المربع المرسوم .
4- عقم اللوب Loop باللهب حتى الاحمرار ثم برده، وانقل بواسطة اللوب كمية قليلة جدا من مستعمرة البكتريا المراد صبغها وامزجها جيداً مع قطرة الماء (لتفكيك مستعمرات البكتريا والحصول على خلايا مفردة) وافرشها على مساحة المربع واترك المسحة بالهواء حتى تجف.
5- ابدأ بعملية تثبيت Fixing لغشاء البكتريا المفروش وعملية التثبيت تتم بإحدى الطريقتين الاتيتين :

المختبر الثاني -2-

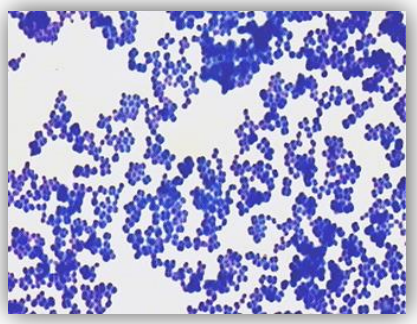
- تثبيت بالحرارة وذلك بامرار الشريحة ثلاث مرات على لهب مصباح بنزن بحيث يراعى ان تكون الشريحة على بعد 20 سم من اللهب وتكون الشريحة دافئة وليست ساخنة .
- تثبيت كيميائي بوضع عدة قطرات من 95% كحول مثيلي لمدة دقيقة بعدها نميل الشريحة للتخلص من الكحول .

المسحة Smear : تحضير مجفف ومثبت لخلايا البكتريا على الشريحة الزجاجية

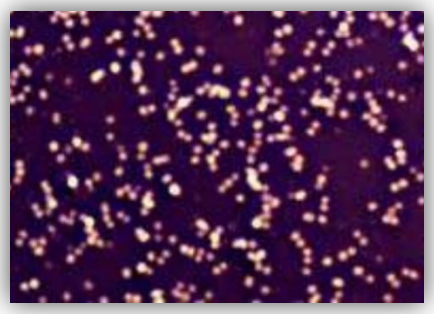
ثانياً :الصبغة البسيطة Simple stain : وهي اسهل واسرع في التصبيغ وسميت بذلك لاننا نستخدم صبغة واحدة في خطوة واحدة والاصباغ عبارة عن املاح اما تكون قاعدية تحمل شحنة موجبة مثل ازرق المثيلين Methylene blue والبلورات البنفسجية Crystal violet والفوشين القاعدية basic fuchsin ، او املاح حامضية تحمل شحنة سالبة مثل السفرانين Safranine و Malachite green .

والبكتريا تعد جسم سالب الشحنة حسب شحنة الجزيئات الحيوية المكونة لتراكيبهاوعند صبغ البكتريا بالاصباغ السابقة يحصل مايلي :

- في حالة تصبيغ البكتريا بصبغة قاعدية كازرق المثيلين فان الصبغة تنجذب نحو الخلايا البكتيرية وبذلك تصطبغ الخلايا البكتيرية نفسها ويسمى الصبغ المباشر Direct stain
- وعند تصبيغ البكتريا بالصبغة الحامضية مثل النكروسين nigrosin فإن الصبغة تتنافر مع الشحنة السالبة للبكتريا وبذلك تصطبغ الخلفية فقط ويسمى الصبغ السالب negative stain .



بكتريا مصبوغة بازرق المثيلين



بكتريا مصبوغة بصبغة النكروسين

المختبر الثاني -2-

خطوات عمل التصبيغ البسيط Procedures of Simple stain

1- ناخذ شريحتين زجاجيتين ونغسلهما بالماء والصابون ثم نجففهما بالهواء مع مراعاة مسك الشريحة بالاصابع من حوافها وليس من السطح حتى لايعلق عليها مادة دهنية.
2- نرسم مربع في وسط كل شريحة بمساحة 1سم^2 ثم ننقل بواسطة لوب Loop قطرة ماء لكل مربع
3- نعقم اللوب باللهب ثو ننقل بواسطته كمية قليلة جدا من مزرعة بكتيرية حديثة (بعمر 24 ساعة) للشريحةالاولى وامزجها جيداً مع قطرة الماء وافرشهاعلى مساحة المربع على الشريحة.
4- نترك الشريحة لتجف في الهواء ثم نمررها على لهب مصباح بنزن باستعمال ملقط لغرض التثبيت.
5- نغمر الشريحة بصبغة ازرق المثيلين (صبغة قاعدية) لمدة دقيقة واحدة .
6- نغسل الشريحة بماء الحنفية ثم تجفف الشريحة بوضعها بين ورقتي ترشيح ونضغط عليه بصورة خفيفة.
7- نفحص تحت المجهر بواسطة العدسة الزيتية ونسجل النتائج .
8- الشريحة الثانية ننقل اليها بواسطة اللوب قطرة ماء ثم نعقم باللهب ثم نبرد اللوب وننقل لقاح من المزرعة البكتيرية ونمزجها مع الماء جيدا بواسطة اللوب الى ان تصبح عكرة.
9- نضيف الى الشريحة بواسطة اللوب صبغة النكروسين (صبغة حامضية) ونمزجها مع اللقاح حتى تصبح طبقة رقيقة .
10- جفف في الهواء ونفحص تحت المجهر .

