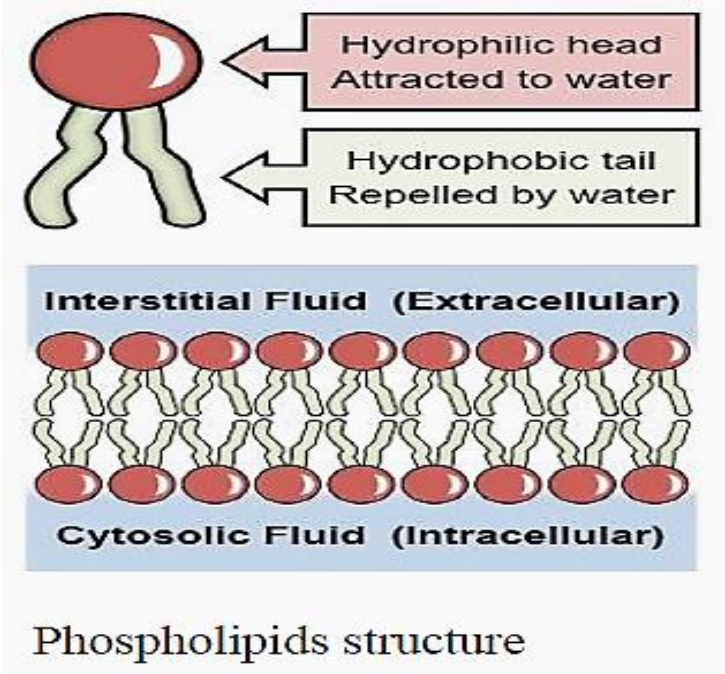
❖ الجدار الخلوي للبكتريا السالبة لصبغة كرام Cell Wall of Gram Negative bacteria

ان الجدار الخلوي للبكتريا السالبة أنحف من جدار البكتريا الموجبة لكنه اكثر تعقيداً , ويتألف من الاجزاء الاتية وفقاً للموقع من الخارج الى الداخل وهي outer membrane و peptidoglycan و periplasmic spaces .

1- **Outer membrane** – وهو طبقة مزدوجة واقعة الى الخارج من طبقة peptidoglycan وتكون الطبقة الابعد من تركيبة الجدار الخلوي للبكتريا السالبة. وترتبط طبقة الـ outer membrane مع طبقة الـ peptidoglycan من خلال مركب Braun's lipoprotein والذي يكون يتواجد بكثرة ومطمور ضمن طبقة الـ Outer membrane .

يتكون Outer membrane من (20 – 25 %) من phospholipid , و (30%) من Lipopolysaccharides (LPS) , و (45 -50%) من proteins.

a. **Phospholipid** – وهي عبارة عن دهون مفسفرة تشبه الدهون الموجودة في الغشاء السيتوبلازمي (سيتم شرحه تفصيلاً في المحاضرات القادمة) , وتكون ذات نهايات محبة للماء Hydrophilic ونهايات كارهة للماء Hydrophobic , فالنهايات المحبة للماء تتجه باتجاه الخارج والكارهة للماء والمتمثلة بالأحماض الدهنية تكون متجه الى الداخل.



