



**2004-2006 m. Bendrojo programavimo dokumento 2 prioriteto „Žmogiškųjų išteklių plėtra“ 4 priemonė „Mokymosi visą gyvenimą sąlygų plėtra“**

Projekto sutarties numeris: ESF/2004/2.4.0-K01-160/SUT-261

Projekto pavadinimas: **Inovatyvūs mokymosi metodai ir naujausios technologijos gamtos mokslų bakalauro rengimui**

---

## **BIO 312. MIKROBIOLOGIJA**

### **Laboratorinis darbas**

#### **Paprastasis dažymas. Dažymas pagal Gramą. Gyvų eukariotinių mikroorganizmų preparatų paruošimas**

##### **Mikroorganizmų ląstelės forma.**

Prokariotinių mikroorganizmų dydis yra nuo 0,1 – 0,2 iki 50µm skersmens. Vidutinis dydis 1-3 µm. Prokariotų ląstelės gali būti apvalios (kokai), pailgos, lazdelės formos (bacilos), lenktos lazdelės formos – spirilės, specifinės spiralės formos – spirochetos. Taip pat gali būti bakterijų, kurių ląstelės su ataugėlėmis, hifais, siūlinės formos bakterijos.

##### **Bakterijų sienelės sandara.**

Peptidoglikanas yra sudarytas iš cukrų – N-acetilglukozamino ir N-acetimuramo rūgšties, o taip pat keleto amino rūgščių – L-alanino, D-alanino, D-glutamininės rūgšties ir lizino arba diaminopimelinės rūgšties – DAP. Šios medžiagos jungiasi sudarydamos pasikartojančią struktūrą – glikano tetrapeptidą. Glikano grandinės, sudarytos iš cukrų yra sujungiamos peptidais. Glikozilinės jungtys, jungiančios cukrus glikano grandinėse yra labai stiprios, bet jos tokios grandinės dar nenulemia sluoksnio tvirtumo visomis kryptimis, todėl sluoksnis sutvirtinamas amino rūgštimis. Gram neigiamose bakterijose šios jungtys susidaro jungiantis DAP amino grupei prie galinio D-alanino karboksilinės grupės. Gram teigiamose sujungimas vyksta per peptidinį tiltą. Pvz., *Staphylococcus aureus* (Gram +) kiekvienas “tilto” peptidas sudarytas iš penkių glicino molekulių.

Gram teigiamos bakterijos dažnai turi keletą peptidoglikano sluoksnių sienelėje, Gram neigiamose bakterijose tik 10% sienelės sudaro peptidoglikanas. Dėl šių sienelės skirtumų bakterijos skirtingai nusidažo Gramo metodu.

Peptidoglikanas yra tik bakterijose. N-acetilmuraminė rūgštis (cukrus) ir DAP (amino rūgštis) niekad neaptinkama archėjų ir eukariotų ląstelių sienelėse. Ne visos bakterijos turi DAP. Ji randama visose Gram – ir kai kuriose Gram + rūšyse, bet daugelis Gram + kokių turi liziną vietoj DAP, o kai kurios Gram + bakterijos – kitas amino rūgštis. Dar viena neįprasta savybė - peptidoglikano sudėtyje yra D konfigūracijos amino rūgščių – D- alaninas ir D- glutamininė rūgštis. Baltymus sudarančios amino rūgštys yra vien L- stereoizomerai.

### **Šviesinė mikroskopija**

Įprastiniams mikrobiologijos darbams naudojami šviesos mikroskopai. Naudojami keli šviesinių mikroskopų tipai: šviesaus lauko, fazių kontrasto, tamsaus lauko, fluorescenciniai. Labiausiai paplitę šviesaus lauko mikroskopai. Jame yra du lęšių tipai – objektyvo ir okuliario lęšiai. Pavyzdžiai, stebimi šiuo mikroskopu tampa matomi dėl kontrasto tarp jų ir juos supančios terpės. Taip lengva matyti spalvotus organizmus, tačiau daugelį mikroorganizmų sunku, nes jie neišsiskiria iš terpės. Todėl jie yra dažomi.

