# تصبيغ البكتريا Bacterial Staining

## التصبيغ البسيط Simple Staining

تتميز الاحياء المجهرية بشفافيتها العالية وهذا يعني انها تسمح بمرور الضوء من خلالها بكثافه عالية تقارب كثافة الضوء المار من خلال الشريحة الزجاجية تقريبا ، عليه فان رؤيتها تحت المجهر ، وهي بحالتها الاعتيادية غير المصبوغة ، لا تكون واضحة . اي انها لا تميز كثيراً عن الشريحة الزجاجية . من هنا يتم التصبيغ Staining خلايا الاحياء المجهرية ولاسيما البكتريا . بكلمه اخرى ان الغرض الاساس من التصبيغ هو جعل خلايا البكتريا قابلة للرؤيا تحت المجهر على نحو مميز . هذا اولاً ثم ان التصبيغ يساعد في تمييز الاشكال الخارجية للبكتريا وتمييز بعض اجزائها مثل الابواغ أو السبورات Spores والكبسولة او المحفظة Capsule .

الصبغات dyes هي مواد كيميائية مؤلفة من جزأين احداهما عضوي ويسمى بـ Chromophore وهو المسؤول عن عملية التلوين ، واخر غير عضوي يتمثل بأيون قد يكون سالباً او موجباً مكمل للجزء العضوي . فصبغة المثلين الازرق Methylene blue تحتوي على ايون الكلور ( ذي الشحنة السالبة ) بصفته جزءاً غير عضوي مقابل جزء عضوي يحمل شحنة موجبة .

وتقسم الصبغات على **اساس الشحنات التي تحملها** الاجزاء العضوية منها والمسؤولة عن التصبيغ او من الناحية الكيميائية الى :-

**1- الصبغات القاعدية Basic dyes:-** ومن الامثلة عليها :-

- Methylene blue لون الصبغة ازرق .
- Carbol fuchsin لون الصبغة احمر .

- Malachite green لون الصبغة اخضر .
- Safranine لون الصبغة وردي .
- Crystal violet لون الصبغة بنفسجي .

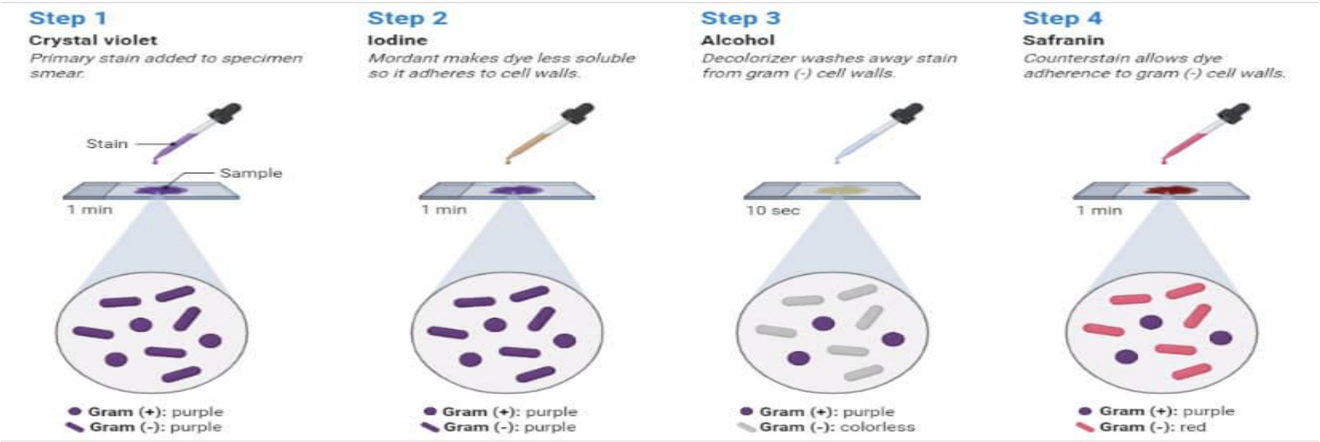
ويكون الجزء العضوي في هذه الصبغات حاملاً لشحنة الموجبة اما الجزء غير العضوي فيكون سالباً .

