

ΓΝΩΡΙΜΙΑ ΜΕ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΡΩΣΗΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ

Στόχοι εργαστηριακής άσκησης

Να μπορούν οι μαθητές και οι μαθήτριες:

- Να αναγνωρίζουν την αναγκαιότητα χρώσης των παρασκευασμάτων με ειδικές χρωστικές για τη βελτίωση της παρατηρούμενης εικόνας στο οπτικό μικροσκόπιο.
- Να διακρίνουν τις χρωστικές σε κατηγορίες με βάση τη χημική τους συμπεριφορά.
- Να επιλέγουν την κατάλληλη χρωστική ανάλογα με το ζητούμενο πειραματικό αποτέλεσμα.

Θεωρητικό υπόβαθρο

Η παρατήρηση των μικροσκοπικών παρασκευασμάτων γίνεται είτε **άμεσα** (παρατήρηση ζωντανού οργανισμού ή δομών του στη φυσική τους κατάσταση) είτε μετά από **στερέωση** (νέκρωση) ή και **χρώση** του υλικού. Στην πρώτη περίπτωση τα παρασκευάσματα χαρακτηρίζονται ως **προσωρινά** ή **νωπά**, ενώ στη δεύτερη ως **μόνιμα**.

Παρασκευάσματα που προέρχονται από ζωντανούς οργανισμούς (μονοκύτταροι οργανισμοί, μικροσκοπικοί πολυκύτταροι οργανισμοί, κύτταρα ή ιστοί οργανισμών) περιέχουν νερό σε μεγάλο ποσοστό με αποτέλεσμα να είναι σχεδόν αόρατα αν παρατηρηθούν στο μικροσκόπιο χωρίς καμία ιδιαίτερη επεξεργασία. Για να γίνουν ορατά στο οπτικό μικροσκόπιο εφαρμόζονται κατάλληλες **τεχνικές χρώσης**. Ποικιλία χρωστικών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη χρώση νωπών ή μόνιμων παρασκευασμάτων, ενώ ταυτόχρονα υπάρχουν δυνατότητες για **επιλεκτική χρώση** συγκεκριμένων τμημάτων του παρασκευάσματος. Πιο συγκεκριμένα, η διαφορετική χημική σύσταση των διαφορετικών κυτταρικών στοιχείων προκαλεί τη διαφορετική συμπεριφορά τους απέναντι στην ίδια χρωστική.

Οι κυριότεροι τρόποι με τους οποίους ενώνονται οι χρωστικές ουσίες με τα κυτταρικά συστατικά είναι **χημικά** και **με προσρόφηση**. Ανάλογα με τη χημική τους σύσταση, άλλες βάφουν όλες ανεξαιρέτως τις «διαφανείς» δομές και άλλες βάφουν εκλεκτικά μόνο ορισμένες.

Η πλειονότητα των χρωστικών είναι **οργανικές αρωματικές ενώσεις**. Οι χρωστικές διακρίνονται χημικά σε δύο κατηγορίες: στις **βασικές** ή **κατιονικές** (θετικά φορτισμένες χρωστικές) και στις **όξινες** ή **ανιονικές** (αρνητικά φορτισμένες χρωστικές). Σε μια βασική χρωστική, η χρωμοφόρος ομάδα, δηλαδή η προσδιοριστική του χρώματος, είναι κατιονική π.χ. κυανού του μεθυλενίου, πράσινο του μεθυλίου, σαφρίνη και κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet). Μια όξινη χρωστική περιέχει ανιονικό χρωμοφόρο π.χ. εωσίνη, όξινη φουξίνη και ερυθρό του Κονγκό (Congo red).

Κατά συνέπεια, οι **κατιονικές χρωστικές** συνδέονται με τα αρνητικά φορτισμένα συστατικά του κυττάρου π.χ. με τα νουκλεϊκά οξέα ή τους όξινους πολυσακχαρίτες. Επειδή οι επιφάνειες των κυττάρων είναι αρνητικά φορτισμένες, οι χρωστικές της κατηγορίας αυτής μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως γενικής χρήσης χρωστικές. Οι **ανιονικές χρωστικές** συνδέονται με τα θετικά φορτισμένα συστατικά του κυττάρου όπως οι πρωτεΐνες.

