تصبيغ البكتريا Bacterial Staining

يمكن فحص شكل الخلية البكتيرية بطريقتين:

1. فحص البكتريا الحية المصبوغة كما هو الحال في فحص حركة البكتريا من خلال تقنية القطرة المعلقة.
2. فحص البكتريا الميتة المصبوغة بالصبغات

تكون البكتريا الحية عديمة اللون ولا يمكن رؤيتها بصورة واضحة في المياه لأنه لا يوجد فرق بين لونها ولون الماء ولهذا عندما تصبغ بالصبغات تصبح مخالفة للون المحيط وبذلك تكون مرئية.

<u>الصبغات</u>: هي عبارة عن أملاح تتركب من أيونين، أيون حامضي، وأيون قاعدي، وتسمى الصبغات عموماً حسب الأيون الملون فيها بالصبغات القاعدية والحامضية أو المتعادلة.

الصبغات الحامضية تصبغ مكونات الخلية القاعدية (السايتوبلازم) بينما تصبغ الصبغات القاعدية مكونات الخلية الحامضية (الأحماض النووية) ولكي يتم صبغ الخلايا بكاملها لا بد من استخدام نوعي الصبغة الحامضي والقاعدي. توجد الصبغات على هيئة بلورات أو مسحوق وتذاب في سوائل خاصة مثل الماء والكحول ثم تحفظ في زجاجات خاصة.

توجد صبغات خاصة تستخدم لصبغ بعض أجزاء الخلية البكتيرية التي يمكن رؤيتها باستخدام العدسة الشيئية الزيتية ذات التكبير العالي والتي يتلاءم استخدامها مع التحضيرات المصبوغة أكثر من المسحات الرطبة.

تختلف البكتريا عن محيطها من الناحية الكيمياوية ولهذا يمكن تفريقها عن محيطها بالتصبيغ الذي يعتمد على تفاعل متخصص بين الصبغة والخلية وليس مع المحيط. وللتصبيغ أهمية كبيرة في دراسة الأحياء المجهرية وذلك لعدة نقاط:

1. دراسة المظهر الخارجي للبكتريا الذي يشمل شكلها وتجمعها.

2. دراسة بعض التراكيب الداخلية مثل جدار الخلية والفجوات والأجسام النووية.
3. إمكانية استخدام التكبير العالي الزيتي.

تحضير وتثبيت البكتريا لغرض التصبيغ

يجب تثبيت المادة قبل صبغها أي جعلها ملتصقة بالشريحة، وإذا لم تثبت المسحة أو المادة فسوف تزول أثناء خطوات التصبيغ، وتستعمل الحرارة لغرض التثبيت في أغلب طرائق التصبيغ، فهي تقوم بلصق الخلايا على الشريحة إضافة إلى قتلها، وتكون خطوات التثبيت كالآتي:

1. تؤخذ قطرة من الماء وتوضع على الشريحة وتمزج مع البكتريا المأخوذة من الوسط الصلب.
2. تنشر القطرة على الشريحة بحيث تكون مسحة رقيقة جداً.
3. تترك الشرائح لتجف في الهواء.
4. تمرر المسحة ثلاث مرات على الجزء العلوي من لهب المصباح، ويجب عدم المبالغة بزيادة تعريض المسحة للحرارة حيث أن الحرارة العالية تحطم شكل وتركيب الأحياء المجهرية المعدة للتصبيغ، ولهذا يجب أن تكون الشريحة ساخنة فقط وليست حارة جداً عند لمسها بظهر اليد.

تعتبر عملية التثبيت هذه كافية لقتل الأحياء المجهرية حيث يتخثر بروتوبلازم الخلية وبذلك تلتصق الخلايا بالشريحة، والتثبيت الجيد هو الذي يحافظ على شكل وتركيب الخلايا حسب تجمعاتها الطبيعية ولهذا فإنها تستخدم بنطاق واسع في الدراسات البكتريولوجية. هذا ويمكن استخدام بعض المواد الكيمياوية لتقوم بالتثبيت بدلاً من الحرارة والكحول خير مثال على هذه المواد.

أنواع الصبغات

أ. الصبغات البسيطة Simple stain

وهي الصبغات التي تتكون من نوع واحد من الصبغات وتكون على نوعين:

1. الصبغات القاعدية Basic dyes
2. الصبغات الحامضية Acidic dyes

التصبيغ المباشر بالصبغات البسيطة (التصبيغ الموجب)

إن الصبغات البسيطة عبارة عن أملاح يكون أحد أيوناتها ملوناً. والملح عبارة عن مركب كيمياوي يكون أحد أيوناته موجباً والآخر سالباً، فمثلاً صبغة أزرق المثيلين Methylene blue عبارة ملح كلوريد المثيلين الأزرق وهو يتأين كالآتي:

