



احياء مجهرية

صبغة كرام

المرحلة الرابعة

م.م ساره عبدالحميد حسن

الصبغات المركبة/ صبغة كرام

سميت الصبغات المركبة بهذا الاسم لكونها تفرق بين انواع الجراثيم المختلفة اعتمادا لقابليتها على الاحتفاظ بنوع معين من الصبغات دون الاخرى كما سميت بالمركبة كونها تعتمد على اكثر من نوع واحد من الصبغات

صبغة كرام Gram stain

اكتشفها وطورها العالم كريستيان كرام عام ١٨٨٤م سميت بأسمه وتم عن طريقها تقسيم الجراثيم الزمرتين رئيسيتين هما:

الجراثيم الموجبة لصبغة كرام Gram positive bacteria

الجراثيم السالبة لصبغة كرام Gram negative bacteria

وتتكون صبغة كرام من المكونات التالية وحسب تسلسلها في عملية التصيغ الى:

_ صبغة قاعدية: وتتمثل بالبنفسج البلوري Crystal Violet

_ مثبت للصبغة : وتكون اما احماض او قواعد او املاح معدنية او محلول ايودين. Iodine Solution.

_ عامل مزيل للصبغة (قاصر) : ويتمثل بالكحول الايثيلي بتركيز ٩٥% الذي يعمل على ازالة الصبغة من الخلية المصبوغة

_ صبغة مغايرة: وتتمثل بصبغة السفرانين Safranin

الغرض من صبغة السفرانين هو اعطاء لون مغاير للخلية التي فقدت لونها بالقصر (اي المعاملة بالكحول)

ان الجراثيم التي لم تفقد صبغتها تبقى محتقظة بالصبغة الاولى البنفسجية وهذه الجراثيم

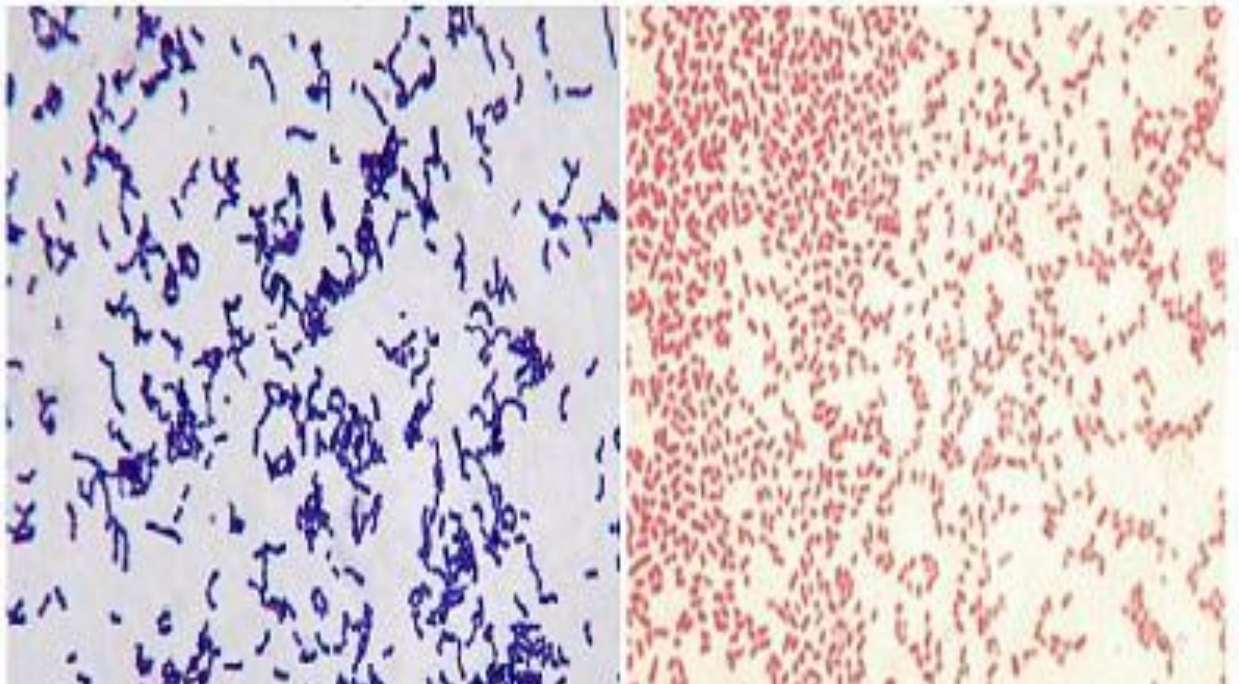
_ تحضر مسحة رقيقة من العينة البكتيرية المراد تصيغها ثم تضاف لها قطرات من صبغة الكرسنال

البنفسجية وهذه هي الجراثيم الموجبة لصبغة كرام

اما الجراثيم التي فقدت صبغتها الاولى فاها سوف تتلون بالصبغة المغايره (السفرانين) فتبدو حمراء تحت المجهر وتدعى بالجراثيم السالبة لصبغة كرام.

