

## Niektoré poznatky o farbení baktérií podľa Grama

DAGMAR BUZINKAYOVÁ

**Súhrn.** Práca sa zameriava na skúmanie vplyvu technických faktorov na výsledok farbenia buniek mikroorganizmov podľa Grama.

Podľa výsledkov práce je na odfarbovanie genciánovou violetou zafarbených a Lugolovým roztokom morených buniek výhodnejšie použiť neutralizovaný etanol a nie zmes acetón—etanol. Ak sa preparáty nefarbia rovnakým roztokom farbiva každý deň, odporúča sa používať farbivo čerstvo pripravené. V prípade, že sa farbivom farbí každý deň, je výhodnejšie pripraviť základné súčasti farbiva do zásoby a podľa potreby ich zlievať. Farbivo treba aplikovať na preparát cez filter. Na farbenie sú vhodné čerstvé (24 h) kultúry, keďže tieto dávajú najjednoduchšie výsledky. Je výhodné pripravovať preparáty tak, aby v nich bunky boli v tenkom nátere. Pri farbení treba dodržiavať určený postup a časy pôsobenia jednotlivých roztokov.

Farbenie mikrobiálnych buniek podľa Grama má v bakteriológii taxonomickú hodnotu [9]. S výsledkom farbiteľnosti podľa Grama koreluje rad fyziologických, chemických, fyzikálnych a fyzikálnochemických vlastností bunky, ako citlivosť oproti enzýmom a antibiotikám, zmenenému osmotickému tlaku, kyslým a zásaditým farbivám a zmenám povrchového napätia v médiu [7, 8].

Príčinou odlišného správania bakteriálnych buniek pri ich farbení podľa Grama sú dva typy bunkových stien. V ultratenkých rezoch sa javí grampozitívna bunková stena ako jednoduchá kompaktná vrstva. Bunková stena gramnegatívnych baktérií má typickú trojvrstvovú štruktúru biologických membrán. Stavba bunkovej steny a tým aj odlišná permeabilita pre komplex farbiva genciánová violet—jód spôsobujú zmenu farbiteľnosti; grampozitívna bunková stena tvorí bariéru pri extrakcii komplexu alkoholom. Grampozitívne bunky

---

Dagmar Buzinkayová, Výskumná a vývojová jednotka GRt MaPP, Miletičova 14, Bratislava; t. č. Katedra technickej mikrobiológie a biochémie, Chemickotechnologická fakulta SVŠT, Jánska 1, 812 37 Bratislava.

sa môžu zmeniť na gramnegatívne napr. mechanickým poškodením ultrazvukom, ale aj roztieraním so skleným prachom. Nedostatočným vysušením pri fixácii záhrevom ešte vlhké bunky napučievajú, vznikajú na nich submikroskopické trhlinky a pôvodne grampozitívne baktérie sa menia na gramnegatívne. Aj starnutím buniek sa pôvodné gramnegatívne stávajú zdanlivo grampozitívnymi, čo tiež súvisí so zmenou permeability, preto sa na posúdenie farbitelnosti podľa Grama majú používať iba mladé bunky. Aj práve kľúčiace spóry grampozitívnych bacilov sa správajú ako gramnegatívne [1, 7, 9, 10].

Tento spôsob farbenia, objavený roku 1884, je pomenovaný podľa jeho autora Dána Christiana Grama. Hľadal spôsob, ako v mikroskopických preparátoch patologického pľúcneho tkaniva zafarbiť pneumokoky tak, aby boli zafarbené iba baktérie a pozadie ostalo bezfarebné. Toto sa mu podarilo, keď mikroskopické rezy zafarbil genciánovou violetou, potom preparáty moril jódом a odfarbil alkoholom. Pritom tkanivo pôvodne rovnako zafarbené ako baktérie bolo možné alkoholom opäť odfarbiť a pneumokoky ostali tmavofialové. Aplikáciou tohto postupu farbenia aj na iné baktérie, napr. na salmonely sa ukázalo, že tieto sa po morení jódом opäť odfarbujú podobne ako tkanivo a potom sa dajú zafarbiť kontrastným farbivom, napr. fuchsínom alebo safranínom na červeno. Sám Gram ešte nevystihol taxonomickú hodnotu tohto farbenia [1, 7].

