الكلية	كلية التربية للعلوم الصرفة
القسم	علوم الحياة
المادة باللغة الانجليزية	Practical Microbiology
المادة باللغة العربية	الاحياء المجهرية – العملي
المرحلة الدراسية	الثالثة
اسم التدريسي	م. عمر ضياء الدين صلاح الدين
عنوان المحاضرة باللغة الانجليزية	Gram Stain
عنوان المحاضرة باللغة العربية	صبغة كرام
رقم المحاضرة	٨
المصادر والمراجع	
	"Bergey's Manual of Determinative Bacteriology"، "microbiology"

محتوى المحاضرة

صبغة كرام Gram Stain

تصبيغ البكتريا بصبغة كرام :

تعتبر صبغة كرام من اهم واكثر الصبغات التفاضلية المستخدمة في الدراسات البكتريولوجية وبواسطتها تقسم البكتريا إلى مجموعتين كبيرتين وهما :البكتريا الموجبة لصبغة كرام والبكتريا السالبة لصبغة كرام ,ويعتمد الفرق في التصبيغ على اساس الاختلاف في تركيب الطبقات السطحية لجدران الخلايا البكتيرية حيث يلاحظ ان مجموعة البكتريا الموجبة لصبغة كرام تحتفظ بالصبغة الاولى الزرقاء او البنفسجية نظرا لاحتواء غشاء الخلية البكتيرية على تراكيب معقدة تتفاعل مع الصبغة الاولى وبوجود اليود تثبتها ولا توجد هذه التراكيب في البكتريا لسالبة لصبغة كرام .

اول من استخدم هذه الصبغة هو الباحث كرستيان كرام Christian Gram عام 1884 ولذلك تعرف باسمه لحد الان , تتضمن صبغة كرام اربعة محاليل هي :

١- **الصبغة القاعدية Basic stain** : تستخدم الصبغة القاعدية Crystal Violet.

٢- **المادة المثبتة :** يستخدم في التثبيت محلول Lugols Iodine Solution وتعمل المادة المثبتة على زيادة لصق الصبغة بالخلية البكتيرية أي انها تثبت الصبغة ولا تزال بسهولة بعد اضافة المثبت .

٣- **المادة القاصرة Decolorizing agent :** يستخدم لهذا الغرض كحول اثيلي بتركيز 95% او أسيتون وتعمل المادة القاصرة على ازالة الصبغة الاولى Crystal violet والتي اصطبغت بها الخلايا

البكتيرية حيث ان هناك بعض الخلايا تفقد الصبغة بسهولة مقارنة بخلايا اخرى لا تفقد هذه الصبغة بسهولة وعلى اساس الفرق في قابلية القصر هذه يمكن التمييز بين الانواع البكتيرية من خلال الصبغة التفاضلية Gram Stain .

٤- **الصبغة المخالفة Counter stain :** وهي صبغة قاعدية مخالفة باللون للصبغة الاولى والغرض منها صبغ الخلايا التي فقدت الصبغة الاولى خلال عملية القصر اما الخلايا التي لم تفقد الصبغة الاولى فانها لا تصطبغ بها بل تبقى محتفظة بالصبغة الاولى Crystal violet وتستخدم هنا صبغة السفرانين Safranin.

***وتتلخص صبغة كرام كالأتي :**

تصطبغ اولا الخلايا بصبغة قاعدية يعقبها معاملة الخلايا بمادة مثبتة للصبغة مثل اليود يعقبها معاملة الخلايا بمادة قاصرة مثل الكحول فالخلايا التي تحتفظ بالصبغة أي تقاوم قصرها بالكحول تسمى مجموعة البكتريا الموجبة لصبغة كرام Gram Positive(G+) اما الخلايا التي لا تقاوم القصر بالكحول تسمى مجموعة البكتريا السالبة لصبغة كرام Gram Negative (G-) .

***المواد اللازمة :**

١- مزارع بكتيرية عمرها ٢٤ساعة .
٢- محاليل صبغية :

a- Crystal violet
b-Lugols Iodine
c- كحول اثيلي
d- صبغة Safranin

٣- شرائح زجاجية نظيفة .
٤- حوض التصبيغ .
٥- مجهر ضوئي نظيف .
٦- قنينة حاوية على زيت السدر.
٧- قنينة حاوية على الزايلين Xylene .
٨- اوراق تنظيف العدسات .

*** طريقة العمل :**

١- حضر مسحة بكتيرية مثبتة .
٢- ضع صبغة Crystal violet على المسحة البكتيرية بكمية وافرة لمدة (١-٢) دقيقة .
٣- اغسل الشريحة بالماء .
٤- ضع محلول اليود لمدة دقيقة واحدة .
٥- اسكب محلول اليود "لا تغسل الشريحة بالماء ".
٦- ضع عدة قطرات من محلول مزيل اللون "الكحول الاثيلي " لمدة (١٥-٢٠) ثانية .
٧- اغسل الشريحة بعناية بالماء .
٨- ضع صبغة Safranin المخالفة باللون لمدة (١-٢) دقيقة .
٩- اغسل الشريحة جيدا بالماء ثم ضعها بين طبقتين من الورق النشاف الى ان تجف "لا تمسح النموذج".

