تصبيغ البكتريا بصبغة كرام Gram Staining

من خلال المحاضرة السابقة تبين ان هناك صبغات معينة تستخدم لتصبيغ البكتريا بهدف التشخيص او تحديد المواقع التصنيفية لها . ومن هذه الصبغات صبغة كرام وسميت صبغة كرام بهذه التسمية نسبة الى مكتشفها الطبيب الدنماركي Dr.Hans عام 1883 . وتتكون من الصبغات والمواد الاتية بحسب تسلسل استخدامها في عملية التصبيغ :-

1- Crystal Violet (البنفسجي)

2- Iodine Solution (Gram's Iodine)

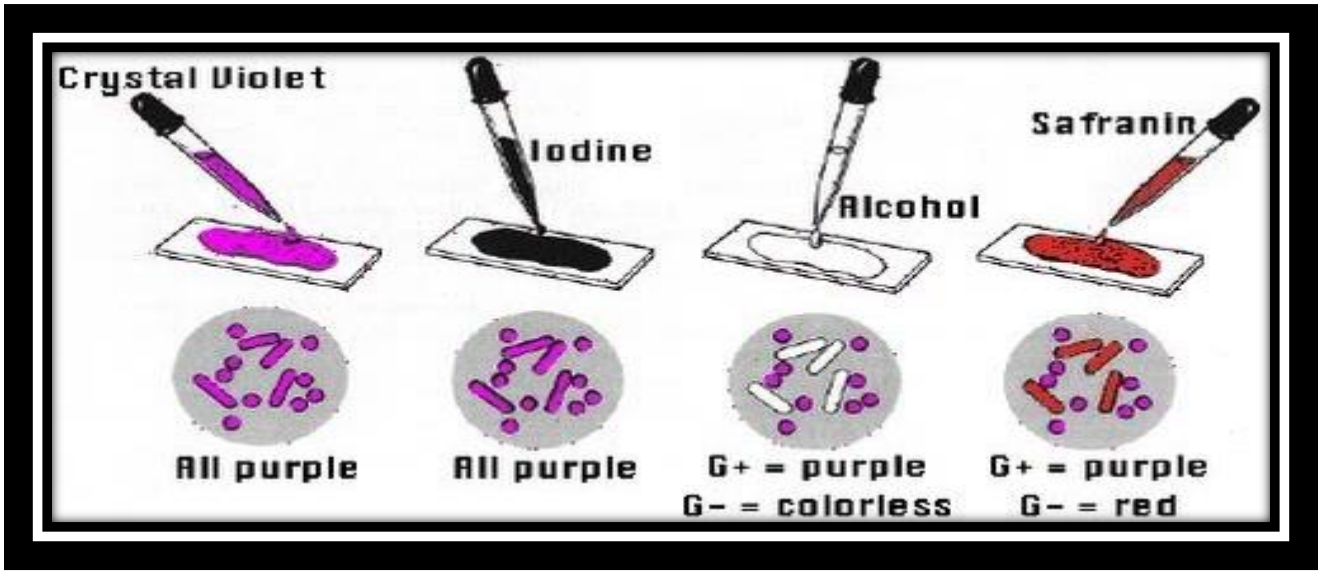
3- Ethanol 95 %

4- Safranin (counterstain) (وردي)

خطوات التصبيغ

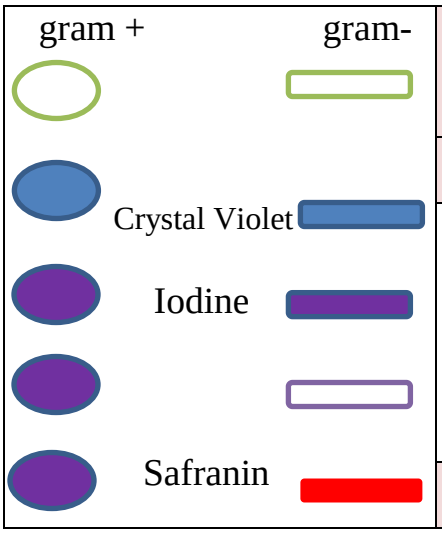
1. بعد تحضير الغشاء من البكتريا المراد تصبيغها تضاف قطرات من صبغة الكريستال البنفسجي وتترك بحيث تلامس الغشاء لفترة دقيقة واحده .
2. تغسل الصبغة الزائدة بماء الحنفية معتدلة الجريان او باستخدام قنية الغسل .
3. تضاف قطرات من محلول اليود على الغشاء وتترك لدقيقة واحدة .
4. تغسل الصبغة الزائدة بالماء ايضاً .
5. تضاف قطرات من الكحول الأثيلي (بتركيز 95 %) وتترك على الغشاء فترة 0.5 دقيقة ثم تغسل بالماء .
6. تضاف قطرات من صبغة Safranin على الغشاء وتترك لمدة 0.5 دقيقة ثم تغسل بالماء .