Šviesinis mikroskopas didina iki 1500 -2000 kartų, o skiriamoji geba –apie 0,2  $\mu\text{m}$ . Tai reiškia, kad taškai, esantys arčiau vienas kito nei šiuo atstumu, bus neatskiriami. Paprastai okuliario padidinimas būna 10x -15x, objektyvų 10x – 100x. Didelio padidinimo objektyvams naudojamas imersinis aliejus, kuris padidina šviesos surinkimą.

Fazinio kontrasto mikroskopijoje mėginiai nedažomi, panaudojama ta savybė, kad mikroorganizmai laužia šviesos spindulius kitaip negu terpė (kitoks refrakcijos indeksas). Šis efektas sustiprinamas.

Tamsaus lauko mikroskopas įrengtas taip, kad šviesa pasiektų mėginį iš šonų. Tokiu būdu lęšius pasiekia tik mėginio išsklaidyta šviesa. Šiuo būdu galima stebėti mikroorganizmų judėjimą, žiuželius.

### **Mikroorganizmų dažymas**

Bakterijas sunku stebėti mikroskopu nedažytas, nes daugelis jų yra bespalvės. Be to, specialūs dažymo būdai taikomi norint išryškinti įvairias morfologines bakterinės ląstelės struktūras - žiuželius, kapsules, endosporas.

Pavyzdžių dažymui naudojami dažai yra organiniai junginiai, kurie yra afiniški tam tikroms ląstelių medžiagoms. Daugelis dažniausiai naudojamų dažų turi teigiamą krūvį (vadinami katijoniniai, baziniai dažai) ir sąveikauja su neigiamą krūvį turinčiomis medžiagomis – nukleino rūgštimis ir rūgštiniais polisacharidais. Kadangi ląstelės paviršius paprastai turi neigiamą krūvį, šie dažai tinka tiesioginiam ląstelių dažymui. Tokie yra safraninas, metileno mėlynasis (metileno mėlynojo chloridas), kristalinis violetas, safraninas.

Jei dažanti medžiaga neigiamas jonas – dažai rūgštiniai (anijoniniai) – Kongo raudonasis, nigrozinai. Rūgštiniai dažai kaupiasi aplink mikroorganizmus nepatekdami į jų vidų – šiuo atveju mikroorganizmai lieka bespalviai ir išryškėja spalvoto fono dėka. Toks dažymas vadinasi negatyviuoju arba netiesioginiu.

Diferenciniai dažai taip pavadinti todėl, kad ne visas ląstelių rūšis dažo vienodai. Pvz. Dažant pagal Gramą vienos bakterijos nusidažo violetine spalva (gram +) o kitos rausva (gram -).

## **1. dalis. Tiesioginis dažymas, mikroorganizmų formos nustatymas**

### **Darbo priemonės**

Mikroskopas su 100x didinančiu imersiniu objektyvu  
imersinis aliejus  
objektiniai stikleliai  
spiritinė lempelė  
mikrobiologinė kilpelė arba automatinė pipetė ir sterilūs antgaliai  
metileno mėlynojo dažų tirpalas

### **Tepinėlio paruošimas**

Ant objektinio stiklelio užlašinamas mažas lašas vandens. Nuo lėkštelės sterilia kilpele paimamas nedidelis kiekis mikroorganizmų, kilpele keliskart paliečiamas lašelis – jis turi susidrumsti. Tada lašelis tolygiai išsklaidomas po visą stiklelio paviršių, kad susidarytų plonas tepinėlis. Mėginys gali būti paimamas iš skystos kultūros, tuomet vandens lašinti nereikia.

