اعـداد: اسـتاذ عـلـي يـحـيـى

مختبر صبغة جرام Gram stain

الصبغات التفريقية Differential stains

تستخدم فيها صبغتين او اكثر. وتستخدم هذ الصبغات التفريق بين الانواع البكتيرية. من اكثر الصبغات التفريقية شيوعا هي صبغة Gram stain.

سؤال: ما هي استخدامات صبغة جرام Gram stain

1- للتفريق بين البكتيريا الموجبة و السالبة لصبغة غرام.

2- لتعرف على اشكال البكتيريا.

3- لتعرف على ترتيب الخلايا البكتيرية.

تصنيف البكتيريا بالاعتماد على صبغة جرام Classification of bacteria based on Gram stain

رغم ان صبغة جرام من اكثر الصبغات اهمية واستخدام الا انها غير دقيقة تماما مع بعض الانواع، حيث تنصبغ بعض الانواع من البكتيريا بشكل ضعيف او لا تنصبغ بصبغة جرام. بالتالي هذا التغير يعتمد بالدرجة على التغيرات بمكونات الجدار الخلوي للبكتيريا. بالتالي تساعد على تصنيف اربعة مجاميع من البكتيريا حسب صبغة جرام.

1- بكتيريا الموجبة لصبغة جرام Gm(+)ve bacteria جدارها احتفظ بالصبغة الاساسية (الكريستال البنفسجي Crystal violet) ولا تأخذ الصبغة المعاكسة (السفرانين Safranin).

2- بكتيريا سالبة صبغة جرام Gm(-)ve bacteria لا تحتفظ بالصبغة الاساسية (الكريستال البنفسجي Crystal violet) تنصبغ بصبغة المعاكسة (السفرانين Safranin).

3- بكتيريا تنصبغ بشكل ضعيف بالصبغة (لا تتفاعل معها)

4- بكتيريا التي تنصبغ بشكل متفاوت (متغير) بصبغة جرام. **تنوية:** ربما هذا التغير يعود لمزارع البكتيرية التي عمرها يتجاوز اكثر من **48 ساعة**. هذا يعود نتيجة التغير في مكونات جدار الخلية البكتيرية لذلك يجب استخدام مزارع بكتيرية عمرها يتراوح بين **18** الى **24** ساعة حصرا.

اعـداد: اسـتاذ عـلـي يـحـيـى

خطوات جراء صبغة جرام Procedure of gram stain

1- تحضير المسحة بوضع قطرة ماء مقطر او (محلول ملحي 0.9%) في وسط الشريحة Slid

2- اخذ البكتيريا بوساطة Loop و تمزج مع القطرة بشكل طبقة رقيقة.

3- تثبيت المسحة اما بالكحول او بنار اللهب.

4- سكب صبغة (الكريستال البنفسجي Crystal violet) لمدة 60 ثانية.

5- غسل المسحة بالماء بشكل غير مباشر (حفاظا على المسحة) الى يم تخلص من جميع الصبغة.

6- سكب الايودين لمدة دقيقة.

7- غسل الأيودين بالماء.

8- ازالة الصبغة (قصرها) بالكحول او الاسيتون لمدة 30 ثانية.

9- سكب الصبغة المعاكسة (السفرانين Safranin) لمدة دقيقتين.

9- غسل بالماء، ثم تترك لتجف على الحامل (توضع على الورق).