**2- الصبغات الحامضية Acidic dyes :-** من ابرز الامثلة عليها :-

Acidic fuchsin و Nigrosine ويكون الجزء العضوي في هذه الصبغات حاملاً لشحنة سالبة، اما الجزء غير العضوي فيكون المكمل فيكون موجباً . وهذه الصبغات تسمى احيانا بالسالبة Negative dye ولها استعمالاتها الخاصة في مجال الاحياء المجهرية كما سنأتي اليها لاحقا .

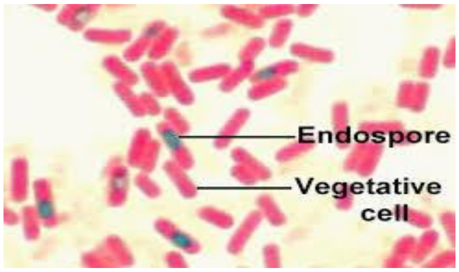
وثمة تقسيم اخر للصبغات على **اساس الغرض من استخدامها** او الغرض من عملية التصبيغ :-

1. **التصبيغ البسيط Simple Staining** :- وفية تستخدم صبغة واحده في جميع مراحل عملية التصبيغ .
2. **الصبغات التفريقية Differential stains:-** مثل Gram stain- Giemsa stain- Acid-Fast Stain وفيها تستخدم اكثر من صبغة واحده خلال مراحل التصبيغ . وبالنتيجة تكتسب خلايا البكتريا لون صبغة واحدة من هذه الصبغات وليس جميع الصبغات المستخدمة . وتفيد هذه الصبغات في تمييز البكتريا الى مجموعتين او اكثر اعتماداً على لون الصبغة المكتسبة .



3. **الصبغات السالبة Negative stains :-** ويقصد بها الصبغات الحامضية وهذه لا تلون البكتريا نفسها وانما المنطقة التي تحيط بها تاركة البكتريا لتبدو شفافة تحت المجهر في محيط مظلم .

4. **الصبغات المتخصصة Special stains** :- وهذه الصبغات تستخدم لتصبيغ اجزاء معينه من البكتريا مثل الابواغ Spore stain والكبسولة Capsule stain والاسواط Flagella stainمن دون اجزاء الخلية الاخرى .




## الفكرة الاساسية في التصبيغ البسيط

يمكن اعتبار البكتريا ذات طبيعة حامضية او انها تسلك سلوكاً حامضياً لاحتوائها على عدد من المكونات الحاملة للشحنات السالبة نحو بعض البروتينات والاحماض النووية وغيرها ، والتي عند اضافة الصبغة اليها ( لاسيما الصبغات القاعدية ) فان الجزء العضوي المسؤول عن التصبيغ والحامل لشحنة موجبة سوف يرتبط بهذه المكونات فيضفي على البكتريا لون الصبغة .

### أولاً :- التصبيغ البسيط Simple Staining

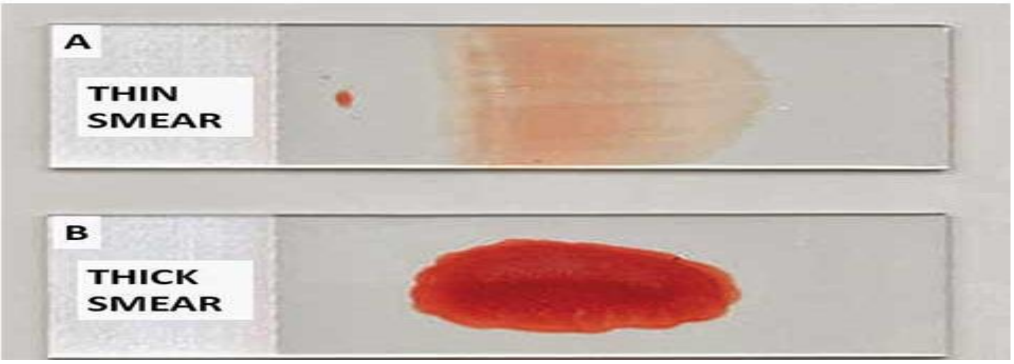
تسبق عملية التصبيغ خطوة اساسية ومهمة وهي خطوة تحضير الغشاء Smear التي تستهدف تثبيت خلايا البكتريا على الشريحة الزجاجية والتصاقها بها دون ازاحتها اثناء عملية التصبيغ التي يتخللها الغسل بالماء لإزالة الصبغة الزائدة .

