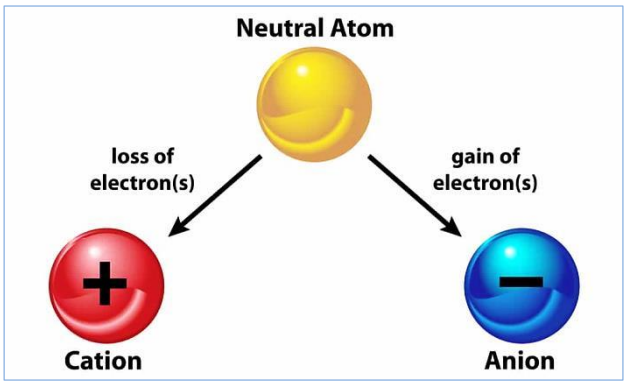
التصبيغ Staining

الصبغة Stain : هي مادة كيميائية لها القدرة على الارتباط بالمواد الأخرى معطية لها اللون، الصبغة بالأساس عبارة عن املاح **Salt** والمعروف ان الملح يتكون من ايون **موجب الشحنة cation** وآخر **سالب الشحنة anion** ، يجب على الأقل يكون احد الايونين حامل للون الصبغة ويسمى هذه الجزء الحامل للصبغة بـ **Chromophore** وهو الذي يعطي الصبغة لونها المميز. للصبغة قدرة عالية على التأين مما يجعلها اكثر نشاطاً ويجعل لها القدرة على الارتباط بالخلية.

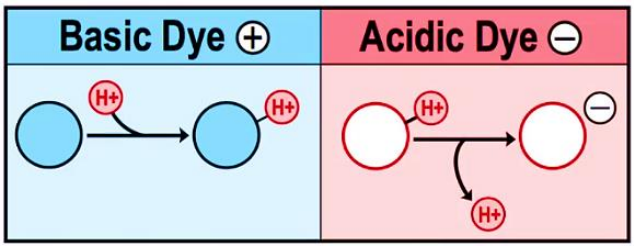
لتحديد اشكال البكتريا او اجزائها المختلفة لابد من تصبيغها بعد تثبيت العينة على سطح الشريحة، ويقصد بعملية الصبغ هو تلوين البكتريا بصبغات خاصة لتحديد اجزائها المختلفة.



❖ **الصبغات تقسم الى :**

اولاً: صبغات حامضية acidic stain :

وهي الصبغات التي يكون فيها الجزء الحامل للصبغة هو الايون السالب anion، هذه الصبغة ترتبط بالأجزاء موجبة الشحنة في الخلية مثل بعض الاحماض الامينية (الارتباط بأواصر ايونية). مثل صبغة الحبر الهندي **Indian ink**، صبغة النيكروسين **Nigrosin**، صبغة الفوكسين الحامضي **acid fuchsine**، الأيوسين **Eosin**، صبغة احمر الكونجو **Congo red** .



ثانياً: صبغات قاعدية basic stain :

وهي الصبغات التي يكون فيها الجزء الحامل للصبغة هو الايون الموجب cation، هذه الصبغات ترتبط بالأجزاء السالبة الشحنة في الخلية مثل DNA و البروتينات بأواصر ايونية. مثل صبغة ازرق المثلين **Methylene blue**، اذ ان الجزء المسؤول عن اللون محمول على الايون الموجب للصبغة، وبما ان الخلية البكتيرية مشحونة بشحنة سالبة فأنها سوف تتحد مع الايون الموجب للصبغة والمسؤول عن اللون وبالتالي تصطبغ الخلية البكتيرية باللون الأزرق. أيضا من الأمثلة الأخرى صبغة الفوكسين القاعدي **basic fuchsine**، والسفرانين **Safranin**، والكرستال البنفسجي **Crystal violet**، اخضر المالاكايت **Malachite green**. وللأصباغ القاعدية قدرة كبيرة على صبغ الخلية البكتيرية وخاصة النواة، وهي شائعة الاستعمال في صبغ البكتريا.

ملاحظة: معظم أجزاء الخلية البكتيرية تكون ذات شحنة سالبة ولذلك الصبغات القاعدية في المختبر تكون هي الأكثر استعمال من الصبغات الحامضية"

❖ **تحسين كفاءة التصبيغ :**

تضاف بعض المواد لمحلول الصبغة لتزيد من قدرتها على الصبغ مثل الفينول **Phenol** الذي يزيد من قدرة الصبغة على النفاذية بالخلية كما ان استعمال الحرارة يزيد من قوة اتحاد الصبغة بمكونات الخلية وهناك مواد أخرى تسمى **مرسخات mordant** لها القدرة على ان تكون مع الصبغة مركبات غير ذائبة وترسب على الخلايا وتثبيتها بها فتزيد من القدرة على الصبغ ومن امثلة هذه المواد حمض التانيك tannic acid المستعمل في صبغ جدار الخلية واليود المستعمل في صبغة جرام.

