

VAJA 8: Priprava mikrobioloških preparatov

- 1.) **CILJI:** V vaji se bomo seznanili z delom mikrobiologa, izdelali bomo lastne mikrobiološke preparate in si jih ogledali pod mikroskopom.
- 2.) **UVOD:** Nevidni svet mikroorganizmov že dolgo zaposluje pozornost človeka, bodisi ko spoznava in se bori proti povzročiteljem bolezni ali ko skuša izrabiti njihove koristne lastnosti.
Delo mikrobiologa poteka pretežno v laboratoriju, kjer veljajo strogi varnostni ukrepi. Cilj mikrobiologa je, da si nek očem neviden organizem ogleda pod mikroskopom, zato pa mora pripraviti temu primeren mikrobiološki preparat. Postopek priprave preparata sestoji iz večih faz, katerih potek bomo podrobneje opisali v nadaljevanju.

3.) **MATERIAL:**

- a.) Predpriprava:
 - bela halja
 - rokavice
- b.) Priprava razmaza:
 - gojišče bakterij
 - objektniki
 - fiziološka raztopina
 - geza (mikrobiološka zanka)
 - gorilnik
- c.) Fiksiranje:
 - gorilnik
- d.) Barvanje po Löfflerju:
 - petrijevka
 - metilensko barvilo
 - destilirana voda
- e.) Barvanje po Gramu:
 - petrijevka
 - jodovica (lugol)
 - aceton – alkohol
 - destilirana voda
 - fuksin (kontrastno barvilo)
- f.) Mikroskopiranje:
 - mikroskop (imerzijski objektiv)
 - imerzijsko olje

4.) **METODE DELA:**

- a.) Predpriprava: Še preden se lotimo dela poskrbimo za svojo varnost. Vse nepotrebne stvari pospravimo, oblečemo si belo haljo in nadanemo rokavice.
- b.) Priprava razmaza: Vzamemo gezo, jo razžarimo nad plamenom (s tem jo steriliziramo) in jo ohladimo na robu gojišča. Pri tem gezo držimo pokonci, tako da je čimmanj možnosti, da bi se na njej nabrale kakšne druge bakterije iz okolja. Nato se z gezo le dotaknemo kolonije. Vzorec nanesimo na že pripravljen objektnik, na katerem naj bo čimmanjša kapljica fiziološke raztopine. Z gezo razmažemo vzorec, vse dokler se ta ne posuši. Po opravljenem delu gezo zopet razžarimo.
- c.) Fiksiranje: Objektnik z vzorcem dvakrat potegnemo čez plamen. Bakterije se s tem vakumsko prilepijo na steklo in se uničijo. Paziti moramo le, da jih ne zažgemo!
- d.) Barvanje po Löfflerju: Objektnik z vzorcem postavimo v petrijevko. Razmaz prelijemo z metilenskim barvilom in počakamo 3 minute. Če se med tem časom

- barvilo začne sušiti, dodamo novo. Po treh minutah odvečno barvilo speremo z destilirano vodo.
- e.) Barvanje po Gramu: Objektnik z vzorcem postavimo v petrijevko. Razmaz prelijemo z encian-vijoločnim barvilom in ga pustimo delovati 1-2 minuti. Nato barvilo odlijemo in vzorec prelijemo z jodovico – ta pomaga vezati barvilo na strukture. Za tem jod speremo z acetom-alkoholom, ki odpravi nevezano barvilo. Objektnik speremo še z destilirano vodo in ga prelijemo s kontrastnim barvilom (fuksinom). Ko mine pol minute barvilo odlijemo.
 - f.) Mikroskopiranje: Sliko najprej poiščemo pri mali povečavi. Nato na objektnik dodamo kapljo imerzije in prestavimo objektiv na imerzijskega. S tem dobimo 1450-kratno povečavo sicer očesu nevidnega organizma.
- 5.) **REZULTATI**: glej prilogo na strani 3 (risbe 1-2)
- 6.) **ZAKLJUČEK**: Delo mikrobiologa je vse prej kot enostavno. Pri delu je potrebno biti pazljiv in natančen, saj nikoli ne veš, ali je organizem, ki ga opazuješ, patogen ali ne. Na objektnik ne smeš nanesti preveč vzorca, ker za dober preparat potrebuješ čimtanjši sloj bakterij. Prav tako moraš biti spreten v držanju petrijevk in geze ter paziti na sterilnost materiala, ki ga uporabljaš.
- 7.) **DISKUSIJA**: Mikrobiolog mora v prvi vrsti poskrbeti za svojo varnost – v ta namen nosi haljo in rokavice ter pazi na to, da vzorec kolonije ne pride v stik s kožo. Geza mora biti ob vsaki uporabi sterilna. Z njo se le dotaknemo kolonije – s tem si olajšamo delo pri pripravi razmaza. Po razmazu mora biti na objektniku čimtanjši sloj bakterij, saj bodo te le tako dobro vidne. Nato z dvema hitrima potegoma objektnika skozi plamen vzorec fiksiramo in s tem uničimo bakterije. Paziti moramo, da se vzorec ne segreje preveč – temperaturo preverimo s tem, da se z objektnikom dotaknemo dlani. Fiksiranju sledi barvanje. Izbiramo lahko med več vrstami barvanja – različna barvila se namreč vežejo na različne vrste bakterij. V vaji smo se seznanili z barvanjem po Löfflerju in z barvanjem po Gramu. Slednje je zahtevnejše, večina pozitivnih bakterij pa je patogenih. Po barvanju si preparat ogledamo še pod mikroskopom. Sliko najprej poiščemo pod malo povečavo, nato pa z uporabo imerzijskega olja še pod imerzijsko povečavo, ki vzorec poveča kar 1450-krat. Po opravljenem poskusu preparate odvržemo, uporabljen material razkužimo ter si umijemo roke in s tem preprečimo morebitno okužbo.