



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، آزمایشگاه میکروبیولوژی



آزمایشگاه میکروبیولوژی پایه

رنگ آمیزی گرم

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Gram Staining

10µm



زمینه ی نظری

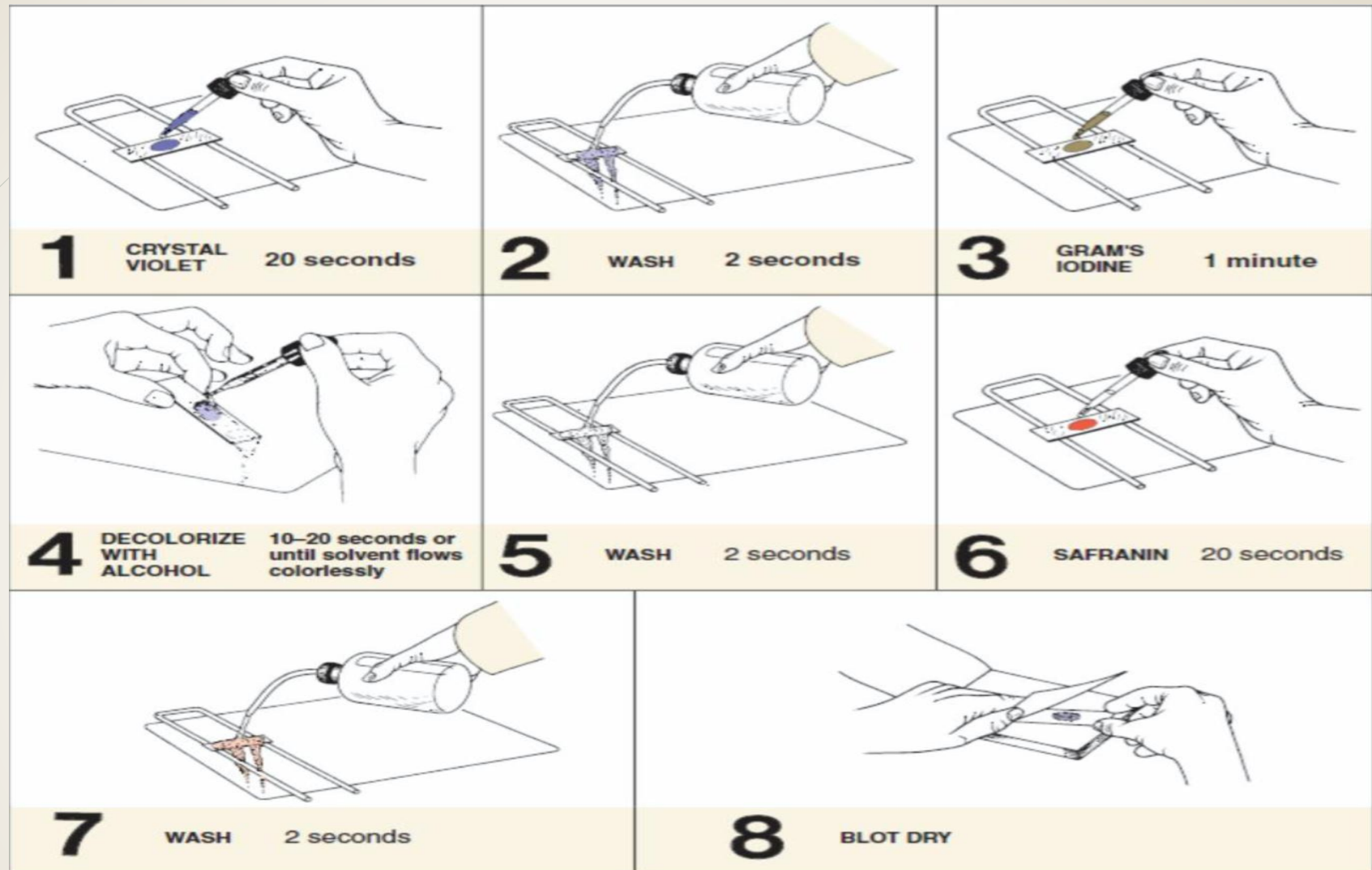
3

این رنگ آمیزی در رده بندی باکتری ها اهمیت دارد. در این رنگ آمیزی باکتری ها به دو گروه اصلی بر اساس ساختار دیواره تقسیم می شوند. باکتری های گرم مثبت، باکتری هایی هستند که دیواره آن ها دارای یک غشای دو لایه است و از بیشتر از ۴۰ لایه پپتیدوگلیکان تشکیل شده، در حالی که دیواره گرم - ها از دو لایه غشای دو لایه تشکیل شده که از تعداد کمی پپتیدوگلیکان تشکیل شده است. این یعنی میزان لیپید در دیواره باکتری های گرم - از گرم + بسیار بیشتر است و قسمت خارجی آن را تشکیل داده است.

مواد و وسایل

4

- 1- لوپ یا فیلدوپلاتین
- 2- لام شیشه ای تمیز
- 3- تشتک مخصوص رنگ آمیزی
- 4- آبقشان (پی ست)
- 5- کشت های میکروبی 24 ساعته روی نوترینت آگار شامل باکتری های زیر:
 - باسیلوس سرئوس
 - اشریشیا کلی
 - استافیلوکوکوس آرتوس
- 5- محلول های رنگی
 - کریستال ویوله
 - لوگل یا یدیدوره
 - الکل
 - سافرانین



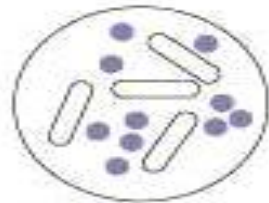
روش کار:

- مراحل رنگ آمیزی گرام را می توان به شرح زیر بیان نمود:
- 1-تهیه مواد و محلولهای رنگی مذکور
- 2-تهیه گسترش روی لام : ابتدا از نمونه باکتری یک گسترش روی لام تهیه می کنیم.
- 3-فیکس کردن نمونه با استفاده از حرارت و متانول
- 4-رنگ آمیزی با کریستال ویوله : در این مرحله مقداری از رنگ کریستال ویوله را با قطره چکان به روی سطح گسترش میکروبی روی لام میریزیم و می گذاریم 10 تا 30 ثانیه بماند تا رنگ در دیواره سلولی میکروبها نفوذ کند.
- 5-مرحله شستشو: پس از سپری شدن مدت زمان 10 تا 30 ثانیه ، رنگ اضافی روی لام را خالی کرده و با استفاده از آب مقطر سطح روی گسترش را شستشو می دهیم.