ثالثاً: الصبغة المركبة (التفريقية) Compound stain or Differential : سميت

بالمركبة لانه يستعمل فيها اكثر من صبغة، وبنفس الوقت فهي تميز بين مجموعتيم من البكتريا تختلفان في تركيب الجدار الخلوي. وتعد **صبغة گـرام Gram stain** التي اكتشفها الطبيب الدنماركي **هانس كريستيان گـرام** من اهم الصبغات التفريقية في الدراسات البكتريولوجية والتي قسمت البكتريا الى مجموعتين رئيستين استناداً الى الاختلاف في تركيب الجدار الخلوي وهما :

1- البكتريا الموجبة لصبغة گـرام Gram positive bacteria
2- البكتريا السالبة لصبغة گـرام Gram negative bacteria

وفي هذه الصبغة تستعمل صبغتان هما البلورات البنفسجية (بنفسجية اللون) والسفرانين (الحمراء اللون)

المختبر الثاني -2-

طريقة العمل Procedures :

1- يتم تحضير مسحة من مزرعة بكتيرية حديثة بعمر 24 ساعة حسب الخطوات المذكورة سابقا في تحضير المسحة.

2- نضيف الصبغة الاساسية وهي **البلورات البنفسجية Crystal violet** بشكل قطرات على السلايد وتبقى لمدة **(نصف دقيقة)** ثم نغسل الصبغة بالماء الجاري(تيار خفيف).

3- نضيف **اليود Iodine** لمدة **(دقيقة)** ثم نغسل بالماء الجاري (تيار خفيف).

4- نضيف الكحول **(الايثانول 95%)** لمدة **(20 ثانية)** حتى زوال اخر قطرة صبغة مع الكحول ثم نغسل بالماء الجاري (تيار خفيف).

5- نضيف الصبغة المعاكسة counter stain **السفرانين Safranine** لمدة **(نصف دقيقة)** ثم نغسل بالماء الجاري (تيار خفيف).

6- نغسل السلايد بالماء الجاري ونجففه بوضعه بين طبقتي ورقة ترشيح ونفحص بالمجهر تحت العدسة الزيتية .

(ملاحظات مهمة)

1- الجدار الخلوي للبكتريا **الموجبة لصبغة گـرام +G** بسيط التركيب واكثرسمكاً ويتألف من طبقة الببتيدوكلايكان الاكثر سمكاُ من البكتريا السالبة لصبغة گرام وطبقة حامض التايكويك teichoic acid

2- الجدار الخلوي للبكتريا **السالبة لصبغة گـرام -G** معقد التركيب واقل سمكاً ويتألف من طبقة الببتيدوكلايكان التي تكون رقيقة وطبقة متعدد السكريات الدهني وطبقة دهون مفسفرة.

3- يتم مشاهدة المسحة المصبوغة بالمجهر تحت العدسة الزيتية باستعمال زيت السدر وذلك لتوضيح الرؤية لان معامل انكسار الزجاج يساوي معامل انكسار الزيت.

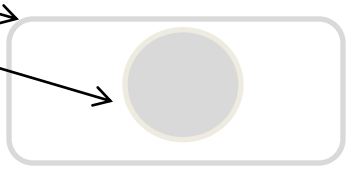
امثلة على انواع بكتيرية شائعة مع شكلها ونوع اصطباغها بصبغة گـرام

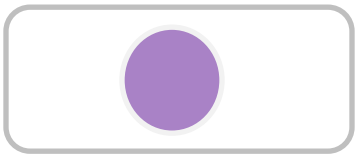
الاسم العلمي للبكتريا	الشكل	نوعها بالنسبة لصبغة گـرام
Staphylococcus aureus	كروية بشكل عناقيد	موجبة لصبغة گـرام
Streptococcus pyogenes	كروية بشكل سلاسل (سبحات)	موجبة لصبغة گـرام
Bacillus subtilis	عصوية	موجبة لصبغة گـرام
Escherichia coli	عصوية	سالبة لصبغة گـرام
Pseudomonas aeruginosa	عصوية	سالبة لصبغة گـرام

