Lab - 9

تصبيغ البكتريا :Bacterial staining -

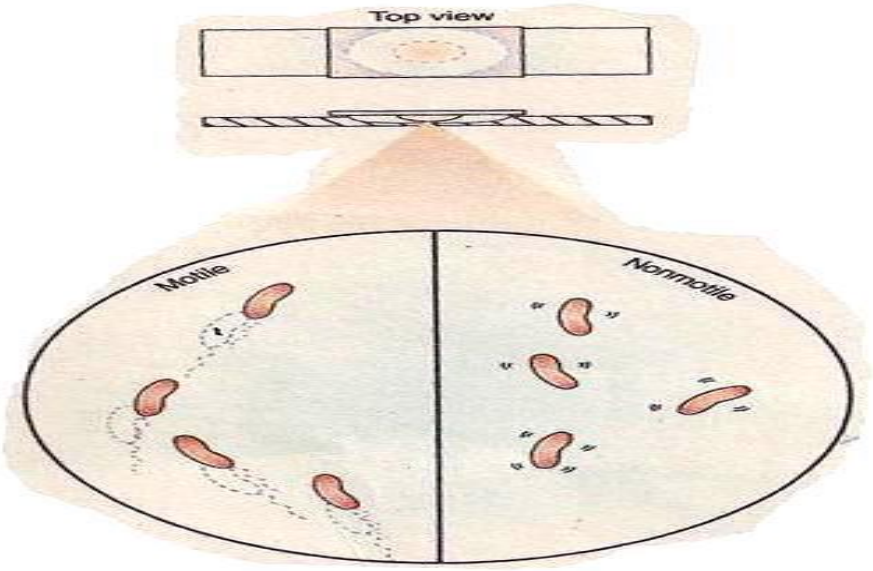
لو فحصنا البكتريا تحت المجهر بشكلها الطبيعي وبدون تصبيغ لشاهدنا أجسام صغيرة حية وشفافة ودقيقة وأحيانا متحركة، كذلك يمكن فحص البكتريا بصورتها الطبيعية بعد تعليق الخلايا في المحلول الفسيولوجي saline ثم تؤخذ قطرة من العالق وتوضع على شريحة نظيفة ثم يوضع الغطاء وتفحص، هذه الطريقة تدعى بـ wet mount ممكن أن نشاهد البكتريا وأحيانا بعض الحبيبات داخل الكائنات المجهرية.

* عند فحص عالق من البكتريا بالطرق أعلاه نلاحظ أن حركة البكتريا نوعان:-

1- الحركة البراونية - :((Brownian movementهي حركة غير حقيقية للبكتريا تظهر نتيجة تذبذب أو اهتزاز البكتريا نتيجة تصادم جزيئات المحلول مع خلايا البكتريا وهي تحصل بين الجزيئات ضمن المحلول.

2- حركة البكتريا (الحركة الحقيقية):- وهي حركة ناتجة عن امتلاك بعض الأنواع من البكتريا على أعضاء الحركة الأسواط (flagella) والتي تمكن البكتريا بالحركة من مكان إلى آخر.

إن شفافية الخلايا وحركتها المستمرة تجعل من الصعب دراسة الخلايا البكتيرية بشكل مفصل لذلك نلجأ إلى تصبيغ البكتريا لكي تبدو الخلايا بشكل أوضح وبشكل ثابت يسمح لنا بالفحص المطول.



شكل :- الفرق بين الحركة البراونية والحركة الحقيقية

تحضير المسحة Smear Preparation

إن أول وأهم خطوة في طريقة التصبيغ هو تحضير المسحة Smear وفيما يلي خطوات تحضير المسحة وفائدة كل خطوة: -

1- تنظيف الشريحة باستعمال ورق تنظيف العدسات Lens cleaning paper لإزالة الأوساخ والدهون العالقة وتجفف والغاية من هذه الخطوة هي للتخلص من أي جزئية قد تتداخل مع الفحص المجهري.

2- بواسطة قلم التأشير ترسم دائرة صغيرة أو مربع في وسط الشريحة وذلك لتحديد مكان عينة البكتريا.

3- في حالة كانت البكتيريا نامية في وسط سائل يعقم الناقلة الحلقية (Loop) ثم تنقل قطرة من الوسط السائل (بعد رجه) وتوضع ضمن الدائرة المرسومة تفرش على شكل طبقة رقيقة وتترك لتجف في الهواء او بواسطة طبق التسخين.