- 6- مرحله اضافه کردن محلول لوگل : چند قطره از محلول لوگل را روی گسترش پخش نموده و می گذاریم بمدت حدودا دو برابر زمان طی شده مربوط به کریستال ویوله به همان حالت بماند.
- 7- مرحله شستشو: محلول اضافی را خالی کرده و با آب مقطر لام را شستشو می دهیم.
- 8- مرحله رنگ بری با استفاده از استن - الکل : لام را با زاویه 45 درجه نگه داشته و بعد با استفاده از محلول رنگ بر الکل - استن که بر روی گستره می ریزیم به ملایمت آنرا بی رنگ می کنیم.
- 9- مرحله شستشو: بعد از مدت زمان 10 تا 30 ثانیه لام را با آب مقطر شستشو می دهیم.
- * در صورتی که رنگ بری به صورت کامل انجام نشد مراحل 8 و 9 را تکرار می کنیم.*
- 10- رنگ آمیزی با سافرانین ویا کربول فوشین : در این مرحله سطح گسترش را با رنگ ثانویه یعنی سافرانین پوشانده و 10 تا 30 ثانیه صبر می کنیم.
- 11- مرحله شستشو: رنگ اضافی را خالی کرده و با آب مقطر لام را شستشو می دهیم تا کاملا خشک شود.
- 12- مشاهده لام رنگ آمیزی شده با عدسی 100 با استفاده از روغن



- Crystal violet
- Iodine
- Alcohol
- Safranin



1 Application of crystal violet (purple dye)
(Primary stain)

2 Application of Gram's iodine (mordant)

3 Alcohol wash (decolorization)

4 Application of safranin (counterstain)



Crystal violet

Gram's iodine

Alcohol

Safranin

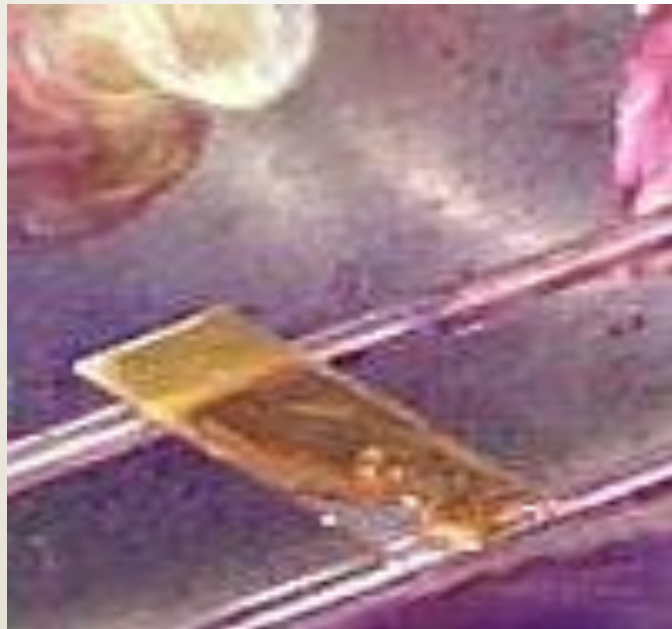
1. What is the name of this Gram stain solution?



2. How long was the stain left on the slide before being rinsed off?



3. What is the name of the Gram stain solution?



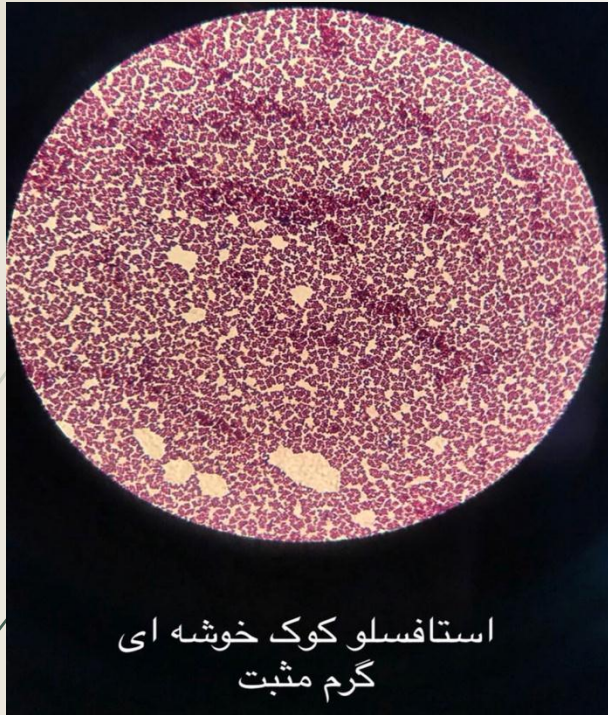
4. What is the name of this Gram stain solution?

How long was this stain left on the slide before being rinsed off?