١٠- افحص الشريحة بالمجهر الضوئي بالعدسة الصغرى ثم الكبرى وعند وضوح الصورة ضع قطرة من زيت السدر ثم افحصها بالعدسة الزيتية .
١١-بعد الانتهاء من الفحص نظف العدسات بورق التنظيف الجافة ثم بورق تنظيف مبللة بالزايلين ثم بورق تنظيف جافة .

*** ملاحظات حول صبغ الخلايا بصبغة كرام :**

١- تتوقف نتائج صبغة كرام على عمر المزارع البكتيرية ,فالخلايا القديمة والميتة تبدو دائما سالبة لصبغة كرام .
٢- البكتريا السالبة لكرام يمكن ان تظهر موجبة في حال :
أ- كانت المسحة البكتيرية سميكة اكثر من اللازم .
ب-لم تجر عملية ازالة اللون بشكل جيد بواسطة الكحول وضمن المدة المحددة .
٣- البكتريا الموجبة لصبغة كرام يمكن ان تبدو سالبة لكرام عند الافراط في عملية ازالة اللون .
٤- بعض أنواع *Bacillus* تصبح موجبة لكرام فقط بعد عدة انقسامات من إنبات البوغ .
٥- في اثناء تلوين بعض البكتريا مثل (*Proteus, Corynebacterium*) بطريقة كرام ,فان قسما منها يبدو موجبا لكرام والآخر سالبا لكرام .
٦- للحصول على نتائج جيدة ,يجب تحضير مسحة بكتيرية شفافة ما أمكن بحيث تكون بالكاد مرئية عبر زجاج الشريحة ,كما ان البكتريا يجب ان تكون حية وفتية .

تصبيغ أجزاء الخلية البكتيرية Bacterial Structure Staining

تصبيغ السبورات Spores Staining :

بعض أنواع بكتريا لها القابلية على إنتاج جسم بيضوي ذو جدار سميك يكون مقاوم للعوامل والظروف الخارجية المحيطة به حيث يمكن بقاؤه فترات طويلة في الظروف الغير طبيعية مثل درجات الحرارة العالية والمواد الكيمياوية السامة ,تعرف هذه الاجسام بالسبورات Spores والتي تمثل الطور الساكن ,ويتكون في الخلية سبور واحد فقط ,وتتصف انواع جنسي (*Bacillus,Clostridium*) بقابليتها على انتاج السبورات .
تقاوم السبورات التصبيغ العادي للبكتريا فلذلك يجب استعمال صبغات معينة مع التسخين لتسهيل ادخال الصبغة خلال جدار السبور وبمجرد دخول الصبغة الى البكتريا فانها تثبت بها ويصعب إزالتها منها وتبقى السبورات لفترات طويلة في طور السكون ويعود العديد منها الى النمو وتكوين خلية خضرية عند توفر الظروف الملائمة .

*** المواد اللازمة :**

١. مزارع بكتيرية لكل من (*Clostridium* او *Bacillus*) عمرها ٧٢ساعة.
٢. محاليل صبغية : a-Malachite green
b-Safranin
٣. شرائح زجاجية نظيفة .
٤. مجهر ضوئي وأوراق تنظيف العدسات .
٥. قنينة تحتوي زيت السدر وقنينة تحتوي الزايلين .

*** طريقة العمل :**

يستخدم في تصبيغ السبورات طريقة Schaeffer and Fulton Method :

١. حضر مسحة بكتيرية مثبتة بالنار .
٢. ضع محلول Malachite green على المسحة ثم سخن الشريحة الى ان يبدأ المحلول بالتبخر ,لا تدع الصبغة تجف على المسحة اثناء التسخين حيث يجب اضافة المزيد من الصبغة كلما احتاج الأمر واستمر بالتسخين لمدة (٣-٥) دقائق .
٣. انتظر حتى تبرد الشريحة ثم اغسلها جيدا بالماء .
٤. ضع صبغة الSafranin لمدة (١-٢) دقيقة .
٥. اغسل الشريحة جيدا بالماء ثم جففها باستعمال ورق نشاف "لا تمسح الشريحة ".
٦. افحص الشريحة باستخدام المجهر الضوئي على العدسة الصغرى ثم الكبرى وعند وضوح الصورة ضع قطرة من زيت السدر وافحصها بالعدسة الزيتية .
٧. بعد الانتهاء من الفحص المجهري نظف عدسات المجهر بورق النشاف والزايلين كما تعلمت ..

***النتيجة :**

تصطبغ البكتريا باللون الأحمر او الوردي اما السبورات فتصطبغ باللون الأخضر ونلاحظ اختلاف موقع السبور في الخلية باختلاف الانواع البكتيرية فهو اما ان يكون طرفي Terminal ,او يكون تحت طرفي Sub Terminal ,او يكون مركزي Central ,ويلاحظ حجمه ان كان متساوي او اكبر من قطر الخلية الخضرية .

UNIVERSITY OF ANBAR