### تحضير الغشاء Smear

1) تؤخذ شريحة زجاجية نظيفة وتوضع عليها قطرة ماء بوساطة الناقل الجرثومي Loop .

2) تؤخذ مسحة من النمو من مزرعة بكتريا صلبة ( بكتريا نامية في وسط صلب ) المراد فحصها وتمزج جيدا مع قطره الماء على سطح الشريحة وتنتشر بوساطة ابره التلقيح على مساحه 1 سم$^2$ دائرية .

3) يجفف مزيج البكتريا وقطرة الماء على الشريحة تجفيفاً هوائياً او بأمرارها على اللهب ، على بعد محدد يحقق التجفيف من دون الحرق . ويتم مسك الشريحة والحالة هذه بالملقط . ويعد التجفيف خطوة مهمه لضمان التصاق خلايا البكتريا بالشريحة .




## خطوات التصبيغ

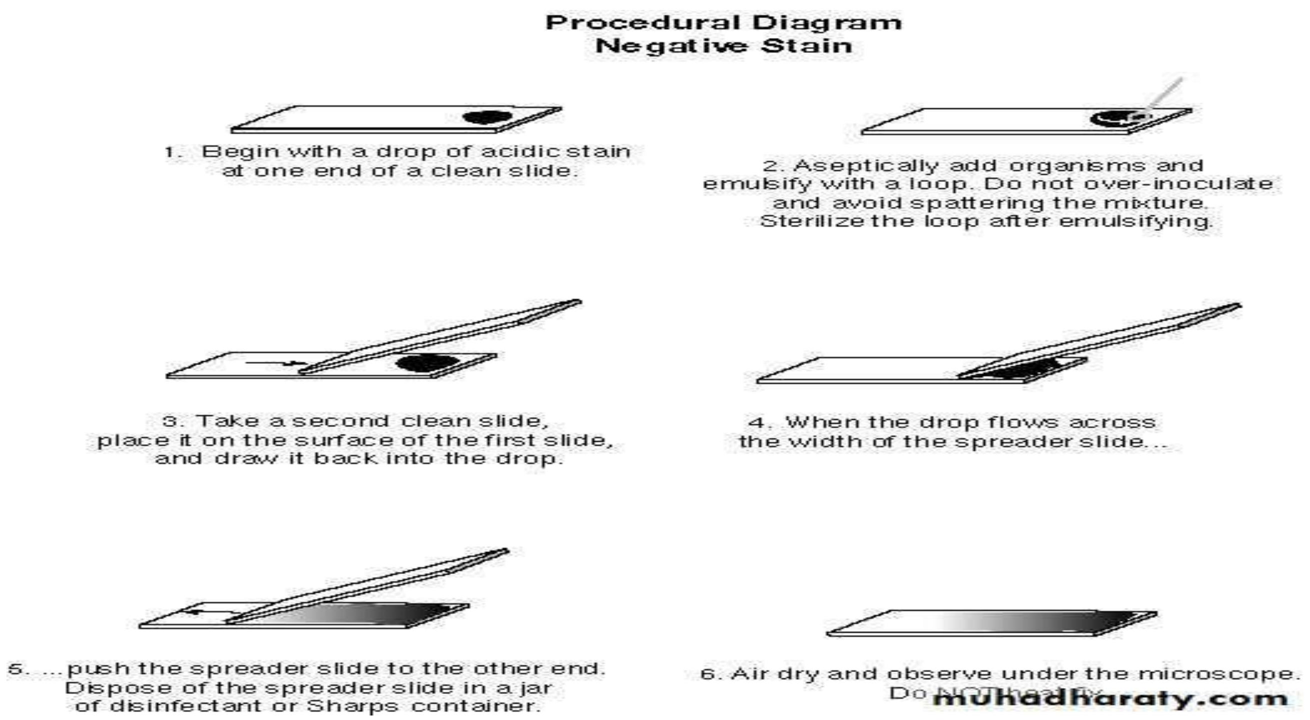
1. توضع قطرة من الصبغة المطلوبة ( صبغة المثلين الازرق او ايه صبغة قاعدية اخرى ) على الغشاء المحضر وتترك لمدة من 2-3 دقائق .
2. تغسل الصبغة الزائدة من على الغشاء بإمرار ماء الحنفية الجاري بسرعة متوسطة على سطح الشريحة .
3. تجفيف الشريحة هوائيا او باللهب وبحسب الطريقة التي ذكرت في تحضير الغشاء ثم تفحص البكتريا تحت المجهر على القوة الصغرى اولا ثم تحت العدسة الزيتية ، تسجل الملاحظات الخاصة بشكل ولون البكتريا وتجمعاتها .