أما في حالة أخذ عينة من وسط صلب فينقل جزء من المستعمرة (لمسة رقيقة جدا) بواسطة الـ Loop إلى قطرة من ماء مقطر وتخلط جيدا وتفرش بشكل طبقة رقيقة ضمن الدائرة المرسومة ويعقم اللوب, ثم تبرد على حافة الوسط الصلب, تترك لتجف بالهواء لمدة (5-11) دقيقة مع مراعاة أن تكون المسحة رقيقة لكي تصبغ الخلايا بشكل متساو.

4- تثبت المسحة بتمرير الشريحة 3 مرات فوق لهب مصباح بنزن بحيث لا ترتفع حرارة الشريحة عند لمسها باليد بعد كل مرة تمرر على اللهب وهي أهم خطوة في تحضير المسحة إذ

تعمل على:-

1- تثبيت أو التصاق العالق البكتيري لكيلا نفقدها خلال الغسل عند التصبيغ.

2- إذا كانت البكتريا مرضية تفقد امراضيتها أي تفقد خطورتها وتصبح غير قادرة على الإصابة.

3- تبقى البكتريا محافظة على شكلها وحجمها عند إجراء التثبيت بالصورة الصحيحة.

س:ما الغاية من استخدام لهب مصباح بنزن عند تحضير المسحة المجهرية ؟

Smear: - هو تحضير مجفف لخلايا البكتريا على الشريحة الزجاجية ففي نهاية عملية التثبيت تصبح الشريحة جاهزة للتصبيغ.

أنواع الصبغات

تقسم الصبغات المستعملة في تصبيغ الجراثيم إلى ثلاثة مجاميع:-

1- الصبغات البسيطة Simple stains:-

أ- الصبغات القاعدية Basic dyes

ب- الصبغات الحامضية Acidic dyes

2- الصبغات التفريقية أو المركبة Differential or compound stains:-

أ- صبغة كرام Gram's stain

ب- الصبغة الصامدة للحامض Acid fast stain

3- الصبغات الخاصة Special stains:-

أ- صبغة الأبواغ Spore stain

ب- صبغة المحفظة Capsule stain

1- الصبغات البسيطة Simple stains: -

تكون بنوعين وهما اما صبغات قاعدية Basic dyes مثال على ذلك صبغة المثيلين الأزرق Methylene blue التي تتكون من كلوريد المثيلين الأزرق Methylene blue chloride والذي يتحلل كما يلي :-

$$MB\ Cl \rightarrow MB^{+} + Cl^{-}$$

وبما أن خلايا الجراثيم تكون ذات شحنات سالبة لذلك تتحد شحناتها مع الشحنة الموجبة الزرقاء فتصطبغ الخلية الجرثومية باللون الأزرق.

أو صبغات الحامضية :Acidic dyes - مثل صبغة النكروسين Nigrosine والحبر الهندي Indian ink التان تستخدمان لصبغ المحفظة الجرثومية.

سميت الصبغات البسيطة بهذا الاسم لأنها تستخدم نوع واحد من الصبغات في خطوة واحدة، ومن فوائد الصبغات البسيطة هي التعرف غلى شكل الجرثومة، حجمها وترتيبها.

طريقة اجراء التصبيغ بالصبغة البسيطة

الأدوات: -

1- مزرعة بكتيرية حديثة العمر 18-24 ساعة.
2- صبغة الميثلين الأزرق Methylene blueأو السفرانين Safranine.
3- شرائح زجاجية Slides.

طريقة العمل :-

1- نضع الشريحة الزجاجية المثبت عليها المسحة البكتيرية على سلك للصبغ بأسفله حوض.
2- نغمر المسحة البكتيرية بالصبغة المطلوبة (صبغة المثيلين الأزرق أو السفرانين) ونتركها وقتا" كافيا" للتفاعل (30-60) ثانية لأزرق المثيلين أو السفرانين.
3- نتخلص من محلول الصبغة ثم نغسل الغشاء المصبوغ بالماء وذلك لإزالة الصبغة الزائدة.
4- نجفف الشريحة الزجاجية بوضعها بين ورقتي نشاف نظيف ثم تمرر أعلى اللهب عدة مرات.
5- نضع قطرة من زيت السدر على الغشاء المصبوغ ثم نفحص الشريحة الزجاجية بواسطة المجهر باستخدام العدسة الزيتية.