الصبغات الميكروبية Microbial Stains

لتحديد أشكال الأحياء الدقيقة العامة أو أجزائها المختلفة لابد من صبغها بعد تثبيت على سطح الشريحة ويقصد بعملية الصبغ هذه تلوين الكائنات الحية الدقيقة بصبغات خاصة لتحديد أجزائها المختلفة.

الصبغة Stain:

هى مادة ملونة عضوية لها القدرة على الالتحام مع المواد الأخرى معطية لها اللون. ويجب أن يتوافر لها شرطان أساسيان هما:

1. توافر ما يسمى حامل اللون، وهو الذي يعطى الصبغة لونها المميز.

2. توافر العامل الذي يعطى للصبغة القدرة على التأين، والذي يجعلها أكثر نشاطاً، ويجعل لها القدرة على الالتحام بالجسم المصبوغ.

وتنقسم الصبغات إلي ما يلي:

أولاً:الصبغ البسيط Simple stain

ثانيا: الصبغ المفرق differential stain

ثالثا: الصبغ الخاص special stain

تحضير وتثبيت الغشاء البكتيري للصبغ

Preparation and Fixation of Bacteria for Staining

أهمية التثبيت :

1- يؤكد التصاق adhesion الخلايا البكتيرية على الشريحة الميكروسكوبية .

2- يقتل الخلايا المثبتة .

3- يغير طبيعة أنزيمات الخلية وذلك يمنعها من هضم أجزاء الخلية الذي قد يؤدي إلى التحلل الذاتي autolysis وفقد العينة.

4- تخثير المواد الابروتينية للخلية.

طرق التثبيت:

أ- تثبيت بالحرارة heat fix:

ويتم إما بتمرير الشريحة على لهب بنزن Bunsen burner عدة مرات _ ويراعى أن استعمال الحرارة أكثر من اللازم سيشوه شكل وتركيب الخلية المصبوغة ، لذا يجب أن تكون الشريحة دافئة وليست ساخنة .

ب- تثبيت كيميائي chemically fix:

بوضع كحول ميثيلي 95% methyl alcohol لمدة دقيقة ثم نميل الشريحة للتخلص من الكحول الفائض .

تصبيغ البكتريا بصبغة كرام Gram Stain

وهي من الصبغات التفريقية التي تستخدم لتصبيغ البكتريا بهدف التشخيص وتحديد المواقع التصنيفية لها ومن هذه الصبغات صبغة كرام وسميت بهذا الاسم نسبة إلى مكتشفها الطبيب الدنماركي Dr.Hans Christian عام 1883م وتتكون صبغة كرام من الصبغات والمواد الآتية وحسب تسلسل استخدامها في عملية التصبيغ :

1. Crystal Violet .
2. Iodine Solution.
3. Ethanal %95.
4. Safranin (Counter Stain)

تتلخص خطوات التصبيغ بما يأتي :

1. بعد تحضير الغشاء من البكتريا المراد تصبيغها تضاف قطرات من صبغة الكرستال البنفسجي وتترك بحيث تلامس الغشاء لفترة دقيقة واحدة .
2. تغسل الصبغة الزائدة بالماء.
3. تضاف قطرات من محلول اليود على الغشاء وتترك لدقيقة واحدة.
4. تغسل الصبغة الزائدة بالماء.
5. تضاف قطرات من الكحول الاثيلي (بتركيز 95%) وتترك ملامسة للغشاء فترة ½ دقيقة.
6. يغسل الكحول الزائد بالماء.
7. تضاف قطرات من صبغة Safranin على الغشاء وتترك لمدة ½ دقيقة ثم تغسل بالماء.
8. تجفف الشريحة وتفحص بالعدسة الصغرى ثم بالعدسة الزيتية ، حيث نلاحظ إن البكتريا قيد الفحص أما اكتسبت لون الصبغة الأولى وهي صبغة الكريستال البنفسجي فيظهر عندئذ تحت المجهر باللون البنفسجي وتسمى البكتريا في هذه الحالة ببكتريا موجبة لصبغة كرام ويرمز لها G+ أو g+ أو إنها تظهر تحت المجهر بلون الصبغة الأخيرة وهي صبغة السفرانين الوردي وتسمى البكتريا في حالة ظهورها باللون الوردي أو الأحمر ببكتريا سالبة لصبغة كرام ويرمز لها بـ G− أو g− .

أن صفة الاحتفاظ باللون الوردي أو باللون البنفسجي صفة خاصة بالبكتريا على مستوى الجنس.

ومن الأمثلة على البكتريا السالبة لجنس كرام g− التي تظهر بصورة دائماً وليس بين فترة وأخرى وتظهر بالون الوردي أو الأحمر:

Escherichia coli , Enterobacter aerogenes , Salmonella typhi , Shigelle dysanteria وجميع البكتريا ضمن عائلة Enterobacteraceae

أمثلة على البكتريا الموجبة لصبغة كرام g+ والتي تظهر تحت المجهر باللون البنفسجي :

Clostridium Spp , Bacillus Spp , Lactobacillus Spp , Streptococcus Spp

النظريات التي تفسر تصبيغ خلايا البكتريا بصبغة كرام:

إن احتفاظ خلايا بعض أنواع البكتريا لصبغة الكريستال البنفسجي وظهورها تحت المجهر باللون البنفسجي واحتفاظ البعض الآخر بصبغة السفرانين وظهرها تحت المجهر باللون الأحمر يعود هذا الاختلاف إلى التباين في التركيب الكيمياوي لجدار الخلية بين هذين النوعين من البكتريا .

فجدار خلايا كرام السالبة من البكتريا تحتوي على نسبة عالية من المواد الدهنية التي يزال جزء منها بإضافة الكحول في المرحلة الثانية من عملية التصبيغ الأمر الذي يؤدي إلى نضوح معقد صبغة الكريستال واليود من الخلية إلى الخارج فتكون الخلية مهيأة لاستقبال صبغة أخرى وهي صبغة السفرانين عليه تبدو هذه الأنواع من البكتريا باللون الوردي عند الانتهاء من تصبيها بصبغة كرام بخلاف البكتريا الموجبة لصبغة كرام والتي تظهر تحت المجهر باللون البنفسجي حيث تحتوي في جدارها الخلوي على نسبة واطئة (في حدود 2%) من المواد الدهنية .

وهناك نظرية أخرى تفسر احتفاظ خلايا كرام الموجبة بلون صبغي الكريستال البنفسجي وهي إن خلايا هذه البكتريا تحتوي نسبة عالية من ايونات المغنسيوم Mg++ والتي تساهم في ارتباط معقد الصبغة واليود بمكونات الخلية ذات السلوك الحامض ويوضح الجدول أدناه بعض الفروقات بين بكتريا g+ و g− :

الخواص	G+	G-
الحساسية تجاه المضادات الحيوية وبخاصة البنسلين	كثير الحساسية	قليل الحساسية
محتوى الجدار الخلوي من المواد الدهنية	قليلة (٢-٣%)	كثيرة (٢٠-٣٠%)
الميزوزومات Mesosomes	موجودة	غير موجودة أو نادرة
أنزيم Lysozyme	يؤثر	لا يؤثر