المحاضرة الثالثة

تصبيغ البكتريا Staining of bacteria

انواع الصبغات

1- الصبغات الحامضية :Acidic dyes

وهي صبغات تحمل شحنة سالبة (-) مثل صبغة السفرانين Safranin الحمراء وصبغة fuchsine carbol و Acid fuchsine و وصبغة Congo red وهو شاي صيني اسود Fuchsine: وهي صبغة حمراء مزرقة مشتقة من شجيرة ذات زهرات حمراء او ارجوانية

2- الصبغات القاعدية : Basic dyes

وهي الصبغات التي تحمل الشحنات الموجبة (+) مثل صبغة كرستال فايوليت Crystal violet ولونها بنفسجي و صبغة Methyl violet

3- الصبغات المتعادلة : Neutral dyes

وهي الصبغات التي تحمل شحنات موجبة وسالبة مثل صبغة Methylene blue

لماذا تصبغ الخلايا البكتيرية ؟

البكتريا عبارة عن خلايا شفافة لا يمكن رؤيتها بالمجهر الا بعد تصبيغها

التصبيغ يفيدنا في :

1- رؤية الخلايا الشفافة بوضوح

2- معرفة شكل وحجم الخلايا البكتيرية

3- للكشف عن بعض التفاعلات الفيزيائية والكيميائية التي تحدثها الصبغات مع الخلية البكتيرية لتساعد في تشخيص البكتريا

تحضير وتثبيت الغشاء البكتيري للصبغة (اللطخة SMEAR)

Preparation and Fixation of Bacteria for Staining

تحضير اللطخة للمزارع الميكروبية السائلة :

يعقم اللوب بالحرارة ثم نبرده وبعد ذلك يغطس بالمزرعة السائلة نرفعه بعد ذلك ونضع القطرة المحمولة بطرف اللوب على سطح الشريحة الزجاجية بالمنتصف بعدها نوزع القطرة بالتساوي ضمن مساحة محددة من منتصف الشريحة الزجاجية لغرض تجنيس وتوزيع القطرة بصورة متفرقة بعدها تجفف اللطخة بالهواء الاعتيادي وتثبت بأمرارها على اللهب عدة مرات ، ولا يجوز امرار اللطخة مباشرة على اللهب دون ان تجف وذلك خوفاً من حصول تشوه للخلايا ولا تعطي اشكالا حقيقية .

تثبت اللطخة على حرارة اللهب وهي تساعد على تخثر البرتين الخلوي مما يساعد على التصاق خلايا البكتريا على الشريحة الزجاجية

نعقم اللوب على اللهب ونأخذ بواسطته قطرة من الماء ونضعها بمنتصف الشريحة الزجاجية وبعدها نعقم اللوب مرة ثانية ونبرده نأخذ جزء من مستعمرة نامية على وسط صلب ونضعه على القطرة ونمزجه جيداً معها ونبدأ بتوزيع المزيج على الشريحة وبعدها نكمل العمل كما ذكر سابقاً

طرق تصبيغ : Methods staining

التصبيغ البسيط : simple staining

تأخذ اللطخة المحضرة سابقاً ونضع عليها عدة قطرات من صبغة Methylene blue لمدة 1-2 دقيقة بعدها نغسل الشريحة الزجاجية بالماء . نجفف الشريحة بالهواء ونفحصها تحت المجهر ونلاحظ البكتريا قد تلونت بلون ازرق .

التصبيغ المركب compound staining(تصبيغ gram)

تستخدم في أكثر من صبغة واحدة ويعرف أيضا بالصبغ التفريقي differential staining لأنة يتم في التفرقة بين البكتريا في مجاميع مختلفة تبعا لقابليتها وتفاعلها مع الأصباغ المستخدمة في التصبيغ. ومن أهم طرق التصبيغ المركب صبغ جرام .

عند اتباع هذه الطريقة نجد أن البكتريا تنقسم الى مجموعتين

1-بكتريا تصبغ بالصبغة القاعدية الاساسية (الكريستال البنفسجي) في وجود اليود بدرجة لايمكن معها ازالة الصبغة من الخلايا بالغسيل بالكحول او الاسيتون . وتصبغ الخلايا البكتيرية gram positive باللون البنفسجي وتعرف يعني (البكتريا الموجبة لصبغة جرام).

2-بكتريا تزال منها الصبغة البنفسجية بعد الغسل بالكحول بسهولة (لذلك تصبح الخلايا شفافة بعد الغسل بالكحول)

ولتسهيل رؤية خلاياها تصبغ بصبغة حمراء مثل (السفرانين)وتسمى بالصبغة العكسية .

حيث تصبغ خلايا البكتريا باللون الأحمر وتسمى البكتريا السالبة لجرام gram negative .