❖ **يقسم التصبيغ الى ثلاثة مجاميع :**

1. **التصبيغ البسيط simple staining .**
2. **التصبيغ التفريقي Differential staining** : منها :
   - صبغة جرام Gram's stain.
   - الصبغة المقاومة للحامض acid fast stain.

3. تصبيغ التراكيب **Structural staining** : منها :
   - تصبيغ الابواغ Spore staining.
   - تصبيغ المحفظة Capsule staining.
   - تصبيغ الاسواط Flagellar staining.

❖ **تحضير وتثبيت البكتريا للتصبيغ Preparation & Fixation bacteria for staining :**

طريقة العمل Procedure :

1. نحضر شريحة زجاجية نظيفة ومعقمة وجافة.
2. نضع قطرة صغيرة من المزرعة البكتيرية السائلة بواسطة عروة التلقيح inoculating loop على الشريحة الزجاجية، بينما لو اخذنا البكتريا من مزرعة صلبة ففي هذه الحالة توضع قطرة من الماء المقطر على الشريحة وتمزج جيدا مع جزء المستعمرة المأخوذ بواسطة عروة التلقيح.
3. ننشر العينة على الشريحة بواسطة غطاء الشريحة لغرض تكوين طبقة رقيقة.
4. نجفف المسحة وذلك بأمرار الشريحة فوق اللهب ثلاث مرات الى اربع مرات.
5. نضيف عدة قطرات من الصبغة المراد استعمالها.
6. نغسل الشريحة بالماء بهدوء ثم نجفف الشريحة ونفحص بالعدسة الزيتية.

- **أهمية تثبيت البكتريا :**

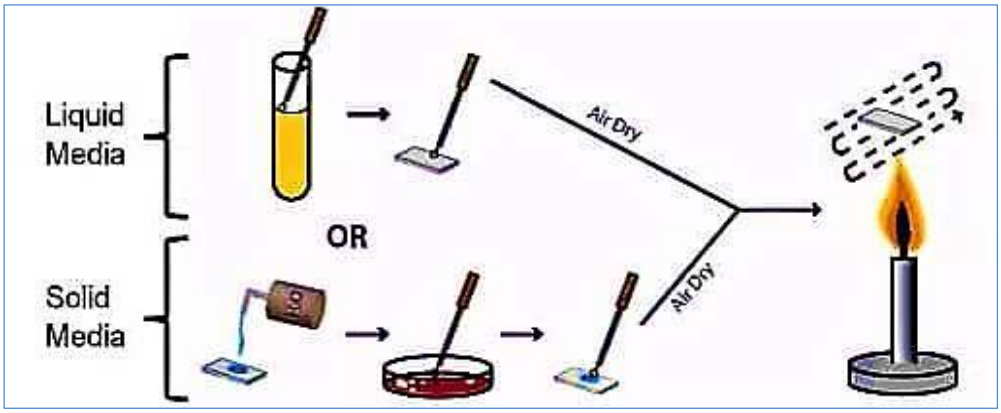
1. تأكيد التصاق adhesion الخلايا البكتيرية على الشريحة الزجاجية.
2. قتل الخلايا المثبتة.
3. تغيير طبيعة انزيمات الخلية وذلك يمنعها من هضم أجزاء الخلية الذي قد يؤدي الى التحلل الذاتي autolysis وفقد العينة.
4. تخثير المواد البروتينية للخلية.

- **طرق التثبيت :**

1. **التثبيت بالحرارة heat fixation** : ويتم بإمرار الشريحة على لهب بنزن Bunsen burner عدة مرات، وفيها يجب ان يراعى ان استعمال الحرارة اكثر من اللازم يؤدي الى تشوه شكل وتراكيب الخلية المصبوغة، لذا يجب ان تكون الشريحة دافئة وليست ساخنة.

2. **التثبيت الكيميائي Chemically fixation** : ويتم بوضع الكحول المثيلي methyl alcohol بنسبة 95% لمدة دقيقة واحدة ثم نميل الشريحة للتخلص من الكحول الفائض.