Znak gramnegativity, resp. grampozitivity sa použil pri rozdelení baktérií na 19 častí v 8. vydaní Bergeyovho manuálu určenia baktérií [2]. Toto predbežné skupinové zadelenie baktérií do určitej časti podľa v laboratóriu ľahko zistiteľného znaku významne uľahčuje ich identifikáciu, taxáciu a nomenklatúru.

V opisoch baktérií sa zväčša jednoznačne udáva ich farbitelnosť podľa Grama. Skúsený a kritický laboratórny pracovník však vie, že ním pozorovaný mikroskopický preparát nemá vždy jednoznačné znaky. Príčinou tohto javu môžu byť biologické a technické faktory, ako napr. rôzna farbitelnosť buniek spôsobená rodovou a druhovou príslušnosťou, ale aj kultiváciou a vekom, odlišné zloženie farbiaceho roztoku genciánovej violeti, odlišné zloženie roztoku použitého na odfarbovanie, pokazené roztoky farbív, nevhodná a nedostatočná fixácia preparátu, príliš hustý preparát, nedodržanie postupu a nesprávna technika farbenia.

S biologickými faktormi farbitelnosti baktérií podľa Grama sa zaoberala Herrmannová [5], pričom dokázala, že variabilnosť výsledku je väčšia pri grampozitívnych ako gramnegatívnych bunkách. Výsledok zafarbenia buniek pozorovaných v zornom poli mikroskopu hodnotila takto: jednoznačne a výlučne grampozitívne (tmavofialové a fialovočierne zafarbenie), grampozitívne bunky s červeným leskom, približne rovnaká zmes grampozitívnych a gramnegatívnych buniek, prevažne gramnegatívne bunky s malým počtom grampozitívnych buniek a jednoznačne gramnegatívne bunky.

V tejto práci sme sa zamerali na skúmanie vplyvu technických faktorov na výsledok farbenia buniek mikroorganizmov podľa Grama. Porovnali sme farbiace postupy podľa ČSN [3] a podľa Davisa [4] so zvláštnym zameraním na spôsob odfarbovania pri čerstvých a starších kultúrach, ako aj s čerstvým a starším farbivom.

### Materiál a metóda

Roztoky farbív	ČSN 56 0100	Davis [4]
Roztok A	2,5 % alkoholický roztok genciánovej violeti (1) 1 % vodný roztok šťaveľanu amónneho (2) roztok genciánovej violeti na farbenie (1) : (2) = 20 : 80	nasýtený alkoholický roztok genciánovej violeti 0,5 % vodný roztok fenolu(2) roztok genciánovej violeti na farbenie (1) : (2) = 10 : 90
Roztok B	1 g I <sub>2</sub> , 2 g KI, 300 ml dest. vody	1 g I <sub>2</sub> , 3 g KI, 300 ml dest. vody
Roztok C	neutralizovaný etanol (96 %) (neutralizácia roztokom NaOH na fenol-ftaleín)	neutralizovaný etanol (96 %) alebo zmes acetón—etanol (1 : 4)
Roztok D	1 g bázičského fuchsínu 10 ml etanolu (96 %) 100 ml 5 % vodného roztoku fenolu Pri oboch postupoch sa na dofarbovanie použil zriedený roztok D (1 : 10)	1 g bázičského fuchsínu 10 ml etanolu (96 %) 100 ml 5 % vodného roztoku fenolu
Postup farbenia a časy pôsobenia jednotlivých roztokov		
Farbivo	ČSN 56 0100 [3]	Davis [4]
genciánová violet	20 s	3 min
Lugolov roztok (vrství sa na genciánovú violet)	20—30 s	1 min
odfarbovanie etanolom	kým sa vyplavuje farbivo, nie viac ako 30 s	15—30 s
opláchnuť vodou		
dofarbenie fuchsínom	30—60 s	30 s
opäť opláchnuť vodou		

*Poznámka.* V originálnej metóde Gramovho farbenia podľa Davisa sa dofarbuje neutrálnou červenou. V našich pokusoch sme použili zriedený fuchsín pri oboch spôsoboch farbenia.