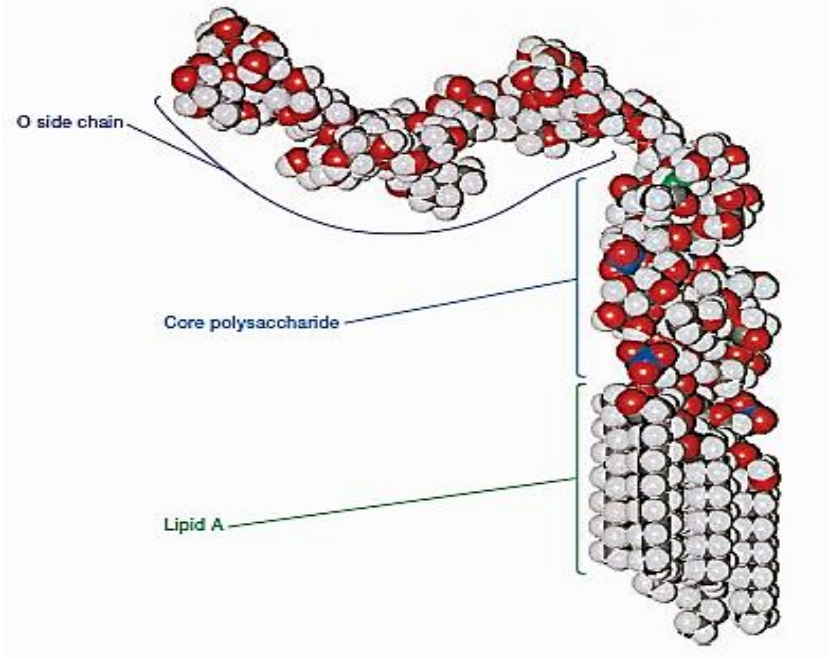
Phospholipids structure

b. Lipopolysaccharides (LPS) – وهو عبارة عن جزيئات معقدة وكبيرة تتكون من الدهون والسكريات lipids and carbohydrates وهو الجزء الخارجي للـ outer membrane , ويتألف الـ LPS من ثلاثة اجزاء وهي بحسب ترتيبها من الخارج الى الداخل وكلاتي :-

⇐ **O - antigen** – أو **O side chain** - وهو عبارة عن سكريات متعددة polysaccharides تمتد نحو الخارج , وهو يمثل الجزء الخارجي الطرفي من الـ LPS و outer membrane و cell wall وكما مبين في الشكل ادناه. وهذه السكريات غريبة في تنوعها حيث انها تكون متباينة من حيث المكونات من سلالة بكتيرية وأخرى حيث ان هناك عدد من البكتريا السالبة لصبغة كرام Gram negative bacteria تكون قادرة وبسرعة على تغيير طبيعة او تركيبة الـ O- antigen مما يجعلها قادرة على التهرب رمن دفاعات الجسم.

⇐ **Core Polysaccharide** – اللب – وهو عبارة عن Oligosaccharides .

⇐ **Lipid A** – وهو عبارة عن مركب دهني يسمى ايضاً بالـ Endotoxin ويكون متجه الى الداخل كونه مركب كاره للماء وهو المسؤول عن الخصائص الفسلجية والمناعية التي تحدث في جسم الانسان والمتمثلة بارتفاع درجة الحرارة fever , حيث ان هذا الـ Endotoxin يتحرر من الجدار الخلوي بعد تحطم هذا الجدار نتيجة تعرضه للمضادات الحيوية antibiotics المستخدمة في العلاج وفي حال دخل الـ LPS او Lipid A لمجرى الدم bloodstream فأنه يؤدي الى حدوث الصدمة السمية او الصدمة الانتنانية septic shock والتي لا يمكن علاجها بشكل مباشر.



Lipopolysaccharide Structure

يمكن تشخيص السلالات البكتيرية من خلال التفاعلات المناعية لكون التركيب الكيميائي لمركب (LPS) يكون مميز لكل سلالة بكتيرية. بالإضافة الى ذلك فأن هذا المركب LPS يقوم بعدة وظائف وهي :-

1- اعطاء صفة الشحنة السالبة للبكتريا بسبب احتوائه على مجاميع الفوسفات.
2- يساهم في استقرار وثباتية تركيبة الـ outer membrane .
3- التصاق البكتريا بأسطح المضيف host وتكوين الـ biofilm.
4- الوظيفية الرئيسية للـ LPS هي عمله كحاجز نفوذ permeability barrier حيث ان اجزاء الـ LPS وتجاورها مع بعضها ادت الى تقييد دخول املاح الصفراء Bile salts والمعادن الثقيلة heavy material والمضادات الحيوية. وعلى الرغم من ان الـ LPS يعمل كحاجز نفوذ permeability barrier إلا ان الـ outer membrane يعتبر أكثر نفاذية بكثير من الغشاء البلازمي plasma membrane. ان LPS يساهم في دخول الجزيئات الصغيرة مثل الكلوكوز glucose والسكريات الاحادية monosaccharaides , وهذا يتم نتيجة وجود ما يعرف بـ porin proteins . معظم هذه الـ porine تكون متجمعة مع بعضها البعض لتكون تركيب ثلاثي الابعاد Trimer ويمتد خلال الـ outer membrane تسمح هذه التراكيب بدخول الجزيئات التي تكون ذات وزن جزيئي اقل من 600 دالتون (daltons).
5- يساعد البكتريا من التهرب من دفاعات الجسم كعملية البلعمة phagocytosis.
6- الـ O- side chain يعطي خصائص او صفة الاستضداد للبكتريا antigenicity لذلك يسمى ايضاً بالـ somatic antigen حيث انه يقوم بتحفيز دفاعات الجسم وخلق استجابة مناعية تؤدي الى انتاج اجسام مضادة antibodies.
7- الجزء المهم من الـ LPS هو Lipid A وهو الجزء السمي ويعمل كسم داخلي endotoxin ويسبب بعض الاعراض التي تظهر في اصابات البكتريا السالبة لصبغة كرام (كما اشرنا سابقاً)

