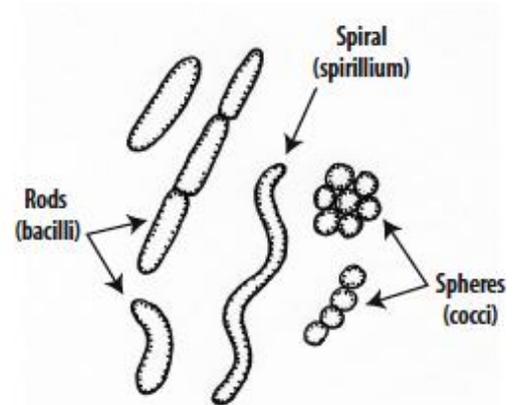


## Gram-Staining von Bakterien

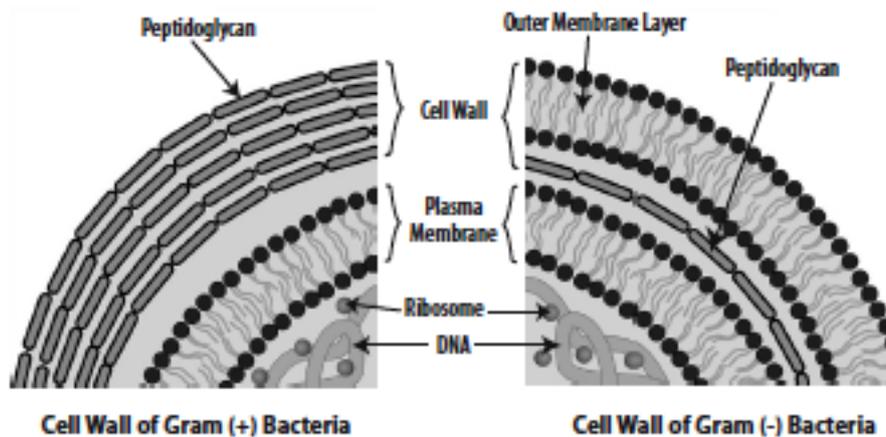


### Hintergrundinformationen

Die Gramfärbung ist ein wichtiges Kriterium für die Unterscheidung von Bakterien nach dem Aufbau ihrer Zellwand. Sie beruht auf dem unterschiedlichen Aufbau der Bakterienhülle aus verschiedenen Peptidoglycanen (Murein) sowie Teichonsäuren. Grampositive Bakterien besitzen dabei eine dickere, mehrschichtige Mureinhülle, die bis zu 50 % der Hüllentrockenmasse ausmachen kann. Zusätzlich enthält die Zellwand zwischen 20 und 40 % Teichonsäuren. Gramnegative Bakterien dagegen haben nur eine dünne, einschichtige Mureinhülle, die nur etwa 10 % der Trockenmasse der Bakterienhülle ausmacht und keine Teichonsäuren enthält[1]. Bei der Gramfärbung wird nach Anfärbung der Bakterien mit einem basischen Farbstoff durch Nachbehandlung mit Lugolscher Lösung (enthält einen Jod-Kaliumjodid-Komplex) ein Farbstoff-Jod-Komplex in den Bakterien gebildet. Dieser Farbkomplex ist im Gegensatz zum primären Farbstoff wasserunlöslich aber er ist löslich in Ethanol und wird deshalb aus gramnegativen Bakterien durch Behandlung mit Ethanol wieder extrahiert. Wegen der dickeren Mureinschicht wird er dagegen aus grampositiven Bakterien unter den Bedingungen der Gramfärbung nicht durch Ethanol extrahiert.



Bedeutend ist das Färbeverfahren insbesondere bei der Diagnostik von Infektionskrankheiten. „Grampositive“ und „gramnegative“ Bakterien reagieren unterschiedlich auf Antibiotika. Nach Trocknung (je nach Materialart etwa 5-15 Minuten) und Fixierung (in der Regel Hitzefixierung) des Bakterienausstrichs wird mit dieser schnellen diagnostischen Methode in etwa fünf Minuten das „Gramverhalten“ bestimmt. Damit hat man die Möglichkeit, sofort mit der antibiotischen Therapie zu beginnen, bevor das Ergebnis der mindestens 24 Stunden dauernden kulturellen Erregeranzucht mit nachfolgender Bestimmung vorliegt.