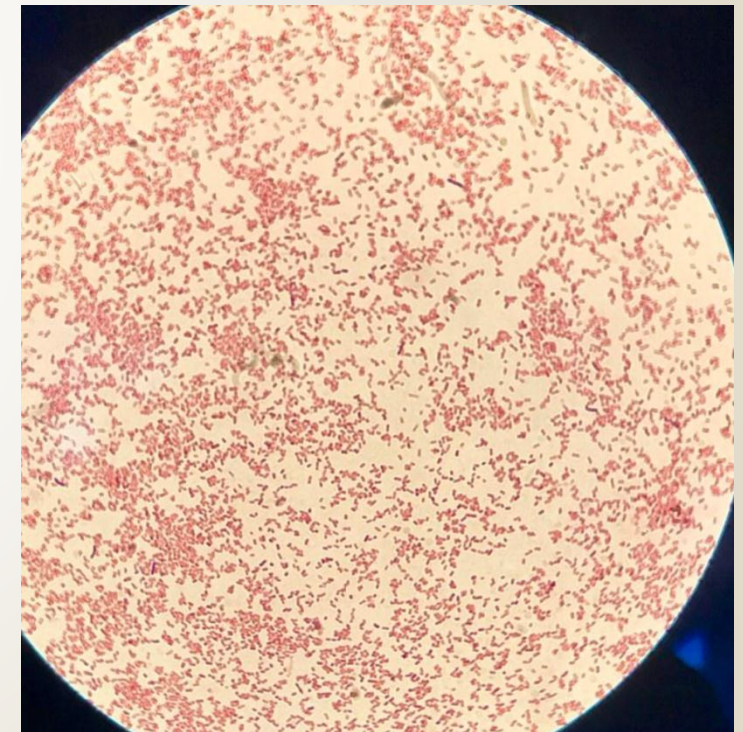
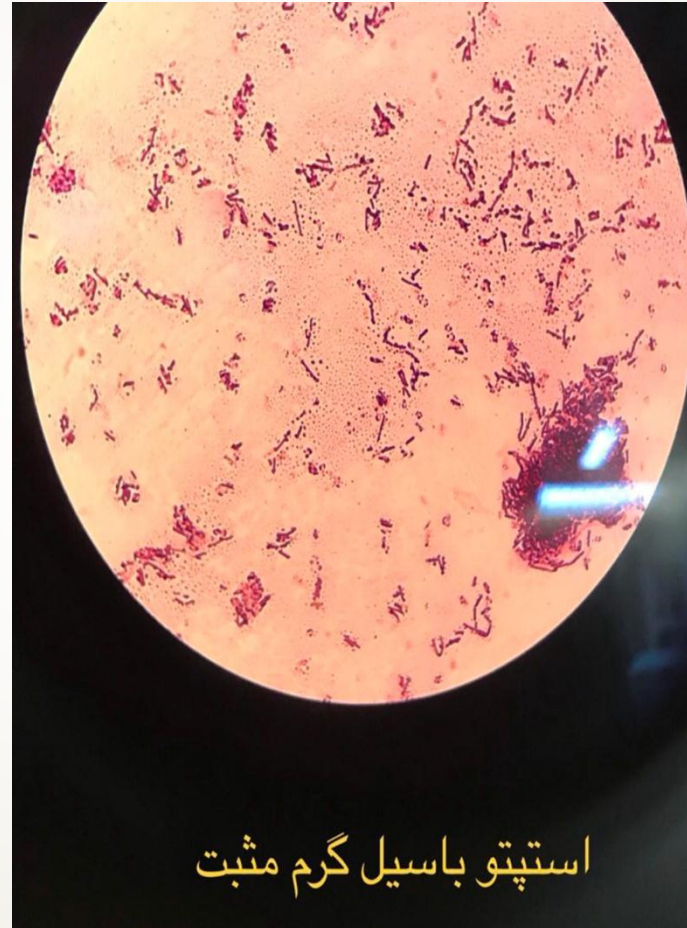
نتیجه

10

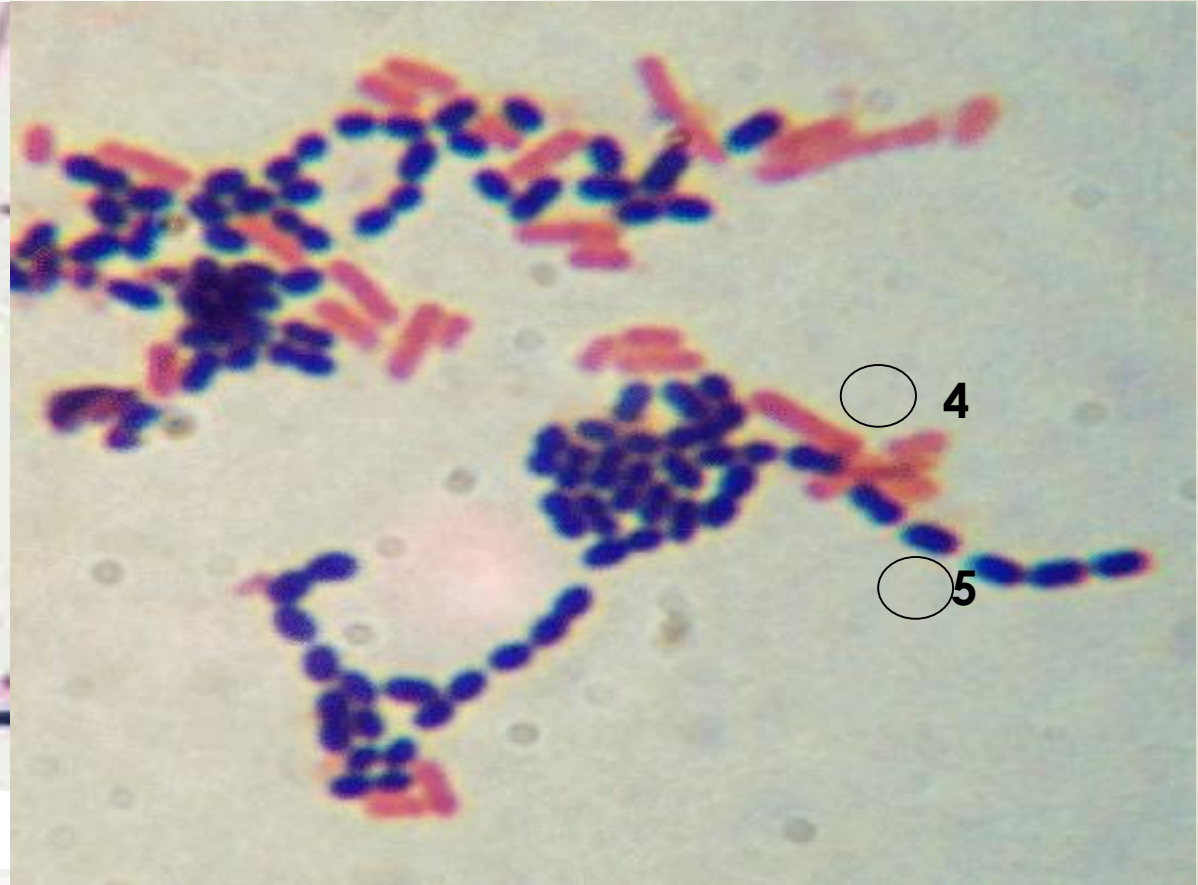


- باکتری ها گرم + بنفش رنگ و باکتری های گرم - قرمز رنگ است.