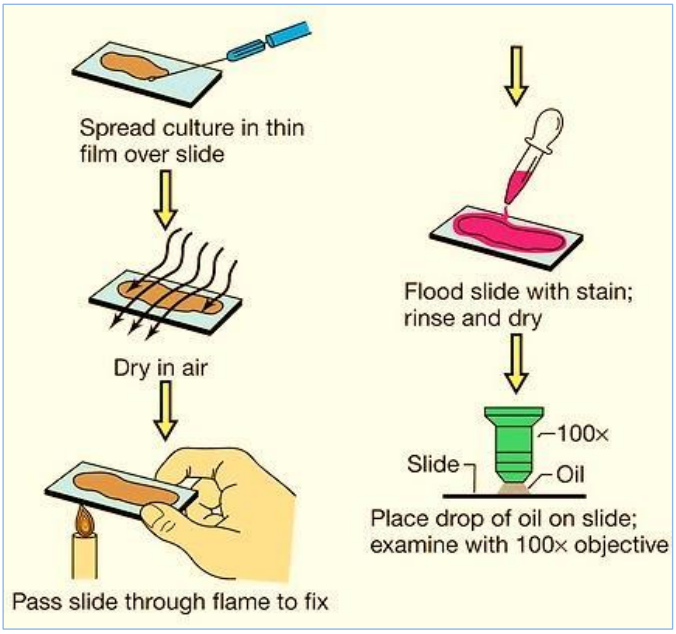
ملاحظة: عند تصبيغ الشريحة يجب ان تمسك الشريحة بالأصابع من حوافها حتى لا يعلق بها أي مواد دهنية موجودة بالأصبع. والتثبيت النموذجي هو الذي يحفظ تركيب الخلية في شكلها ووضعها الطبيعي دون حدوث تشوهات او ظهور تراكيب لم تكن موجودة بالخلية البكتيرية.



❖ **التصبيغ البسيط Simple staining :**

للتصبيغ البسيط دور مهم في التعرف على شكل البكتيريا وابعاد الخلية وترتيب الخلايا وبالتالي يساعد في التشخيص الأولي للبكتيريا. يقصد بالتصبيغ البسيط هو استعمال صبغه واحده فقط في التصبيغ للبكتيريا ويتم بان توضع عده قطرات من الصبغة لمده كافيه على الغشاء البكتيري المثبت ثم يتم غسل الصبغة بماء وتجفف الشريحة، بعد ذلك تفحص باستعمال العدسة الزيتية في المجهر الضوئي، يعتمد الصبغ البسيط على حقيقه ان الخلايا البكتيرية تختلف كيميائياً عن الوسط المحيط بها، لذلك فإنها تصطبغ لإظهار تباين بينها وبين الوسط. من اشهر الصبغات المستخدمة فيها هي صبغه ازرق المثليين والسفرانين والبنفسجي البلوري والفوكسين.

التصبيغ البسيط الذي يستهدف الخلايا البكتيرية ذاتها يسمى **بالتصبيغ المباشر direct stain** والصبغ البسيط الذي يستهدف الخلفية ويترك الخلايا البكتيرية غير مصبوغة يسمى **بالتصبيغ السالب negative stain**، اذا كان الغشاء المحضر سميكا فسيظهر الغشاء المصبوغ ككتل متجمعة من ماده مصبوغة من قليل جدا من الخلايا الفردية.

