

Gramfärgning

Senast uppdaterad: 2023-10-05

Inledning

Dansken Christian Gram (1853–1938) upptäckte färgningsmetoden "gramfärgning" av en slump. Han behandlade bakterier med en gentianaviolettlösning och därefter med en jod-kaliumjodidlösning (Lugols lösning). Vid tvättning med etanol försvann all färg från vissa bakterier (gramnegativa) men inte från grampositiva bakterier. Gram hade upptäckt en metod för att kunna skilja mellan dessa två bakteriegrupper. Dessutom fann han att man kunde använda färgpigmentet kristallviolett för att ge bakterier en kontrastfärg. I denna laboration används Grams metoder för att identifiera grampositiva och gramnegativa bakterier.

Material

Bakteriemassa (eventuellt från agarplatta). Grampositiv bakterie; exempelvis Bacillus, gramnegativ bakterie; exempelvis Echerichia coli, en okänd (ofarlig) bakterie. Lösningar i droppflaskor med kristallviolett, Lugols lösning, acetonsprit, safranin. Rena objektglas, platinaögla, pipetter (1–3 ml), två 1000 ml bägare (vatten och slask), värmeugn (37–50°C), brännare, etanol för sterilteknik samt mikroskop.

Utförande

En säkerhetsgenomgång av laborationen diskuteras inledningsvis.

1. Starta med att en liten droppe vatten placeras mitt på ett rent objektglas.
2. Tag lite bakteriemassa med en platinaögla och suspendera (lös upp) i droppen.
3. Lufttorka preparatet i värmeugn med temperaturen 37–50°C, cirka 5–10 minuter.
4. Fixera preparatet genom att föra objektglaset, med bakteriesidan uppåt, försiktigt 4–5 gånger genom brännarens sparlåga.
5. Täck bakterierna med kristallviolett och låt verka 1 minut.
6. Skölj försiktigt bort färgen med Lugols lösning.
7. Täck bakterierna med mera Lugols lösning och låt verka i 1 minut. Häll av lösningen.
8. Avfärga med acetonsprit tills ingen blå färg längre syns med blotta ögat. Det tar cirka 20–60 sekunder.
9. Skölj försiktigt i vatten i cirka fem sekunder.
10. Täck bakterierna med safranin. Låt verka i en minut.
11. Skölj försiktigt i vatten cirka fem sekunder. Låt lufttorka.
12. Undersök i mikroskop.

Övrigt

Vilka egenskaper hade din okända bakterie?

Rita av ditt resultat och skriv ner dina observationer.

Till läraren

Målgrupp: [7–9, Gy]

Teori

Alla bakterier färgas av Lugols lösning. Vid färgningen bildas ett komplex mellan färgämnet och jod som finns 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. Grampositiva bakterier förblir därför blåvioletta medan de gramnegativa färgas rosa till röda.

Tips

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.

Exempel på ”okänd bakterie” kan vara:

- Lactobacillus acidophilus (gram +)
- Micrococcus luteus (gram +)
- Arkéer, t.ex. Halobacterium sp (gram –)
- Cyanobakterier t ex Spirulina sp, Nostoc sp (gram)

KRC rekommenderar att skolan köper in färdigblandade lösningar. Om man ska utgå från fast pulver och själv bereda lösningarna gäller särskilt riskbedömningsunderlag. Se RB Lärare.

Recept för reagenslösningar

Stamlösning kristallviolett

kristallviolett	5 gram
96 % alkohol	100 cm ³

Kristallviolettlösning

Stamlösning	10 cm ³
Destillerat vatten	40 cm ³
1 % ammoniumoxalatlösning	50 cm ³

FILTRERAS

Jodjodkaliumlösning enligt Lugol till Gramfärgning

Jod	1 g
Kaliumjodid	2 g
Destillerat vatten	300 cm ³

Acetonsprit

Aceton	20 cm ³
96 % etanol	80 cm ³

Safraninlösning

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

Övrigt


KRC's systerorganisation Bioresurscentrum har tagit fram ett dokument; Säkerhetsanvisningar-for laborationer-med-mikroorganismer-samt-GMM. I det finns nyttig information om arbete i skolan med exempelvis bakterier. Dokumentet kan laddas ned från adressen:

<https://bioresurs.uu.se/wp-content/uploads/2022/08/Sakerhetsanvisningar-for-laborationer-med-mikroorganismer-samt-GMM.pdf>

Underlag för riskbedömning – Gramfärgning

En anpassning av riskbedömningen görs på arbetsplatsen.