Na vyšetrenie grampozitivity a gramnegativity mikroorganizmov sme použili tieto kultúry získané na Katedre technickej mikrobiológie a biochémie ChTF SVŠT a Krajskej hygienickej stanici v Bratislave: *Staphylococcus aureus*, *Candida tropicalis*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas ovalis*, *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter* sp., *Escherichia coli* a *Citrobacter* sp.

Výsledok farbenia preparátov podľa Grama sme podľa Herrmannovej [5] a skúseností, ktoré sme získali my, označovali takto:

- G++ jednoznačne a výlučne grampozitívne bunky,
- G+a jednoznačne grampozitívne bunky, niektoré bunky gramnegatívne,
- G+b grampozitívne bunky s červeným okrajom,
- G+c grampozitívne bunky s gramnegatívnymi granulami,
- G± zmes grampozitívnych a gramnegatívnych buniek,
- G— gramnegatívne bunky s malým počtom grampozitívnych buniek,
- G—— jednoznačne a výlučne gramnegatívne bunky.

## Výsledky

Podľa experimentálnych skúseností dokumentovaných v tabuľke 1 sa ukázalo, že na výsledok farbenia mikrobiálnych buniek podľa Grama mal istý vplyv spôsob ich odfarbovania po zafarbení genciánovou violetou a morení Lugolovým roztokom. Tento vplyv sa prejavil najmä pri čerstvých grampozitívnych bunkách *Candida tropicalis*, ale nie pri starších bunkách. Po odfarbení neutralizovaným etanolom a zafarbení fuchsínom ostali bunky podľa očakávania jednoznačne grampozitívne, kdežto pri odfarbení zmesou acetón—etanol boli niektoré bunky gramnegatívne. Toto platilo pre obe metódy farbenia.

Bez ohľadu na spôsob odfarbovania buniek po ich zafarbení genciánovou violetou a morení Lugolovým roztokom javil sa rozdiel vo výsledku farbenia pri čerstvých, ako aj starších bunkách kultúr *Candida tropicalis* a *Pseudomonas ovalis*. *Candida tropicalis* pri farbení podľa ČSN [3], s použitím staršieho farbiva vykazovala variabilitu v tom smere, že staršie farbivo pri čerstvej, ako aj staršej kultúre javilo sklon zanechávať v preparáte istý počet gramnegatívnych buniek a v jednom prípade dokonca rovnomernú zmes grampozitívnych a gramnegatívnych buniek. Aj pri gramnegatívnych bunkách kultúry *Pseudomonas ovalis* sme zaznamenali, že pri použití staršieho farbiva boli v preparáte

Tabuľka 1. Výsledky zafarbenia buniek v závislosti od spôsobu odfarbovania, veku kultúr a farbiva pri metóde podľa ČSN 56 0100 (ČSN)  
 Table 1. Results of dyeing the cells — depending on the technology of dyeing, age of the cultures and of the dye, using the method according to ČSN 56 0100 (Czech. Standard and the method according to Davis (D))

Vek kultúry a farbiva <sup>1</sup>	Odfarbovací roztok <sup>6</sup>	<i>S. aureus</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>P. putida</i>		<i>P. ovalis</i>	
		ČSN	D	ČSN	D	ČSN	D	ČSN	D
čerstvá kultúra <sup>2</sup> (24 h) staršia kultúra <sup>3</sup> (3 d)	čerstvé f. <sup>4</sup>	G+b	G++	G+a	G+a	G—	G—	G—	G—
	staré f. <sup>5</sup>	G+b	G++	G±	G+a	G—	G—	G—	G—
	čerstvé f. <sup>4</sup>	G+b	G++	G++	G++	G—	G—	G—	G—
	staré f. <sup>5</sup>	G+b	G++	G+a	G++	G—	G—	G+a	G+a
čerstvá kultúra <sup>2</sup> (24 h) staršia kultúra <sup>3</sup> (3 d)	čerstvé f. <sup>4</sup>	G+b	G++	G+a	G++	G—	G—	G—	G—
	staré f. <sup>5</sup>	G+b	G++	G++	G++	G—	G—	G—	G+a
	čerstvé f. <sup>4</sup>	G+b	G++	G++	G++	G—	G—	G—	G—
	staré f. <sup>5</sup>	G+b	G++	G+a	G++	G—	G—	G+a	G+a

