

DIFERENCIALNO BARVANJE PO GRAMU TER PRIPRAVA MIKROSKOPSKEGA PREPARATA IMENOVANEGA RAZMAZ

1. CILJ EKSPERIMENTA:

Spoznali smo metodo barvanja bakterij po gramu. Pri bakterijah "bacillus cereus" smo ugotavljali v katero skupino spadajo (gram + ali gram -). Naučili smo se tudi pripravljati tip mikroskopskega preparata, imenovanega razmaz.

2. UVOD:

Pri barvanju po gramu uporabljamo različna barvila, ki jih pri gram + bakterijah ne moremo izprati, pri gram - bakterijah pa lahko barvilo s pomočjo alkohola odstranimo. Barvanje po gramu nam pomaga razvrščati bakterije v dve glavni skupini (gram + in gram -). Gram + bakterije so npr.: bacili davice in jetike; gram - bakterije pa npr.: bakterije griže, kuge in tifusa. Vsako vrsto bakterij lahko razvrstimo v gram + ali gram - skupino. Gram + bakterije se obarvajo modrovijolično in imajo membrano in celično steno (*peptidoglikan*). Gram - bakterije se obarvajo rdeče, imajo pa tanko membrano, celično steno, ki jo obdaja lipopolisaharidni sloj in bičke iz flagelina.

"Razmaz" je tip mikroskopskega preparata, ki se obarva s pomočjo tokočih ali poltekočih objektov (v našem primeru tuš) in se kasneje posušijo in strdijo.

3. MATERIAL IN APARATURE:

- mikroskop, objektno in krovno steklo;
- bakterije (*bacillus cereus*);
- bakterijska zanka (eza);
- gorilnik;

- urna stekla;
- tuš;
- filtrirni papir;
- čaša;
- metilvijolično barvilo;
- lugolova raztopina;
- fuksin in
- acetonski alkohol (3%).

4. METODE DE LA:

Priprava razmaza:

Najprej smo z alkoholom razmastili objektno steklo, potem pa smo nanj kanili kapljico tuša. Z ezo, ki smo jo pred tem razžareli nad plamenom, smo nanесли bakterije iz gojišča na objektno steklo. Za tem smo ezo spet razžarili nad ognjem in z drugim objektnim steklom pokrili objektno steklo, na katerem so bile bakterije in tuš. Tako smo dobili razmaz. Odstranili smo (drugo) objektno steklo in prvotno osušili nad plamenom in ga pokrili s krovnim steklom. Tako pripravljen preparat smo opazovali pod mikroskopom, najprej pod malo in potem še pod veliko povečavo.

Barvanje po gramu:

Najprej smo ezo razžareli nad plamenom, počakali da se ohladi in nanесли bakterije iz gojišča na objektno steklo. Bakterije smo razmazali v pravokotnik (približno 1 · 4 cm). Preparat smo spet osušili nad plamenom, ezo smo razžareli in jo dali na svoje mesto, kulturo bakterij pa zaprli in pospravili. Potem smo preparat barvali z metilvijoličnim barvilom dve minuti. Barvilo smo odlili in preparat sprali z vodo. Za tem smo preparat prelili z lugolovo raztopino in počakali eno minuto. Tudi lugolovo raztopino smo odlili in preparat spirali z acetonskim alkoholom pol minute. Nato smo preparat sprali z vodo in ga prelili s fuksinom. Potem smo preparat spet sprali z vodo, ga pokrili s krovnim steklom in ga opazovali pod mikroskopom. Na krovno steklo smo kanili še kapljico imerzijskega olja, ki ima podoben lomni količnik kot steklo (1,5). Kapljica se je dotikala spodnje leče objektiva in krovnega stekla, tako da vmes ni bilo zraka, ki ima lomni količnik 1. Zaradi tega je bil dovod svetlobe večji, slika pa jasnejša.

5. REZULTATI:

Razmaz - kultura bakterij obarvanih s tušem (400×):

6. ZAKLJUČEK:

Priprava razmaza:

Na črnem ozadju so bile vidne drobne bele pikice in paličice. Paličice so bile bakterije (bacili), pikice pa njihove spore.

Barvanje po gramu:

Obarvane bakterije so bile pod mikroskopom vidne kot temno vijolične črtice.

7. KRITIKA:

Pri vaji smo spoznali, kako se pripravlja mikroskopski preparat razmaz in spoznali metodo barvanja bakterij po gramu. Potekala je hitro in brez problemov, zdela se mi je poučna, saj me je že nekaj časa zanimalo, kako se bakterije razvrsti v gram + ali gram -. Zanimiva se mi je zdela imerzijska tehnika, saj smo pri tem postopku praktično uporabili znanje iz fizike.

8. DISKUSIJA:

Naše bakterije (bacillus cereus) lahko upravičeno uvrstimo med gram + bakterije, saj se vse gram + bakterije v barvilih, ki smo jih uporabljali, obarvajo vijolično. Če bi bile bakterije gram -, bi se morale obarvati rdeče.

9. VIRI:

- France Verbinc - Slovar tujk (šesta izdaja), CZ, Ljubljana 1979;
- LEKSIKON Cankarjeve založbe, Ljubljana 1973;
- Corinne Stockley: SLIKOVNI POJMOVNIK - BIOLOGIJA, TZS, 1991;
- LEKSIKON Cankarjeve založbe - biologija, Ljubljana 1976.