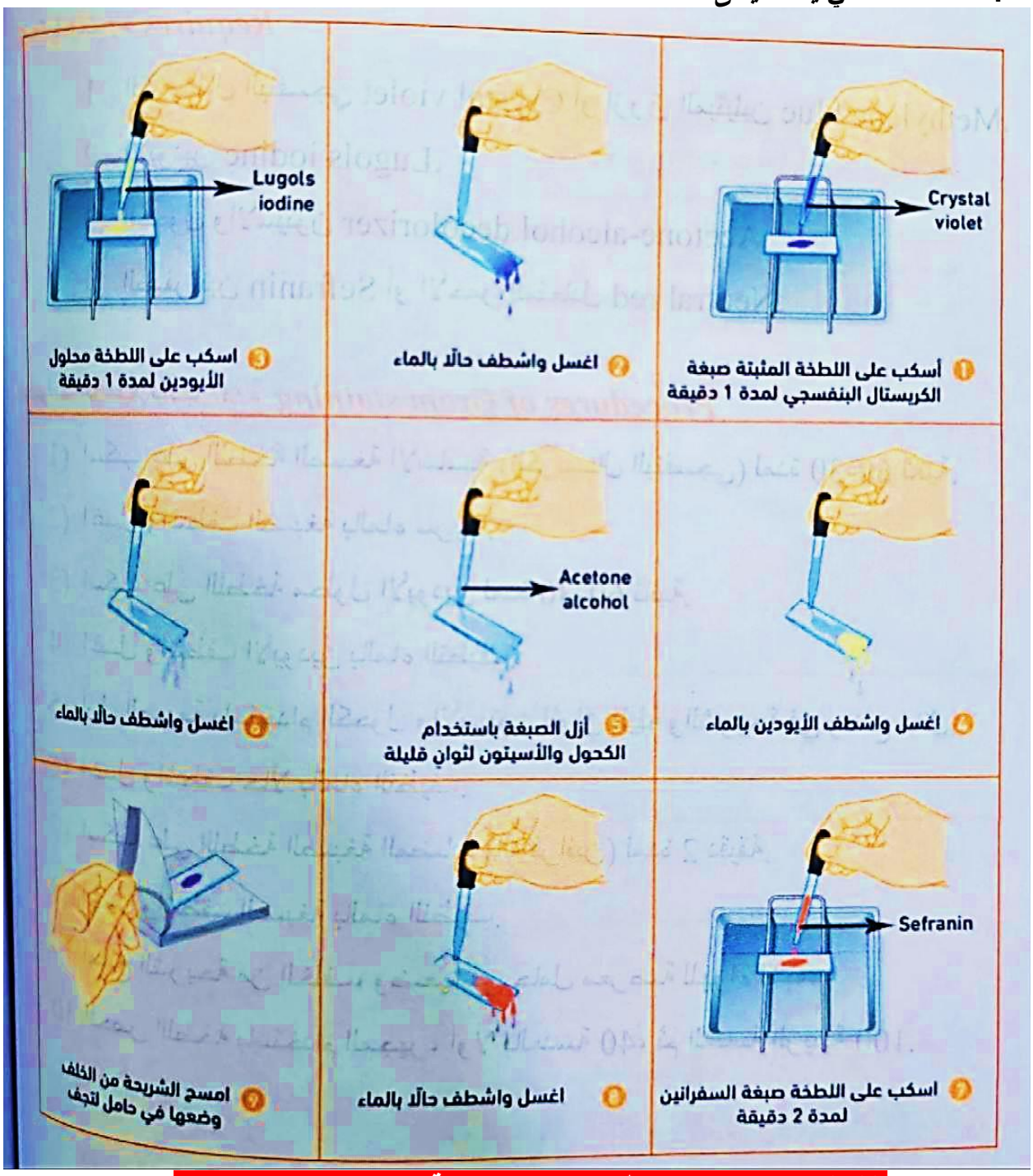
10- فحص المسحة بالعدسة بقوة 40X ثم قوة 100X الزيتية.

ملاحظات:

◄ **دور الايودين في التصبيغ:** يتحد **الايودين** مع صبغة **Crystal violet** داخل جدار الخلية البكتيرية مكونًا معقدًا غير قابل للذوبان. هذا المعقد يرتبط بقوة بجدار الخلية السميك للبكتيريا موجبة لصبغة غرام.

◄ **دور الحرارة Bunsen burner في التصبيغ:** دور هام في تثبيت مسحة البكتيريا على الشريحة Slid لكي لا يتم جرف البكتيريا عند الغسل فضلا عن قتل البكتيريا خاصة البكتيريا المرضية مما يحقق السلامة عند العمل.

