

Χρώση και παρατήρηση νωπών παρασκευασμάτων

Η παρατήρηση νωπών παρασκευασμάτων βελτιώνεται σημαντικά με τη χρησιμοποίηση ορισμένων μη τοξικών χρωστικών ουσιών, οι οποίες έχουν την ικανότητα να χρωματίζουν συγκεκριμένα κύτταρα ή ενδοκυτταρικά στοιχεία in vivo, διαπερνώντας τις πλασματικές μεμβράνες χωρίς να θίγουν τη δομή και τη λειτουργικότητα τους. Πρόκειται για την εφαρμογή της vital χρώσης που επιτρέπει να αναγνωρίζονται και να ξεχωρίζουν οπτικά ορισμένα μέρη του κυττάρου, τα οποία κανονικά διακρίνονται με δυσκολία. **Πιο συγκεκριμένα, η διαφορετική χημική σύσταση των διαφορετικών κυτταρικών στοιχείων προκαλεί τη διαφορετική συμπεριφορά τους απέναντι στην ίδια χρωστική. Αυτό συμβαίνει διότι η χρωστική αποταμιεύεται διαφορετικά είτε επειδή συνδέεται χημικά με ορισμένα ενδοκυτταρικά συστατικά, είτε επειδή διαλύεται σε μια συγκεκριμένη κυτταρική φάση με τη μορφή μορίων ή ιόντων. Έτσι εκδηλώνεται η διαφορετική χρώση των επί μέρους συστατικών.**

Η πλειονότητα των χρωστικών είναι οργανικές αρωματικές ενώσεις. Οι χρωστικές διακρίνονται χημικά σε δύο κατηγορίες στις **βασικές** ή **κατιονικές** και στις **όξινες** ή **ανιονικές**. Σε μια βασική χρωστική η χρωμοφόρος ομάδα, δηλαδή η προσδιοριστική του χρώματος, είναι κατιονική. Τέτοιες βασικές χρωστικές είναι **το κυανούν του μεθυλενίου** και **το πράσινο του μεθυλίου**. Μια όξινη χρωστική, περιέχει ανιονικό χρωμοφόρο και σαν παράδειγμα αναφέρεται το κυανούν της ανιλίνης. Η ένταση της χρώσης που πραγματοποιείται με μία κατιονική ή ανιονική χρωστική εξαρτάται από την οξύτητα ή την αλκαλικότητα του μέσου. Για μία κατιονική χρωστική όσο πιο μεγάλος είναι ο βαθμός διάστασης με σύγχρονη απελευθέρωση κατιόντων (χαμηλό pH), τόσο μεγαλύτερη ποσότητα χρωστικής δεσμεύεται. Αντίστοιχα και μία ανιονική χρωστική δίνει εντονότερη χρώση σε υψηλό pH.

1. Κυανούν του μεθυλενίου: Είναι βασική χρωστική της ομάδας της θειαζίνης με μικρή διαλυτότητα στο νερό(3.55%) και μικρότερη στην αλκοόλη(1.48%). Είναι άριστη χρωστική για βακτηριολογικές μελέτες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για παρατηρήσεις στο μικροσκόπιο. Το κυανούν του μεθυλενίου ανάγεται μετά από πρόσληψη δύο ηλεκτρονίων από ένα δέκτη και με τη σειρά του θα δώσει τα ηλεκτρόνια στο O₂ αποτελώντας έτσι ένα παράλληλο δρόμο μεταφοράς ηλεκτρονίων στο οξυγόνο. Έτσι μπορεί να εκτιμηθεί η μεταβολική δραστηριότητα των μικροβίων με την αναγωγή (αποχρωματισμό) του κυανού του μεθυλενίου παρέχοντας μια γενική εικόνα για την ποιότητα π.χ του ακατέργαστου όσο και του παστεριωμένου γάλακτος. Η χρωστική υπάρχει έτοιμη στα εργαστήρια του Λυκείου και στο εμπόριο.

2. Πράσινο του μεθυλίου: Είναι βασική χρωστική και θεωρείται ειδική για το σύμπλοκο πρωτεΐνη-DNA. Η αντίδραση οφείλεται στις φωσφορικές ρίζες του DNA. Στο σύμπλοκο πράσινο του μεθυλίου-DNA αντιστοιχούν δέκα άτομα φωσφόρου ανά μόριο χρωστικής. Για την παρασκευή του, ρίχνουμε 1,9g σκόνης πράσινου του μεθυλίου (που υπάρχει στο εργαστήριο), σε 95ml 50% λευκού οινόπνευματος.(50 ml αλκοόλης 95% σε 45 ml νερού).

3. Ιώδιο: Ανήκει σε ομάδα ουσιών χωρίς χρωμοφόρες ομάδες δηλαδή χωρίς να είναι χρώματα από χημική άποψη, χρησιμεύουν ως μικροχημικοί δείκτες γιατί εμφανίζουν χρωματικό αποτέλεσμα. Το ιώδιο είναι γνωστό ως χρωματικός δείκτης για την ανίχνευση του αμύλου, όταν χρησιμοποιείται με προσθήκη ΚJ. Και αυτό διότι το J₂ είναι δυσδιάλυτο στο νερό, ενώ διαλύεται στο υδατικό διάλυμα του ΚJ. Για την παρασκευή του αντιδραστήριου που είναι γνωστό ως **Lugol** διαλύονται 1-2 gr ΚJ σε 200-300 ml απεσταγμένου νερού με προσθήκη στο διάλυμα 1 gr J₂.

Η χρωματική αντίδραση του ιωδίου σε τομές νωπού φυτικού υλικού παρουσιάζει μια ποικιλότητα ανάλογα με τη χημική σύσταση:

Μπλε: Καφέ: Κίτρινο:

Άμυλο Κυτταρίνη Πηκτίνες

Πρωτεΐνες Υμενίνη

Αλκαλοειδή Καλόζη

Εξαιτίας της χαρακτηριστικής δομής του μορίου του αμύλου με την προσθήκη ιωδίου, το ιώδιο τοποθετείται στις κοιλότητες του μορίου (το άμυλο έχει ελικοειδή μορφή), με αποτέλεσμα το χαρακτηριστικό βαθύ μπλε χρώμα (παρατήρηση αμυλοκόκκων).