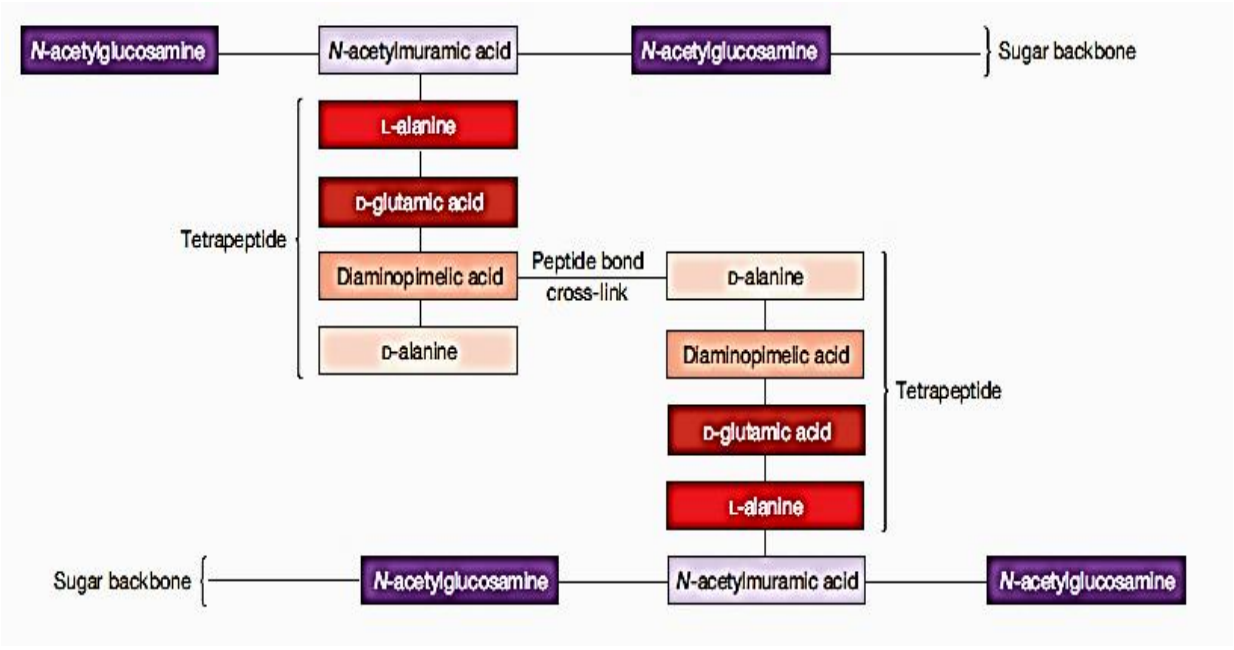
c. Proteins – هناك نوعين من البروتينات الموجودة في الجدار الخلوي للبكتريا السالبة :

أولاً- Matrix Proteins – يتوزع هذا النوع من البروتينات في outer membrane بحسب حبها او كرهها للماء ويشكل هذا النوع من البروتينات قنوات لنقل المواد من الخارج الى الداخل حيث يطلق عليها porins والتي اشرنا لها انفاً.