- کوکوباسیل گرم منفی

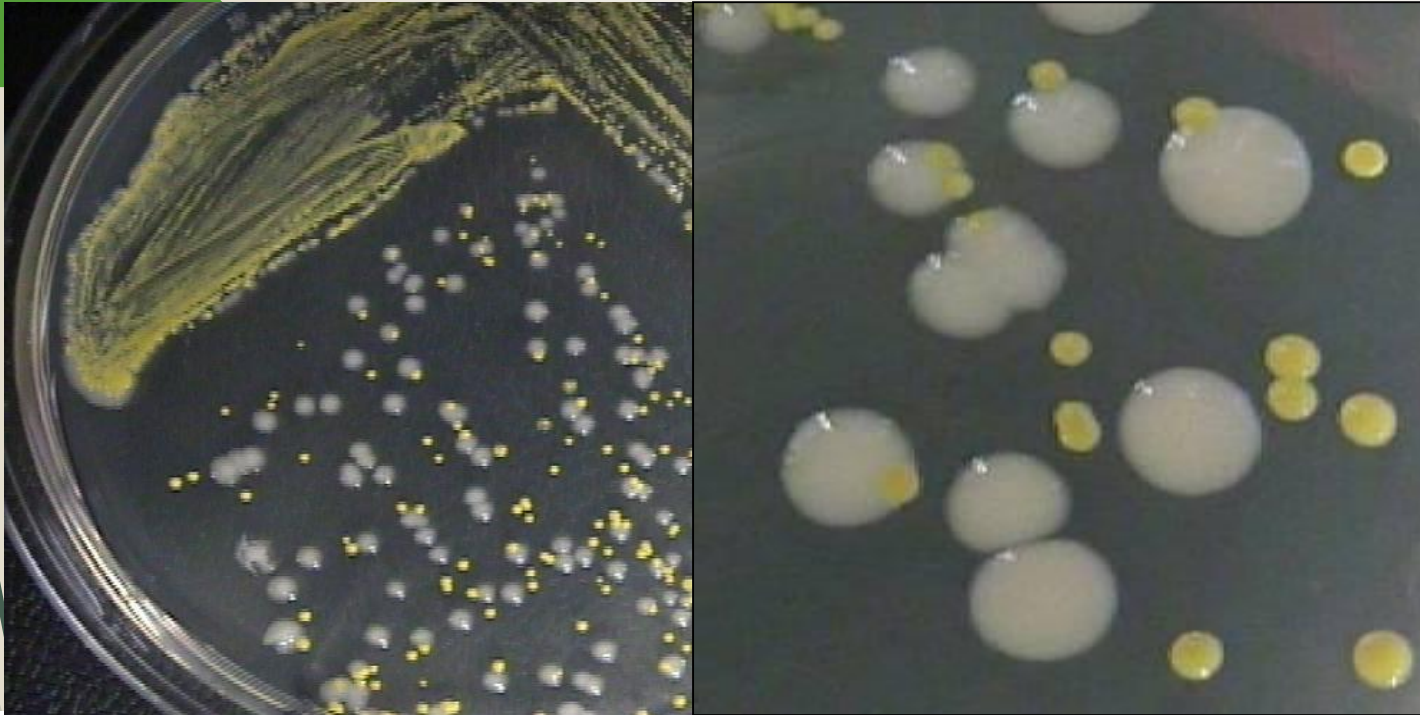


Identify the *Gram-positive* cells and the *Gram-negative* cells in these photographs.

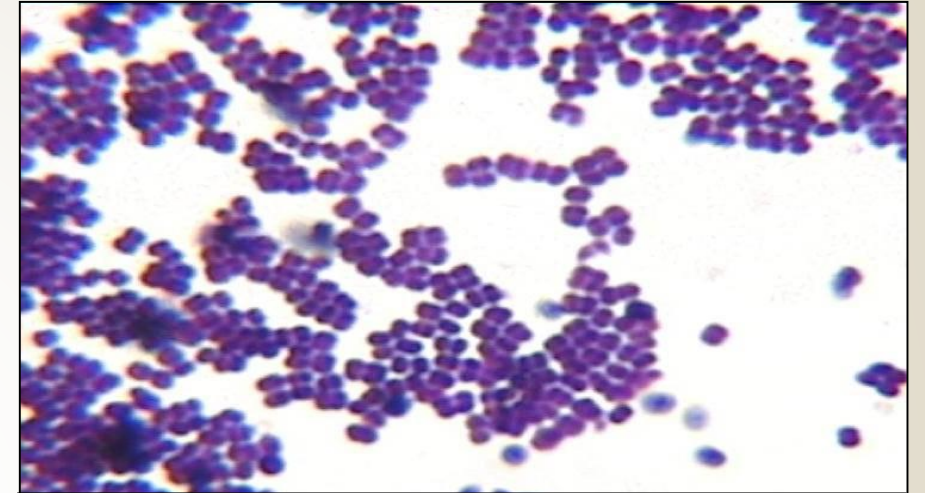


Answers: 1. Gram-negative spirilli 2. Gram-positive bacilli 3. Gram-positive cocci
5. Gram-positive cocci 4. Gram-negative bacilli