Ο παρακάτω πίνακας συνοψίζει τις κυριότερες χρωστικές που χρησιμοποιούνται στη μικροσκοπία.

Χρωστική	Σύσταση	Χρήση
Lugol	1g I (κρυσταλλικό) 2g KI 100ml απεσταγμένο νερό	Φυτικοί ιστοί Βακτήρια
Methylene blue	1g Methylene blue 100ml απεσταγμένο νερό	Ζωικά κύτταρα
Εωσίνη	1g εωσίνη 100ml απεσταγμένο νερό	Φυτικοί ιστοί Ζωικοί ιστοί
Giemsa	3ml Giemsa 49ml NaHPO ₄ 0,2M 51ml NaH ₂ PO ₄ 0,2M 100ml απεσταγμένο νερό	Πυρήνας Παράσιτα στο αίμα π.χ. πρωτόζωα του γένους <i>Plasmodium</i>
Όξινη φουξίνη	0,5g όξινη φουξίνη 100ml απεσταγμένο νερό	Αίμα Συνδετικός ιστός
Bismark brown	90ml κορεσμένο διάλυμα Bismark brown σε απεσταγμένο νερό 30ml αλκοόλη 70%	Βακτήρια Πυρήνας

Οι χρωστικές που συνηθέστερα χρησιμοποιούνται στο σχολικό εργαστήριο είναι οι εξής:

- **Ιώδιο:** χρωματικός δείκτης για την ανίχνευση του αμύλου όταν χρησιμοποιείται με προσθήκη KI. Και αυτό γιατί το I₂ είναι δυσδιάλυτο στο νερό, ενώ διαλύεται στο υδατικό διάλυμα του KI. Για την παρασκευή του αντιδραστηρίου που είναι γνωστό ως **Lugol** διαλύονται 1-2g KI σε 200-300ml απεσταγμένου νερού με προσθήκη στο διάλυμα 1g I₂. Η χρωματική αντίδραση του ιωδίου σε τομές νωπού φυτικού υλικού παρουσιάζει μια ποικιλότητα ανάλογα με τη χημική σύσταση: το άμυλο βάφεται **μπλε**, η κυτταρίνη, οι πρωτεΐνες και τα

αλκαλοειδή βάφονται καφέ, ενώ οι πηκτίνες και η υμενίνη βάφονται **κίτρινες**.

- **Πράσινο του μεθυλίου (methyl green staining solution):** κατιονική χρωστική που αντιδρά ειδικά με τα σύμπλοκα DNA – πρωτεϊνών λόγω των φωσφορικών ριζών του DNA.
- **Μπλε του μεθυλενίου (methylene blue solution):** κατιονική χρωστική που βάφει τη χρωματίνη (σύμπλοκο DNA – πρωτεϊνών) του πυρήνα.

Αντικείμενο της παρούσας εργαστηριακής άσκησης είναι η **μικροσκοπική παρατήρηση φυτικών κυττάρων μετά από χρώση**. Για τον σκοπό αυτό προσφέρεται ιδιαίτερα ο βολβός του κρεμμυδιού. Οι λευκοί χιτώνες του βολβού του κρεμμυδιού καλύπτονται εσωτερικά από έναν υμένα. Αυτός αποτελείται από μία μόνο στιβάδα κυττάρων, γεγονός που διευκολύνει τη μικροσκοπική παρατήρηση.

Σημείωση

*Τα **αλκαλοειδή** είναι ιδιαίτερη κατηγορία οργανικών ενώσεων που περιέχουν άζωτο και εντοπίζονται κυρίως σε φυτά (π.χ. μορφίνη, νικοτίνη, καφεΐνη). Οι **πηκτίνες** είναι οργανικές ενώσεις της ομάδας των πολυσακχαριτών. Εντοπίζονται στα κυτταρικά τοιχώματα και τους μεσοκυττάριους χώρους πολλών φυτικών ιστών. Η **υμενίνη** είναι προϊόν λιπιδικής φύσης που μοιάζει με κερί και επικάθεται στην επιφάνεια τοιχωμάτων επιδερμικών κυττάρων που έρχονται σε επαφή με το περιβάλλον. Καθιστά το κυτταρικό τοίχωμα αδιάβροχο και μειώνει την απώλεια νερού από το φυτικό κύτταρο.*

Εκτιμώμενη διάρκεια άσκησης

Η εκτιμώμενη διάρκεια της άσκησης είναι μία διδακτική ώρα.

