



# Färgmetoder - Gramfärgning

Inledning	<p>Metoden har fått sitt namn efter dansken Christian Gram. Han upptäckte metoden av en slump då han utarbetade färgningsmetoder. Han behandlade bakterier med en gentianaviolett-lösning och därefter en jod-kaliumjodidlösning (Lugols lösning). Vid avfärgning med etanol försvann all färg från vissa bakterier (gramnegativa) men blev kvar hos vissa (grampositiva). Gram fann att man även kunde kontrastfärga bakterier med kristallviolett. Denna infärgning används som en av de första metoder för att identifiera bakterier. Alla bakterier färgas av Lugols lösning. Vid färgningen bildas ett komplex mellan färgämnet och jod inuti cellväggen. Hos grampositiva bakterier, med mycket tjock och tät cellvägg, hålls färgkomplexet kvar medan den tunnare och porösare gramnegativa cellväggen lättare kan tvättas ut med etanol.</p>
Material	<p>Kristallviolett, Lugols, aceton-alkohol, saffraninlösning i fyra olika droppflaskor</p> <p>Bakterier: Bacillus subtilis (grampositiva), Echerichia coli (gramnegativa) och Ev. okänd bakterie</p>
Riskbedömning	<p>Vid mikrobiologiskt arbete se säkerhetsföreskrifter!</p> <p><i>En fullständig riskbedömning ges av undervisande läraren.</i></p>
Utförande	<p>Det kan vara lämpligt att testa sin okända bakterie mot referensbakterierna på samma objektglas. Lägg den okända i mitten och en grampositiv och en gramnegativ på var sin sida.</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. En liten droppe vatten placeras mitt på ett rent objektglas.</li><li>2. Ta <u>lite</u> bakteriemassa med en platinäögla och suspendera (lös upp) i vattendroppen.</li><li>3. Lufttorka preparatet i 37-50 °C</li><li>4. Fixera preparatet genom att föra objektglaset, med bakteriesidan uppåt, försiktigt 4-5 gånger genom brännarens sparlåga.</li><li>5. Täck bakterierna med kristallviolett och låt verka 1 minut.</li><li>6. Skölj försiktigt bort färgen med Lugols lösning.</li><li>7. Täck bakterierna med mera Lugols lösning och låt verka i 1 minut. Håll av lösningen.</li><li>8. Avfärga i aceton-alkohol tills ingen blå färg längre löser sig. Det kan ta ca 20-60 sekunder.</li><li>9. Skölj försiktigt i vatten i ca 5 sekunder.</li><li>10. Täck bakterierna med saffranin. Låt verka i 1 minut.</li><li>11. Skölj försiktigt i vatten ca 5 sekunder. Låt lufttorka.</li><li>12. Undersök i mikroskop</li></ol> <p><i>Gramnegativa</i> bakterier förblir blåvioletta och grampositiva blir rosa till röda.</p>

## Till läraren

### Underlag för riskbedömning

Köp kristall violett färdig i lösning!

Kristall violett, 0,25% lösning: Fara Miljöskadligt, H350 Kan orsaka cancer. P201, P202, P280, P308+P313, P405

Etanol: Brandfara, Fara, H225, H319 och P210, P280, P305+P351+P338, P403+P233

Ammoniumoxalatlösning, 1%: ej märkespliktig

Jod, <25%: ej märkespliktig

Kaliumjodid: Fara, Hälsofara, H372 Orsakar organskador genom lång eller upprepad exponering. P260, P264, P270, P314, P501

Lugols lösning för gramfärgning: ej märkespliktigt

Aceton: Fara Brandfara, Skadlig, , EUH066 Upprepad kontakt kan ge torr hud eller hudsprickor. H225 Mycket brandfarlig vätska och ånga. H319 Orsakar allvarlig ögonirritation. H336 Kan göra att man blir dåsig eller omtöcknad. P210, P233, P240, P241, P242, P243, P261, P264, P271, P280, P304+P340, P312, P337+P313, P370+P378, P403+P233, P403+P235, P405, P501

Safranin, 0,25% lösning; ej märkespliktigt

### Recept för reagens till Gramfärgning

#### Stamlösning kristallviolett

Gentianaviolett eller kristallviolett	15 g
96 % alkohol	300 cm <sup>3</sup>

#### Kristallviolettlösning

Stamlösning	10 cm <sup>3</sup>
Destillerat vatten	40 cm <sup>3</sup>
1 % ammoniumoxalatlösning	50 cm <sup>3</sup>

FILTRERAS

#### Jodjodkaliumlösning enligt Lugol till Gramfärgning

Jod	1 g
Kaliumjodid	2 g
Destillerat vatten	300 cm <sup>3</sup>

#### Acetonsprit

Aceton	20 cm <sup>3</sup>
96 % alkohol	80 cm <sup>3</sup>

#### Safraninlösning

Safranin 0,25g/10 ml 95% sprit	10 cm <sup>3</sup>
Destillerat vatten	90 cm <sup>3</sup>