Culture A should be composed of these two bacteria

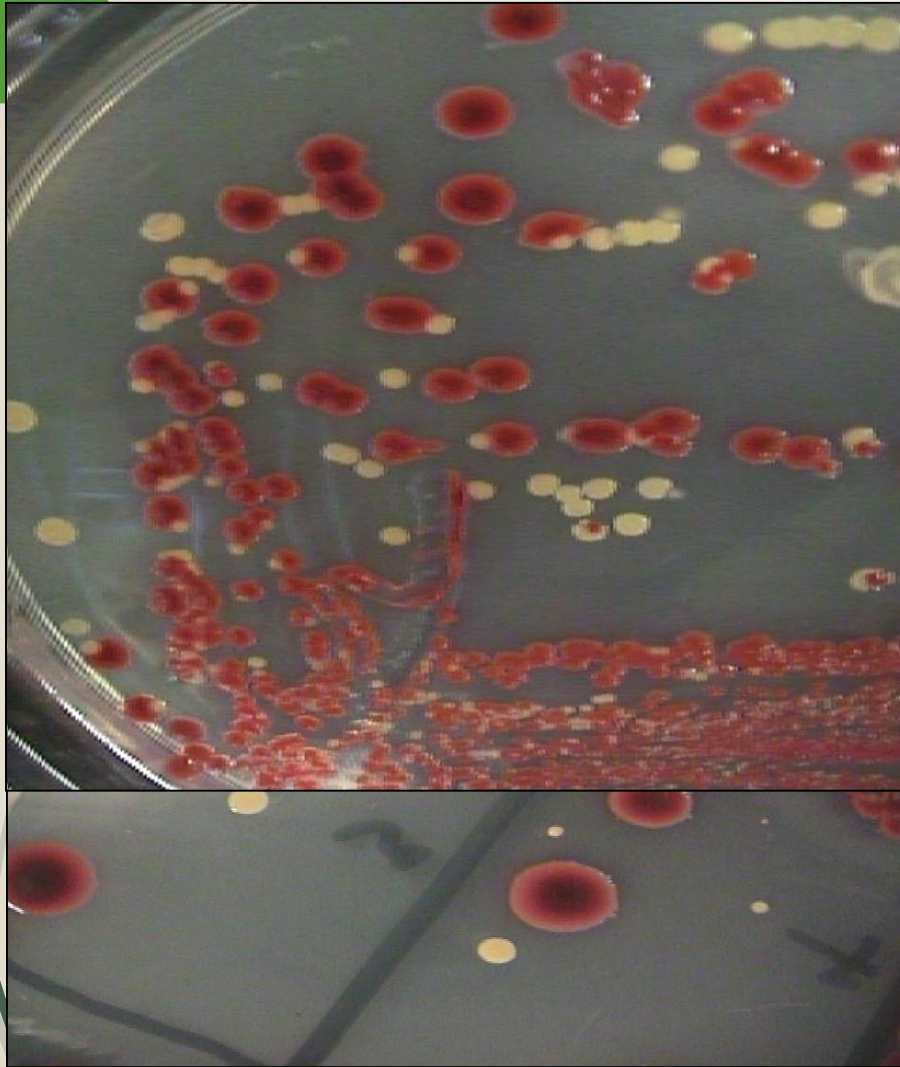


Micrococcus lutea produces tiny **bright yellow** colonies and *Klebsiella pneumoniae* produces larger, mucoid white colonies.

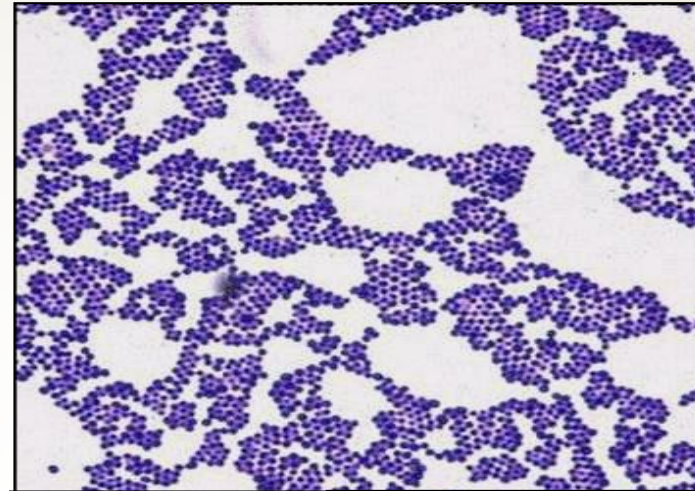


Micrococcus lutea (Gram-positive sarcinae cocci in cuboidal packets of four to eight, stained **purple-violet**) and *Klebsiella pneumoniae* (very small Gram-negative bacilli stained **red-pink**).

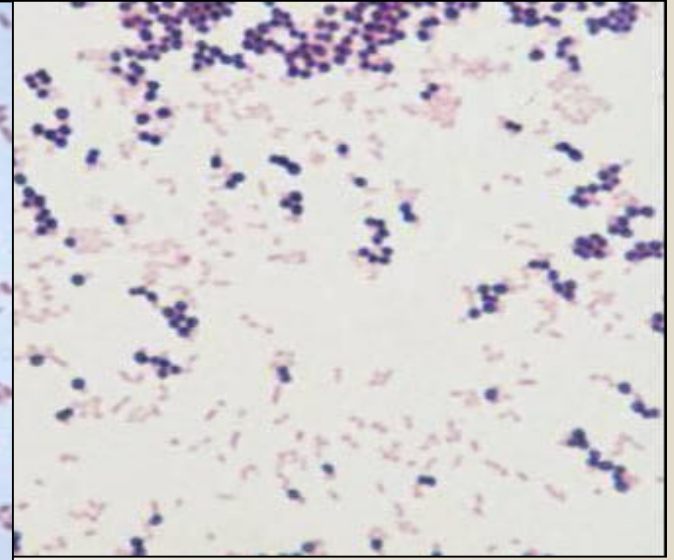
Culture B should be composed of these two bacteria



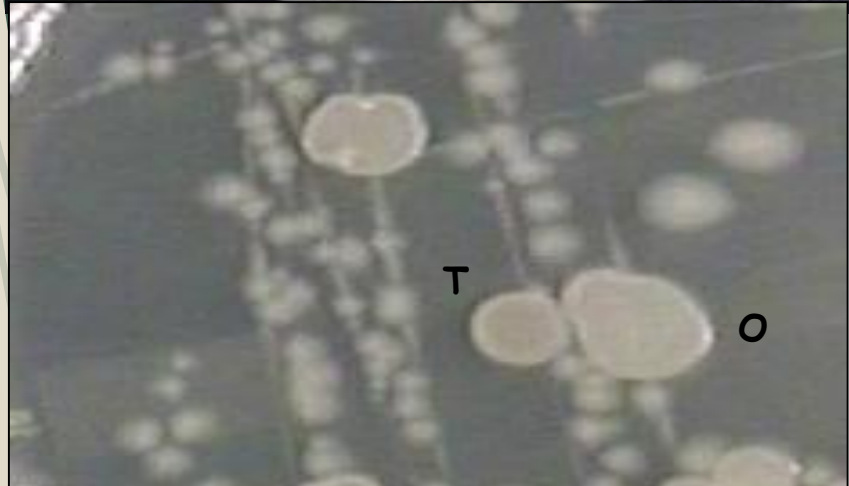
Staphylococcus aureus produces small **pale golden** colonies and *Serratia marcescens* produces larger **reddish** colonies.



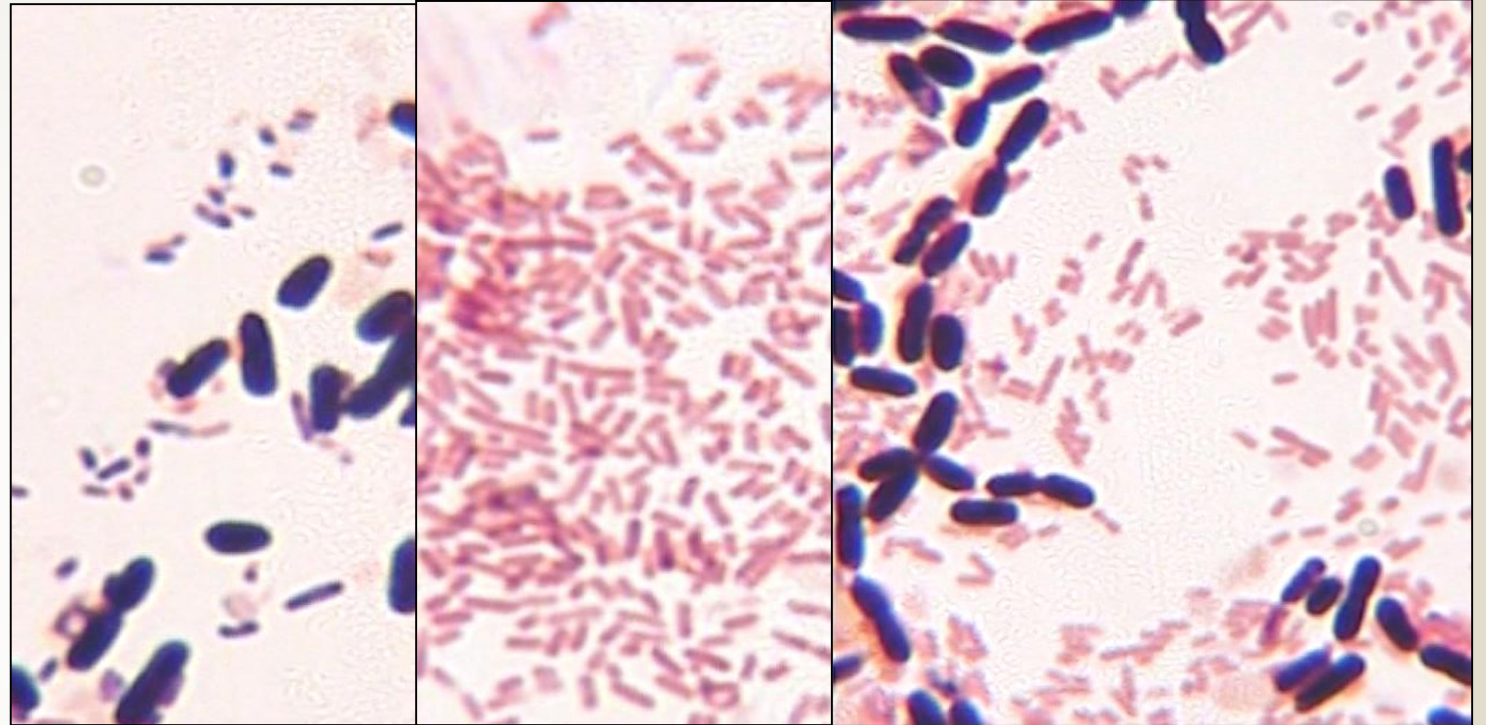
Staphylococcus aureus (irregular clusters of small Gram-positive cocci stained **purple-violet**) and *Serratia marcescens* (very small Gram-negative bacilli stained **red-pink**)



Culture C should be composed of these two bacteria



Escherichia coli produces small irregular translucent (T) white colonies and *Bacillus megaterium* produces larger, more rounded opaque (O) white colonies. These are sometimes difficult to distinguish in room light.

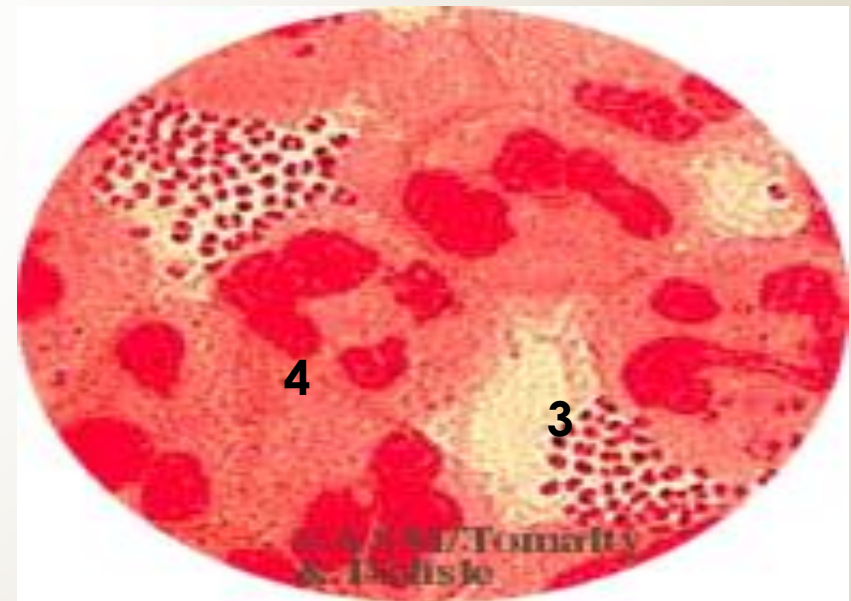
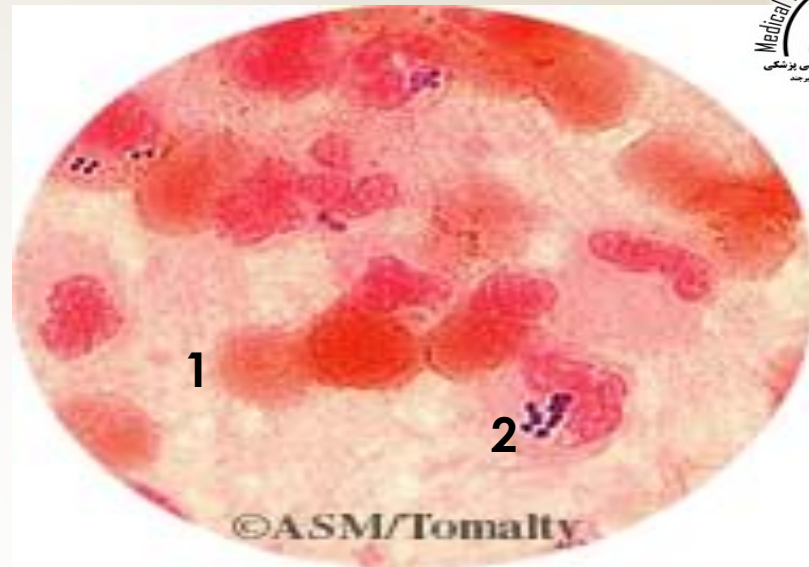


Bacillus megaterium (large, thick Gram-positive bacilli, often with endospores, stained **purple-violet**) and *Escherichia coli* (small Gram-negative bacilli stained **red-pink**).

These photos show a Gram stain of a bacterial infection (x1000).

Distinguish the bacteria and the human cells in each smear.

Which photo (top or bottom) shows Gram-negative bacteria? Are they bacilli or cocci?



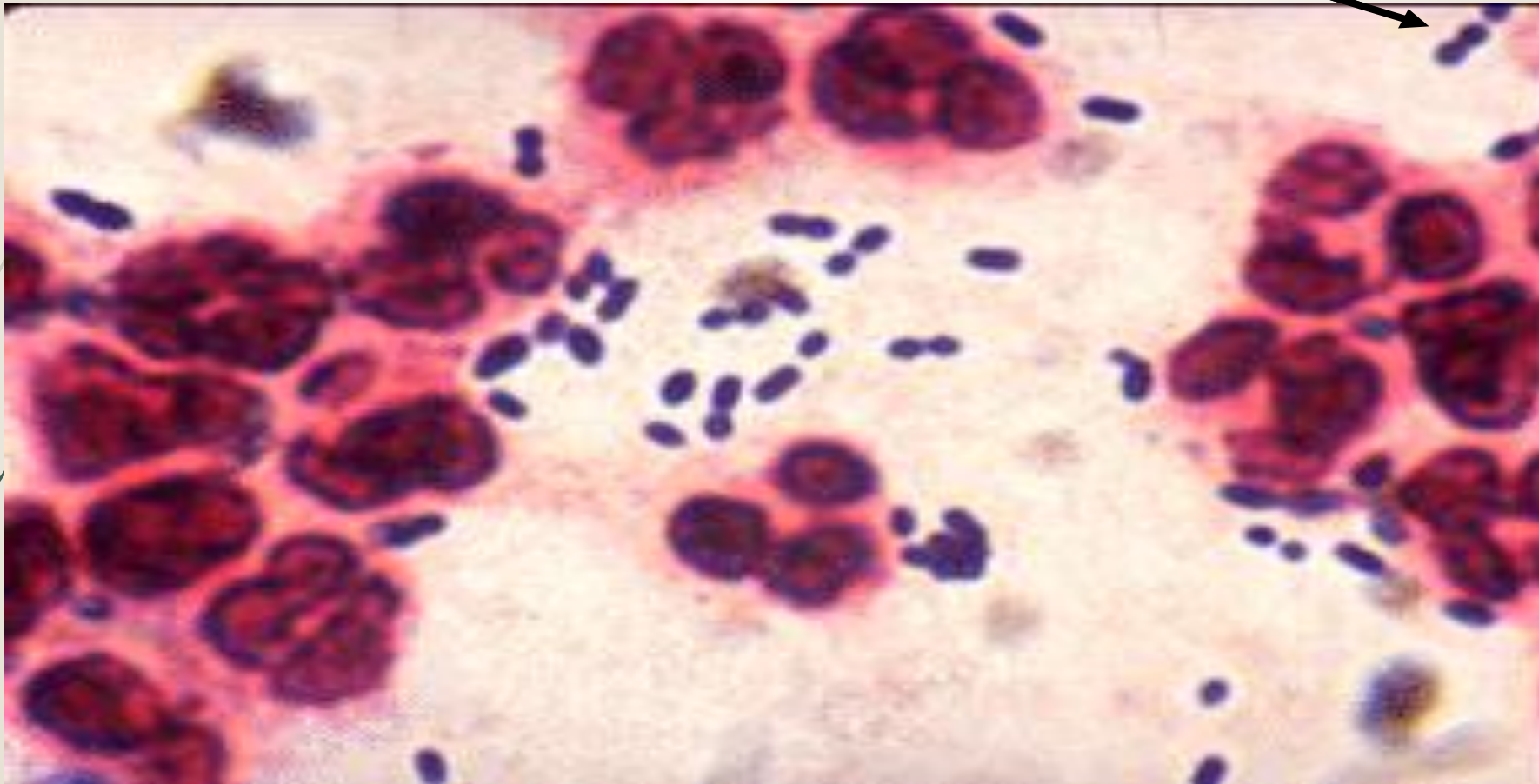
Answers:

1 and 4: Human cells

2 and 3: Bacteria

Gram-negative cocci in bottom photo

What is the *Gram stain reaction*, *cell morphology*, and *cell arrangement* seen here?



