

Metoda: Barvení dle Grama

Kateřina Pacandová, ZL 2. ročník

Školitelé: Mgr. Monika Kouhoutová

Princip: Gramovo barvení je základní a jednoduchá barvicí technika, využívaná zejména v mikrobiologických laboratořích. Jejím hlavním cílem je rozdělení bakterií na tzv. gram pozitivní a gram negativní. Do těchto skupin se bakterie řadí v závislosti na stavbě své buněčné stěny. Grampozitivní bakterie mají ve stěně tlustou vrstvu peptidoglykanu a polysacharidy, tyto vrstvy brání vymytí modrého komplexu krystalové violeti a Lugolova roztoku alkoholem. Zatímco v gramnegativní bakterie mají jen tenkou vrstvu peptidoglykanu a lipopolysacharidy krystalová violeť se alkoholem vymyje a dále se preparát dobarvujeme karbolfuchsinem nebo safraninem

Postup:

1. preparát (nátěr vzorku necháme na vzduchu oschnout, fixujeme plamenem kahanu 3x protáhneme)
2. na preparát kápneme roztok krystalové violeti a necháme působit cca 20 sekund
3. bez opláchnutí přikápneme Lugolův roztok a necháme působit 20 - 30 sekund
4. odbarvujeme acetonem - lijeme opatrně na zešíkmené sklíčko nad nátěr, přes preparát necháváme volně stékat do odtékání barvy, maximálně však 20 sekund
5. opláchneme destilovanou vodou stejně opatrně jako při odbarvování
6. dobarvíme zředěným karbolfuchsinem (nebo safraninem) 30 - 60 sekund
7. opláchneme vodou a usušíme vložením mezi dva filtrační papíry

Uplatnění metody: Metoda se uplatňuje v rozlišování bakterií v mikrobiologické laboratoři

Úskalí metody: Nejprve se vždy musíme ujistit, zda námi používané chemikálie nejsou po datu expirace, v takovém případě je nemůžeme použít, protože nelze zaručit jejich správnou reakci. Důležité je také dodržení časů působnosti jednotlivých barvicích roztoků. Dále není žádoucí, aby námi použité kultury byly staré, v takovém případě mohou být gramlabilní tzn. Barví se pouze částečně různými barvami.

Přístrojové vybavení: Pro provedení Gramova barvení je potřebný pouze kahan k fixaci řezu. Dále z technických pomůcek: používáme podložní sklíčka k bakteriálnímu nánosu, který provádíme za pomoci vatové výtěrové tyčinky. Filtrační papír, do kterého pokládáme obarvená sklíčka (z důvodu vysušení). Potřebné chemikálie: krystalová violeť, Lugolův roztok, alkohol a nakonec dle dostupnosti využíváme buď karbolfuchsin nebo safranin.

Odběr a transport: Gramovo barvení využíváme zejména v mikrobiologických laboratořích, tudíž využít lze širokou škálu bakterií, přičemž každá má jiné nároky na odběr i transport. Existují i výjimky, které tímto barvením nelze znázornit jedná se například o mykobakterie, které mají vysoce hydrofobní stěnu a barviva přijímají obtížně. Materiál odebíráme většinou vatovou výtěrovou tyčinkou, jedná – li se o

výtěr z tělní dutiny či rány, dále se může jednat o moč, krev, stolici nebo punktáty. Transport do laboratoře by měl proběhnout v co nejkratším možném čase. Atmosféra a teplota při transportu záleží na typu odebraného materiálu.