



Ministry of Higher education and scientific research

University of Tikrit

College of science

Department of Biology

## Lab. of Practical Microbiology (1)

For second stage - 2025-2026



مدرس المادة : بشري علي كاظم

## مختبر صبغة جرام Gram stain

### الصبغات التفرقية Differential stains

تستخدم فيها صبغتين أو أكثر. وتستخدم هذه الصبغات التفرقية بين الأنواع البكتيرية. من أكثر الصبغات التفرقية شيوعاً هي صبغة **Gram stain**.

### سؤال: ما هي استخدامات صبغة جرام Gram stain

- 1- للتفرقة بين البكتيريا الموجبة و السالبة لصبغة غرام.
- 2- لتعرف على أشكال البكتيريا.
- 3- لتعرف على ترتيب الخلايا البكتيرية.

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

رغم أن صبغة جرام من أكثر الصبغات أهمية واستخداماً إلا أنها غير دقيقة تماماً مع بعض الأنواع، حيث تنصبغ بعض الأنواع من البكتيريا بشكل ضعيف أو لا تنصبغ بصبغة جرام. بالتالي هذا التغير يعتمد بالدرجة على التغيرات بمكونات الجدار الخلوي للبكتيريا. بالتالي تساعد على تصنيف أربعة مجاميع من البكتيريا حسب صبغة جرام.

- 1- بكتيريا الموجبة لصبغة جرام **Gm(+ve) bacteria** جدارها احتفظ بالصبغة الأساسية (الكريستال البنفسجي Crystal violet) ولا تأخذ الصبغة المعاكسة (السفرانين Safranin).
- 2- بكتيريا سالبة صبغة جرام **Gm(-ve) bacteria** لا تحتفظ بالصبغة الأساسية (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. **تنويه:** ربما هذا التغير يعود لمزارع البكتيرية التي عمرها يتجاوز أكثر من **48 ساعة**. هذا يعود نتيجة التغير في مكونات جدار الخلية البكتيرية لذلك يجب استخدام مزارع بكتيرية عمرها يتراوح بين **18** الى **24** ساعة حصراً.

## 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 الايودين 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 التصبغ:** يتحد الايودين مع صبغة **Crystal violet** داخل جدار الخلية البكتيرية مكونا معقدًا غير قابل للذوبان. هذا المعقد يرتبط بقوة بجدار الخلية السميك للبكتيريا موجبة لصبغة غرام.

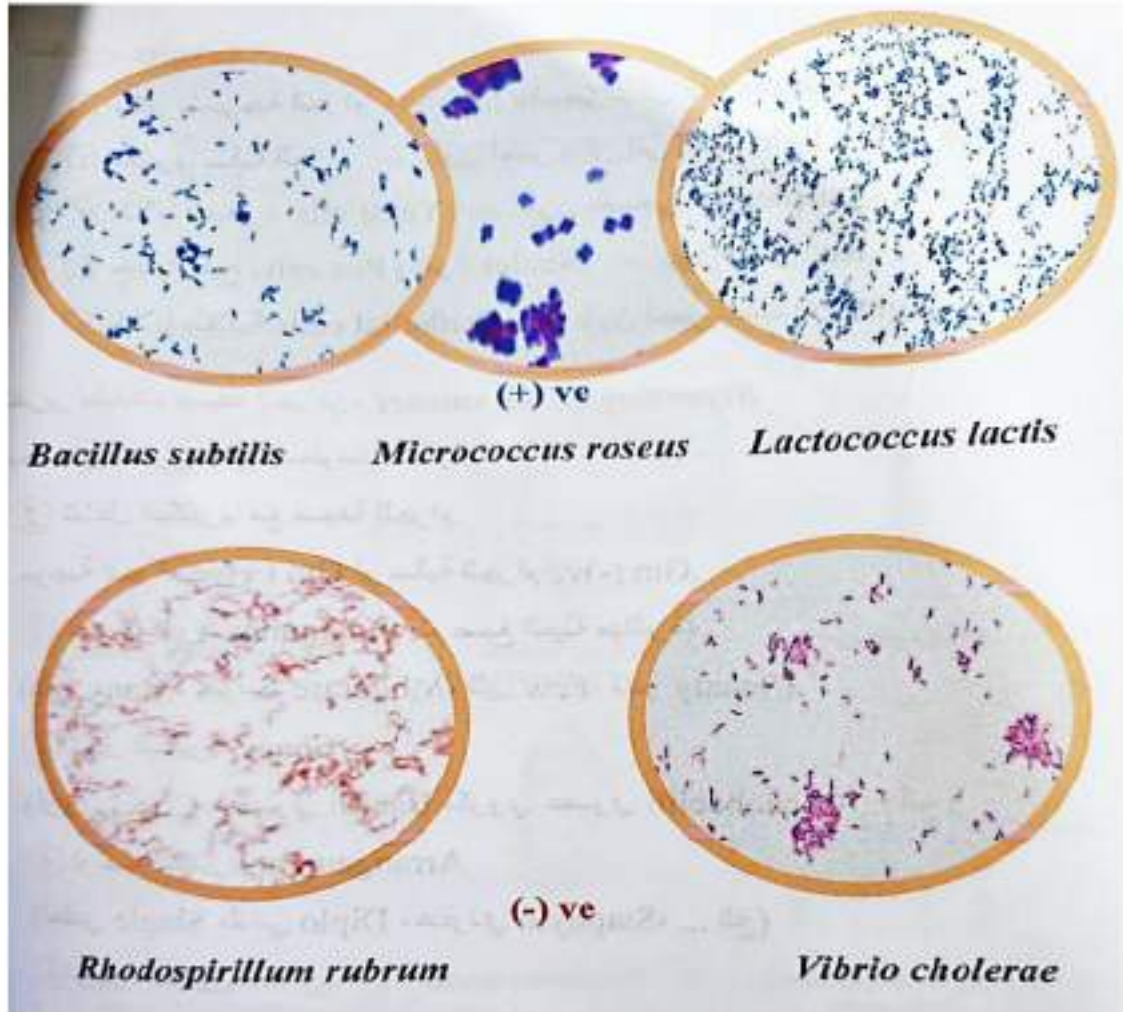
◀ **دور الحرارة Bunsen burner في التصبغ:** دور هام في تثبيت مسحة البكتيريا على الشريحة Slid لكي لا يتم جرف البكتيريا عند الغسل فضلا عن قتل البكتيريا خاصة البكتيريا المرضية مما يحقق السلامة عند العمل.



**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.



### 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 (كرسنال 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 2-7 **نانو متر nm** بالتالي ارتباط ضعيف الارتباط بين الايودين و طبقة **Peptidoglycan** بالتالي سهولة ازالة معقد الصبغة الاساسية (كرسنال البنفسجي و الايودين) نتيجة اذابة طبقة **Peptidoglycan** ايضا.