<sup>1</sup>Age of the culture and of the dye; <sup>2</sup>Fresh culture; <sup>3</sup>Old culture; <sup>4</sup>Fresh dye; <sup>5</sup>Old dye; <sup>6</sup>Decolourizing solution; <sup>7</sup>Neutralized ethanol; <sup>8</sup>Acetone—ethanol mixture.

Tabuľka 2. Výsledky zafarbenia buniek v závislosti od veku kultúr a farbiva pri metóde podľa 56 0100 (ČSN) a podľa Davisa (D)

Table 2. Results of dyeing the cells — depending on the age of the cultures and of the dye, using the method according to ČSN 56 0100 (Czech. Standard) and the method according to Davis (D)

Vek kultúry a farbiva <sup>1</sup>	Odfarbovací roztok <sup>6</sup>	<i>S. epidermidis</i>		<i>B. cereus</i>		<i>Enterobacter</i> sp.		<i>E. coli</i>		<i>Citrobacter</i> sp.	
		ČSN	D	ČSN	D	ČSN	D	ČSN	D	ČSN	D
čerstvá kultúra <sup>2</sup> (24 h) staršia kultúra <sup>3</sup> (14 d)	čerstvé f. <sup>4</sup>	G+b	G+b	G+a	G++	G—	G+	G—	G±	G—	G±
	staré f. <sup>5</sup>	G+b	G+b	G++	G++	G±	G±	G±	G±	G±	G±
	čerstvé f. <sup>4</sup>	G±, (G+a)	G+b	G+c	G+c	G—	G—	G—	G—	G—	G—
	staré f. <sup>5</sup>	G++	G++	G+c	G+c	G—	G—	G—	G—	G—	G—

<sup>1</sup>Age of the culture and of the dye; <sup>2</sup>Fresh culture; <sup>3</sup>Old culture; <sup>4</sup>Fresh dye; <sup>5</sup>Old dye; <sup>6</sup>Decolourizing solution; <sup>7</sup>Neutralized ethanol.

dosť veľké nepravidelnosti v ich zafarbení. Pritom bol zreteľný rozdiel medzi čerstvou a staršou kultúrou. V staršej kultúre sme v preparáte zafarbenom starším farbivom nachádzali častejšie bunky zafarbené ako grampozitívne s menším počtom gramnegatívnych buniek, a to pri oboch spôsoboch odfarbovania. V čerstvej kultúre bol tento rozdiel menej výrazný.

V zafarbených preparátoch kultúry *Staphylococcus aureus* sa javil predovšetkým badateľný rozdiel v celkovom vzhľade preparátu medzi spôsobom zafarbenia podľa ČSN [3] a podľa Davisa [4]. Tento rozdiel neovplyvnil vek kultúry a farbiva ani spôsob odfarbovania. Rozdiel vo výsledku sa manifestoval v jednoznačne grampozitívnom zafarbení buniek pri farbení podľa Davisa [4]; bunky boli zreteľne modré (nie fialové). Pri zafarbení podľa ČSN [3] boli samé bunky tmavšie (fialové), ale ich okolie sa do značnej miery farbilo do ružova, čo zapríčinilo, že celkový vzhľad preparátu bol taký, ako by išlo o gramnegatívnu kultúru, čo by mohlo ľahko zmiatať menej skúseného pracovníka. Narucka [6] udáva, že niektoré kmene *Staphylococcus aureus* bývajú opudzrené alebo potiahnuté mukóznou látkou, čo môže byť znakom stupňa ich virulencie.