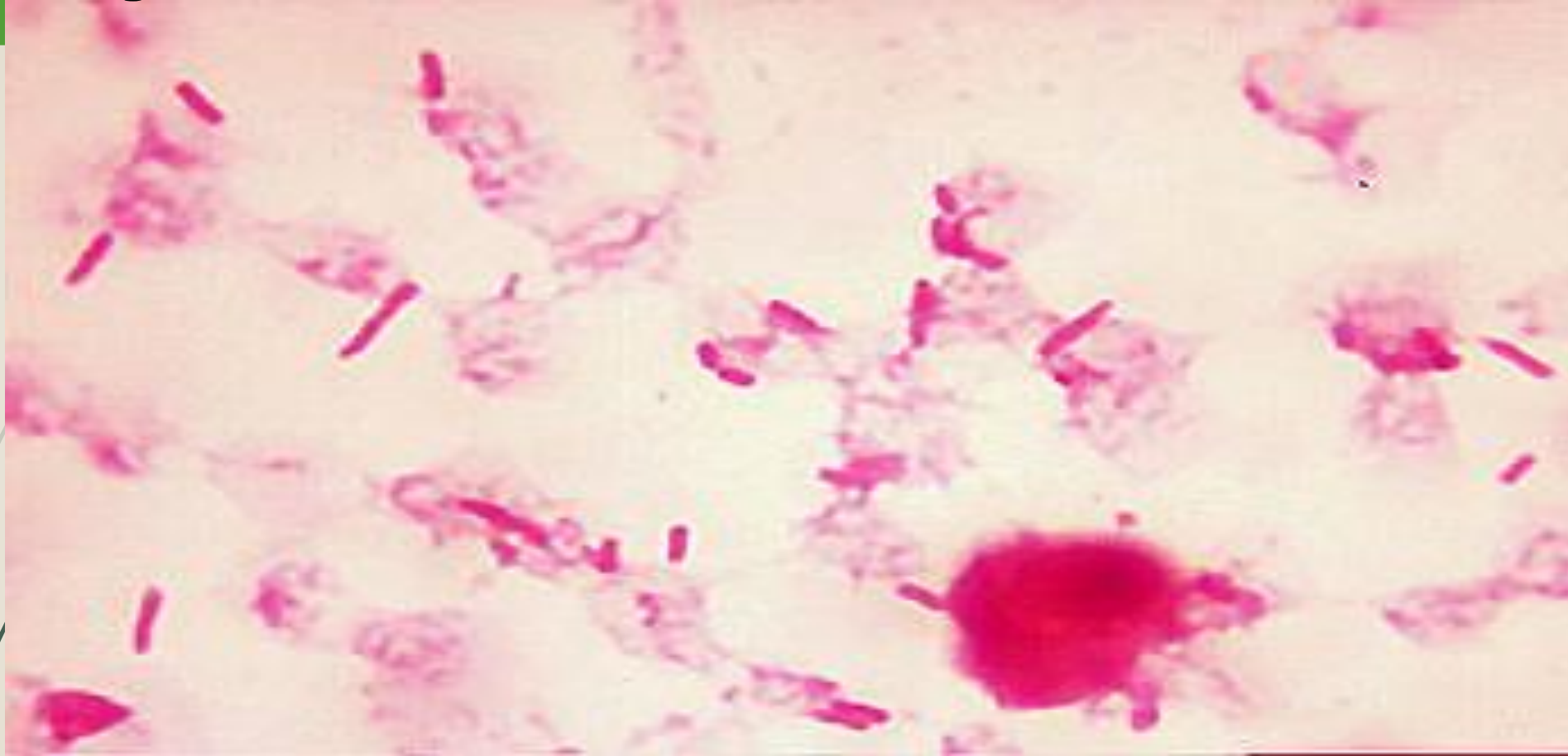
Answer: Gram-positive diplococcus

What is the Gram stain reaction, cell morphology, and cell arrangement seen here?



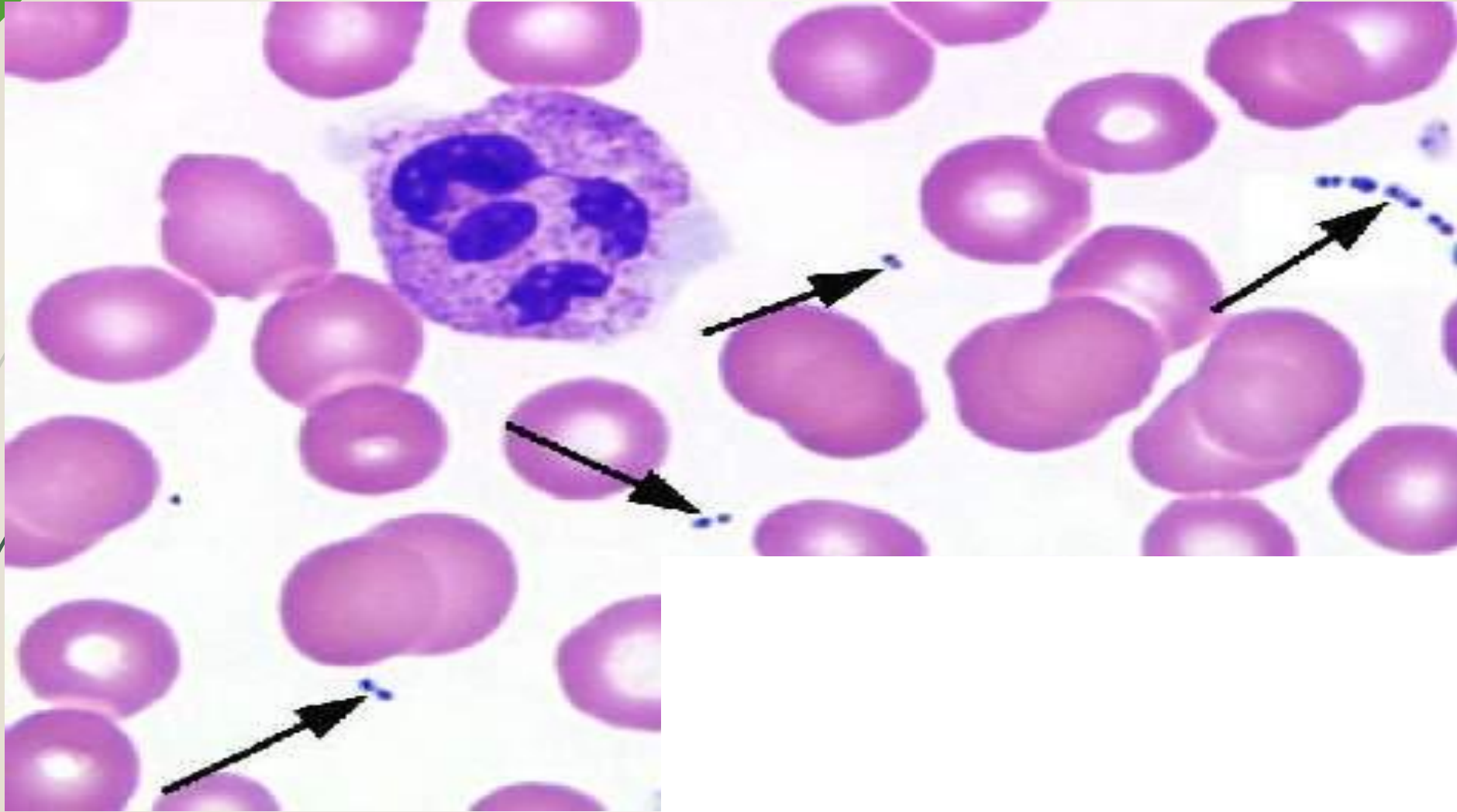
Answer: Gram-positive streptococcus

What is the Gram stain reaction, cell morphology, and cell arrangement seen here?



Answer: Gram-negative bacilli

What is the Gram stain reaction, cell morphology, and cell arrangement seen at the arrows?



Answer: Gram-positive diplococcus