7. تجفف الشريحة وتفحص بالعدسة الصغرى ثم بالعدسة الزيتية ، اذ يلاحظ ان البكتريا قيد الفحص اما قد اكتسبت لون الصبغة الاولى وهي صبغة الكريستال البنفسجي . فتظهر عندئذ تحت المجهر باللون البنفسجي وتسمى في هذه الحالة بالبكتريا موجبة لصبغة كرام ويرمز لها بـ G^+ او انها تظهر بلون الصبغة الاخيرة وهي صبغة السفرانين الوردي وتسمى البكتريا وحالة هذه بالبكتريا السالبة لصبغة كرام ويرمز لها بـ G^- كما موضح في الشكل أدناه .



واذا ماجرت عملية التصبيغ على مراحل وتم فحص البكتريا في كل مرحلة تحت المجهر فأنها تلاحظ على النحو الموضح في الجدول .

مراحل التصبيغ	لون البكتريا تحت المجهر	
	بكتريا G^+	بكتريا G^-
1- الكريستال البنفسجي	بنفسجي	بنفسجي
2- محلول اليود	بنفسجي	بنفسجي
3- الكحول الاثيلي	بنفسجي	عديم اللون
4- السفرانين	بنفسجي	وردي
المرحلة الاخيرة	بنفسجي	وردي



أن صفة الاحتفاظ باللون الوردي او باللون البنفسجي صفة خاصة بالبكتريا على مستوى الجنس (والنوع) ولا تحيد عن هذه الصفة الا في حالات نادرة كان تكون المزرعة البكتيرية قديمة جداً ومن الامثلة على البكتريا السالبة لصبغة كرام (G^-) التي تظهر دائما باللون الوردي بعد الانتهاء من تصبيغها بصبغة كرام :- *Salmonella typhi* , *Escherichia coli* , *Shigella dysenteria* , *Enterobacter aerogenes* وجميع هذه البكتريا مصنفة ضمن عائلة *Enterobacteraceae* .

ومن الامثلة على البكتريا الموجبة لصبغة كرام (G^+) والتي تظهر تحت المجهر باللون البنفسجي :- *Lactobacillus spp* , *Clostridium spp* , *Streptococcus spp* , *Bacillus spp* .

النظريات التي تفسر تصبيغ خلايا البكتريا بصبغة كرام

ان احتفاظ بعض انواع البكتريا بصبغة الكريستال البنفسجي وظهور ما تحت المجهر باللون البنفسجي واحتفاظ البعض الاخر بصبغة السفرانين وظهورها تحت المجهر باللون الاحمر يعود الى التباين في التركيب الكيميائي لجدار الخلية بين هاذين النوعين من البكتريا. فجدار خلايا كرام السالبة من البكتريا يحتوي على نسبة عالية من المواد الدهنية (الطبقة التي تعرف بالغشاء الخارجي Outer membrane) التي تزال بإضافة الكحول في المرحلة الثالثة من عملية التصبيغ الامر الذي يؤدي الى نضوح معقد صبغة الكريستال – اليود الى الخارج فتكون الخلية مهيأة لاستقبال صبغة اخرى وهي

السفرانين ، وعلية تبدو هذه الانواع من البكتريا باللون الوردي عند الانتهاء من تصبيغها كما هو موضح في الجدول . بخلاف البكتريا الموجبة لصبغة كرام التي تحتوي في جدارها الخلوي على نسبة واطئه (في حدود 2%) من المواد الدهنية .

وهناك نظرية اخرى تفسر البكتريا الموجبة لصبغة كرام بلون الكريستال البنفسجي وهي ان هذه البكتريا تحتوي على نسبة عالية من ايونات المغنسيوم Mg^{++} التي تساعد في ارتباط الصبغة بمكونات الخلية ذات الطبيعة الحامضية وذلك بتوسط اليود ، كما هو موضح في ادناه ويحول المعقد الناتج دون ترك الصبغة للخلية حتى في حالة معاملتها بالكحول من هنا تسمى اليود احيانا بالمادة الدباغية mordant او المثبتة . ويذكر انه يمكن استبدال السفرانيين بصبغة carbol fuchsin ولاسيما عند تصبيغ البكتريا اللاهوائية واستبدال الكحول الاثيلي بالأسيتون acetone .

الخواص	G +	G^-
- الحساسية تجاه المضادات الحيوية وبخاصة البنسلين .	حساسة	قليلة الحساسية
- محتوى الجدار الخلوي من المواد الدهنية .	قليلة (2-3) %	كثيرة (20 – 30)%
- الميزوزومات Mesosomes	موجودة	غير موجودة او نادرة
- انزيم Lysozyme	يؤثر في الجدار	لا يؤثر في الجدار

ملاحظات مهمة

1. لا تستخدم صبغة كرام في تصنيف المجموعة التي تدعى بـ Archaea او Archaeabacteria لأنها تشتمل على مجموعة غير متجانسة من البكتريا ولا تخضع استجابتها للصبغة الى ثوابت يمكن تفسيرها ولا تستخدم لأنواع اخرى مثل *Mycoplasma* التي تتميز بخلوها من الجدار بخلاف البكتريا الحقيقية Eubacteria .
2. يمكن الكشف عن بعض المسببات المرضية من البكتريا بتصبيغ سوائل الجسم body fluid بصبغة كرام مباشرةً من دون الحاجة الى زرع هذه السوائل لعزل المسبب المرضي منها .

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 .