V tabuľke 2 sú výsledky hodnotenia preparátov, ktoré boli tiež farbené obidvoma metódami, ale odfarbované už iba etanolom, pretože tento spôsob sa v predehádzajúcich pokusoch javil ako výhodnejší. Ďalšími premennými tu boli vek kultúry a farbiva. Sledovali sme čerstvú kultúru (24 h) a starú kultúru (14 d). Takisto sme použili farbivo čerstvé a 14-dňové.

Zvláštny jav sme tu pozorovali pri farbení kultúry *Staphylococcus epidermidis* s čerstvým farbivom podľa ČSN [3]. Preparát bol miestami hustý a miestami riedky. Na riedkych miestach bola väčšina buniek jednoznačne grampozitívna s niekoľkými bunkami, ktoré boli jednoznačne gramnegatívne. Na inom mieste preparátu, kde boli bunky veľmi husto vedľa seba, bola približne rovnaká zmes grampozitívnych a gramnegatívnych buniek. Rovnaký preparát, ale s riedko rozprestrenými bunkami zafarbenými podľa Davisa [4], bol jednoznačne grampozitívny, pričom okraje buniek boli zreteľne červené. Pri ostatných kombináciách veku kultúry a farbiva, ako aj spôsobu farbenia nebol v čerstvej kultúre medzi čerstvým a starým farbivom (pod starým farbivom rozumieme také, ktoré stálo dlhší čas, napr. 14 dní, nepoužité a ktorého vlastnosti sa mohli nekontrolovane zmeniť) pozorovateľný rozdiel, bunky boli jednoznačne grampozitívne s červeným okrajom. Stará kultúra farbená starým farbivom podľa ČSN [3] i podľa Davisa [4] vykazovala jednoznačne a výlučne grampozitívne bunky bez červeného okraja.

Pri farbení čerstvej a starej kultúry *Bacillus cereus* čerstvým i starým farbivom sme pozorovali tieto rozdiely v zafarbení preparátu: najmarkantnejší rozdiel bol medzi starou a čerstvou kultúrou a v prepráte starej kultúry bolo vidieť pri oboch spôsoboch farbenia s použitím čerstvého a starého farbiva, že bunky boli síce grampozitívne, ale vykazovali výraznú gramnegatívnu gra-

nuláciu, čo mohlo súvisieť aj s tvorbou spór a ich klíčením. Tento jav sme nepozorovali v čerstvej kultúre, či bola farbená čerstvým alebo starým farbivom. Bunky boli jednoznačne a výlučne grampozitívne s výnimkou v čerstvej kultúre a čerstvom farbive podľa ČSN [3], kde sme v preparáte pozorovali okrem jednoznačného grampozitívneho zafarbenia aj niektoré gramnegatívne bunky.

Ďalej sme pozorovali preparát kultúry, ktorá bola označená ako *Enterobacter* sp. a podľa známych skutočností mala byť gramnegatívna. Táto skutočnosť sa vo farbení všetkými spôsobmi v podstate potvrdila. Pri bližšom posúdení zafarbených preparátov sa však javil istý rozdiel v starej a čerstvej kultúre. Stará kultúra zafarbená čerstvým farbivom podľa ČSN [3], ako aj podľa Davisa [4] bola gramnegatívna, s malým počtom grampozitívnych buniek. Rovnaká kultúra zafarbená starým farbivom bola podľa ČSN [3] tiež gramnegatívna s malým počtom grampozitívnych buniek, ale zafarbená podľa Davisa [4] bola jednoznačne a výlučne gramnegatívna. Pri farbení čerstvej kultúry všetkými kombináciami bola jednoznačne a výlučne gramnegatívna iba tá, ktorá bola farbená čerstvým farbivom podľa ČSN [3]. Pri ostatných kombináciách sme v preparáte pozorovali zmes grampozitívnych a gramnegatívnych buniek.

