3. এইসব ব্যাকটেরিয়া পেনিসিলিন সেনসিটিভ হয়।	হয়।
4. টিকোইক অ্যাসিড উপস্থিত বা অনুপস্থিত।	4. টিকোইক অ্যাসিড সর্বদাই অনুপস্থিত।
5. গ্রাম-পজিটিভ ব্যাকটেরিয়া অধিক ড্রাগ রেসিস্টেন্ট হয়।	5. গ্রাম-নেগেটিভ ব্যাকটেরিয়া কম ড্রাগ রেসিস্টেন্ট হয়।
6. যদি টক্সিন (Toxin) উৎপন্ন করে তবে সেটি এক্সোটক্সিন (exotoxin)।	6. টক্সিন (Toxin) উৎপন্ন করে এবং সেটি এন্ডোটক্সিন (endotoxin)।
7. মেসোজোম উপস্থিত। উদাহরণ—স্ট্রেপটোকক্কাস, স্ট্যাফাইলোকক্কাস, ব্যাসিলাস সাবটিলিস, ক্লসট্রিডিয়াম প্রভৃতি।	7. অধিকাংশ ক্ষেত্রে মেসোজোম থাকে না। উদাহরণ—ই. কোলাই, ডিব্রিও কলেরী, রাইজোরিয়াম, সিউডোমোনাস প্রভৃতি।

3.9. অ্যাসিড-ফাস্ট ব্যাকটেরিয়া (Acid-Fast Bacteria)

মাইকোব্যাকটেরিয়াম ও নোকার্ডিয়া শ্রেণির ব্যাকটেরিয়া সমূহ গ্রাম রঞ্জক বা অন্য কোনো রঞ্জন প্রক্রিয়ায় রঞ্জিত করা যায় না। অন্যান্য ব্যাকটেরিয়ার থেকে এদের কোশপ্রাচীরের গঠন সম্পূর্ণ ভিন্ন ধরনের হয়। এই সব ব্যাকটেরিয়াকে **জেইল-নীলসেন পদ্ধতিতে** (Zichl-Neelsen method) গরম, তীব্র কার্বল-ফুক্শিন (Carbol-Fuchin) দ্বারা রঞ্জিত করা হয়। রঞ্জিত ব্যাকটেরিয়া খনিজ অ্যাসিড ব্যবহারে বর্ণহীন হয় না। এই সব ব্যাকটেরিয়াকে **অ্যাসিড-ফাস্ট ব্যাকটেরিয়া** (acid-fast bacteria) বলে। মাইকোব্যাকটেরিয়াম লেপ্রী, মাইকোব্যাকটোরিয়াম টিউবারকল, নোকার্ডিয়া sp প্রভৃতি অ্যাসিড-ফাস্ট ব্যাকটেরিয়ার উদাহরণ।

■ জেইল-নীলসেন রঞ্জিতকরণ পদ্ধতি (Zichl-Neelsen staining method) ঃ

(i) স্লাইডের ফিক্সড স্মিয়ারকে গরম কার্বল-ফুক্শিন দিয়ে 10 মিনিট ধরে রঞ্জিত করা হয়।

(ii) দশ মিনিট পর সাধারণ নলের জলে স্লাইডকে সতর্কতার সঙ্গে ধৌত করা হয়।

(iii) স্মিয়ারকে 1% HCl ও 70% অ্যালকোহলের মিশ্রণে এক মিনিট রাখা হয়।

(iv) এরপর যতক্ষণ না স্মিয়ারটি হালকা গোলাপি বর্ণ ধারণ করছে ততক্ষণ 70% প্রশমি অ্যালকোহল দিয়ে ধৌত করা হয়।

(v) এরপর 2% মিথিলিন ব্লু (Methylene blue) বা ম্যালাকাইট গ্রীন (Malachite green) দি রঞ্জিত করা হয়।

অ্যাসিড-ফাস্ট ব্যাকটেরিয়ার কোশপ্রাচীরে লিপিডের পরিমাণ প্রচুর হয় এবং মাইকোলিক অ্যাসি (Mycolic acid) উপস্থিত থাকে। কোশপ্রাচীরের এই বৈচিত্র্যের জন্য তারা গ্রাম রঞ্জকে রঞ্জিত হয় অ্যাসিড-ফাস্ট রঞ্জন পদ্ধতিতে এদের রঞ্জিতকরণ সম্ভবপর হয়।

PATHOGENIC BACTERIA VERSUS NONPATHOGENIC BACTERIA

PATHOGENIC BACTERIA	NONPATHOGENIC BACTERIA
Bacteria that can cause diseases	Bacteria that do not cause disease, harm or death to another organism
Parasites	Commensals
Harmful	May be useful
Virulence genes are present in the genome	Do not possess virulence genes
Adhere to the cells of the tissues in order to escape from the fluid flows inside the body	Do not adhere to the tissue
Invades the cells of the body	Live outside the body cells
Resist phagocytosis by using a slick capsule, leucocidins, and other antiphagocytic mechanisms	Subjected to phagocytosis
Produce toxins that can alter the metabolism of the host cells	Do not produce toxins
Produce their colonies within the tissues	Do not produce colonies

Visit www.PEDIAA.com

Gram Staning Procedure
Take a clean grease free slide
Prepare a smear by using nichrome wireloop
Air dry and heat fix the slide
Flood the smear with crystal violet for 1-2 minutes.
Wash the slide with water
Flood the smear with Gram's Iodine for 1-2 minutes
Treat the slide with decolourising agent i.e 95% Ethanol
Wash the slide with water
Flood the smear with Basic fuschin or Safranin
Wash the slide with water
Observe under oil immersion