كلوريد أزرق المثيلين ⟵ أزرق المثيلين$^{(+)}$ + الكلوريد$^{(-)}$

يعود لون هذه الصبغة إلى الأيون الموجب المتمثل بأزرق المثيلين، أما البكتريا فتحمل شحنات سالبة عندما يكون الوسط النامية فيه يحمل أساً هيدروجينياً متعادلاً أو قريباً من التعادل. وعلى هذا الأساس ترتبط الشحنات السالبة في الخلية البكتيرية مع الشحنات الموجبة لأيون أزرق المثيلين وبذلك تصطبغ الخلية البكتيرية بصبغة أزرق المثيلين نتيجة للتجاذب ما بين الشحنات الموجبة للصبغة مع الشحنات السالبة للخلية البكتيرية.

التصبيغ غير المباشر (السالب) Negative stain

تعتبر صبغة الأيوسين من الصبغات الحامضية وتتمثل بملح Sodium eosinate الذائب والذي يتأين بدوره إلى أيونات الصوديوم$^{(+)}$ الموجبة وأيونات الأيوسين$^{(-)}$ والحاملة للصبغة، أي أن الصبغة تحمل شحنة سالبة. وهناك صبغات حامضية أخرى مثل النكروسين Nigrosin وأحمر الكونكو Congo red.

لا تصطبغ الخلية البكتيرية بالصبغات الحامضية نظراً للتنافر الموجود بين الشحنات السالبة للخلية والشحنات السالبة للصبغة ولهذا فإن الصبغة تبقى خارج الخلية وتترسب حول جدار الخلية، ولهذا يسمى هذا النوع من التصبيغ غير المباشر أو السالب. فيحدث في التصبيغ السالب أن الخلية البكتيرية لا تصطبغ بالصبغة وأن محيطها هو الذي يصطبغ وتبقى الخلية بدون لون ولهذا السبب لا تستخدم هذه الصبغة بنطاق واسع في الدراسات البكتريولوجية وتقتصر أهميتها فقط في توضيح شكل البكتريا الظاهري إضافة إلى حجمها.

ب. الصبغات التفاضلية Differential dyes

تعتمد طرق التصبيغ البسيطة على أساس الاختلاف ما بين الخلايا البكتيرية ومحيطها كيمياوياً وبذلك يمكن صبغها دون محيطها. كما تختلف الأحياء المجهرية أيضاً عن بعضها البعض الآخر في بعض الصفات الفيزياوية والكيمياوية وتبعاً لذلك تختلف تفاعلات هذه الخلايا مع الصبغات المختلفة وعلى هذا الأساس وجدت الأصباغ التفاضلية والتي تستخدم كأساس في تفريق أنواع البكتريا.

1. صبغة گرام Gram stain

تعتبر صبغة گرام من أهم الصبغات التفاضلية المستخدمة في الدراسات البكتيريولوجية حيث بواسطتها تقسم البكتريا إلى مجموعتين كبيرتين وهما المجموعة الموجبة لصبغة گرام والمجموعة السالبة لصبغة گرام.

يعتمد الفرق بين هاتين المجموعتين على أساس الاختلاف في تركيب الطبقات السطحية لجدران الخلايا البكتيرية. حيث أن جدار الخلية في البكتريا الموجبة لصبغة گرام تتكون من طبقة سميكة من مادة Peptidoglycan الذي يعمل كحاجز يحتفظ باللون الأرجواني لصبغة البنفسج البلوري ولا يزال اللون حتى بعد استعمال القصر بالكحول.

أما البكتريا السالبة لصبغة گرام فتتكون من طبقة خفيفة من الـ Peptidoglycan وتغلفها من الخارج طبقة من الـ Lipopolysaccharide والتي لا تستطيع الاحتفاظ باللون الأرجواني لصبغة البنفسج البلوري مما يؤدي إلى زوال الصبغة عند قصرها بالكحول وبذلك تأخذ اللون المضاد وهو اللون الأحمر لصبغة السفرانين.

تتضمن صبغة گرام أربعة محاليل وهي الصبغة القاعدية (Crystal violet)، ومادة مثبتة (اليود Iodine)، ومادة قاصرة (الكحول الأثيلي 95%)، وصبغة مخالفة باللون Counter stain (السفرانين).

<u>المادة المثبتة Fixative agents</u>: تعمل المادة المثبتة على زيادة لصق الصبغة بالخلية البكتيرية أي أنها تثبت الصبغة بمعنى آخر، ومن الأمثلة على المواد المثبتة والمستخدمة هي بعض الحوامض والقواعد أو الأملاح المعدنية أو اليود، وتكون الصبغة جيدة باستخدام المثبت، كما أن الصبغة لا تزال بسهولة بعد إضافة المثبت.