The cell wall of gram-positive bacteria is thicker than that of gram-negative bacteria, causing them to retain the crystal violet stain

Der dänische Mediziner Hans Christian Gram entwickelte die Färbemethode als Mitarbeiter bei Carl Friedländer in Berlin. Er suchte nach einer Färbemethode, mit der Bakterien in tierischen Geweben dargestellt werden können, also kontrastierend zu den Gewebezellen gefärbt wurden. Die gefundene Färbemethode, veröffentlicht 1884, hatte jedoch nur bei einigen Bakterien, den grampositiven, Erfolg. Émile Roux wendete die Methode zur färberischen Differenzierung von grampositiven und gramnegativen Bakterien an, insbesondere zur Bestimmung von Gonokokken (gramnegativ im Gegensatz zu vielen anderen Kokken) (Veröffentlichung 1886).

Beispiele für grampositive Bakterien: Alle Arten der Stämme Actinobacteria (etwa die Aktinomyzeten) und Firmicutes. Beispiele für Firmicutes: Streptococcus, Enterococcus, Staphylococcus, Listeria, Bacillus, Clostridium, Lactobacillus, Erysipelothrix rhusiopathiae.

Beispiele für gramnegative Bakterien: Alle Arten der Abteilung Proteobacteria sind gramnegativ, so die Enterobakterien (Escherichia coli, Salmonella, Shigella, Klebsiella, Proteus, Enterobacter). Weitere Beispiele der Proteobakterien: Pseudomonas, Legionella, Neisseria, Rickettsia, Pasteurella multocida.

### Inhalt des Kits

- 1 Färbelösung Kristallviolett
- 1 Färbelösung Safranin
- 1 Färbelösung Iod
  
- 1 Microampulle *Bacillus subtilis*
- 1 Microampulle *Micrococcus luteus*
- 1 Microampulle *Aquaspirillus serpens*
  
- 1 Box mit Zahnstochern

Außerdem wird eine Heizplatte benötigt, ein Abfalleimer/Abfallbeutel (autoklavierbar) und (optional mit Ölimmersion) ein Mikroskop.

Jede Gruppe benötigt:

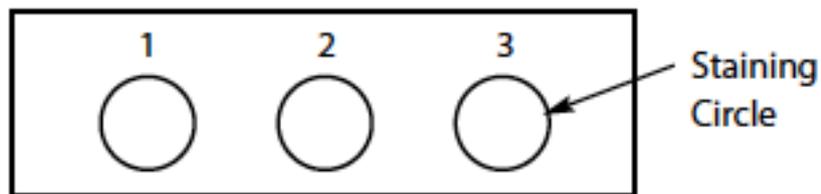
- 1 Mikroskop
- 1 großen Becher
- 1 kleinen Becher
- 1 Objektträger
- 1 Pipette
- 1 Tropfpipette zum Entfärben
- Papiertücher

Die Schüler sollten während des Versuchs einen Laborkittel, Brille und Handschuhe tragen. Außerdem sollte während eines mikrobiologischen Experimentes NICHT im Saal gegessen, getrunken oder sich geschminkt werden. Generell ist darauf zu achten mit den Händen nicht die Bakterien anzufassen und anschließend etwas anderes zu berühren. Immer erst Hände waschen!!!

## Ablauf des Versuchs

### Schritt 1

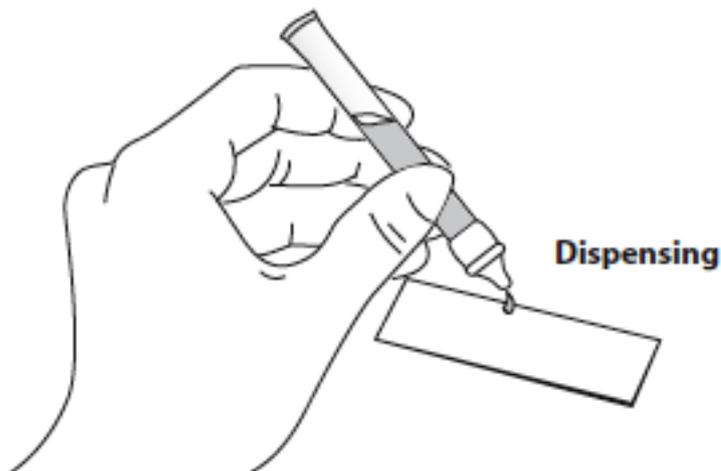
Bereite einen Objektträger wie unten dargestellt vor und tropfe in jeden aufgemalten Kreis einen Tropfen der entsprechenden Kultur:



