**آشنایی با رنگ آمیزی گرم**

**همکاران عزیز، یکی از مهارت های بسیار پرکاربرد در انجام پروژه های زیست خصوصاً در پروژه مبازه با میکروب ها ، تقسیم بندی و تفکیک باکتری هاست در ذیل یکی از روش های آن را بیان می کنیم.**

**معرفی:**

 **یکی از ابتدایی‌ترین، قدیمی‌ترین و در عین حال ساده‌ترین روش‌های تقسیم‌بندی و تفکیک باکتری‌ها از یک‌دیگر بر اساس روشی است که فردی به نام «گِرَم» با به کار گیری نوعی رنگ‌آمیزی به میکروب‌شناسان معرفی کرده است. این روش بر مبنای ساختار دیواره‌ی باکتری‌ها آن‌ها را به دو رنگ صورتی و بنفش در می‌آورد. باکتری‌هایی که به رنگ بنفش در می‌آیند «گرم مثبت» و باکتری‌هایی که به رنگ صورتی در می‌آیند «گرم منفی» نامیده می‌شوند. اگر چه امروزه باکتری‌هایی شناخته شده‌اند که از تقسیم‌بندی این نوع رنگ‌آمیزی سرپیچی می‌کنند، اما هنوز هم این روش از اعتبار علمی بالایی برخوردار بوده و نخستین گام در شناسایی و رده‌بندی (سیستماتیک) باکتری به شمار می‌آید.**

**مواد مورد نیاز: برای انجام این رنگ‌آمیزی به وسایل ساده‌ای که در بیش‌تر آزمایش‌گاه‌های نه چندان حرفه‌ای هم یافت می‌شود نیاز دارید. لام برای تهیه‌ی گسترش میکروبی (فروتی)‌ تان و آب مقطر و آب‌پاش (پیسِت) برای شست‌وشو. یک شعله برای تثبیت گسترش میکروبی. رنگ‌های کریستال ویوله (رنگ بنفش) و سافرانین (رنگ صورتی). الکل برای رنگ‌بری و لوگل برای تثبیت رنگ. یک لوپ یا وسیله‌ی دیگری که بتوان آن را استریل کرد و برای برداشتن باکتری به کار برد. لوپ دارای یک دسته‌ی عایق و یک سیم بلند است که سر آن می‌تواند صاف باشد یا به شکل دایره‌ی کوچکی خم شده است.**

**.**

**روش:**

**یک قطره‌ی کوچک آب مقطر وسط یک لام تمیز بگذارید. مقدار کمی باکتری (به اندازه‌ی یک نقطه‌ یا ماکزیمم یک (ه) در این متن هم کافی است!) با لوپی که از شعله عبور داده شده است، برداشته و در قطره بگذارید. با همان لوپ در حالی که قطره را گسترش می‌دهید، باکتری‌ها را در قطره پخش کنید، به طوری که قطره به طور یک‌نواختی کدر شود.**

**بگذارید گسترش میکروبی شما کاملاً خشک شود. آن را چند بار از روی شعله عبور دهید تا باکتری‌ها به لام بچسبند (تثبیت). حالا به سراغ رنگ‌آمیزی می‌رویم.**