### **Fiksavimas**

Prieš dažymą mikroorganizmai fiksuojami ant objektinio stiklelio – tam, kad nenusiplautų dažymo metu. Dažniausiai naudojamas išdžiovinimas ore ir pakaitinimas ant spiritinės lempelės liepsnos.

Objektinis stiklelis pašildomas spiritinės lempelės liepsnoje – keliskart pravedamas virš liepsnos. Per didelis karštis gali deformuoti mikroorganizmus ir gram teigiamos bakterijos gali nusidažyti gram neigiamai. Stiklelis turi būti šiltas, bet ne per karštas laikyti.

### **Dažymo eiga:**

1. Ant objektinio stiklelio padarykite bakterijų suspensijos tepinėlį;
2. išdžiovinkite ore;
3. fiksuokite preparatą mikrobiologinės lempelės liepsnoje;
4. užpilkite tepinėlį metileno mėlynojo dažais ir palaikykite vieną minutę;
5. nuplaukite dažų perteklių vandeniui;
6. išdžiovinkite objekcinį stiklelį ore.

Mėginys stebimas naudojant šviesinį mikroskopą.

Vietoj metileno mėlynojo galima naudoti safraniną (dažyti 1min.), bazinį fuksiną, Genciano violetinį (dažyti 30s) ar kitus dažus.

### **Dažniausios klaidos ruošiant mikroskopinį preparatą:**

Per storas tepinėlis. Šiuo atveju stebint mikroskopu matosi vientisa nudažytų bakterijų masė, sunku nustatyti ląstelės formą.

Per stiprus kaitinimas fiksuojant. Bakterijų ląstelės gali deformotis, suirti.

## **2. dalis. Dažymas pagal Gramą**

Bakterijos skirstomos į dvi pagrindines grupes – Gram neigiamas ir Gram teigiamas – pagal tai, kaip dažosi šiuo būdu. Skirtingą dažymosi būdą nulemia sienelės struktūra. Gram neigiamų bakterijų sienelėje peptidoglikanas (mureinas) sudaro tik 10-20proc. sienelės, tuo tarpu gram teigiamose – 60-90 proc. Pirmojo dažymo (genciano violetu) metu nusidažo abiejų grupių bakterijos. Dažymo procedūros metu įdėjus jodo, susidaro netirpūs kristalo violeto - jodo kompleksai, kurie iš gram teigiamų bakterijų neišsiplauna tačiau iš gram neigiamų dažai išsiplauna

etanoliu. Gram neigiamos bakterijos po ekstrakcijos etanoliu vėl tampa bespalvės, todėl, kad jos būtų matomos per mikroskopą, reikalingas antras dažymas – safraninu arba baziniu fuksinu.