Ďalšou podľa známych skutočností gramnegatívnou kultúrou boli bunky *Escherichia coli*. Jednoznačne gramnegatívne sa farbili staré kultúry, pričom sa nepravidelne vyskytol aj malý počet grampozitívnych buniek. Naproti tomu čerstvá kultúra javila pri oboch spôsoboch farbenia čerstým i starým farbivom podobnú tendenciu ako *Enterobacter* sp. Zo štyroch preparátov čerstvej kultúry zafarbenej podľa ČSN [3] a podľa Davisa [4], čerstvým a starým farbivom, jednoznačne a výlučne gramnegatívne bunky boli iba v preparáte, ktorý bol zafarbený čerstvým farbivom podľa ČSN [3]. V ostatných prípadoch sme v zafarbenom preparáte pozorovali rovnomernú zmes grampozitívnych a gramnegatívnych buniek.

Poslednou gramnegatívnou kultúrou boli baktérie rodu *Citrobacter*. Aj tu bola stará kultúra vo všetkých prípadoch jednoznačne gramnegatívnejšia ako čerstvá kultúra. V čerstvej kultúre bola vyslovene gramnegatívna (s malým počtom grampozitívnych buniek) iba tá, ktorá bola zafarbená čerstvým farbivom podľa ČSN [3]. Staré farbivo podľa ČSN [3], ako aj farbivo podľa Davisa [4] dávali zmes grampozitívnych a gramnegatívnych buniek.

## Diskusia

Zhodnotením našich experimentálnych skúseností s farbením kultúr grampozitívnych a gramnegatívnych mikroorganizmov sme nadobudli tento názor:

a) Významný vplyv na výsledok farbenia kultúr podľa Grama má roztok a spôsob odfarbovania buniek zafarbených genciánovou violetou a morených Lugolovým roztokom. Odfarbovali sme neutralizovaným etanolom a zmesou acetón—etanol. Lepšie a jednoznačnejšie výsledky sme získali odfarbovaním neutralizovaným etanolom. Toto sa významne prejavilo pri grampozitívnych kultúrach.

b) Obidva spôsoby odfarbovania, podľa ČSN [3] i podľa Davisa [4], sa dajú použiť. Podľa našich pozorovaní sa farbenie podľa ČSN veľmi dobre osvedčilo pri gramnegatívnych bunkách, pri použití čerstvého farbiva a v čerstvej kultúre. V týchto prípadoch sme najčastejšie dostávali jednoznačne gramnegatívne výsledky. Pri farbive starom 14 dní podľa ČSN [3] sme často dostávali menej jednoznačné výsledky. Pri grampozitívnych bunkách sa nám javilo výhodnejšie farbivo podľa Davisa, pomocou ktorého sme častejšie získali jednoznačne grampozitívne výsledky. V sporných prípadoch preto odporúčame farbiť súčasne podľa ČSN [3] a podľa Davisa [4].

c) Významnou otázkou je čas použiteľnosti roztoku toho istého farbiva genciánovej violete. Všeobecne je známe, že na farbenie pripravený roztok je iba obmedzene trvanlivý. V ČSN [3] sa uvádza použiteľnosť 7—14 dní. Podľa našich skúseností sa javilo výhodnejšie použiť čerstvé farbivo, keď sa rovnakým farbivom nefarbí každý deň. Vtedy je výhodnejšie pripraviť farbivo zliatím roztoku genciánovej violete, roztoku šťavelanu amónneho, prípadne fenolu a aplikovať ho na preparát cez filter.

d) Vek kultúry sa jednoznačne prejavil pri grampozitívnych organizmoch. Štrnásť dní stará kultúra *Bacillus cereus* a *Candida tropicalis* dávali menej jednoznačné výsledky. Pri grampozitívnych paličkách javili tendenciu k výraznej granulácii a u *Candida tropicalis* niektoré bunky strácali schopnosť udržať genciánovú violetu. Na základe našich skúseností môžeme iba potvrdiť, že taxonomický význam Gramovho farbenia platí iba pre čerstvé (24 h) kultúry.