#1 *Bacillus subtilis*

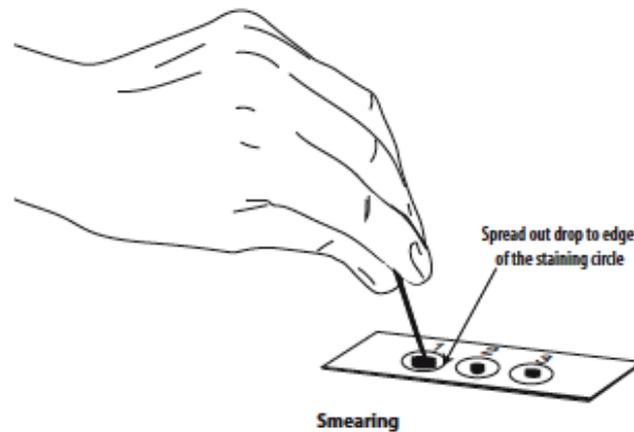
#2 *Micrococcus luteus*

#3 *Aquaspirillum serpens*



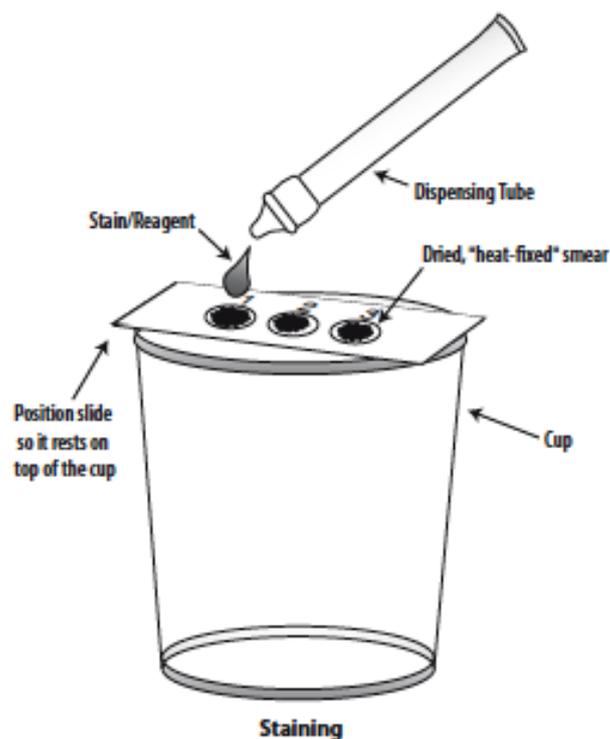
### Schritt 2

Verteile die Bakterien mit einem Zahnstocher auf dem Objektträger und lass diesen von Deinem Lehrer „hitze-fixieren“



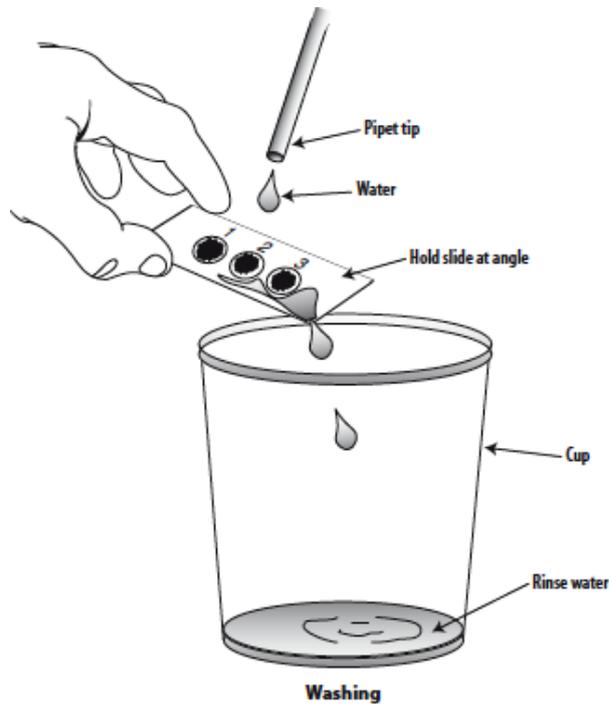
### Schritt 3

Gib einen Tropfen der Färbelösung Kristallviolett auf jeden getrockneten Bakterien-Schmierfilm und warte 1 min.



