

Gramovo barvení bakterií

Cíl, teorie:

- a) seznámit s nejpoužívanější technikou barvení bakterií
- b) seznámit s použitím klasického taxonomického dělení bakterií na gramnegativní a grampozitivní bakterie – morfologická analýza

Buněčná stěna bakterií je důležitá povrchová struktura prokaryotní buňky. Stěna zajišťuje **tvar** bakterií a umožňuje jim přežití v **hypotonickém prostředí**.

Podle techniky Gramova barvení podle stavby buněčné stěny rozlišujeme bakterie grampozitivní (G+), gramnegativní (G-), bakterie bez buněčné stěny a bakterie s porušenou buněčnou stěnou. Bakteriální buněčné stěny obsahují **peptidoglykan (murein)**, který patří mezi polymery. Gramovo barvení, jedna z nejpoužívanějších technik barvení bakterií v mikrobiologii. Technika je pojmenována podle dánského bakteriologa Hanse Christiana Grama. Metoda je určena k rozlišení bakteriálních druhů do dvou hlavních skupin podle chemických a fyzikálních vlastností jejich buněčné stěny.

Jako pomůcka pro zapamatování po sobě jdoucích barviv a kroků slouží slova VLAK nebo VLAS, jednotlivá písmena označují použité barvicí roztoky – V (krystalová violet), L (Lugolův roztok), A (alkohol - ethanol nebo aceton), K (karbolfuchsin) nebo S (safranin).

Začínáme aplikací prvního barviva, krystalové violeti, na fixovaný vzorek bakteriální kultury. Po oplachu se následně přidá Lugolův roztok jódu, který působí jako mořidlo. Poté se vzorek ošetří acetonem/ethanolem, který funguje jako odbarvovač. Role acetonu/etanolu je velmi důležitá, protože určuje konečné zbarvení bakterií. Grampozitivní bakterie mají poměrně silnou vrstvu peptidoglykanu a proto krystalovou violet zůstává v buněčné stěně, výsledkem je modrofialový vzhled. Naproti tomu gramnegativní bakterie mají tenkou peptidoglykanovou vrstvu a po působení ethanolu dochází k vymytí krystalové violeti. Proto je třeba následně použít další barvivo, safranin nebo karbolfuchsin, čímž se gramnegativní bakterie zbarví do růžova nebo červena.

Gramovo barvení může být ovlivněno fyziologickým stavem buněk, stářím buněčné kultury a složením kultivačního média. Proto v určitých případech můžeme mluvit o tzv. gramlabilitě. Pro barvení se využívají čerstvě narostlé bakterie. Buňky totiž mohou ztratit svoji grampozitivitu např. mechanickým poškozením, UV zářením, působením kyselin, zásad či rozpouštědel.

Vlastní pracovní postup byl inovován na základě praktických zkušeností z laboratorních cvičení v minulých letech, zejména zkrácením doby barvení.

Materiál a přístrojové vybavení:

Bakteriální kultury různých druhů bakterií ze skupiny hodnocené jako BSL 1, které se vyskytují v běžně v životním prostředí – *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, laktobacily, *Streptococcus thermophilus* apod., optický mikroskop, preparační souprava, podložní sklička, imerzní olej,

pipety, destilovaná voda, roztok krystalové violeti, Lugolův roztok, safranin, ethanol, kádinky, pracovní rukavice.

Vlastní pracovní postup

- a) Na čisté podložní sklíčko naneste do kapky sterilní destilované vody bakteriální kulturu a vytvoříme bakteriální suspenzi. Necháme dobře zaschnout!!
- b) Provedte fixaci preparátu, tzn. preparát 3x po sobě protáhnete plamenem kahanu. Po vychladnutí provádíme barvení.
- c) Preparát barvíme 20–50 sekund roztokem krystalové violeti (modrá barva).
- d) Převrstvíme na 20-50 sekund Lugolovým roztokem.
- e) Převrstvíme etanolem nebo acetonem max. 10-15 sekund, odtéká fialový roztok. (Odbarvujeme jen gramnegativní bakterie, grampozitivní zůstávají modré!).
- f) Důkladně opláchneme destilovanou vodou.
- g) Barvíme 30-60 sekund roztokem karbolfuchsinu nebo safraninu. (Obarvujeme gramnegativní bakterie na červeně).
- h) Osušíme filtračním papírem a pozorujeme imerzním objektivem.
- i) Podle zbarvení preparátu zjistíme, jestli předložená kultura obsahuje G^+ nebo G^- bakterie.

Získané výsledky a vyhodnocení

Do protokolu velmi pečlivě popíšeme čas barvení v jednotlivých krocích u jednotlivých preparátů, dobu oplachování preparátů a výsledek barvení.

Popíšeme případné časové a další odchylky, ke kterým došlo v průběhu vlastní práce.

Diskuse a závěr

Zjistíme, s jakými výsledky se setkali další studenti ve skupině, provedeme diskusi.