**تصبيغ البكتريا Bacterial Staining**

تستخدم طرق مختلفة لتصبيغ البكتريا حيث يساعد التصبيغ في تمييز شكل البكتريا وحجمها وطريقة ترتيبها ، اضافة الى ذلك فأنها تمكننا من رؤية بعض التراكيب الخارجية كالأبواغ وبالتالي تساعدنا في تحديد نوع البكتريا في النموذج.

البكتريا الحية تكون عديمة اللون تقريبا وهي لا تتميز عن الوسط المائي المعلقة به ولهذا لايمكن رؤيتها بوضوح، ولذلك فان صبغ البكتريا تجعلها تتميز في اللون عن الوسط الموجود به فتصبح مرئية وتسهل رؤيتها.

## طرق التصبيغ :

تستعمل في الوقت الحاضر انواع مختلفة من الصبغات وبطرق متعددة للتصبيغ.

**1- صبغات بسيطة simple stain وتشمل:-**

أ- صبغات قاعدية.

ب- صبغات حامضية .

ت- صبغات غير محددة التأثير.

**2- صبغات تفريقية (مركبة) وتشمل:-**

أ- صبغة كرام Gram stain.

ب- الصبغة الصامدة للأحماض acid- fast stain.

**3- صبغات فحص تركيب الخلية وتشمل:-**

أ- صيغة فولجين والخاصة بتصبيغ المادة النووية.

ب- صبغة السبورات الداخلية.

ت- صبغة جدار الخلية.

ث- صبغة الكبسول.

ج- صبغة الاسواط.

**ويمكن تصنيف طرق التصبيغ الى :**

1- التصبيغ البسيط (مثل ازرق المثيلين)
2- التصبيغ المركب ( مثل صبغة كرام).

**التصبيغ البسيط simple staining :**

تستخدم في هذه الطريقة صبغة واحدة مثل ازرق المثيلين methylene blue حيث تجري الخطوات التالية :-

1- تحضير المسحة البكتيرية بالطريقة السابقة الذكر.
2- تغطى الشريحة بصبغة ازرق المثيلين وتترك لمدة 1-2 دقيقة.
3- تغسل الطريقة بالماء الجاري وتجفف باستخدام ورقة الترشيح او تركها تجف بهواء المختبر .
4- تفحص بالمجهر باستخدام العدسة الزيتية بعد وضع قطرة الزيت عليها.

**التصبيغ المركب compound staining:**

تستخدم في هذه الطريقة اكثر من صبغة واحدة كما تسمى ايضا بالصباغة التفريقية differential staining وتعتبر صبغة كرام من اهم طرق الصباغة التفريقية المستخدمة في الدراسات البكترولوجية.

**صبغة كرام gram stain**

عرفت طريقة كرام للتصبيغ لأول مرة 1884 من قبل Cristian Gram وتستخدم حاليا على نطاق واسع لتمييز البكتريا اعتمادا على طريقة التصبيغ الى :-

1- البكتريا الموجبة لصبغة كرام Gram positive (G+)
2- البكتريا السالبة لصبغة كرام Gram negative (G -)

تحتاج صبغة كرام لأربعة محاليل مختلفة:

1- الصبغة الاساسية : وهي صبغة الكريستال البنفسجي (crystal violet)
2- المثبت او المرسخ : وهو عبارة عن مادة تزيد من قابلية الجذب بين الخلية والصبغة مما يساعد على ترسيب الصبغة وتثبيتها على سطح الخلية ويستعمل لهذا الغرض اليود.

3- عامل مزيل اللون decoloring agent : وهو عبارة عن مادة تزيل الصبغ الاولية من الخلية المصبوغة ويستعمل لهذا الغرض الكحول الاثيلي بتركيز 95%.

4- الصبغ المضادة counter stain : وهي صبغة تختلف في لونها عن الصبغة الاساسية والغرض من استعمالها هو اعطاء الخلايا التي ازيلت منها الصبغة الاساسية لونا يختلف عن لون الصبغة الاساسية ويستعمل لهذا الغرض صبغة السفرانين ذات اللون الوردي او الاحمر الفاتح.

**طريقة العمل:**

1- تحضير الشريحة (اللطخة) وتثبت بالحرارة

2- الصبغ بصبغة الكرستال البنفسجي لمدة 30 ثانية.

3- غسل الشريحة بالماء لازالة الصبغة الزائدة.

4- يضاف محلول اليود ويترك لمدة 30 ثانية للتفاعل.

5- يغطى الغشاء البكتيري بالكحول الاثيلي 95% ويترك لمدة 10-2- ثانية.

6- الغسل بالماء.

7- تصبغ الشريحة بالصبغة المضادة (السفرانين) وتترك لمدة 20-30 ثانية ثم تجفف الشريحة بورق النشاف.

8- فحص الشريحة.

**العوامل المؤثرة على كفاءة التصبيغ بصبغة كرام**

1- كثافة العالق البكتيري او المسحة حيث ان المسحة الكثيفة تكون عملية ازالة اللون فيها صعبة وبالعكس اذا كانت المسحة قليلة فتكون ازالة الصبغة فيها سريعة.

2- تركيز نقاوة المواد او الكواشف المستخدمة للتصبيغ.

3- الغسل وتجفيف المسحة بين خطوات التصبيغ حيث ان الماء الزائد على سطح الشريحة يعمل على تخفيف الكواشف ولاسيما اليود.

4- طبيعة المزرعة البكتيرية وعمرها اذ يجب ان تكون المزرعة البكتيرية حديثة لان القديمة تحتوي عل خلايا ميته وهذا يعطي نتيجة كاذبة بالتصبيغ.