Elever




Kemikalie	Faropiktogram och faroangivelser	Om något händer
Kristallviolett, 0,5 % i etanol	 H225 Mycket brandfarlig vätska och ånga. H319 Orsakar allvarlig ögonirritation	Vid mindre spill: Torka upp med papper.
Lugols lösning (jod-kaliumjodid-lösning)	Ej märkningspliktig	
Safranin (aq)	Ej märkningspliktig	
Aceton-etanol (l)	 H225 Mycket brandfarlig vätska och ånga. H319 Orsakar allvarlig ögonirritation. H336 Kan göra att man blir dåsig eller omtöcknad.	

Förebyggande åtgärder	<p>I laborationen enbart används små mängder (droppar) av utspädda kemikalielösningar. Köp om möjligt in färdigspädda lösningar av kristallviolett och jod-jodidjon-lösning.</p> <p>Vi beredning från fast pulver gäller att kristallviolett klassas som CMR-ämne och jod i fast form är ett riskminskningsämne. Se riskbedömningsunderlag på nästa sida.</p>
------------------------------	---

Datum	2023-10-05	Utförd av	KRC	Klass	
--------------	------------	------------------	-----	--------------	--

Riskbedömning (RB) Lärare: Vid beredning av lösningar från pulver

Kemikalie	Faropiktogram och faroangivelser	Om något händer
Kristallviolett (fast pulver)	 <p>H312 Skadligt vid förtäring. H318 Orsakar allvarliga ögonskador. H351 Misstänks kunna orsaka cancer. H410 Mycket skadligt för vattenlevande organismer</p>	<p>Allt arbete måste ske i dragskåp. Undvik att andas in damm. Vid invägning ska dragskåpet vara avstängt för att undvika damm.</p> <p>Använd skyddshandskar och ögonskydd.</p> <p>Vid kontakt med ögon: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja. Vid exponering eller misstanke om exponering: Sök läkarhjälp.</p>
Etanol	 <p>H225 Mycket brandfarlig vätska och ånga. H319 Orsakar allvarlig ögonirritation</p>	<p>Vid spill: skölj med vatten.</p>
Ammoniumoxalat, (NH ₄) ₂ C ₂ O ₄ · H ₂ O (s)	 <p>H302 + H312 Skadligt vid förtäring eller hudkontakt. H319 Orsakar allvarlig ögonirritation</p>	<p>Använd skyddsglasögon. Vid kontakt med ögon: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.</p>
Jod	 <p>H302+H312+H332 Skadligt vid förtäring, hudkontakt eller inandning H315 Irriterar huden. H319 Orsakar allvarlig ögonirritation. H335 Kan orsaka irritation i luftvägarna.</p>	<p>Vid hudkontakt: Tvätta med mycket vatten Vid inandning: Flytta personen till frisk luft och se till att andningen underlättas Vid kontakt med ögonen: Skölj</p>

	H372 Orsakar organskador (sköldkörtel) genom lång eller upprepad exponering (vid förtäring). H400 Mycket giftigt för vattenlevande organismer.	försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja
Kaliumjodid	 H372: Orsakar organskador (sköldkörtel) genom lång eller upprepad exponering (vid förtäring)	Ät inte, drick inte och rök inte när du använder produkten.
Aceton	 H225 Mycket brandfarlig vätska och ånga. H319 Orsakar allvarlig ögonirritation. H336 Kan göra att man blir dåsig eller omtöcknad	Vid mindre spill: torka upp med papper.
Safranin, fast pulver CAS-nr: 477-73-6	 H315 Irriterar huden. H319 Orsakar allvarlig ögonirritation.	Vid hudkontakt: Tvätta med mycket vatten. Vid kontakt med ögonen: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.

Förebyggande åtgärder	Vi beredning från fast pulver gäller att kristallviolett klassas som CMR-ämne och jod i fast form är ett riskminskningsämne. Se i tabell ovan.
Avfall och andra kommentarer	Vid mindre spill och vid städning torkas lösningarna upp med papper. Lägg torkpappret i ett större kärl i dragskåp för avdunstning av lösningsmedel.

Datum	2023-10-05	Utförd av	KRC	Klass	
--------------	------------	------------------	-----	--------------	--