### **Darbo priemonės**

Mikroskopas su 100x didinančiu imersiniu objektyvu

imersinis aliejus

objektiniai stikleliai

spiritinė lempelė

mikrobiologinė kilpelė arba automatinė pipetė ir sterilūs antgaliai

Genciano violeto (kristalinio violeto) dažų tirpalas

Jodo tirpalas

etanolis

Safranino arba bazinio fuksino dažų tirpalas

### **Dažymo eiga**

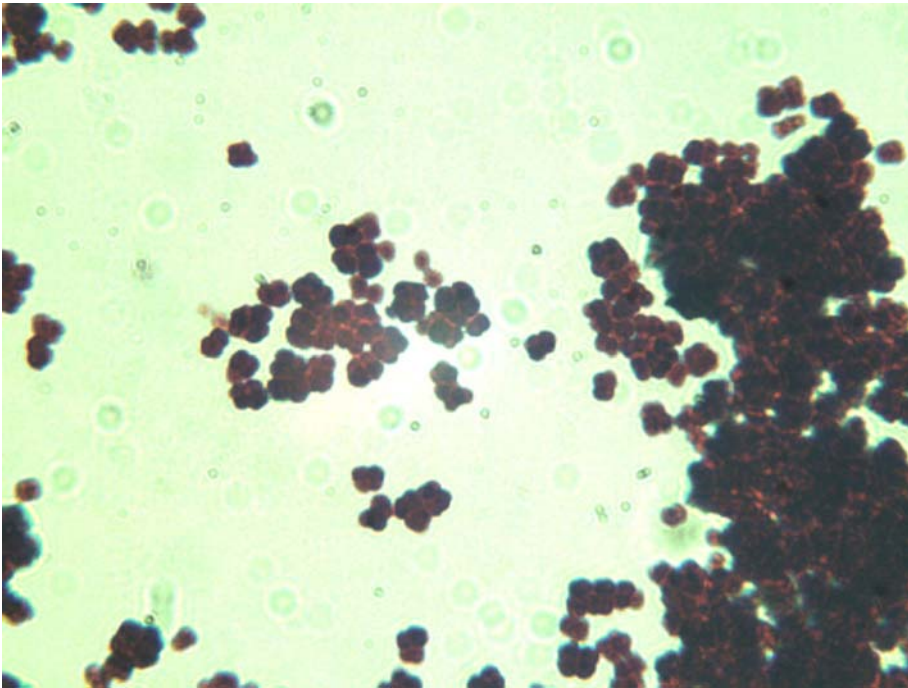
Dažymo eigoje inkubacijos su dažais trumpos, todėl prieš pradėdami dirbti įsitikinkite, kad visi reagentai yra lengvai pasiekiami. Tai kristalinio (Genciano) violeto ir fuksino dažai, etanolis, distiliuotas vanduo ir jodo tirpalas.

1. Ant objekcinio stiklelio padarykite tiriamųjų ir kontrolinių bakterijų suspensijos tepinėlius.
2. Išdžiovinkite ore.
3. Fiksuokite preparatą mikrobiologinės lempelės liepsnoje.
4. Pirminis dažymas: užpilkite preparatus genciano violetinio dažais, palaikykite 1min. Mėginys nusidažo mėlynai violetine spalva.
5. Dažų perteklių nuplaukite vandeniu (kelias sekundes).
6. Užpilkite preparatą jodo tirpalu. Palaikykite 1 min. Mėginys turi išlikti tokios pat spalvos.
7. Nuplaukite jodo tirpalą vandeniu (kelias sekundes).
8. Ekstrakcija. Užpilkite preparatą keliais etanolio lašais, palaukite kol spalva ploniausiose preparato vietose išbluks (3 sekundes), nupilkite etanolį ir greit praplaukite mėginį vandeniu (kelias sekundes). Labai svarbu neperlaikyti mėginio su etanoliu, nes galima išplauti dažus ne tik iš Gram neigiamų, bet ir iš Gram teigiamų bakterijų.
9. Antrinis dažymas. Užpilkite mėginį bazinio fuksino dažais, palaikykite 1 minutę.
10. Nuplaukite mėginį vandeniu (kelias sekundes), naudodami pipetę.