ان هذا الاختلاف في التصبغ يعزى الى الاختلاف في مكونات الجدار الخلوي للخلايا الجرثومية
اذ ان جدار الخلية للجراثيم الموجبة لصبغة كرام تتكون من طبقة سميكة من مادة peptidoglycan
الذي يعمل كحاجز يحتفظ باللون الارجواني للصبغة البنفسجية (البنفسج البلوري) ولايمكن ازالة هذا اللون
حتى بعد استعمال القصر بالكحول.

اما الجراثيم السالبة لصبغة كرام فتتكون من طبقة خفيفة من الببتيدوكلايكان وتغلفها من الخارج طبقة من
البروتين ومتعدد السكريات والتي لايتستطيع الاحتفاظ باللون الارجواني للصبغة البنفسجية (الكريستال البلوري)
مما يؤدي الى زوال الصبغة عند قصرها بالكحول وبذلك تاخذ اللون المضاد وهو اللون الاحمر لصبغة
السفرانين



يوجد الجدار الخلوي بوجه عام في البكتريا الحَقِيْقِيَّة Eubacteria

ويتركب على نحو أساسي من متعددات الببتيدوغليكان peptidoglycan

ومن أهم خصائصه:

أ. يُعدّ من البُنَى الرئيسة في الخلية البكتيرية، إذ يوفر لها حماية نوعية مميزة ويعطيها شكلها الخاص بها

ب - يُعدّ الهدف الأول لهجوم المضادات الحيوية

ج- يتضمن مستقبلات نوعية للعقاقير والفيروسات

د- يعد أحد مسببات الأعراض المرضية لدى الحيوانات

هـ. له دور أساسي في الصفات المناعية وتنوعها لدى البكتريا

تقسم البكتريا وفق نوعية جدارها الخلوي، ووفقاً لأبحاث كريستيان غرام Christian Gram

إلى قسمين أساسيين:

Gram-positive bacteria البكتريا الموجبة الغرام:

تحفظ بملون غرام وتتلون به، ويكون هيكل جدارها سميكاً نسبياً (١٥-٨٠ نانومتر)، يتكون من عدة طبقات من الببتيدوغليكان تتخللها احماض نوعية

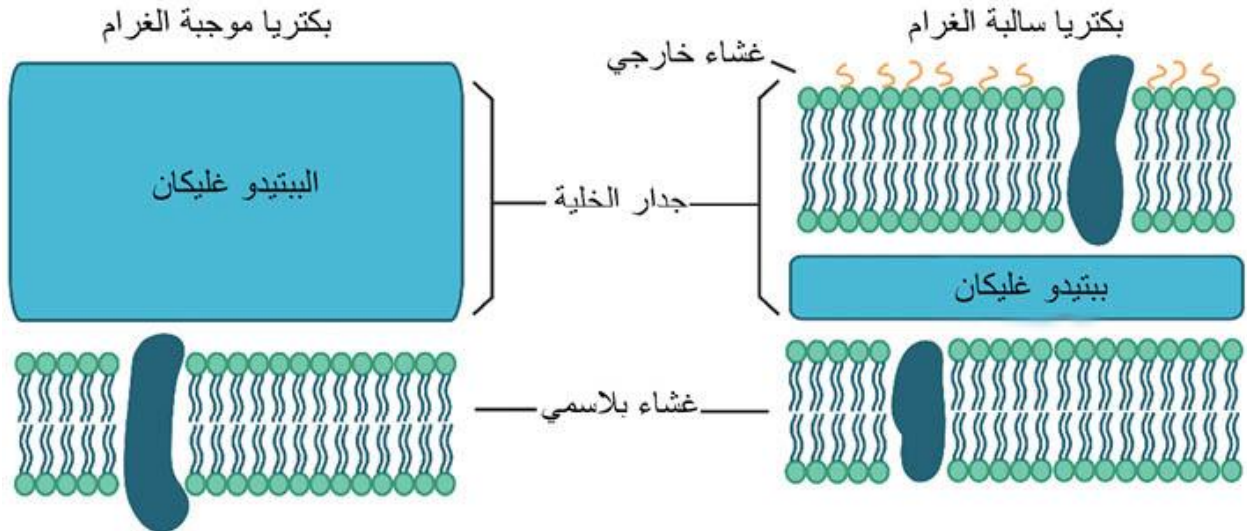
Gram-negative bacteria البكتريا السالبة الغرام:

لا تحفظ بملون غرام ومن ثمّ لا تتلون به، ويكون هيكل جدارها رقيقاً نسبياً (١٠ نانومتر)، يتكون من طبقة واحدة من الببتيدوغليكان محاطة بالغشاء الخارجي تتخللها احماض نوعية

فروقات مهمه بين البكتريا الموجبة لصبغة كرام والبكتريا السالبة لصبغة كرام

G-	G+	الخواص
اقل سما (١٠) نانومتر	سميك (٢٠_٨٠) نانومتر	سمك الجدار الخلوي
اقل سما (رقيقة)	سميكة	سمك طبقة الببتيدوكلايكان
٢	١	عدد طبقات الجدار
%٥٨	%٣-٠	المحتوى الدهني
قليلة الحساسية	كثير الحساسية	الحساسية تجاه المضادات الحيوية وتحديد البنسلين