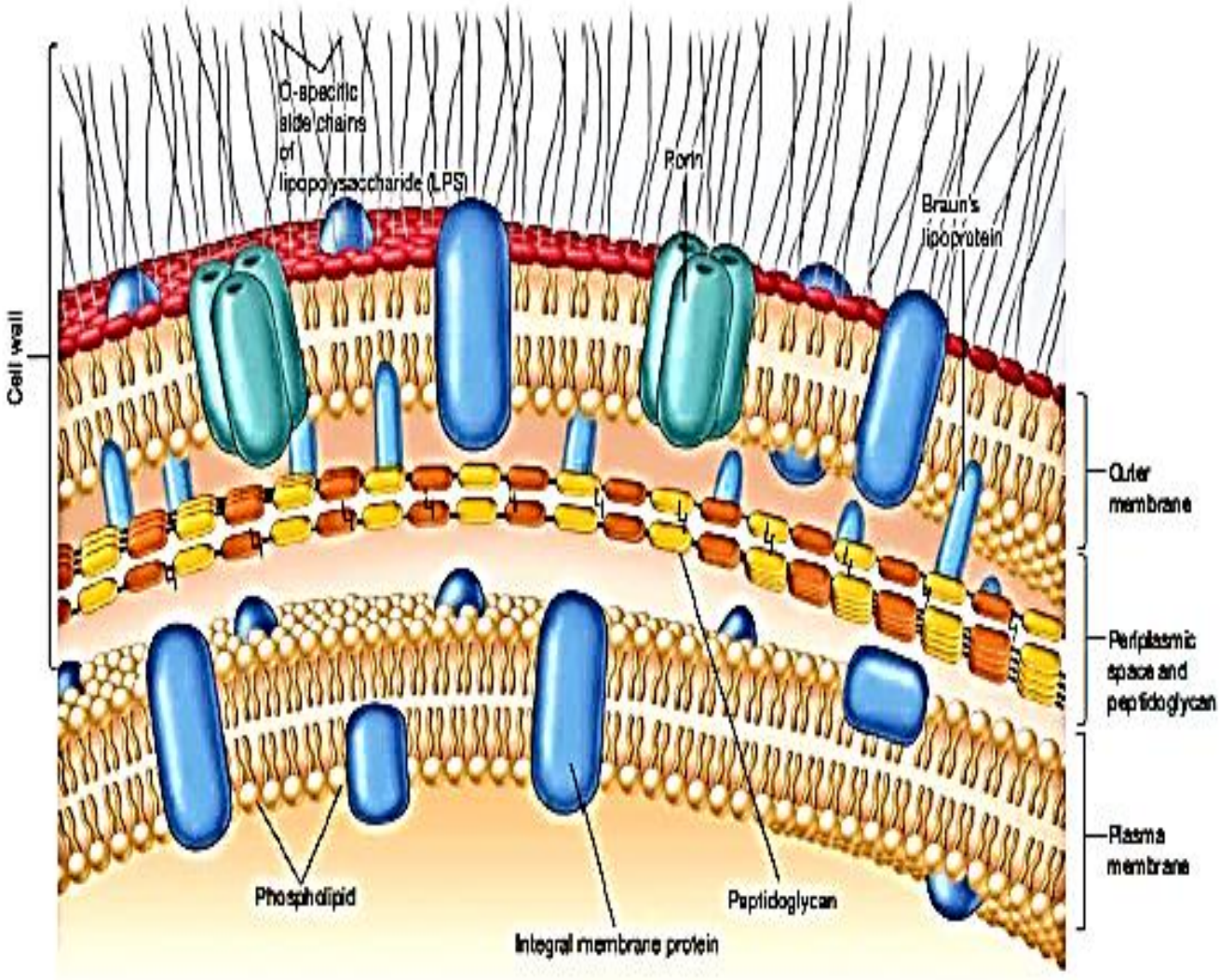
ثانياً - Broun's Proteins – وهو يمثل النوع الثاني من البروتينات الموجودة في الجدار الخلوي للبكتريا السالبة وكما اشرنا انفاً هذا النوع من البروتينات يقوم بمهمة ربط طبقة الـ outer mambarne مع طبقة الـ peptidoglycan .