وتفسير هذا الاختلاف يرجع الى أسس كيمائية اذ أن سطح خلايا البكتريا الموجبة لجرام يحتوي على كميات من ملح المغنيسيوم لحمض الريبونيوكليك والتي تكون مركب معقد مع كل من البروتين الخلوي وصبغة الكريستال البنفسجية واليود وهذا المركب المعقد يثبت الصبغة في الخلية ويجلعها أكثر مقاومة للأ زالة عند الغسيل بالكحول. أما البكتريا السالبة لجرام فسطح

خلاياها لايحوي على حمض الريبونيوكليك والمغنسيوم لذلك فأن صبغة الكريستال البنفسجي لاتثبت في الخلايا وتزال عند الغسيل بالكحول.

خطوات العمل :

1-يحضر غشاء بكتيري من مزرعة البكتريا النامية على الأجار، ثم يثبت بتمريره في اللهب عدة مرات.

2-تترك الشريحة لتبرد ثم يغمر الغشاء بصبغة الكريستال البنفسجي لمدة دقيقة.

3-تغسل الشريحة بالماء الجاري.

4-يغمر الغشاء باليود لمدة دقيقة

5-تغسل الشريحة بالماء ثم تترك لتجف بالهواء.

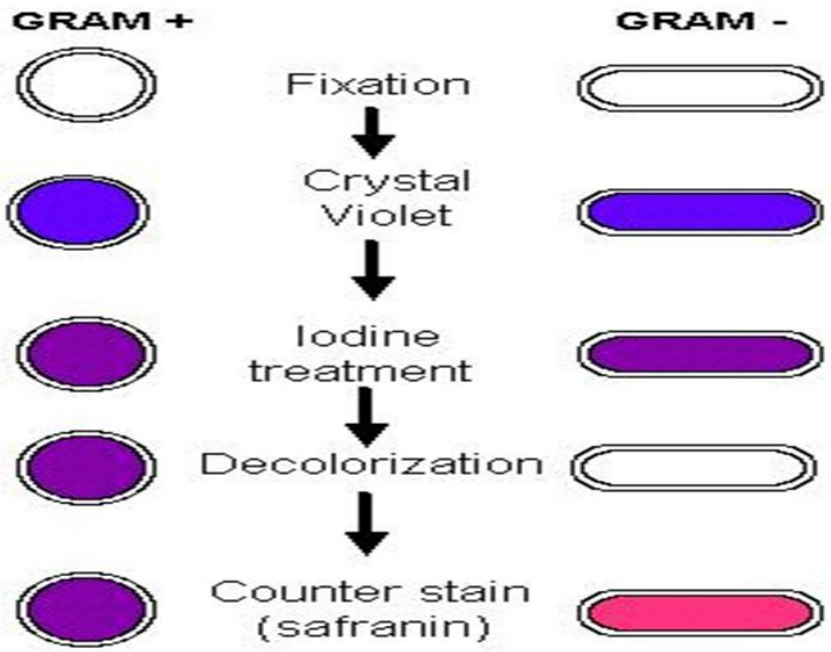
6-يغسل الغشاء بالكحول الأيثانول باضافة للشريحة نقطة نقطة مع امالة الشريحة ليتساقط منها الكحول حتى يصبح الكحول المتساقط عديم اللون

7-يغسل الغشاء بالماء.

8-يغمر الغشاء بصبغة السفرانين لمدة نصف دقيقة.

9-يغسل الغشاء بالماء.

10-تجفف الشريحة ثم تفحص بالمجهر.



علل : يجب ان يكون الكحول المستخدم لغرض التعقيم بالمختبر تركيزه 70% لا أكثر ولا أقل من هذه النسبة.

علل : اضافة اليود بعد الصبغة الأساسية كرستال فايوليت في التصبيغ التفريقي

علل : تظهر البكتريا المصبغة بطريقة كرام بمجموعتين ، مجموعة سالبة حمراء اللون ومجموعة بنفسجية اللون موجبة

ميكانيكية العمل :

في البداية تضاف صبغة الكرستال فايوليت وبعد اضافة اليود يتكون معقد CV-I وبعد اضافة الاسيتون أو الكحول فانه سيذيب الدهون الموجودة في جدار الخلية ، اما البكتريا السالبة بما ان الدهون الموجودة في جدارها الخلوي عالية فانها ستذوب وتتكون فتحات أو ثغور كبيرة في هذا الجدار مما يؤدي الى خروج المعقد أي الصبغة الاساسية وتصبح هذه الخلية جاهزة لاستقبال الصبغة الثانية السفرانين مما يؤدي الى تلونها باللون الأحمر .اما البكتريا الموجبة لصبغة كرام فان نسبة الدهون قليلة بجدارها الخلوي فأن اضافة الكحول في هذه الحالة سيؤدي الى انكماش فتحات الجدار بسبب ازالته للماء الموجود بجدار الخلية وتسمى هذه العملية Dehydration ازالة الماء مما يمنع خروج المعقد الى الخارج وبالتالي تحتفظ الخلية بلونها الاساسي

(البنفسجي) لان الصبغة الثانية السفرانين لا تستطيع اختراق جدار الخلية لانكماش الثغور فيه اذ ان اضافة الكحول للبكتريا الموجبة لصبغة كرام تؤدي الى ازالة الماء وبالتالي تقلل من عملية النفاذية .