رسم يوضح الفرق في الغلاف الخارجي للبكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام



الصبغة المقاومة للحامض: وتتم حسب طريقة زيل نيلسون وكالتالي:

_ يتم عمل مسحة بكتيرية على شريحة زجاجية وبت تثبيتها

_ تغطي الشريحة بصبغة (الكاربول فوكسين) بتركيز ٠,٣% مع التسخين لمدة ٥ دقائق الى ان يتصاعد البخار مع ملاحظة عدم جفاف الشريحة

_ تغسل الشريحة بالماء

_ تقصر بأستخدام الكحول الحامضي بتركيز ٠,٣% والذي يتكون من (حامض الهيدروكلوريك ٣مل و كحول ايثيلي ٩٧مل) ولفترة قصيره (١٥-٢٠) ثانية

_ توضع الصبغة المغايره (المثيلين الازرق) بتركيز ٠,٣% لمدة دقيقة واحده

_ تغس الشريحة بالماء ثم تجفف وبعدها تفحص بالمجهر الضوئي بوساطة العدسة الزيتية.

صبغة التراكيب Structural stain و تستعمل لصبغ تراكيب الخلية واهم تلك الصبغات:

صبغة الابواغ spore stain

بعض الجراثيم التابعة لجنس العصيات والمطثيات تنتج تراكيب مقاومة للحراره تدعى ابواغ داخلية تكون مقاومة للحراره والمواد الكيميائية. وهذه التراكيب لايمكن صبغها بوساطة صبغة كرام او الصبغات العادية وتستخدم الحراه اذا تعمل على سرعة اختراق الصبغة لجدار البوغ وتسهيل عملية التصبيغ.

خطوات صبغة الابواغ:

تحضر مسحة من بكتريا العصيات او المطثيات وتثبت بالحراره

يوضع ٥% من صبغة الملاكايت الخضراء وتسخن الشريحة حتى تتبخر لمدة ٥ دقائق

تغسل الشريحة بالماء

تضاف الصبغة المغايره السفرانين لمدة ٢٠ ثانية

تغسل الشريحة بالماء ثم تجفف وتفحص بالعدسه الزيتية

صبغة المحفظة capsule stain

بعض الجراثيم تحاط بطبقة من مواد هلامية او جلاتينية تدعى بالمحفظة والتي تعد احد الوسائل الدفاعية التي تستخدمها الجراثيم

تتكون المحفظة من مواد قابلة للذوبان في الماء وهي:

glycoprotein البروتين السكري

او polypeptides متعدد الببتيد

لايمكن تصبغ الجراثيم الحاويه على محفظة بالطرق العادية وذلك لان الحراره المستخدمه لتثبيت العينه تعمل

على تحطيم المحفظة لذلك تستعمل صبغة تربط بين التصبغ السالب والتصبغ البسيط مثل صبغة

النكروسين وصبغة الحبر الهندي وتعد هاتين الصبغتين من الصبغات الحامضية لاحتوائها على الايون السالب الصابغ

وعندما تصبغ الجراثيم ذات الشحنة السالبة بصبغة حامضية سالبة ايضا سوف لن تتحد الصبغة مع الشحنات السالبة المماثلة الموجوده على الجراثيم مما يؤدي لتكدسها حول الخلية الجرثومية فتصطبغ المحفظة

فقط لعدم مقدرة الصبغة على اختراق الخلية الجرثومية ويدعى هذا النوع من التصبغ بالتصبغ السالب.

كما هو الحال في تصبغ جرثومة *klebsiella*

خطوات التصبيغ:

_تمزج قطره من المعلق الجرثومي مع قطرة من صبغة الحبر الهندي او النكروسين على الشريحة الزجاجية

_اسحب بوساطة شريحة زجاجية اخرى بنفس الطريقة التي يتم بها تحضير مسحة دم

تجفف الشريحة بالهواء وتفحص بالعدسة الزيتية

صبغة الاسواط Flagellar stain

تتكون الصبغة مما يلي:

كلوريد الصوديوم ١% وحامض التانيك ٣% والفوكسين القاعدي ١,٢٥% مذاب في كحول ايثيلي ٩٥%

شروط صبغة الاسواط:

_ان تكون المزرعة الجرثومية فتية

_احضر المسحة بعناية ويجب ان يكون المستحضر الذي يحتوي على الجراثيم غير مركز

_عند وضع معلق الجراثيم على الشريحة يفضل عدم نشرها بالناقلة بل تركها تنسكب قليلا ثم تنسكب قليلا ثم

تجف بالهواء ولا تستعمل الحرارة لكي لا تتقلص الاسواط او تتحطم

_ان صبغة الاسواط سوف تصبغ الاسواط باللون الاحمر اما جسم الجرثومية فيجب ان يصبغ بصبغة مغايره

مثل المثيلين الازرق