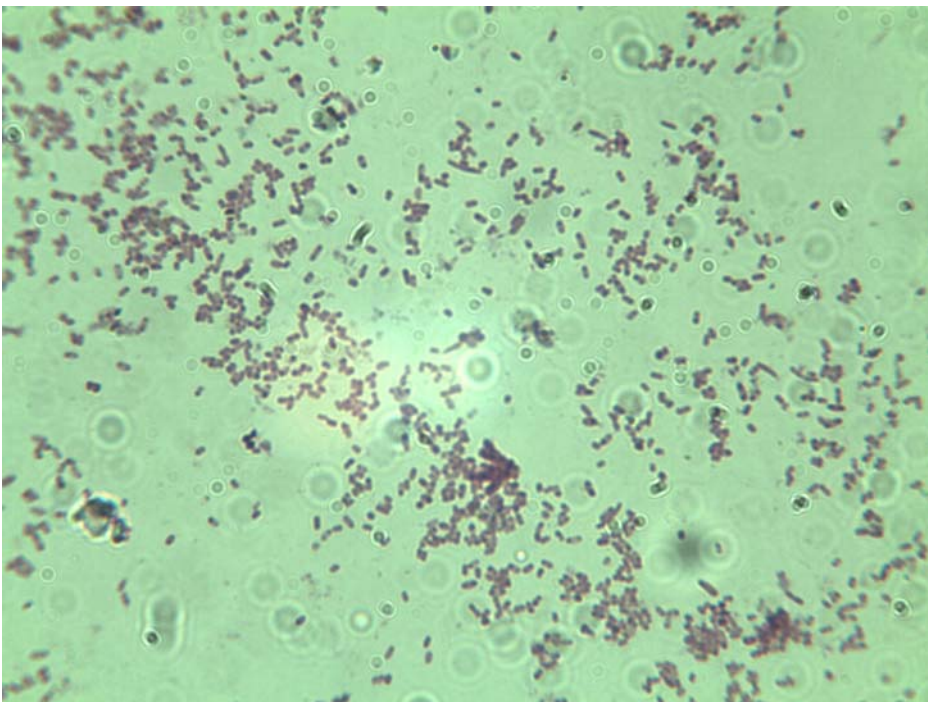
11. Išdžiovinkite preparatą ore.

Šio dažymo metu gram teigiamos bakterijos nusidažo mėlynai violetine spalva, Gram neigiamos – rausvai.

**1pav. Gramteigiamos bakterijos (*Micrococcus*)**



**2pav. Gramneigiamos bakterijos (*Escherichia coli*)**



Kaip kontrolę patikrinimui, ar dažymo procedūra atlikta teisingai, galima paimti mėginį nuo dantų, patalpinti į švarų vandens lašą ant objektinio stiklelio ir atlikti su juo visą dažymo procedūrą (lygiagrečiai tiriamam mėginiui). Šiame mėginyje bus Gram teigiamų ir gramneigiamų bakterijų bei neutrofilų, kurių branduoliai turėtų nusidažyti rausvai, jei dažymo procedūra atlikta teisingai. Leukocitai ir makrofagai turėtų dažytis Gram neigiamai, epitelio ląstelės Gram teigiamai.

Kitas kontrolės būdas – atlikti dažymo procedūrą naudojant gram teigiamų (pvz. *Bacillus*) ir gram neigiamų (pvz. *E.coli*) bakterijų mišinį.

Jei dažymas neišryškino skirtumo tarp žinomų gram teigiamų ir gram neigiamų ląstelių, dažymą pakartokite, modifikuodami dažymo, ekstrakcijos ar plovimo trukmę.

### **Faktoriai, galintys paveikti dažymą:**

Perkaitinimas fiksacijos metu (pažeidžiama bakterijų sienelė)

Per ilgą laikymą su etanoliumi. Per ilgą plovimą vandeniu. Dėl to gali išsiplauti kristalo violeto – jodo kompleksai net ir iš gram teigiamų bakterijų.

Kai kurios gram teigiamos bakterijos labiau išlaiko kristalo violeto – jodo kompleksą, negu kitos, taigi, dažymas priklauso ir nuo rūšies.

Pernelyg ilgą laikymą antrinais dažais.

### **3.dalis. Gyvų eukariotinių mikroorganizmų preparatų paruošimas.**

#### **Darbo priemonės**

Mikroskopas su fotografavimo sistema

objektiniai stikleliai

dengiamieji stikleliai

pipetė

#### **Darbo eiga**

Ant objektinio stiklelio užlašinkite vandens iš gamtinio vandens telkinio (kūdro, griovio, akvariumo). Uždenkite dengiamuoju stikleliu ir stebėkite mikroskopu naudodami 40x ar 60x didinantį objektyvą.

Nupieškite arba nufotografuokite stebimus mikroorganizmus ir nustatykite, kokiai grupei jie priklauso (pirmuonys, dumbliai).