<u>المواد القاصرة Decolorizing agents</u>: وهي عبارة عن مواد مزيلة للصبغة الأولية التي اصطبغت بها الخلايا، مثل كحول الأثيلي (95%) حيث أن بعض الخلايا تفقد الصبغة بسهولة مقارنة بخلايا أخرى لا تفقد الصبغة بسهولة، وعلى أساس الفرق في قابلية القصر هذه يمكن التمييز بين أنواع البكتريا من خلال الصبغات التفاضلية.

<u>الصبغة المخالفة Counter stain</u>: وهي صبغة قاعدية مخالفة باللون للصبغة القاعدية الأولى والغرض منها صبغ الخلايا التي فقدت الصبغة الأولى خلال عملية القصر، أما الخلايا التي لم تفقد الصبغة الأولى فإنها لا تصطبغ بها بل تبقى محتفظة بالصبغة الأولى.

طريقة العمل:

1. تحضر مسحة بكتيرية مثبتة.
2. تصبغ المسحة بصبغة Crystal violet بكمية وافرة لمدة 30 ثانية.

3. تغسل الشريحة جيداً بالماء الجاري.
4. تغطى المسحة بمحلول اليود ويترك التفاعل لمدة 30 ثانية.
5. يسكب محلول اليود بدون غسل الشريحة.
6. تقصر المسحة بالكحول الأثيلي 95% ولمدة 10–20 ثانية.
7. تغسل الشريحة بالماء الجاري.
8. تصبغ المسحة بصبغة السفرانين الحمراء ولمدة 20–30 ثانية
9. تغسل الشريحة بالماء الجاري وتجفف بورق التجفيف.
10. تفحص الشريحة تحت العدسة الزيتية.

ملاحظة: إن استعمال المحاليل الصبغية بصورة غير كافية من ناحية الكمية والوقت المتاح ينتج عنه تصبيغ غير جيد.

2. الصبغة المقاومة للحامض Acid fast stain (AFS)

وهي صبغة تفاضلية تقيس مدى مقاومة الخلايا المصبوغة للقصر بالحامض، ومن الأنواع البكتيرية التي تصطبغ بهذه الصبغة هي بكتريا السل *Mycobacterium tuberculosis* و *Actinomycetes* بالنظر لاحتواء جدران خلاياها على نسبة عالية من الدهن.

يحتاج صبغ هذه الأنواع من الخلايا إلى التسخين بالحرارة إضافة إلى استخدام صبغة ذات ألفة قوية للتفاعل مع هذا الخلايا بحيث إذا ما تم الصبغ يصعب إزالته، إذا أن خلايا البكتريا المقاومة للحامض تقصر ببطء بالكحول المحمض مقارنة ببقية أنواع البكتريا. إلا أن لها القابلية على استرجاع الصبغة الأولى بعد إضافة الصبغة المخالفة وتستخدم طريقة Ziehl-Neelsen Method لهذا الغرض. وتعتبر هذه الصبغة مهمة في تشخيص بعض الأنواع مثل بكتريا السل وبكتريا الجذام *Mycobacterium leprae* وكصبغة تفريقية تستخدم في تصنيف بعض أنواع البكتريا الرمية.

طريقة العمل:

1. تحضر مسحة بكتيرية مثبتة ثم توضع على مشبك حديدي.
2. يوضع الورق النشاف فوق المسحة وتضاف صبغة الكاربول فوكسين الحمراء فوق الورق وتبقى لمدة (5−10) دقائق، وتسخن الصبغة بعد إضافتها بواسطة لهب مصباح خفيف من أسفل المشبك ويجب الحذر من عدم جفاف الصبغة فوق المسحة وذلك بإضافة صبغة إضافية عند الحاجة.
3. تغسل الصبغة بالماء.
4. تقصر الصبغة بالكحول المحمض (95% كحول أثيلي مع 2,5% حامض الكبريتيك) لمدة (10−20) ثانية.
5. تغسل الشريحة بالماء الجاري.
6. تضاف الصبغة المخالفة وهي صبغة أزرق المثيلين وتترك لمدة 30 ثانية وبدون تسخين.
7. تغسل الشريحة بالماء وتجفف بورق النشاف.
8. تفحص الشريحة تحت العدسة الزيتية.

ملاحظة: تظهر البكتريا المقاومة للقصر بالحامض حمراء اللون ويظهر محيط الخلايا باللون الأزرق.

ج. الصبغات التركيبية Structural Stain

تستخدم هذه الصبغات لغرض دراسة بعض الأجزاء التركيبية لخلية البكتريا بالمجهر الضوئي، وأهم الصبغات التركيبية:

1. صبغة المواد النووية Feulgen
2. صبغة السبورات الداخلية Endospore Stain
3. صبغة جدار الخلية Cell Wall Stain
4. صبغة المحفظة Capsule Stain
5. صبغة الأسواط Flagella Stain