(Gram stain) পদ্ধতি বিভিন্ন বৈচিত্র্য প্রদর্শন করে। কিছুক্ষেত্রে ব্যাকটেরিয়ার কিছু অংশ গ্রাম-পজিটিভ ও বাকি অংশ গ্রাম-নেগেটিভের মতো আচরণ করে। তাই এদের **গ্রাম ভ্যারিয়েবল (Gram variable)** বলে। আবার কিছু ব্যাকটেরিয়াকে সদ্য প্রস্তুত করা কালচার থেকে সংগ্রহ করে গ্রাম রঞ্জকে রঞ্জিত করলে গ্রাম-পজিটিভ হয় অথচ পুরাতন কালচার থেকে সংগ্রহ করলে ওই একই ব্যাকটেরিয়া গ্রাম-নেগেটিভ হয়। এই কয়েকটি ব্যতিক্রম ছাড়া ব্যাকটেরিয়াকে গ্রাম রঞ্জক পদ্ধতিতে যথাযথভাবে **দুটি** বিভাগে বিভক্ত করা যায়।

গ্রাম রঞ্জিতকরণের (Gram staining) মূল ভিত্তি হল ব্যাকটেরিয়ার কোশপ্রাচীরের রাসায়নিক গঠনের বৈচিত্র্য। ব্যাকটেরিয়ার কোশপ্রাচীরের মূল উপাদানটি হল **পেপটাইডোগ্লাইকান (Peptidoglycan)**। গ্রাম-পজিটিভ ব্যাকটেরিয়ার পেপটাইডোগ্লাইকান বহুস্তর বিশিষ্ট হয় এবং লিপিডের পরিমাণ বেশি হয়। কিন্তু গ্রাম-নেগেটিভ ব্যাকটেরিয়ার পেপটাইডোগ্লাইকান অত্যন্ত কম এবং লিপিডের পরিমাণ অনেক বেশি হয়। গ্রাম-পজিটিভ ব্যাকটেরিয়ার কোশপ্রাচীরে লিপিড কম হওয়ার জন্য অ্যালকোহল প্রয়োগে কোশপ্রাচীরের জল অপসারিত হয়ে রন্ধ্রের আকৃতি ও ভেদ্যতা কমিয়ে দেয়। ফলসরূপ কোশপ্রাচীরে ক্রিস্টাল ভায়োলেট-আয়োডিনের যৌগ অবস্থান করে এবং কোশগুলিকে বেগুনি বর্ণের দেখায়। গ্রাম-নেগেটিভ ব্যাকটেরিয়ার ক্ষেত্রে কোশপ্রাচীরে লিপিডের পরিমাণ বেশি হওয়ায় অ্যালকোহল প্রয়োগে লিপিড দ্রুত অপসারিত হয়ে রন্ধ্রের আকৃতি ও ভেদ্যতা বৃদ্ধি করে, ফলে ক্রিস্টাল ভায়োলেট-আয়োডিনের যৌগ সহজেই অপসারিত হয়ে বর্ণহীন কোশে পরিণত হয়। এরপর স্যাফ্রানিন প্রয়োগে গ্রাম-নেগেটিভ ব্যাকটেরিয়া গোলাপি বা লাল বর্ণ ধারণ করে।

❑ 3.8.1. গ্রাম রঞ্জিতকরণ পদ্ধতি (Gram staining method) :

(i) একটি পরিষ্কার কাঁচের স্লাইডে ব্যাকটেরিয়ার সাসপেনশন সতর্কতার সাহায্যে বিস্তৃত করা হয় এবং একে বাতাসে শুষ্ক করা হয়।

(ii) এরপর স্লাইডটিকে বুনসেন বার্ণারের শিখার উপর দুই-তিনবার ঘোরানো হয়।

(iii) স্লাইডটি সম্পূর্ণভাবে ক্রিস্টাল ভায়োলেট দিয়ে পরিবৃত করা হয় এবং 30 সেকেন্ড এই অবস্থায় স্লাইডটিকে রেখে দেওয়া হয়।

(iv) এরপর ক্রিস্টাল ভায়োলেট ধৌত করে লঘু আয়োডিনের দ্রবণ দিয়ে স্লাইডের সমগ্র অঞ্চলটিকে পরিবৃত করা হয়।

(v) এক মিনিট পর আয়োডিনের দ্রবণ ধৌত করা হয়।

(vi) এরপর অ্যালকোহল বা অ্যাসিটোন দিয়ে সমগ্র স্লাইডটিকে ধৌত করা হয়। অ্যাসিটোন অধিক ক্রিয়াশীল হওয়ায় সাধারণত অ্যাসিটোনকে সতর্কতা অবলম্বন করে ব্যবহার করা হয়ে থাকে।

(vii) এরপর স্লাইডটিকে অণুবীক্ষণ যন্ত্রে দেখলে যদি ব্যাকটেরিয়া বেগুণি বর্ণ ধারণ করে তবে গ্রাম পজিটিভ হয়। যদি ব্যাকটেরিয়া বর্ণহীন দেখায় তবে তাকে স্যাফ্রানিন বা কার্বল-ফুক্সিন (Carbo fuachin) দিয়ে রঞ্জিত করা হয়। এই রকম রঞ্জিতকরণে গ্রাম-নেগেটিভ ব্যাকটেরিয়া গোলাপি বা লাল বর্ণ ধারণ করে।