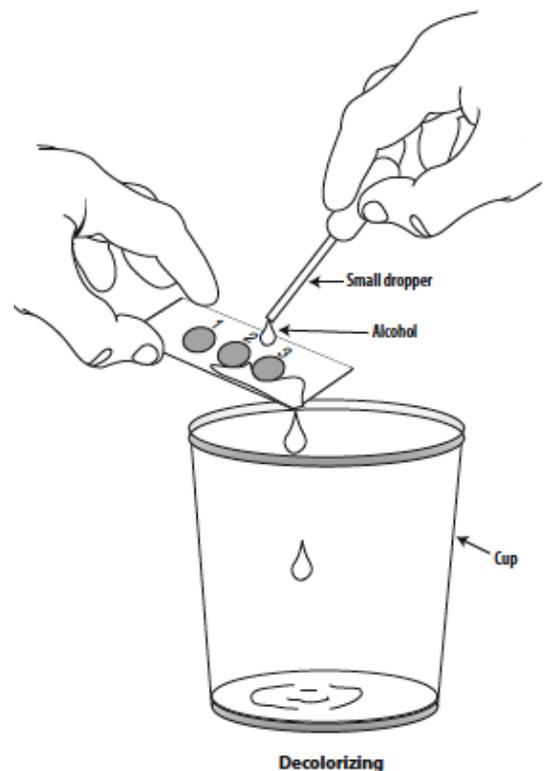
### Schritt 4

Spüle die Färbelösung vorsichtig vom Objektträger ab.



*Schritt 5*

Gib einen Tropfen der Färbelösung Iod auf jeden getrockneten Bakterien-Schmierfilm und warte 1 min – anschließend spüle die Färbelösung vorsichtig ab, bis das Waschwasser klar bleibt. Dann gibst Du vorsichtig den Entfärber auf die drei Areale bis keine Farbe mehr ausgewaschen wird.

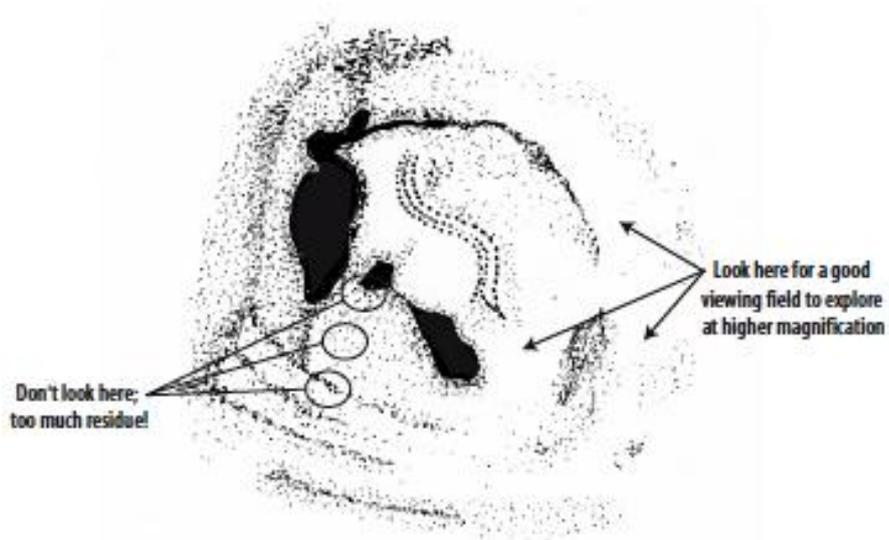


*Schritt 6*

Färbe den Objektträger erneut mit der Färbelösung Safranin und warte 1 min. Anschließend spüle den Objektträger und gib ihn Deinem Lehrer zum trocknen.