2- Peptidoglycan – يشكل peptidoglycan طبقة نحيفة ويمثل حوالي (5 – 11 %) من وزن الجدار الجاف للبكتريا السالبة. وتقع هذه الطبقة ضمن الفسحة الواقعة بين غشاء الخلية والجدار الخلوي والتي تسمى بالـ periplasmic spaces. ان طبقة الـ peptidoglycan تكون ذو تركيب مشابه لما موجود في البكتريا الموجبة لصبغة كرام والموضح في المحاضرة السابقة عدا ان حامضها الاميني L-lysin في سلسلة الـ tetrapeptide في البكتريا الموجبة يستبدل بالحامض الاميني "DAP" *meso*-diaminino pimelic acid . وكما أشرنا سابقاً فأن سلاسل Glycan strands ترتبط مع بعضها من خلال اواصر تساهمية ممتدة من tetrapeptide المرتبطة تساهمياً مع (NAM) من خلال مجموعة الكاربوكسيل , اي ان الـ tetrapeptide لسلسلة Glycan strands ترتبط مع tetrapeptide لسلسلة اخرى.

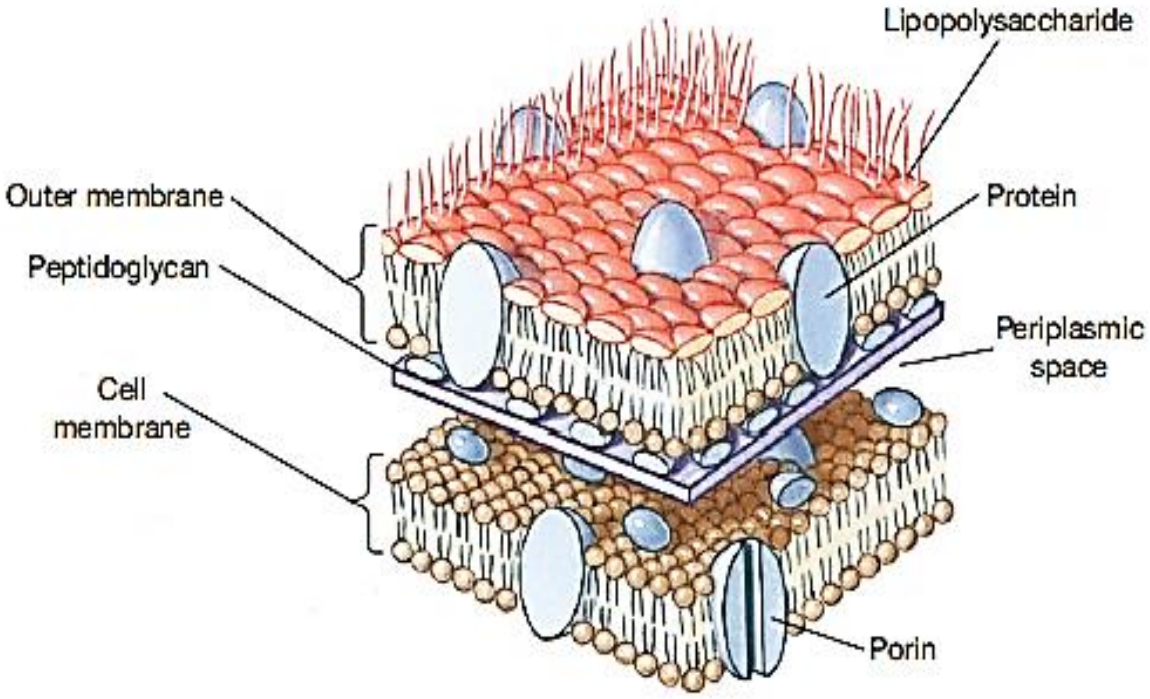
هذا الارتباط يسمى Transpeptidation. في الجدار الخلوي لـ Gram negative تكون عملية الارتباط بشكل مباشر ما بين D-alanine في سلسلة tetrapeptide في المركب (NAM) مع *meso*-diaminino pimelic acid في سلسلة tetrapeptide من مركب اخر من (NAM).



