

Barwienie met. Grama



Zastosowanie:

Barwienie metodą Grama służy do różnicowania bakterii na gram – dodatnie i gram – ujemne. Ściana komórkowa bakterii gram dodatnich składa się z 40 warstw mureiny, co stanowi około połowę jej suchej masy. W organizmach tych ścianę komórkową można zniszczyć za pomocą lizozymu – enzymu występującego w łzach i ślinie. Ściana komórkowa bakterii gram ujemnych składa się z 2-3 warstw mureiny, organizmy te są odporne na działanie lizozymu.

Mechanizm barwienia:

Pierwszy etap barwienia polega na barwieniu fioletem krystalicznym. Jest to zasadowy barwnik, łączący się m.in. z kwasami nukleinowymi. Łatwo penetruje ścianę komórkową, barwiąc bakterie zarówno gram +, jak i gram- na kolor granatowy.

Kolejnym etapem barwienia jest bejcowanie jodem, zawartym w płynie Lugola. Jod tworzy z fioletem krystalicznym związki kompleksowe o dużych rozmiarach i masie cząsteczkowej, również koloru granatowego.

W momencie naniesienia odbarwiacza następuje zagęszczenie sieci mureiny w ścianach komórkowych, a ponadto wypłukanie błony lipopolisacharydowej w bakteriach gram -. W wyniku tego kompleks fioletu z jodem nie może się przedostać przez wielowarstwową i zagęszczoną sieć w ścianie komórkowej bakterii gram + i pozostają one zabarwione. 2-3 warstwowa ściana komórkowa w bakteriach gram ujemnych nie stanowi dla tego kompleksu dużej przeszkody, zostaje on łatwo wypłukany i bakteria jest odbarwiona.

Ostatnim etapem jest podbarwienie odbarwionych bakterii barwnikiem kontrastowym (safraniną, fuksyną karbolową, rzadziej czerwienią obojętną). Bakterie gram ujemne są zabarwione na czerwono, przez co są łatwo odróżniane od ciemnoniebieskich bakterii gram+

Sposób użycia:

1. Utrwalić preparat termicznie (przez 3-krotne przeciągnięcie szkiełkiem nad płomieniem palnika) lub chemicznie.
2. Na utrwalony rozmaz nanieść kilka kropli fioletu krystalicznego. Barwić 1 – 3 minuty.
3. Splukać fiolet krystaliczny wodą i nakropić płyn Lugola. Pozostawić na 1 – 2 minuty.
4. Splukać płyn Lugola wodą i na pochylone szkiełko, kroplami nanosić odbarwiacz, do momentu aż ze szkiełka zaczną spływać bezbarwne krople odczynnika.
5. Splukać preparat wodą i podbarwić fuksyną karbolową, lub safraniną O przez 0,5 – 1 minuty.
6. Splukać preparat wodą i pozostawić do wyschnięcia. Oceny preparatu dokonywać pod immersją.

Wyniki: Bakterie gram dodatnie : ciemnoniebieskie
Bakterie gram ujemne : czerwone

Możliwe źródła błędów: Niektóre bakterie gram dodatnie, mogą się barwić na czerwono. Przyczyn może być wiele: zbyt stara hodowla, ubogie podłoże, zbyt długie utrwalanie w płomieniu palnika, zbyt długie odbarwianie.