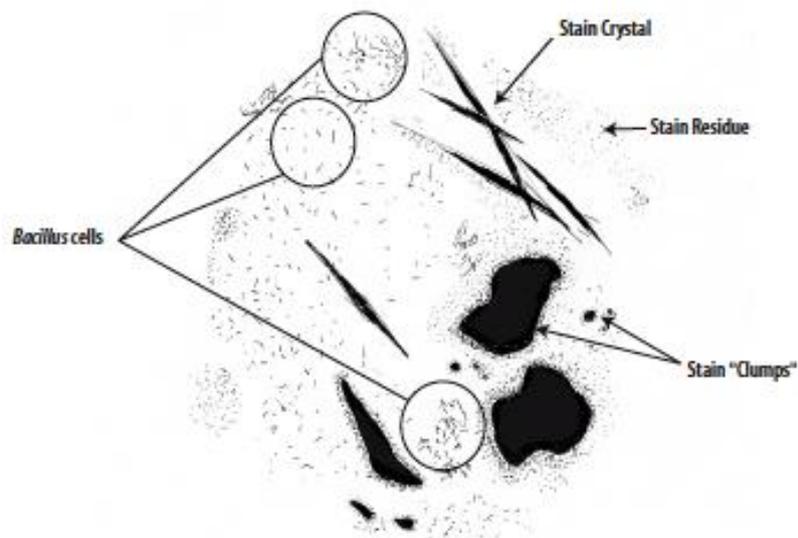
*Schritt 7*

Schau Dir den Objektträger unter dem Mikroskop bei 40x Vergrößerung an um einen guten Ausschnitt wählen zu können (nicht zu stark gefärbt)



**Low magnification (40x) view of stained smear**

Dann wähle eine 100x Vergrößerung um nach bakteriellen Zellen zu sehen.



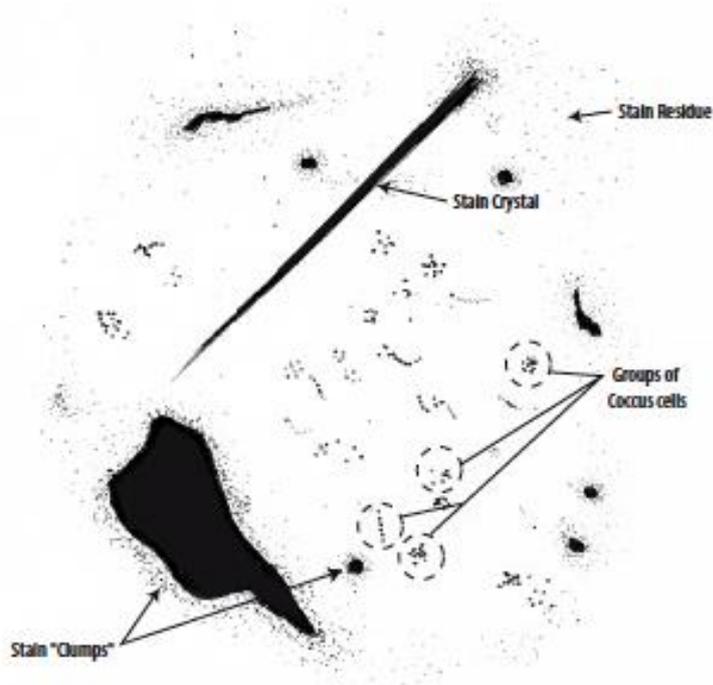
**Bacillus cells at 100x magnification**

Wechsele jetzt zu einer 400x Vergrößerung und schau Dir die Zellen genauer an.