e) Všimli sme si, že na výsledok farbenia buniek v preparáte má významný vplyv aj jeho hustota. Miesta s veľkým počtom buniek bez medzipriestoru sa spravidla farbili inak ako bunky v riedkom nátere. Odporúčame pripravovať preparáty tak, aby boli riedke.

f) Z praxe máme skúsenosť, že farbenie podľa Grama, najmä dodržiavanie časov pôsobenia jednotlivých roztokov, podlieha značnej ľubovôli pracovníkov. Nám sa osvedčilo dodržiavanie časov pôsobenia podľa príslušných predpisov. Preto odporúčame, aby na mieste, kde sa spravidla farbía preparáty, bol vyvesený postup farbenia čitateľný aj z väčšej vzdialenosti. Mimoriadne dôležitý je čas pri odfarbovaní preparátu alkoholom po jeho zafarbení genciánovou violetou a morení Lugolovým roztokom.



## Literatúra

1. BETINA, V. — NEMEC, P.: Všeobecná mikrobiológia. Bratislava, Alfa 1977, s. 477.
2. BUCHANAN, R. E. — GIBBONS, N. E.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Baltimore, The Williams and Wilkins Co. 1974, s. 1246.
3. ČSN 56 0100: Mikrobiologické zkoušení poživatin. Praha, Úřad pro normalizaci a měření 1968, s. 239.
4. DAVIS, J. G.: A Dictionary of Dairying. London. Leonard Hill Ltd 1950, s. 850.
5. HERRMANN, Mathilde: Z. ges. Hyg., 28, 1982, č. 6, s. 402.
6. NARUCKA, U. J.: Occurrence and Health Significance of Staphylococcus aureus in a Pig Slaughter Line. Rotterdam, A. A. Balkema 1979, s. 88.
7. SCHRÖDER, Helga: Mikrobiologisches Praktikum. 3. Aufl. Berlin, VEB Volk und Wissen 1980, s. 220.
8. ŠILHÁNKOVÁ, L.: Mikrobiologie pro potravináře. Praha, SNTL 1983, s. 304.
9. WILDFÜHR, G.: Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Epidemiologie. Band I. 2. Aufl. Leipzig, VEB Georg Thieme 1976, s. 625.
10. WILDFÜHR, G.: Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Epidemiologie. Band IV/1 Laboratoriumsdiagnostik. 2. Aufl. Leipzig, VEB Gustav Thieme 1982, s. 532.

## Некоторые познания об окраске бактерий по методу Грама

### Резюме

Работа посвящена исследованию влияния технических факторов на результаты окраски клеток микроорганизмов по методу Грама.

Из результатов работы следует, что для обесцвечивания клеток, окрашенных генциановым фиолетовым и протравленных раствором Люголя, выгоднее применить нейтрализованный этиловый спирт, а не смесь ацетона и этилового спирта. Если препараты не окрашиваются каждой день одинаковым раствором красителя, рекомендуется применять свежее приготовленный краситель. В том случае, если окрашивание красителем проводится ежедневно, более выгодно приготовить основные составляющие красители про запас, и по мере надобности их сливать. Краситель необходимо применять на препарат через фильтр. Для окрашивания пригодны свежие (24) культуры, поскольку они дают самые однозначные результаты. Выгодно готовить препараты таким образом, чтобы клетки в них были в тонком слое. При окрашивании необходимо соблюдать предписанный порядок и время действия отдельных растворов.

## Some facts concerning the dyeing of bacteria according to Gram

### Summary

The influence of technical factors on the results of dyeing the microorganism cells according to Gram is studied in this contribution.

Neutralized ethanol was found to have better decolourizing effect on cells dyed by gentian violet and pickled by Lugol solution than the acetone—ethanol mixture. If the preparates are not dyed with the same dye solution each day, fresh dye should be used. When the dye is used every day, it is more advantageous to prepare the basic dye components in supply and decant them according to need. The dye should be applied to the preparate through a filter. Fresh (24 h old) cultures are suitable for dyeing as they produce the most unambiguous results. The preparations should be prepared in such a way that the cells in them should be spread sparsely. During dyeing one should keep the given procedure and operation times of individual solutions.