****

**کلاس را به خاطر بسپارید. ک: کریستال ویوله؛ ل: لوگل؛ ا: الکل؛ س: سافرانین.**

**نکته : با توجه به نبود رنگ سافرانین در حال حاضر از رنگ فوشین قلیایی استفاده میگردد.**

**مواد بالا را با قطره چکان به ترتیب روی گسترش بریزید طوری که هر بار تمام گسترش شما با ماده پوشانده شود. اگر دقت کنید، یک یا دو قطره کافی است تا هم رنگ کافی باشد هم رنگ‌ها از لام بیرون نریزند و دست شما را رنگی نکنند. یک دقیقه به هر ماده مهلت دهید (می‌توانید در مورد الکل به جای یک دقیقه پس از ۳۰ تا ۴۵ ثانیه شست‌وشو را انجام دهید. ولی به هیچ عنوان بیش‌تر از ۱ دقیقه برای رنگ‌بری الکل صبر نکنید. می‌توانید لام را مایل بگیرید و الکل را قطره قطره بریزید و تا زمانی که قطره‌ها بی‌رنگ شوند به این کار ادامه دهید). پس از هر مرحله، لام را با جریان ملایم آب مقطر (استفاده از آب معمولی مشکل چندانی ایجاد نمی‌کند) شست‌وشو دهید و سپس ماده‌ی بعدی را اضافه کنید.**

**در آخر لام را در محلی قرار دهید تا خشک شود. می‌توانید یه پنبه یا دستمال کاغذی را بر لبه‌ی عرضی لام قرار دهید و آن را کج کنید به طوری که آب اضافی لام جذب پنبه شود. آن را در معرض هوا قرار دهید تا خشک شود و بعد با عدسی ۱۰۰ برابر میکروسکوپ نوری مشاهده کنید. تصاویری مشابه شکل زیر در عدسی چشمی میکروسکوپ دیده می‌شوند.**

****

**شما با داشتن یک دوربین با قابلیت تنظیم فوکوس، مثل بسیاری از گوشی‌های همراه، می‌توانید به راحتی از رنگ‌آمیزی خود عکس بگیرید. دوربین را بالای عدسی چشمی میکروسکوپ قرار داده و در فاصله‌ی مناسب که تصویر دیده شود بگیرید.**

**بدون لرزش دست دکمه‌ی شاتر را فشار دهید. به همین راحتی! این تصاویر هم در دبیرستان آیین روشن‌ نور تهران تهیه شده است: کوکسی‌های گرم مثبت**

****

 **: مکانیسم**

**اتفاقی که طی رنگ‌آمیزی گرم می‌افتد از این قرار است که باکتری‌های گرم مثبت (که به رنگ بنفش در می‌آیند) دیواره‌ی نفوذ ناپذیرتری نسبت به گرم منفی‌ها دارند. در واقع لایه‌ی پپتیدوگلیکانی که بخش عمده‌ی دیواره‌ی باکتری‌ها را می‌سازد در گرم مثبت‌ها ضخیم‌تر است. در حالی‌که در باکتری‌های گرم منفی دیواره‌ی نازک با غشاء اضافی دیگری از جنس لیپید (نوعی چربی) به نام غشاء خارجی پوشانده شده است. کریستال ویوله از دیواره‌ی هر دو باکتری عبور می‌کند و به مولکول‌های خاصی متصل می‌شود. لوگل با آن ترکیب شده و رسوب‌های درشتی ایجاد می‌کند که رنگ را تثبیت می‌کند. در باکتری‌های گرم منفی، با افزودن الکل، چربی‌های سطحی باکتری شسته شده و منافذ دیواره باز می‌شوند و رسوب از سلول‌های باکتری خارج می‌شود. پس از رنگ‌آمیزی با سافرانین (می‌توان از فوشین هم استفاده کرد)، گرم منفی‌ها که بی‌رنگ بودند به رنگ صورتی دیده می‌شوند. اما گرم مثبت‌ها که پیشتر رنگ بنفش را به خود جذب کرده‌اند با وجود دارا بودن ذرات رنگ قرمز، باز هم به رنگ بنفش دیده می‌شوند. مکانیسم این رنگ‌آمیزی را می‌توانید در شکل شماتیک زیر ببینید.**

****

**تاریخچه: شاید بد نباشد بدانید که نخستین بار میکروب‌شناسی به نام «کریستین گرم» در سال ۱۸۸۴ این نوع رنگ‌آمیزی را کشف کرد و بعدها به نام خود او (Gram) ماندگار شد. به طوری که امروزه یکی از اساسی‌ترین و اولین مرحله‌ی تشخیص باکتری است.**

****