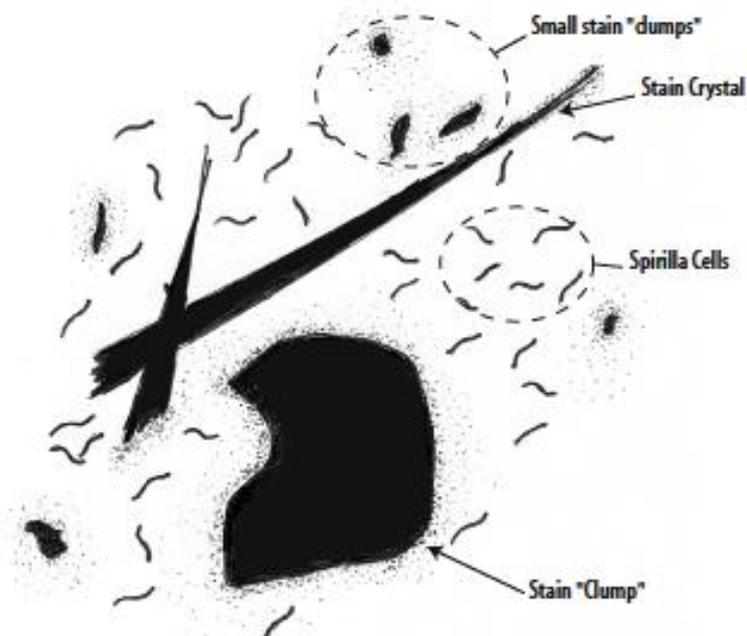


**Bacillus cells at 430x magnification**

Gram-Staining von Bakterien – Best.-Nr.1093046

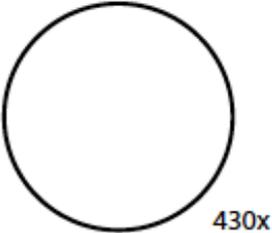
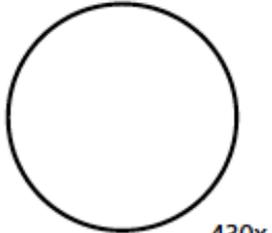
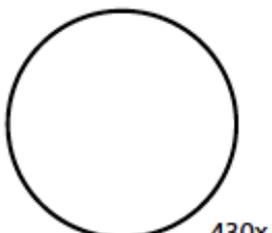


**Coccus cells at 430x magnification**



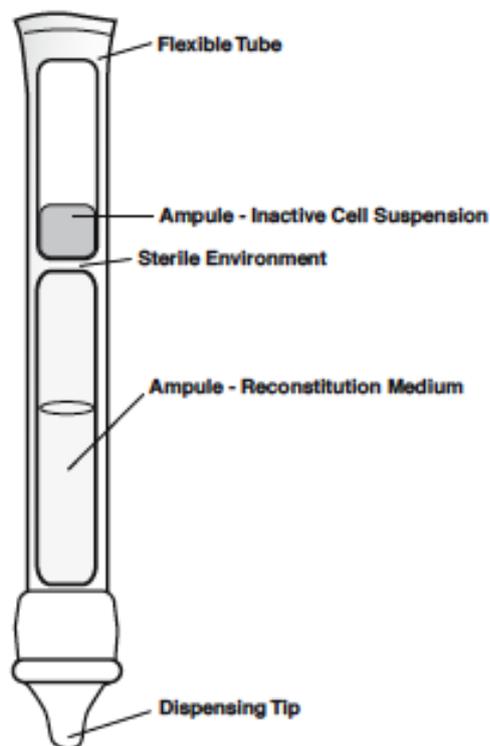
**Spirilla cells at 430x magnification**

Zeichne was Du siehst:

Organism	Shape	Stains	Gram Reaction
<p>#1 <i>Bacillus subtilis</i></p> 			
<p>#2 <i>Micrococcus luteus</i></p> 			
<p>#3 <i>Aquaspirillum serpens</i></p> 			

### Vorbereitungen - Lehrer

Die Bakterienampullen bestehen aus einem Zwei-Kammer-System. So wird gewährleistet, dass Medium und getrocknete Kultur getrennt verwahrt werden und bei Raumtemperatur gelagert werden können.



Um die Kultur zu aktivieren, wird die Ampulle an der Markierung fest zusammengepresst, die innere Ampulle zerbricht und die Zellen kommen mit dem Medium in Kontakt.



Anschließend invertiert man die Ampulle 6-8 mal und lässt sie für ca. 30 min ruhig am Platz stehen.



## Lösungen - Lehrer

**Data Table 1**  
**Microscopic Observations**

Organism	Shape	Stains	Gram Reaction
<i>Bacillus subtilis</i>	Rod (bacillus)	Purple	Gram +
<i>Micrococcus luteus</i>	Sphere (coccus)	Purple	Gram +
<i>Aquaspirillum serpens</i>	Spiral (spirillum)	Pink	Gram -