

Morfologické a cytologické znaky

- pomáhají **IDENTIFIKACI** (rod i druh, př: plísně, mikrokoky - pigment)
- pomocí nich se provádí kontrola **kontaminace** kultury (posuzujeme dva či více odlišných nárůstů)
- posouzení **fyziologického stavu** kultury

- makroskopické **morfologické znaky**: popis kolonií

- mikroskopické **cytologické znaky** – jen mikroskopické (vnitřní struktury, i preparace: fixace, barvení...); nativní preparát (pozorování fázovým kontrastem) barvené preparáty (zviditelní morfologii buňky a jejich struktur: Gramovo, Ziehl Nielsenovo, strukturální barvení)

Makroskopické a mikroskopické znaky se hodnotí pospolu!

I. Morfologie – makroskopické znaky

Bakteriální druh – vzhled kolonie ovlivněn - typem živné půdy!!
- stářím kultury

Sledování znaků na mediích: MPB, MPA; kvasinky, plísně – sladina.

Sledování kolonií vždy výhodné doplnit mikroskopii.

a) charakter růstu v tekuté půdě – statická kultivace

V různých typech růstu mají buňky jinou morfologii, jiné složení buněčné stěny tedy jiné imunologické vlastnosti

typy růstu v tekutých mediích:

- difúzní zákal – po celém mediu, aerobní
- hrubé vločky – aerobní; Staphylococcus, některé bacily (dáno stěnou b.)
- sedliny – fakultativně anaerobní – Lactobacillus, kvasinky
- blanka – znamená špatnou smáčivost buněk či mycelia a džení vrstvičky silou povrchového napětí (předpřidané povrchově aktivní látky tenzidy - by tedy způsobily ponoření blanky; neionogenní tenzidy – neinhibující množení – způsobí difúzní růst blankotvorných buněk); vyskytuje se u buněk tvořících většinou drsné vrásčité kolonie, aerobních; vzhled kožovitý (plísně), suchý vrásčitý křís (oxidativní kvasinky); u stárnoucí kultury blanka sedá.
Pozn.: „mázdra“ = povrchový útvar sedlinotvorných kvasinek, které kvašením vyčerpaly sacharidy a počaly aerobně využívat vlastní vyprodukovaný ethanol.

b) charakter růstu na šikmém agaru

Jak postupovat, abychom na šikmý agar naočkovali kulturu nejvhodněji pro pozorování: používáme předsušený agar (odpadá problém s kondenzační vodou). Rozdíl oproti uchovávání buněk na šikmém agaru, kdy je naopak voda žádoucí – vlhkost).

Očkovat nejlépe: jehlou (ne klička – příliš široká) rovná čára.

Kultivace: 24-48h (kvasinky 2-3 dny)

Takto můžeme posoudit rychlost růstu, tvar nátěru: rovný plný, bodový, ostnitý, rhizoidní; profil nátěru – plochý, vypouklý); povrch nátěru – lesklý, drsný, suchý; konzistenci; pigmenty; exopigmenty - porovnejte rozdíl

c) Popis kolonie bakteriálního druhu

Kolonie je klon buněk narostlý z jednotlivé buňky očkovaného kmene

Zjišťujeme: viz příloha „Morfologie kolonií“.

Nerovnosti růstu – stářím kolonie.

Mukoidní (M) charakter růstu – vlhké slizovité a velmi lesklé kolonie tvořené opouzdřenými buňkami (*Azotobacter*, *Leuconostoc*).

Hladké (S) kolonie – rovný okraj s leskem nebo bez lesku u neopouzdřených buněk.

Drsné (R) kolonie – suché s nerovnými okraji, liší se výškou vrásnění, rostou tak buňky tvořící řetízky, mycelia či pseudomycelia (*Bacillus*; kvasinky *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*; *Trichosporon*).

Změny M – S – R jedny v druhé jsou důsledkem mutací.

Př: infekční materiál – většinou M-kmeny; po několika přeočkováních změna v S-kmeny. Z nich M-forma zpátky těžko získatelná!

Mohou mít R genotypy hladké kolonie??:

- Fenotyp S, M a R je ovlivněn složením media. Př: přítomnost 1) 20% zkvasitelných sacharidů podporuje S a M typy, R typy jsou na něm hladší. 2) Tenzidy způsobují hladké až lesklé fenotypy R typů.

d) Obrovské kolonie kvasinek a plísní

Kvasinky se očkují na vyšší vrstvu sladiny kapkou suspenze mladších buněk ve fyziologickém roztoku přeneseného očkovací kličkou.

Papily = vznik a pomnožení některých mutantů.

Sektory – genetická nejednotnost, sporulace.

e) Růst ve vpichu šikmého agaru MPA (u bakterií)

Určuje nároky MO na kyslík: aerobní MO rostou v horní části vpichu, anaerobní u dna a FANA po celé délce vpichu.

Jaké je stáří očkované kultury? Inokulum je 24h bujonová kultura.

II. Morfologie a cytologie – mikroskopické znaky

- hodnotí se TVAR, VELIKOST a USPOŘÁDÁNÍ buněk, přítomnost zvláštních „orgánů“ na buňce, způsob rozmnožování viditelný v preparátu

Jakou podobu může mít **mikroskopický preparát**, který pod mikroskopem hodnotíme??

- klasické **podložní sklíčko**, na kterém provádíme diferencovné barvení buněk samotných, či jejich složek, či rozlišujeme živé a mrtvé buňky u vitálního testu (barvení netoxickými barvivy obarví buňku mrtvou, která se již nebrání přijetí barviva); pro úplnost můžeme dodat, že preparát na podložním sklíčku je při barvení buněk většinou fixován (v plameni)

- u nativního preparátu (pozorování suspenze) na podložní sklíčko přikládáme **krycí sklíčko**

- při pozorování plísní, kvasinek či aktinomycet pozorujeme **sklíčkové kultury** (krycí sklíčko je vytaženo z agaru, ve kterém bylo během kultivace zapíchnuto pod úhlem 45° a je tudíž kulturou porostlé - hodnotí se pak na něm najednou substrátové i vzdušné mycelium) nebo kultury narostlé na celofánu (některé kultury prorůstají medium, jsou těžko pro pozorování odejmutelné, na celofánu se s nimi snadno manipuluje).

Zdroje:

Šilhánková, Demnerová (1993): Návod pro laboratoře z mikrobiologie, VŠCHT, Praha

http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/index.html

<http://biomikro.vscht.cz/sylaby/biochmikrorg.htm>

Zkratky:

b. - buňka, bakterie

MO – mikroorganismus

MPA – masopeptonový agar

MPB – masopeptonový bujon

FANA – fakultativně anaerobní