Εργαλεία και Υλικά

Εργαλεία

- Οπτικό μικροσκόπιο

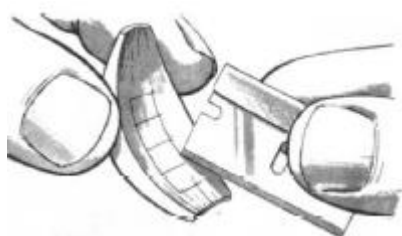
Υλικά

- Αντικειμενοφόρες πλάκες (75 mm x 25 mm)
- Καλυπτρίδες
- Ξυραφάκι ή νυστέρι
- Ανατομικές βελόνες και ανατομικές λαβίδες με λεπτά άκρα
- Σταγονόμετρο
- Διηθητικό χαρτί ή χαρτί κουζίνας
- Βολβός κρεμμυδιού
- Διάλυμα Lugol.
- Διάλυμα μπλε του μεθυλενίου

Πειραματική διαδικασία

Βήμα 1: Κατασκευή νωπού παρασκευάσματος

1. Στο κέντρο μιας αντικειμενοφόρου πλάκας τοποθέτησε με τη βοήθεια του σταγονόμετρου μία σταγόνα του διαλύματος Lugol.



μικρού σου δακτύλου).

2. Ξεφλούδισε ένα κρεμμύδι, κόψε το κρεμμύδι στη μέση και αφάιρεσε έναν εσωτερικό λευκό χιτώνα. Χάραξε, στην εσωτερική του πλευρά, με πολύ κοφτερό ξυραφάκι, επιφάνεια εμβαδού $4-5\text{mm}^2$ (όσο το νύχι του



3. Με τη λαβίδα αφαιρείς τον λεπτό υμένα, φροντίζοντας να μην παρασύρεις και ιστό από την κάτω του πλευρά.

Συμβουλή

Το παρασκεύασμα πρέπει να είναι λεπτό και διαφανές. Εάν η τομή είναι χοντρή, σημαίνει ότι περιλαμβάνει περισσότερες στιβάδες κυττάρων. Στην περίπτωση αυτή, η παρατήρηση αυτή γίνεται στα άκρα του παρασκευάσματος, όπου η τομή είναι συνήθως λεπτότερη.

4. Τοποθετείς το κομμάτι του υμένα στη σταγόνα Lugol που έχεις ήδη ρίξει στην αντικειμενοφόρο πλάκα, προσέχοντας να μην αναδιπλωθεί. Αν αναδιπλωθεί, το ισιώνεις με τη βοήθεια ανατομικής βελόνας.
5. Καλύπτεις το παρασκεύασμα με μια καλυπτρίδα προσέχοντας να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες αέρα.

Συμβουλή

Αν το παρασκεύασμα έχει φυσαλίδες, στάζεις μία-δύο σταγόνες νερού στη μια άκρη της καλυπτρίδας και απορροφάς το νερό από την απέναντι πλευρά. Έτσι παρασύρονται οι φυσαλίδες. Σκουπίζεις το υπόλοιπο νερό με διηθητικό χαρτί.



6. Με ένα κομμάτι διηθητικού χαρτιού προσροφάς το τυχόν πλεόνασμα χρωστικής στα όρια της καλυπτρίδας.

7. Επανάλαβε τη διαδικασία χρησιμοποιώντας ως χρωστική το μπλε του μεθυλενίου.

Βήμα 2: Παρατήρηση παρασκευάσματος στο μικροσκόπιο

Παρατήρησε τα δύο παρασκευάσματά σου (το ένα με τη χρωστική Lugol και το δεύτερο με τη χρωστική μπλε του μεθυλενίου) στο μικροσκόπιο, αρχίζοντας από τη μικρότερη μεγέθυνση.