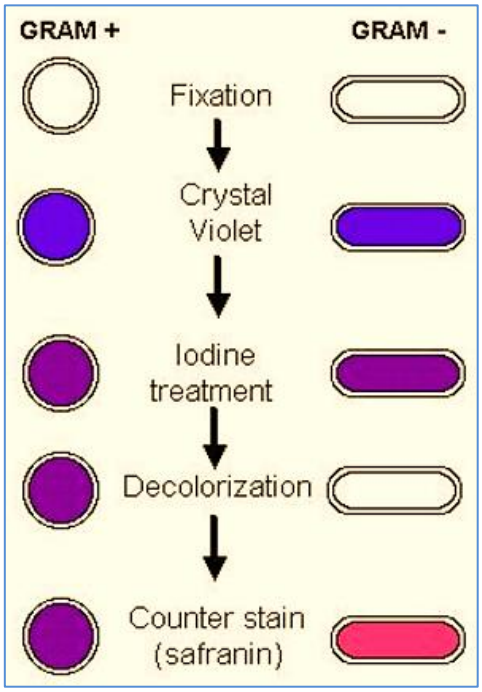


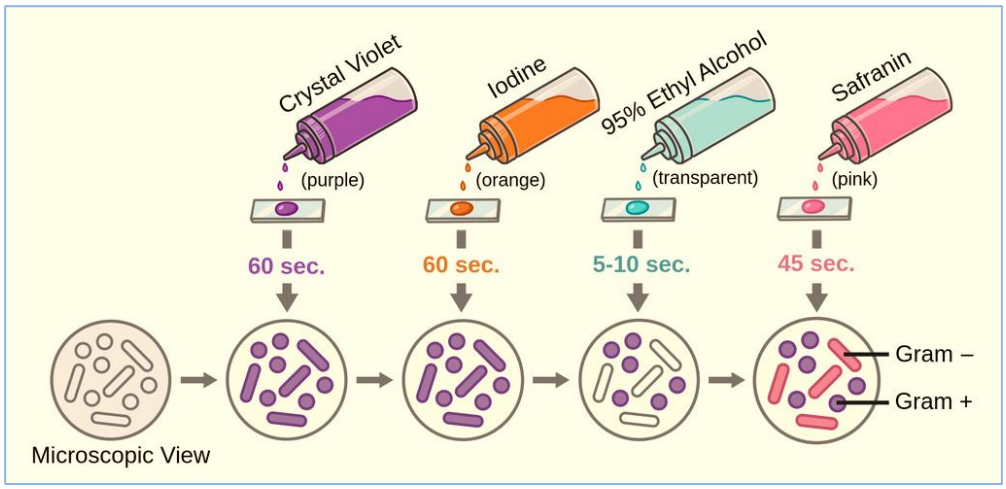
❖التصبيغ التفريقي Differential staining :

- **صبغة جرام Gram stain** : تعتبر صبغه جرام من اهم انواع الصبغات المستخدمة في المستشفيات للتعرف على البكتيريا ويعود الفضل في اكتشافها الى الطبيب ذو الاصل الدنماركي **Hans Christian Gram** الذي كان يعمل في مختبر التشريح التابع لمستشفى برلين Berlin عام 1880م ، حيث قام بتطوير هذه الطريقة لتساعده على تفرقه او انواع البكتيريا المسببة لذات الرئة **pneumonia**، اذ كان احدا انواع البكتيريا يصطبغ **بلون احمر** واطلِق عليها **(بكتيريا سالبة لصبغة جرام)** والاخرى تصطبغ بلون **بنفسجي** اطلق عليها **(بكتيريا موجبة لصبغة جرام)**، ويعتمد لون البكتيريا في صبغة جرام على التركيب الكيميائي لجدار الخلية.

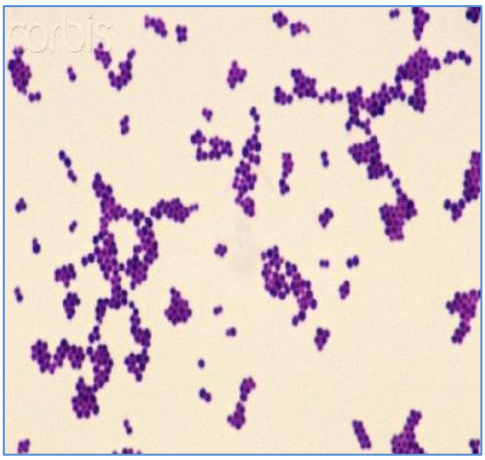
طريقة العمل Procedure :

1. نحضر مسحة Smear من البكتريا المراد فحصها، بعدها يتم تثبيتها (كما شرح سابقاً).
2. تضاف صبغة **الكرستال البنفسجي crystal violet** لمدة دقيقة ثم تغسل بالماء.
3. يضاف **اليود Iodine Solution** لمدة دقيقة واحدة ثم تغسل بالماء.
4. يضاف عامل **إزالة اللون decolorizing agent** لمدة 20 ثانية ثم تغسل بالماء. (عامل إزالة اللون كحول الايثانول بتركيز 95% او كحول واسيتون (aceton-alchol) بنسبة 1:1)
5. تضاف صبغة **السفرانين Safranin** لمدة دقيقة واحدة ثم تغسل بتيار خفيف من الماء.
6. تجفف الشريحة ثم تفحص تحت المجهر.

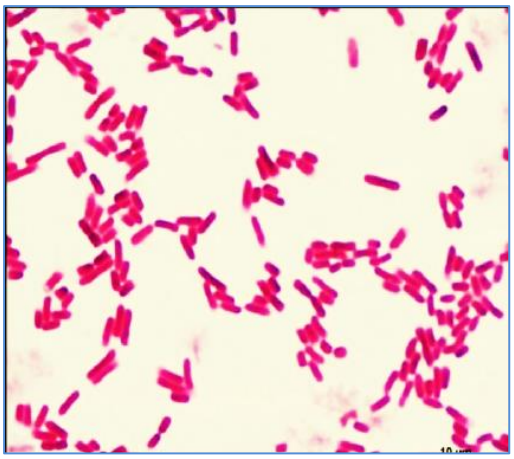




خطوات التصبيغ بصبغة جرام، نلاحظ تغير اللون بعد كل خطوة



Staph. aureus
(Gram-positive) +



E.coli
(Gram-negative) -