peptidoglycan of the Gram-negative bacteria



Typical Gram-Negative Cell Wall

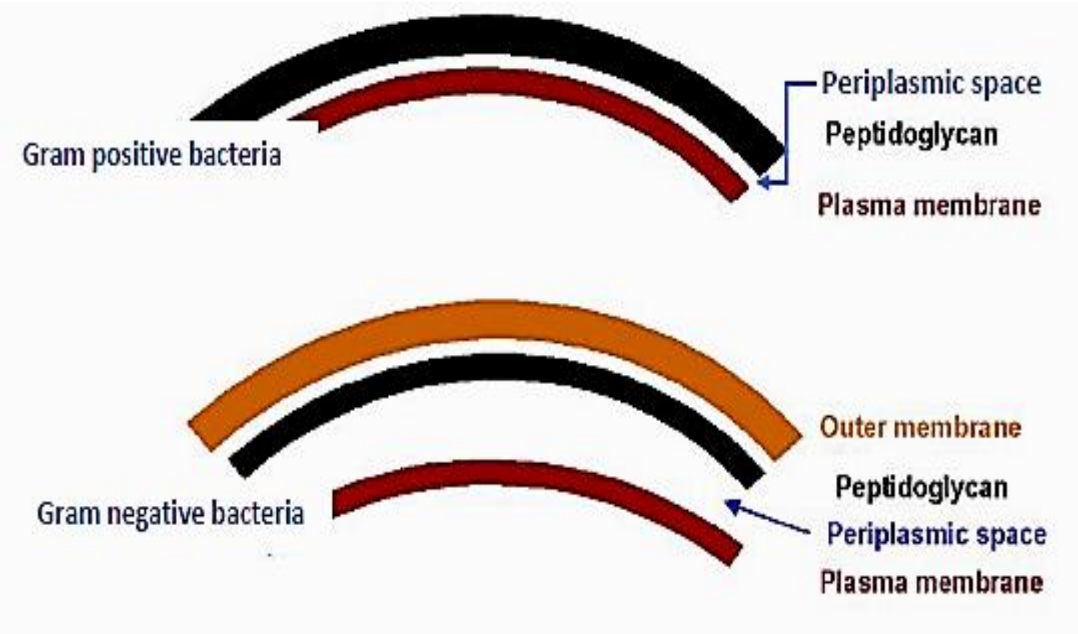


3- Periplasmic Space – هو عبارة عن فراغ او فسحة واقعة بين غشاء الخلية cell membrane وجدار الخلية cell wall. يتكون الـ periplasmic spaces في جدار الخلية السالبة من peptidoglycan وبروتينات بنائية protein constituents ومركبات التأييض الغذائي metabolites. يسهل ملاحظة هذه الطبقة في بكتريا السالبة بواسطة المجهر الالكتروني. ويعتبر الـ periplasmic spaces منطقة مهمة جداً في الايض الخلوي , حيث ان هذه الطبقة لا يقتصر دورها على احتواءها على طبقة الـ peptidoglycan (في حالت البكتريا السالبة). ومن أهم وظائف الـ periplasmic spaces هي :-

a. تساهم في تحطيم الجزيئات كبيرة الحجم التي تم ادخالها عبر الـ outer membrane لتحويلها الى جزيئات او مركبات اصغر يسهل ادخالها عبر الغشاء البلازمي cytoplasmic membrane وذلك لاحتوائها على العديد من الانزيمات الهضمية digestive enzymes. كما ويساهم الـ periplasmic spaces في بعض انواع البكتريا في صناعة طبقة peptidoglycan.

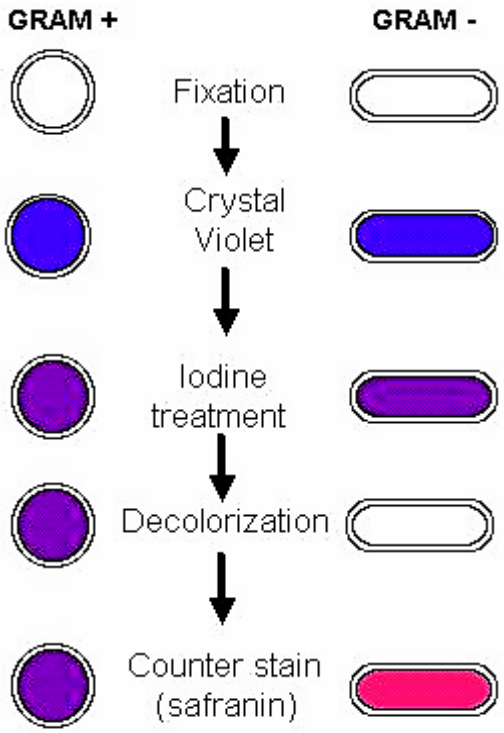
b. تساهم في تحطيم بعض المواد الضارة للخلية مثل المضادات الحيوية antibiotics عبر انزيمات خاصة مثل انزيم الـ beta-lactamase المسؤول عن ابطال مفعول مضادات البنسلينات Penicillin وبعض مضادات السيفالوسبورينات Cephalosporin.

