



Gramfärgning görs med fyra olika lösningar (se bild till vänster). Bilden till höger visar gramnegativa (cerise/röda) stavformade bakterier (bacillus) samt blå runda bakterier (kocker).

Gramfärgning

Bakgrund

Den danske läkaren Christian Gram upptäckte 1884 gramfärgningstekniken. Enligt denna färgningsmetod finns det s.k. grampositiva bakterier och gramnegativa bakterier. Vid gramfärgning fixeras bakterierna först genom att föras genom en eldslåga, därefter färgas dem med kristallviolett, varefter jod-jodkalium tillsätts (Lugols lösning). Cellerna behandlas därefter med alkohol eller aceton, vilket avfärgar de gramnegativa bakterierna medan de grampositiva bakterierna behåller det mörkblå färgkomplexet (kristallviolett). Därefter tillsätts en kontrastfärg, saffranin, som ger de gramnegativa bakterierna en ljusröd färg medan de grampositiva behåller den mörkare färgen.

Hur infärgningsmetoden fungerar är inte helt klarlagd men skillnader i de morfologiska och fysiologiska egenskaperna, såsom skillnader i cellväggs uppbyggnad är troligen avgörande. Gramfärgning har fått stor användning vid klassificering av bakterier.

Uppgift

Du ska färga in några olika bakteriearter och bedöma om dessa är grampositiva eller gramnegativa, samt studera deras form; bacillus (stavar), kocker (runda) eller spirillus (spiralformade).

Säkerhet

- Iakttag god laborativ mikrobiologisk teknik.
- Använd skyddskläder, skyddsglasögon och skyddshandskar.
- Använd endast riskklass 1-organismer.
- Var uppmärksam vid användning av brännare, objektglaset kan bli mycket varmt.
- Kristallviolett (<1% koncentration) är farligt vid förtäring och kan ge ögonskador. Vid stänk spola med vatten. Ämnet är mycket giftigt för vattenorganismer. I högre koncentrationer misstänks kristallviolett kunna orsaka cancer.
- Lugols lösning är skadligt för vattenorganismer. Vid ögon- eller hudkontakt spola med vatten.

- Saffranin irriterar ögon, andningsorgan och hud. Vid ögon- eller hudkontakt spola med vatten.
- Aceton är mycket brandfarligt. Ämnet irriterar ögonen och upprepad kontakt kan ge torr hud eller hudsprickor. Etanol är mycket brandfarligt.

Avfallshantering

Färgämnen sköljs av i en behållare med mycket torkpapper som sedan kastas i brännbart avfall, se nästa sida för exempel. (endast mycket små mängder lösning får spolas i avloppet.) Objektglasen kan kastas i glaskross.

Material

- Objektglas
- Fysiologisk saltlösning, NaCl (0,9%) eller vatten, pipett
- Agarplattor med klass-1-organismer
- Märkpenna
- Trästicker
- 70% spritlösning
- Brännare + tändstickor
- Bägare för uppsamling av trästicker
- Behållare för uppsamling av färglösningar
- Färglösningar för gramfärgning
- Provrörshållare (ser ut som en klädnyppa)
- E.v. kokplatta för att ersätta brännare
- Filtrerpapper
- Mobil/klocka för tidtagning
- Mikroskop och immersionsolja

Utförande

1. Tvätta händerna med tvål och vatten.
2. Torka av bänkytan med 70% spritlösning.
3. Ta fram objektglas. Varje objektglas kan användas till att färga in två olika bakteriearter. Dela in objektglaset i 3 lika stora delar med märkpenan genom att dra ett streck som delar av (den tredje rutan är för att du ska kunna hålla i glaset). Märk glaset vid kanten med respektive bakterie och dina initialer. Rita på baksidan av objektglaset eftersom acetonspriten tar bort markeringen!
4. Lagg en droppe fysiologisk NaCl (eller vatten) i två av rutorna på objektglaset blanda droppen med en liten del av en bakteriekoloni som du tar med en trästicka från plattan. Byt trästicka när du tar en nya bakteriekoloni så att du inte blandar några bakteriearter. Obs, skrapa löst så att du inte får med någon agar!
5. Låt preparatet lufttorka eller för det försiktigt en bit ovanför lågan (ca 15-20

cm), det får inte koka! Håll objektglaset med en provrörshållare så att du inte bränner dig. Som alternativ kan du använda en kokplatta, slå på låg värme och placera objektglaset direkt på plattan. Preparatet måste bli helt torrt och det får inte koka!

6. När objektglaset är helt torrt, fixera bakterierna i lågan genom att föra preparatet c.a. 4-5 gånger genom lågan. Håll objektglaset med en provrörshållare så att du inte bränner dig.

Infärgning

Följande steg ska utföras på en diskbänk eller i dragskåp. Se till att du har en klocka eller tidtagningen med mobilen för varje moment.

7. Placera objektglaset på en ställning över en behållare med papper som fångar upp bortsköljda färgämnen.
8. Droppa på Kristallviolett-lösning på objektglaset och låt ligga i 30 sek.
9. Droppa på Lugols lösning och låt ligga 30 sek.
10. Avfärga med acetonsprit till färgen har försvunnit, droppa rikligt med en pipett.
11. Skölj i rinnande vatten från droppflaska.
12. Efterfärga med Saffranin 10-15 sek.
13. Skölj av med rinnande vatten och torka försiktigt med filterpapper.



Behållare för färglösningar

En ställning där objektglaset kan placeras och samlar upp de färglösningar som används vid gramfärgning, kan enkelt byggas av en plastlåda (här en gammal glasslåda) och ett par glasstavar som tejpas fast i kanten. Objektglaset placeras på glasstavarna. Fyll på med torkpapper som samlar upp färgen då det är mycket viktigt att det inte sköljs ut i avloppet. Torkpappret ska sedan kastas i brännbart avfall.

Mikroskopering

Avläsning av preparaten sker i mikroskop. Börja med att hitta bakterierna med 40x objektivet. När bakterierna syns bra tillsätts 1 droppe immersionsolja och fäll in 100x objektivet över preparatet. Finjustera inställningen. Obs! Immersionsoljan får endast användas till 100x objektivet. Rengör mikroskopet noga med sprit efter användning så att ingen olja finns kvar.

1. Bestäm gramfärg:

Grampositiva bakterier = mörkviolett/blå

Gramnegativa bakterier = cerise/röd

2. Bestäm bakteriernas form och fyll i tabellen på nästa sida.

Resultat

Preparat/bakterie	Grampositiv eller gramnegativ	Form (stav, rund eller spiralformad)

KOCKER

Kock



Diplokokker



Streptokokker



Stafylokokker



BACILLER

Bacill



Diplobaciller



Streptobaciller



Unga celler

För att graminfärgningen ska bli korrekt bör man titta på celler som är under tillväxt, eftersom äldre celler kan ge en gramnegativ färgreaktion. Använd därför bakterier som odlats på agarplatta cirka ett dygn.

Färgreaktionen är inte absolut, det finns bakterier som är på gränsen mellan positiv och negativ reaktion.

Tips!

Se ett kort animerat klipp som visar hur gramfärgning går till: <https://www.youtube.com/watch?v=AZS2wb7pMo4>

På Bioresurs webbplats hittar du instruktioner som beskriver mikrobiologiska arbetsmetoder; samt säkerhetsanvisningar för laborationer med mikroorganismer. Här finns även ett faktablad som beskriver några vanliga bakteriearter som kan användas som stöd till gramfärgningen, <https://bioresurs.uu.se>, välj Resurser och Mikrobiologi.