**ثانياً :- التصبيغ السالب Negative staining**

يهدف هذا النوع من التصبيغ على التعرف على الشكل الخارجي ( المورفولوجي ) للبكتريا اذا يستخدم فيه صبغات حامضية ، اي التي تتنافر مع خلايا البكتريا ذات الطبيعة الحامضية ايضا . فيحدث ان الصبغة لا تدخل الى خلايا البكتريا ولا تصطبغ بها فتبقى الصبغة خارج الخلايا مما تكسب الاجزاء المحيطة بها لون الصبغة نفسها وغالبا ما تستخدم لهذا الغرض صبغة النيكروسين او الحبر الاسود .

**خطوات التصبيغ**

1. توضع قطرات من صبغة النيكروسين Nigrosin قريباً من احدى نهايتي الشريحة الزجاجية .
2. تؤخذ مسحة من النمو من مزرعة البكتريا وبوساطة الناقل الجرثومي وتمزج مع الصبغة على الشريحة .
3. يتم نشر مزيج البكتريا والصبغة على طول الشريحة بوساطة شريحة اخرى نظيفة على ان يكون النشر متجانسا بإمرار الشريحة الثانية على الاولى بزاوية مقدارها 45 درجة .
4. تترك الشريحة الى ان تجف تماما وتفحص تحت المجهر باستخدام العدسة الصغرى ثم الزيتية حيث تبدو خلايا البكتريا شفافة ( غير مصبوغة ) تتلألأ في محيط اسود مصبوغ بلون صبغة النيكروسين الاسود وتدون المعلومات المطلوبة . وكما يلاحظ من الخطوات المذكورة في اعلاه ان ليس هناك معاملة حرارية في طريقة التصبيغ هذه وذلك لأنها خاصة للتعرف على الشكل الخارجي للبكتريا اذ ان المعاملات الحرارية تؤدي الى تشويه الخلايا او تدميرها .


Procedural Diagram
Negative Stain
1. Begin with a drop of acidic stain at one end of a clean slide.
2. Aseptically add organisms and emulsify with a loop. Do not over-inoculate and avoid spattering the mixture. Sterilize the loop after emulsifying.
3. Take a second clean slide, place it on the surface of the first slide, and draw it back into the drop.
4. When the drop flows across the width of the spreader slide...
5. ...push the spreader slide to the other end. Dispose of the spreader slide in a jar of disinfectant or Sharps container.
6. Air dry and observe under the microscope.
Do
muhadharaty.com

## المصادر :

1- قازانجي ، محمد عمر محي الدين (2017) . التجارب العملية في علم الاحياء المجهرية . كلية الزراعة- جامعة بغداد . العراق .

2- الدليمي، خلف صوفي داود (1988) . علم الاحياء المجهرية للأغذية – الجزء العملي. جامعة بغداد . العراق .

3- الشريفي ، حسن رحيم وسالم حسين محمد (1992). مايكروبايولوجيا الالبان العملي . مطبعة دار الحكمة – جامعة البصرة .