اعـداد: اسـتاذ عـلـي يـحـيـى

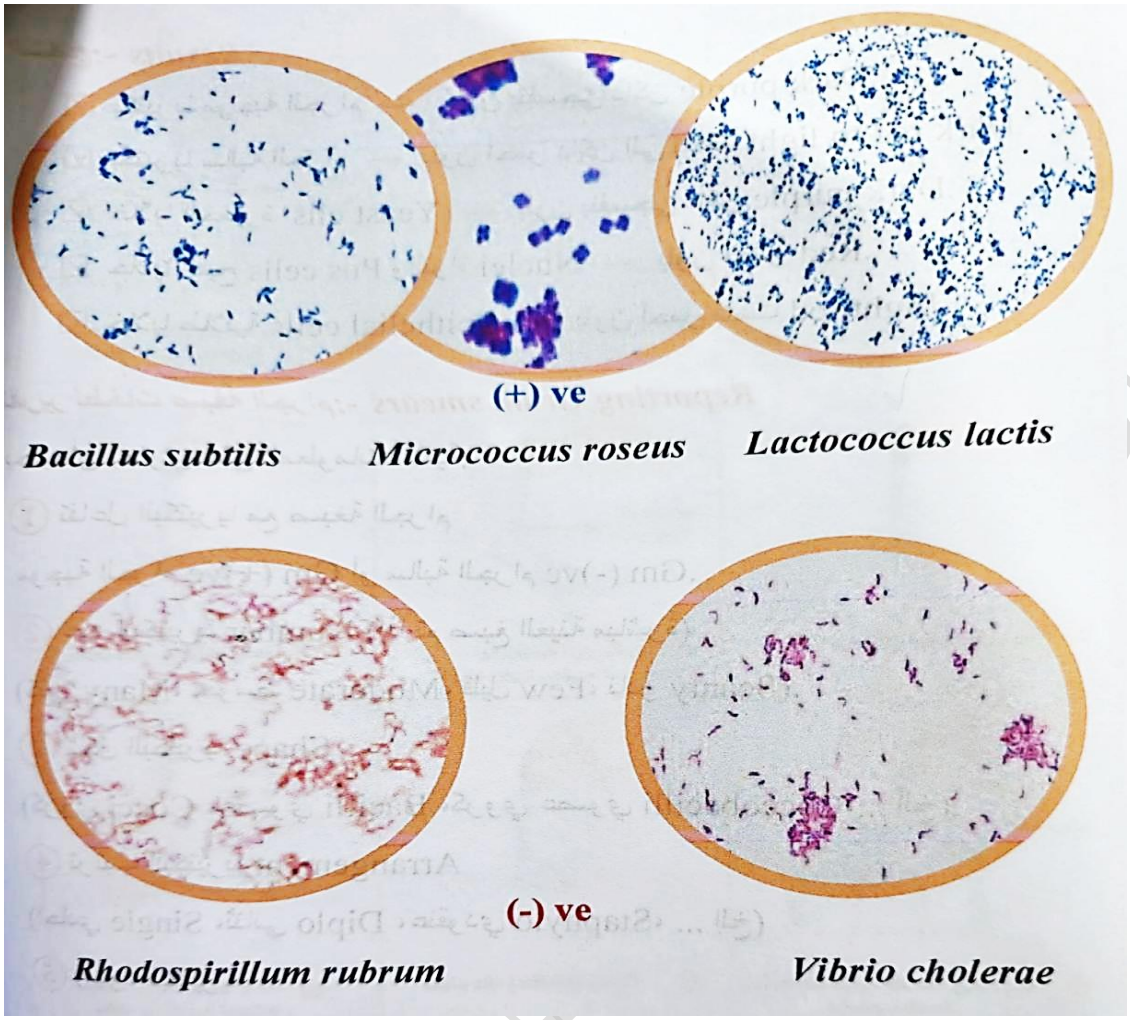


الشكل اعلاه يوضح خطوات اجراء صبغة جرام Gram stain

تفسير نتائج صبغة جرام Result:

- بكتيريا الموجبة لصبغة جرام = تظهر بلون بنفسجي داكن Dark purple.
- بكتيريا سالبة لصبغة جرام = تظهر بلون احمر داكن الى باهت Dark red to light.
- خلايا الخميرة Yeast = بلون بنفسجي داكن Dark purple.
- خلايا WBC و النواة Nuclei = بلون احمر Red.
- خلايا الطلائية Epi-cell = بلون احمر باهت Light red.

اعـداد: اسـتاذ عـلـي يـحـيـى



البكتيريا المصبوغة بصبغة جرام

اسباب الاختلاف بين البكتيريا الموجبة و السالبة لصبغة جرام:

◄**سمك طبقة Peptidoglycan** في بكتيريا الموجبة لصبغة جرام حوالي **20 الى 80 نانومتر nm**، بالتالي يجعل من الصعب ازاله معقد الصبغة الاساسية (كرستال البنفسجي و الايودين) منها بالمذيبات العضوية الكحول او الاسيتون، حيث ارتباط **الصبغة** يكون اقوى بوجود **الايودين** مع طبقة **Peptidoglycan** وهذا يصعب ازلتها للصبغة. بينما رقة طبقة **Peptidoglycan** في البكتيريا السالبة حوالي **7-2 نانو متر nm** بالتالي ارتباط ضعيف الارتباط بين الايودين و طبقة **Peptidoglycan** بالتالي سهولة ازلة معقد الصبغة الاساسية (كرستال البنفسجي و الايودين) نتيجة اذابة طبقة **Peptidoglycan** ايضا.