المختبر الثاني -2-

1- تحضيرالمسحة

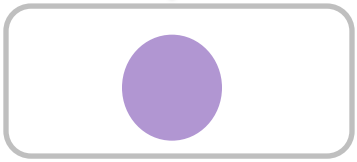
2- اضافة البلورات البنفسجية





في هذه الخطوة جميع الخلايا تأخذ الصبغة البنفسجية

3- اضافة اليود Iodine



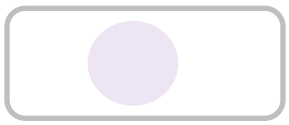
يتكون معقد (اليود ـ البلورات البنفسجية) لتثبيت الصبغة

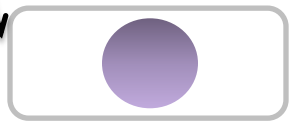
4- اضافة الكحول (القصر)

اما تبقى الصبغة البنفسجية لان طبقة الببتيدوكلايكان سميكة وان الكحول ادى الى ازالة الماء وانكماش جدار الخلية وتقليل فقدان الصبغة

او ان الصبغة البنفسجية تُزال لاحتواء الجدار الخلوي على نسبة عالية من الدهون التي تذوب بالكحول وتتكون ثقوب تؤدي لفقدان الصبغة البنفسجية وكذلك لان طبقة الببتيدوكلايكان رقيقة

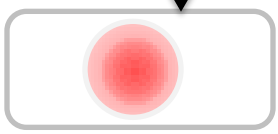
5- أضافة السفرانين

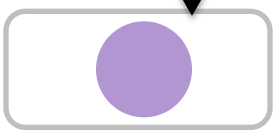




لاتدخل الصبغة

تدخل الصبغة لوجود ثقوب

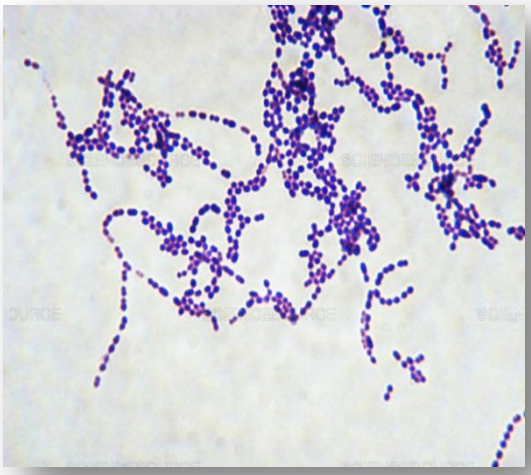




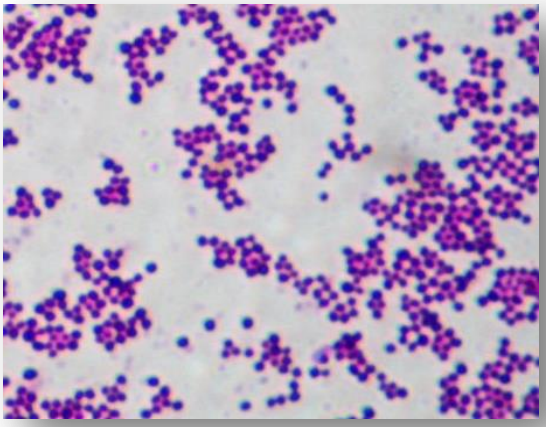
بكتريا موجبة لصبغة گـرام G+

بكتريا موجبة لصبغة گـرام G −

المختبر الثاني -2-



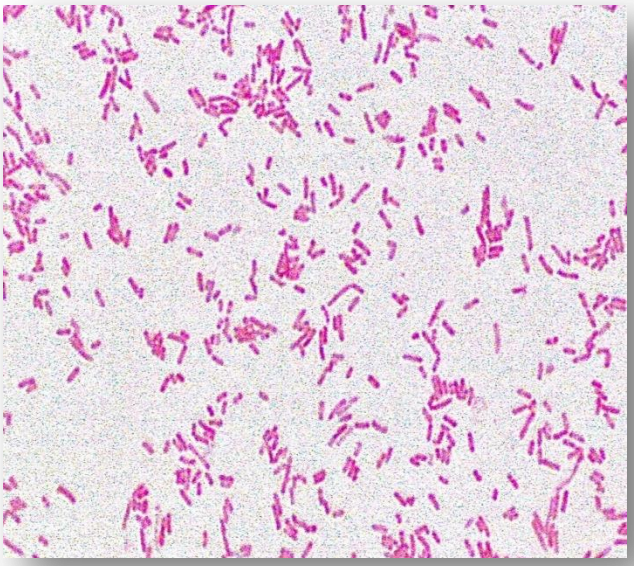
Streptococcus pyogenes



Staphylococcus aureus

Bacillus subtilis

المختبر الثاني -2-



Escherichia coli

امثلة على انواع بكتيرية مصبوغة بصبغة گـرام تحت المجهر الضوئي