

Vježba 2.

Boje i postupci bojenja u bakteriologiji

- ▶ stanice bakterija su propusne za svjetlo i bezbojne – otežano mikroskopiranje
- ▶ za istraživanja svjetlosnim mikroskopom možemo se koristiti bojenjem - građa postaje vidljiva
- ▶ odnos prema bojama ima veliko značenje u identifikaciji bakterija
- ▶ boje
 - ▶ prirodne
 - ▶ umjetne

Postupci bojenja

- ▶ jednostavna
- ▶ složena (diferencijalna)

Gramovo bojenje

- najvažnije sukcesivno diferencijalno bojenje u bakteriologiji
- Christian Gram 1884 g
- gram pozitivne i gram negativne bakterije

1. **primarno bojilo** (genciana violet) - sve se stanice oboje ljubičasto-plavo
2. **sredstvo za nagrizanje - mordant** (lugol J+KJ) intenzivira se boja i sve su stanice i dalje ljubičasto-plavo
3. **agens za odbojavanje** (C_2H_5OH) neke bakterije otpuštaju primljenu ljubičasto-plavu boju dok druge ostaju obojene ljubičasto-plavo (G^+)
4. **kontrastno bojilo** (fuksin), skupina bakterija koja je otpustila primarno bojilo u ovom koraku će se obojiti kontrastnim bojilom (G^-)

- ▶ ova osobina je stalna i vezana je uz kemijski sastav bakterija a koristi se u klasifikaciji bakterija
- ▶ G^- i G^+ različita građa stanične stjenke - različit odnos prema bojama
- ▶ gram neosjetljive
- ▶ gram varijabilne

▶ Na rezultate Gramovog bojenja može utjecati:

- ▶ starost bakterijske kulture,
- ▶ sastav hranjive podloge,
- ▶ debljina razmaza (predebeo neće primiti boju),
- ▶ trajanje pojedinih operacija bojanja i dr.

Zadatak 1

- ▶ U jednostavno obojenom preparatu odrediti oblik bakterija izdvojenih s materijala oko zuba

Materijal

- ▶ Predmetnica, materijal s i oko zuba, čačkalica, špiritusna lampa, fuksin, filter papir, staničevina, bočica s imerzionim uljem, alkohol, mikroskop

Postupak

- ▶ Predmetnicu obrisati staničevinom.
- ▶ Sterilizirati predmetnicu na plamenu (obje strane).
- ▶ Staviti kap vode na predmetnicu.
- ▶ Čačkalicom uzeti malo materijala s i oko zuba koji treba unijeti u kapljicu vode, dobro homogenizirati i napraviti razmaz promjera 1 cm.
- ▶ Preparata je potrebno osušiti opreznim mahanjem predmetnice kroz zrak dok voda potpuno ne ispari. Predmetnica se ne smije zagrijavati jer bi se uslijed povećane temperature izmijenio sastav bjelančevina, struktura i oblik stanice.
- ▶ Preparat je potrebno fiksirati tako da predmetnicu s razmazom koji je okrenut prema gore prihvatimo po sredini i polagano je prevučemo nekoliko puta iznad plamena.
- ▶ Preko fiksiranog preparata prelići otopinu bazičnog fuksina (1-2 minute).
- ▶ Preparat isprati mlazom vode dok voda ne postane čista.
- ▶ Preparat posušiti u filter papiru lagano pritiskajući površini predmetnice tako da filter papir upije suvišnu vodu.
- ▶ Mikroskopirati objektivom uljne imerzije (vlažni objektiv). Na sredinu preparata nanijeti kap imerzionog ulja a potom gledati sa strane i uroniti objektiv u ulje. Nakon toga mikrovijkom izoštriti vidno polje.
- ▶ Skicirati sliku u dnevnik vježbi

Zadatak 2

- ▶ Postupkom bojenja po Gramu odrediti Gram-pozitivnu i Gram-negativnu bakteriju u suspenziji

Materijal

- ▶ Kompletan pribor za pripremanje fiksiranog preparat, suspenzija kultura *Escherichia coli* i *Bacillus mycoïdes*, gencijana violet, lugol, 96 % etanol, fuksin, pribor za ispiranje, filter papir, imerziono ulje, mikroskop

Postupak

- ▶ Na plamenu špiritusne lampe sterilizirati predmetnicu.
- ▶ Na ohladenu predmetnicu nanijeti kapljicu suspenzije kultura *Escherichia coli* i *Bacillus mycoïdes*.
- ▶ Sterilnom mikrobiološkom ušicom razmazati kapljicu u krug promjera 10 cm. Mikrobiološku ušicu sterilizirati na plamenu te odložiti.
- ▶ Preparat sušiti na zraku.
- ▶ Potpuno suh preparat fiksirati na plamenu špiritusne lampe.
- ▶ Fiksirani preparat obojiti gencijanom violet u trajanju od 1 minute. Isprati preparat vodom.
- ▶ Preparat tretirati lugolom u trajanju od 1 minuta, a potom isprati vodom.
- ▶ Odbojiti preparat s 95% etanolom, i isprati vodom
- ▶ Dopunski obojiti fuksinom u trajanju od 30 sekundi do 1 minute.
- ▶ Boju isprati vodom.
- ▶ Preparat posušiti filter papirom, staviti kapljicu imerzionog ulja te mikroskopirati objektivom uljne imerzije.
- ▶ Skicirati sliku u dnevnik vježbi