c. تحتوي هذه الفسحة على انظمة ناقلة للمواد الغذائية وبشكل تخصصي عبر بروتينات ناقلة خاصة transport proteins تتخصص بنقل مواد معينة مثل نقل سكر الـ galactose, ribose and maltose.



Mechanism of Gram Staining

بعد ان استعرضنا تراكيب الجدار الخلوي للبكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام , يتحتم على الطالب ادراك المفاهيم الاساسية لهذا التقسيم (موجبة وسالبة لصبغة كرام) وعلى ماذا بني علماً ان طريقة عمل procedure التصبيغ بصبغة كرام هي احد المواضيع التطبيقية التي سيتم اجراءها بشكل عملي في المختبر. إن الية التصبيغ بصبغة كرام تتضمن اضافة صبغة الـ crystal violet الموجبة الشحنة حيث انها تنجذب نحو الجدار البكتيري السالب الشحنة. ثم يضاف الـ **iodine** والذي يتفاعل مع صبغة crystal violet ليكون معقد من المادتين crystal violet-iodine complex , ليجعلها غير قابلة للذوبان ويعزز بقاءها وثباتها. وعند معاملة البكتريا بـ **ethanol** كقاصر للون فأنه يؤدي الى انكماش المسامات الموجودة في طبقة الـ peptidoglycan لبكتريا Gram positive , ليمنع خروج صبغة crystal violet خارج الجدار وبهذه الحالة تبقى الخلية محتفظة باللون البنفسجي او الارجواني (لون صبغة crystal violet) . بعد هذه الخطوة تضاف صبغة اخرى وهي صبغة الـ safranin. وبالمقارنة فأن الجدار الخلوي لبكتريا Gram negative يتكون من طبقة نحيفة جداً من مركب الـ peptidoglycan وقليلة الارتباط مع بعضها البعض. بالإضافة الى ذلك فأن معاملة الخلية بالكحول ethanol يعمل على اذابة دهون الـ outer membrane , لذلك فأن الكحول يزيل crystal violet-iodine complex من الجدار الخلوي وهذا يؤدي الى ان الخلية سوف تصطبغ بسهولة بالصبغة المعاكسة الاخيرة وهي safranin ذات اللون الاحمر.



الجدول ادناه يوضح مجمل الاختلافات الرئيسية بين الاقسام الرئيسية الثلاثة للبكتريا **Gram-Positive, Gram-Negative, and Acid-Fast Bacteria** وفقاً لقابليتها على أخذ الصبغة والذي يعكس تركيبة جدارها الخلوي .

Characteristics of the Cell Walls of Gram-Positive, Gram-Negative, and Acid-Fast Bacteria			
Characteristic	**Gram-Positive Bacteria**	**Gram-Negative Bacteria**	**Acid-Fast Bacteria**
Peptidoglycan	Thick layer	Thin layer	Relatively small amount
Teichoic acid	Often present	Absent	Absent
Lipids	Very little present	Lipopolysaccharide	Mycolic acid and other waxes and glycolipids
Outer membrane	Absent	Present	Absent
Periplasmic space	Very small gap	Present	Absent
Cell shape	Always rigid	Rigid or flexible	Rigid or flexible
Results of enzyme digestion	Protoplast	Spheroplast	Difficult to digest
Sensitivity to dyes and antibiotics	Most sensitive	Moderately sensitive	*Least sensitive*
Examples	*Staphylococcus aureus*	*Escherichia coli*	*Mycobacterium tuberculosis*