Φύλλο Εργασίας

Δραστηριότητα σχεδίασης

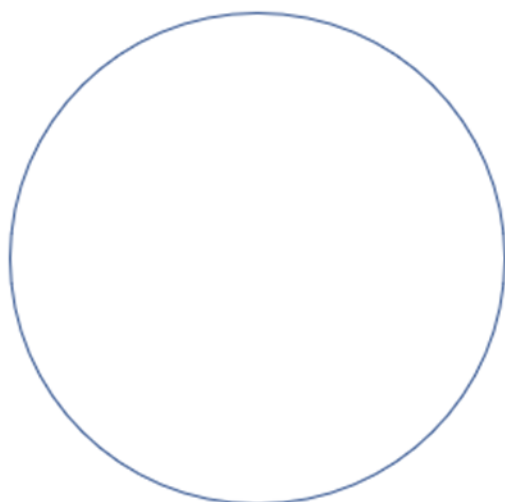
Σχεδίασε παρακάτω, όσο καλύτερα μπορείς, και στη μεγέθυνση που θεωρείς ότι σου δίνει την καλύτερη εικόνα, το παρασκεύασμα που παρατήρησες.

Κάνε δύο σχέδια, ένα για κάθε παρασκεύασμα, δηλαδή για κάθε είδος χρώσης. Τοποθέτησε βέλη για να ονομάσεις τις δομές του κυττάρου που μπορείς να διακρίνεις. Επίσης, υπολόγισε την τελική μεγέθυνση που χρησιμοποίησες σε κάθε παρατήρηση.

1^η Παρατήρηση

Τίτλος:

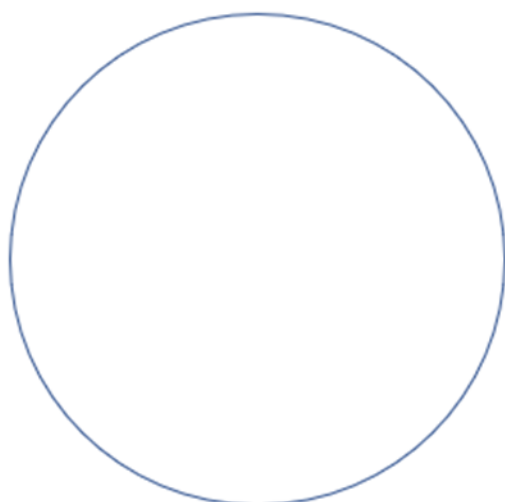
Μεγέθυνση:



2^η Παρατήρηση

Τίτλος:

Μεγέθυνση:



Εφαρμογές – Γενίκευση – Μικροερμηνείες

Δραστηριότητα απάντησης ερωτήσεων

1. Τι σχήμα έχουν τα κύτταρα του κρεμμυδιού που παρατηρείς; Σε τι οφείλεται το σταθερό τους σχήμα;

.....
.....
.....

.....
.....
.....
2. Σε ποια θέση του κυττάρου βρίσκεται συνήθως ο πυρήνας;

.....
.....
.....
.....
.....
3. Ποιο είναι συνήθως το σχήμα του πυρήνα; Πόσοι πυρηνίσκοι υπάρχουν σε κάθε πυρήνα;

.....
.....
.....
.....
.....
4. Το μπλε του μεθυλενίου βάφει τη χρωματίνη. Γιατί κατά τη γνώμη σου βάφει περισσότερο τον πυρήνα από το κυτταρόπλασμα του κυττάρου;

.....
.....
.....
.....
.....
5. Εντόπισε και κατάγραψε τις διαφορές στην παρατηρούμενη εικόνα κατά τη σύγκριση των δύο παρασκευασμάτων.

Βιβλιογραφικές Αναφορές

1. Russell, J. E. (2001). Μικροσκοπία για τους εκπαιδευτικούς: Ανακαλύπτοντας τον κόσμο μέσα από τη στρογγυλή λυχνία. Εκδόσεις Μπουκουμάνης.
2. Δρακωνάκη Ν., Ε.Κ.Φ.Ε Ηλιούπολης (2008) Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιολογίας Γυμνασίου. Ανακτήθηκε από:
https://ekfe-ilioup.att.sch.gr/old/images/files/pdf/askiseis/microscope_gsio_part_1.pdf
3. Αλεξίου Χατζάκη Μ., Τσικρικώνα Χ., Μαλάτος Σ., Εργαστηριακό Μάθημα Ι, Σημειώσεις και Πρωτόκολλα Εργασίας για την Ενότητα: Εισαγωγή στη Βιολογία, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης.