

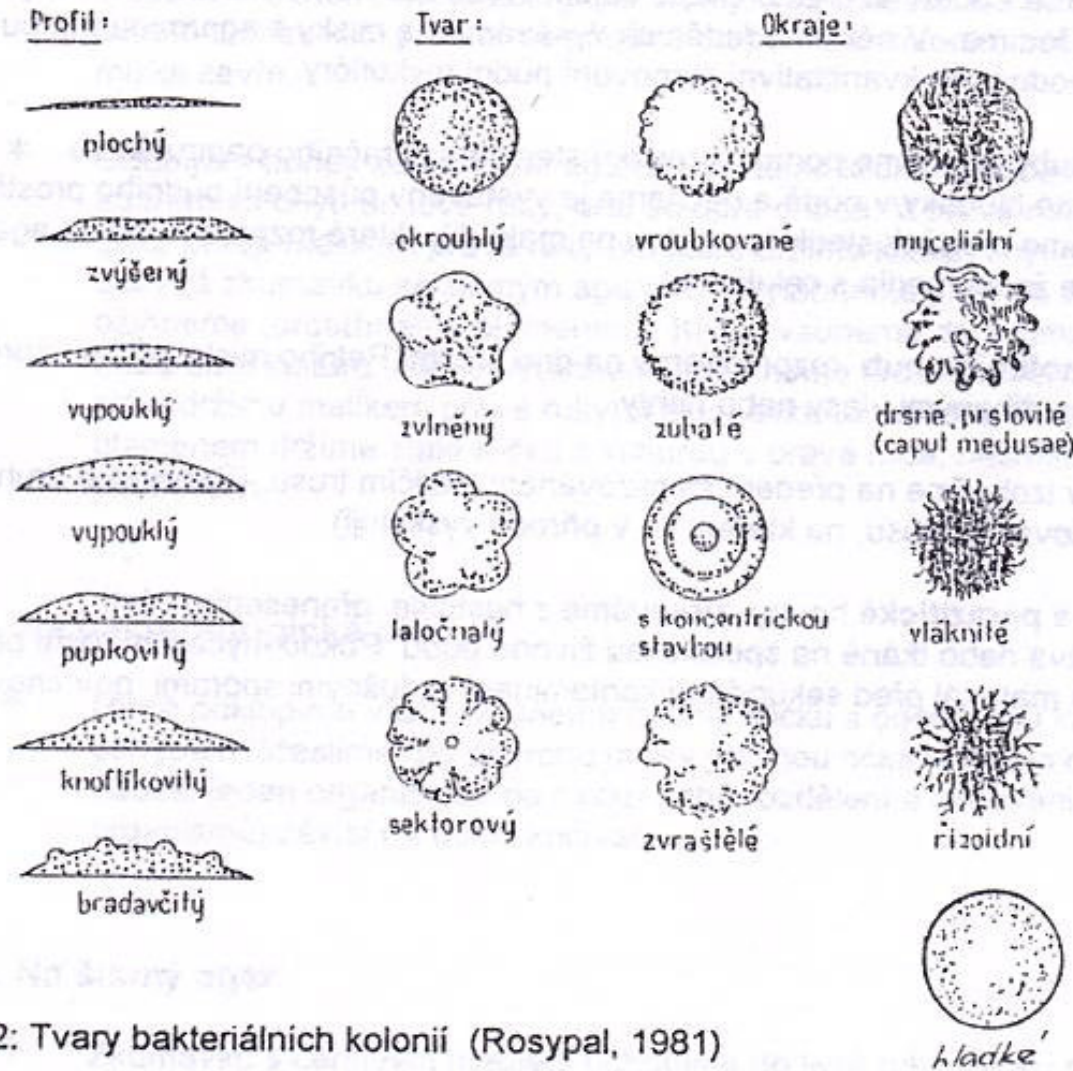
Makroskopické a mikroskopické pozorování bakterií

Cíl – zjištění morfologie bakteriálních kultur z
minulého cvičení

Gramovo barvení

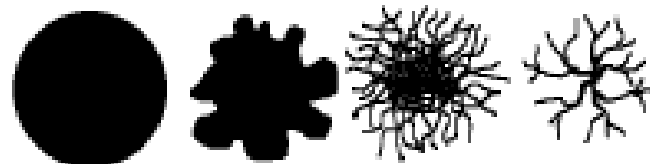
Pozorování preparátů (Gram, nativní preparáty)

- Při správně provedeném křížovém roztěru jsou na misce patrné jednotlivé kolonie, které můžeme pozorovat a hodnotit.



Obr. 2: Tvary bakteriálních kolonií (Rosypal, 1981)

Tvar



Kruhový

Nepravidelný

Vláknitý

Rizoidní

Okraje



Hladké

Vlnité

Vláknité

Zkroucené

Laločnaté

Profil



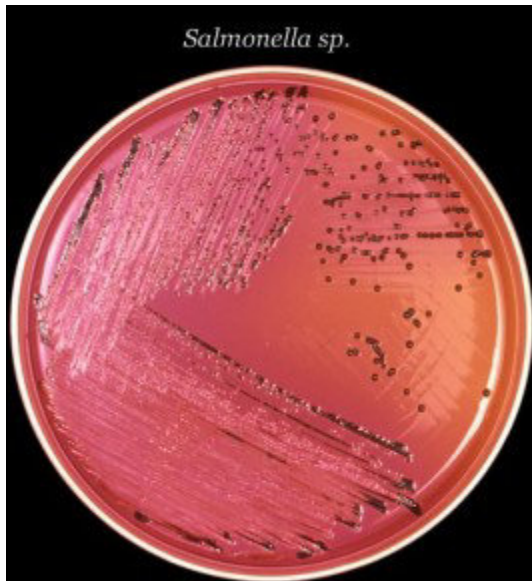
Zvýšený

Vypuklý

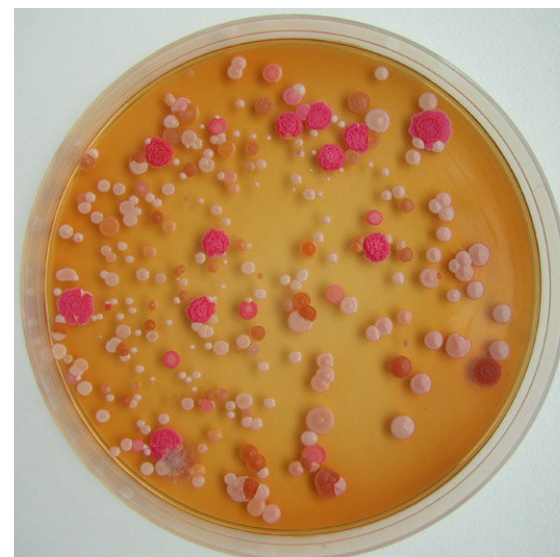
Plochý

Knoflíkovitý

Kráterovitý



Smíšená kultura (transtracheální efuse koně)



Některé morfologické znaky je ale třeba posuzovat v mikroskopickém preparátu (nativní preparát, vlhká komůrka, vitálně barvené preparáty, negativně barvené preparáty, atd.).

6.1.1. Příprava nativního preparátu

Postup :

- * Podložní sklo vyjmeme z alkoholu, přidržíme nad plamenem a položíme na tmavou podložku
- * Do středu sklíčka nanese kapku sterilní vody a vyžíhanou kličkou do ní přeneseme malé množství kultury kultivované na ztuženém agarovém mediu
- * Po důkladném rozmíchání překryjeme suspenzi krycím sklem tak, aby se netvořily bublinky (k překrytí použijeme preparační jehlu nebo sklíčko držíme za hrany a opatrně pokládáme). Pokud kapalina přesahuje okraje krycího skla, odsajeme ji filtračním papírem
- * Pro dlouhodobější pozorování chráníme preparát před vyschnutím tak, že hrany krycího skla potřeme vazelínou, rozehřátým parafinem nebo bezbarvým lakem.

Poznámka:

Preparáty připravované z tekutých živných medií obsahují velké množství krystalků a jiných disperzí, které působí rušivě a mohou se podobat bakteriálním buňkám. Proto se doporučuje bakteriální kulturu před přípravou preparátu centrifugovat a živné prostředí nahradit sterilním fyziologickým roztokem.

6.1.2. Příprava fixovaného preparátu

Postup :

- * Podložní sklo vyjmeme z alkoholu, přidržíme nad plamenem a položíme na tmavou podložku blízko plamene
- * Do středu sklíčka nanese kapku sterilní vody a vyžíhanou kličkou do ní přeneseme malé množství kultury
- * Po důkladném rozmíchání suspenze zhotovíme pomocí sterilní kličky nebo druhého podložního skla nátěr o ploše cca 2 cm²
- * Preparát necháme volně na vzduchu uschnout a fixujeme

Fázový kontrast

Nativní preparát – nedeformované živé buňky bez barvení, pohyb buňky

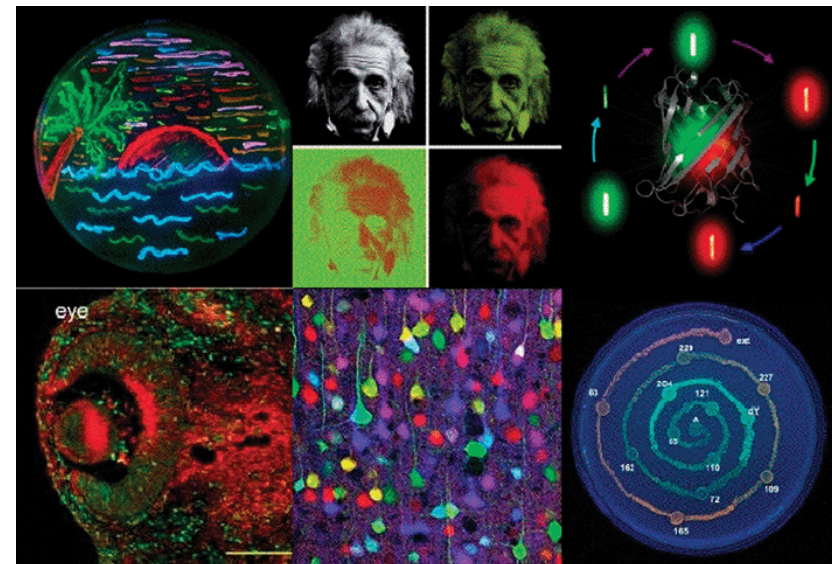
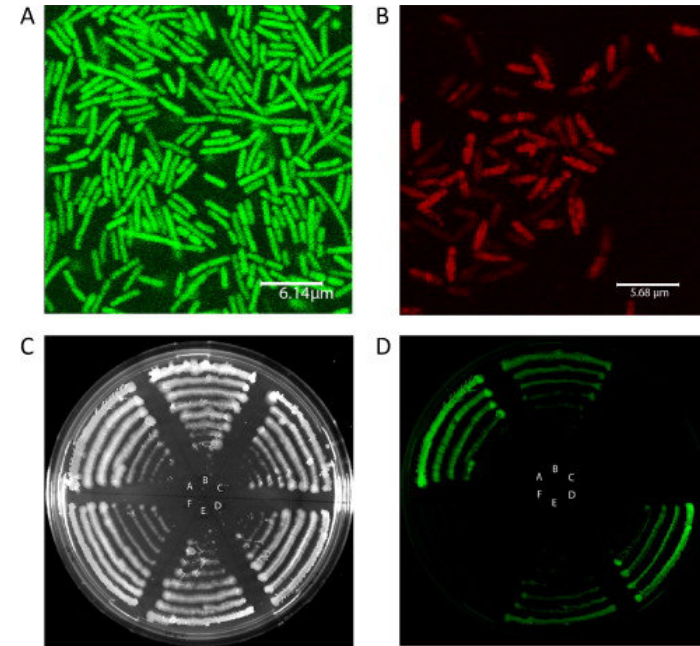
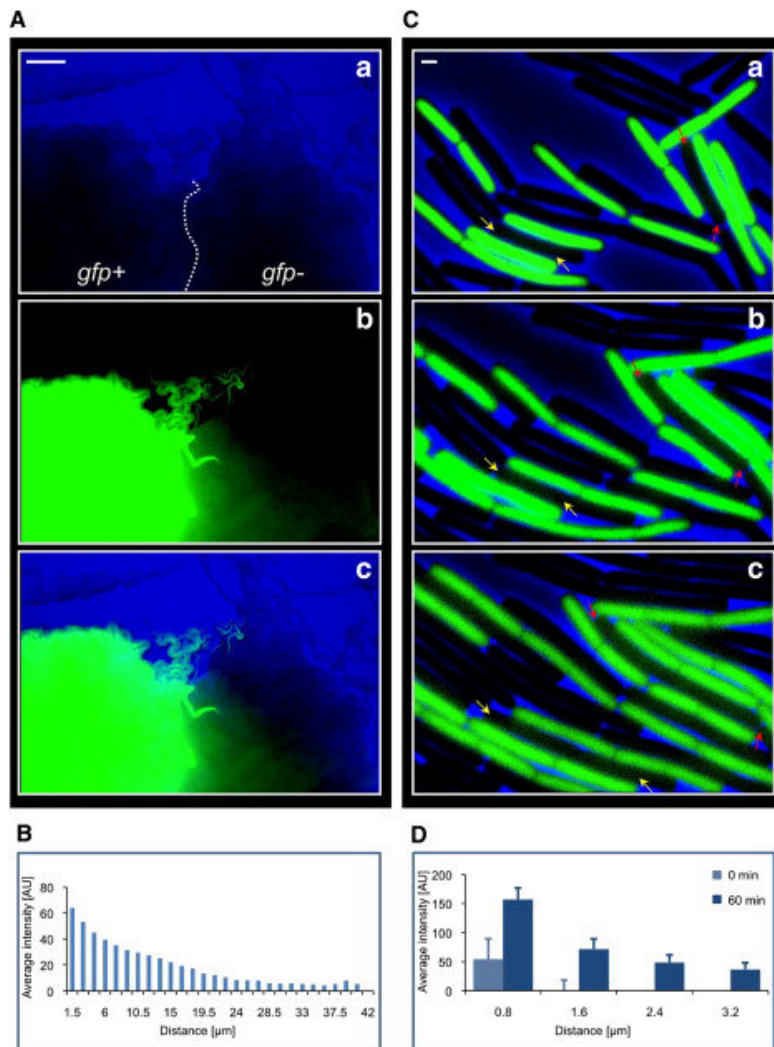
Původně tmavé části buňky (husté) v preparátu září tzv. halo efekt, dochází ke změně amplitudy vlnění; transparentní části (světlé) se jeví jako tmavé

-) rozdíly ve fázi světla převedeny na změny kontrastu

obraz je vytvářen interferencí paprsků fázově posunutých i neposunutých



Fluorescenční mikroskopie



Fixace i barvení mírně buňku deformují! Charakteristický tvar zůstává, ale pro měření přesné velikosti buněk nutno využít nefixovaný preparát negativně obarvený (barví se jen okolí buňky, nikoli ona samotná)

Barvivem zvýrazníme tvar buňky (jednoduché barvení buněčné stěny), či zjistíme, zda je živá (vitální test). Její struktury rozlišujeme diferenciačním barvením a to jak morfologické útvary (spory, stěny), tak chemické složky (barvení volutinu, glykogenu, škrobu..). Diagnostické barvení nám pak pomáhá identifikaci (Gramovo, acidorezistentní...).

Fixace:

Účelem fixace je usmrcení buněk , neboť mrtvé buňky lépe přijímají barvivo, a zároveň přilnutí buněk k podložnímu sklu, aby nebyly během barvicí procedury odplaveny. Bakterie fixujeme zpravidla plamenem, mikroskopické houby a kvasinky většinou chemicky (etanol, aceton). Fixace plísní a kvasinek se provádí pouze při speciálních typech barvení a její postup bývá součástí barvicí metodiky.

Fixace plamenem: Sklíčko se zaschlým nátěrem třikrát protáhneme nesvítivým plamenem kahanu tak, aby bakteriální kultura byla umístěna na horní straně sklíčka.

Po vychladnutí barvíme.

6.3. Barvení podle Grama

Barvení, které v roce 1884 použil Ch. Gram, zůstává jedním z nejdůležitějších barvicích postupů aplikovaných při diagnostice bakterií. Mikroorganismy nejen rozdělují na zbarvené - grampozitivní a nezbarvené - gramnegativní, ale současně nám podává informaci o dalších fyziologických a chemických charakteristikách bakteriálních buněk. (citlivost na antibiotika, rozdíly v osmotických hodnotách, citlivost na zásaditá a kyselá barviva ...)

Podstata grampozitivity není dodnes uspokojivě vysvětlena. Pravděpodobně se zde uplatňuje odlišné chemické složení buněčné stěny G+ a G- bakterií a její intaktnost.

Jedná se o barvení fixovaného preparátu a následné moření buněk roztokem jódu. Vzniká komplex barvivo - jód - složky buněčné stěny, který lze z buněk některých rodů nebo druhů mikroorganismů vyplavit etanolem nebo acetonem. Příslušné druhy jsou označovány jako G-, jejich buněčné stěny jsou pro mikroskopická pozorování dobarvovány karbolfuchsinem. Pokud barevný komplex zůstává v buněčných stěnách zachycen, označujeme organismy jako G+.

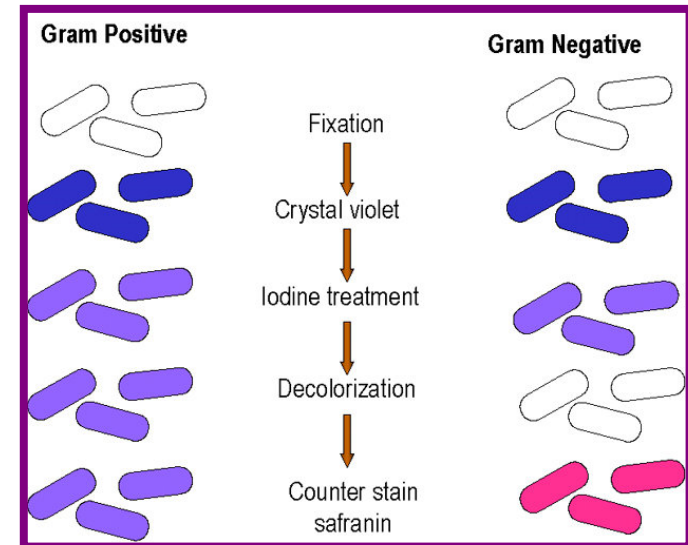
Gramova reakce je u některých bakterií závislá na fyziologickém stavu buňky a na složení kultivačního prostředí. Tyto organismy jsou označovány jako gramlabilní nebo také gramvariabilní.

Některé vnější chemické a fyzikální vlivy - mechanické poškození, UV záření, některá antibiotika, kyseliny, zásady, organická rozpouštědla, atd. mohou způsobit ztrátu grampozitivity.

Postup barvení:

- Připravíme nátěr bakteriální kultury, vysušíme a fixujeme plamenem.
- Preparát ponoříme do krystalové violeti na 30 sec.
- Opláchnout vodou.
- Preparát ponoříme do Lugolova roztoku na 30 sec.
- Opláchnout vodou.
- Odbarvit etanolem či acetonem 20-30 sec.
- Opláchnout vodou.
- Preparát ponoříme do safraninu na 30-60 sec.
- Opláchnout vodou, osušit, pozorovat pod imerzí.

G+ tmavě fialová/modrá až modročerná barva
G- červené či růžové zbarvení



Nejčastější chyby:

příliš hustý nátěr, silný oplach vodou (spláchnutí)
sušení preparátu za tepla – t.j. uvaření buněk
příliš dlouhé odbarvování alkoholem nebo acetonem

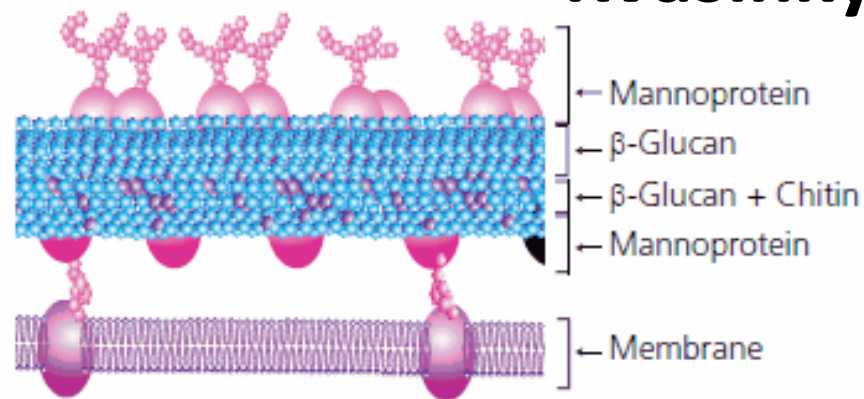
!!! Jaké bakteriální rody Gramovým barvením neobarvíme?

→ rody bez buněčné stěny (mykoplazmata), spirálovité bakterie, silně acidorezistentní rody (např. mykobakterie)

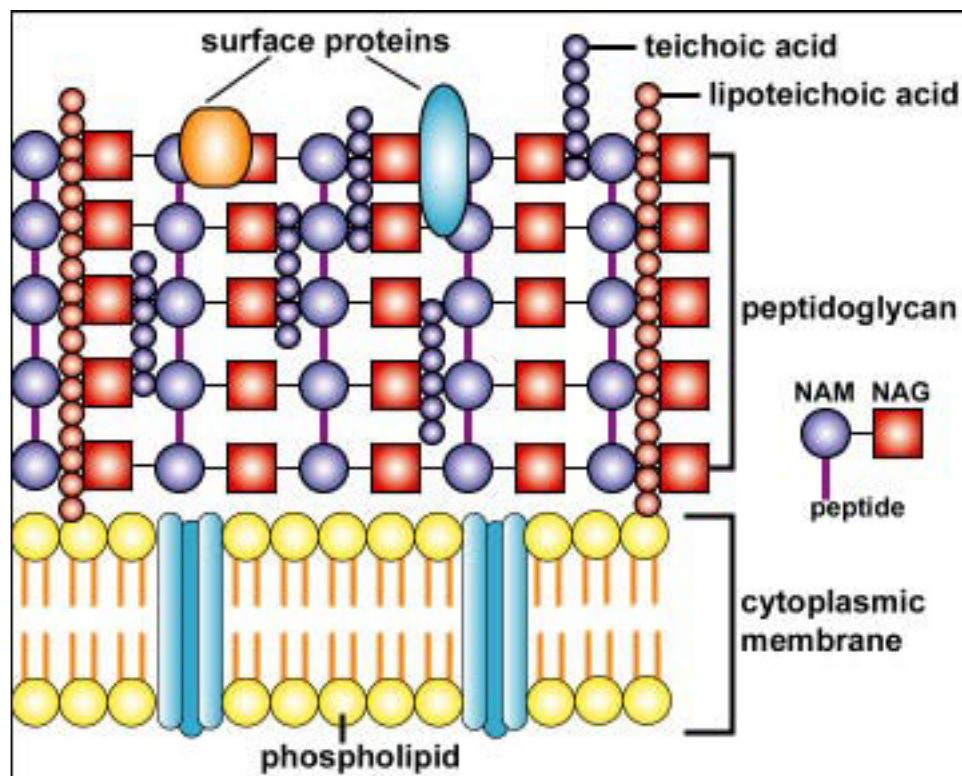
Buněčná stěna!!!!!!

Yeast Cell Wall

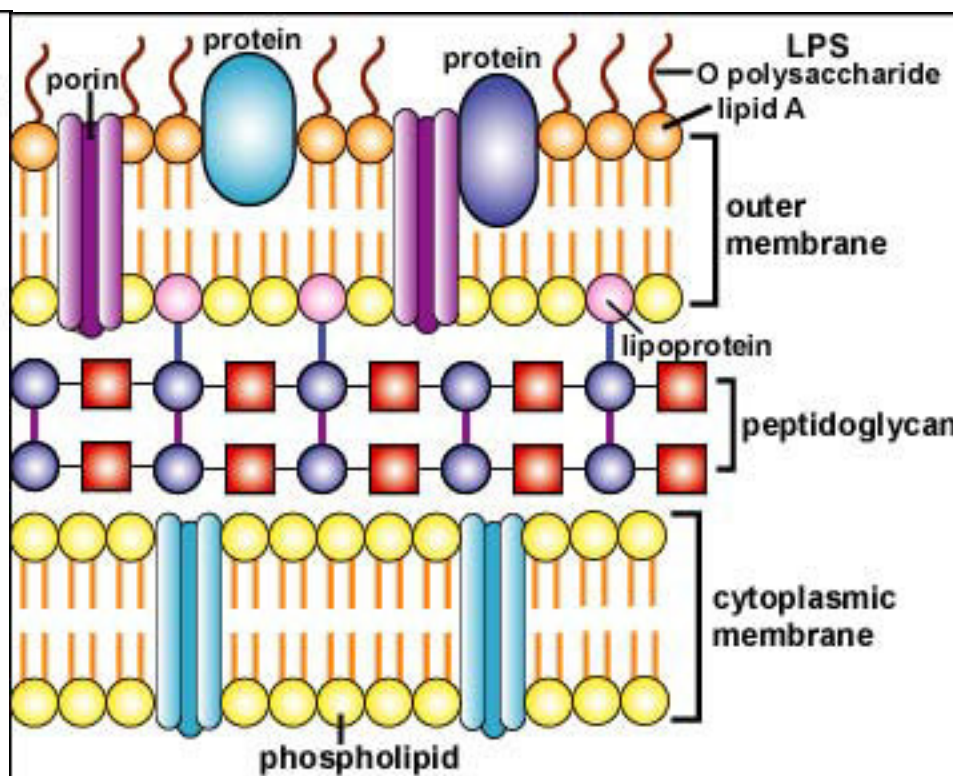
Kvasinky



G+



G-



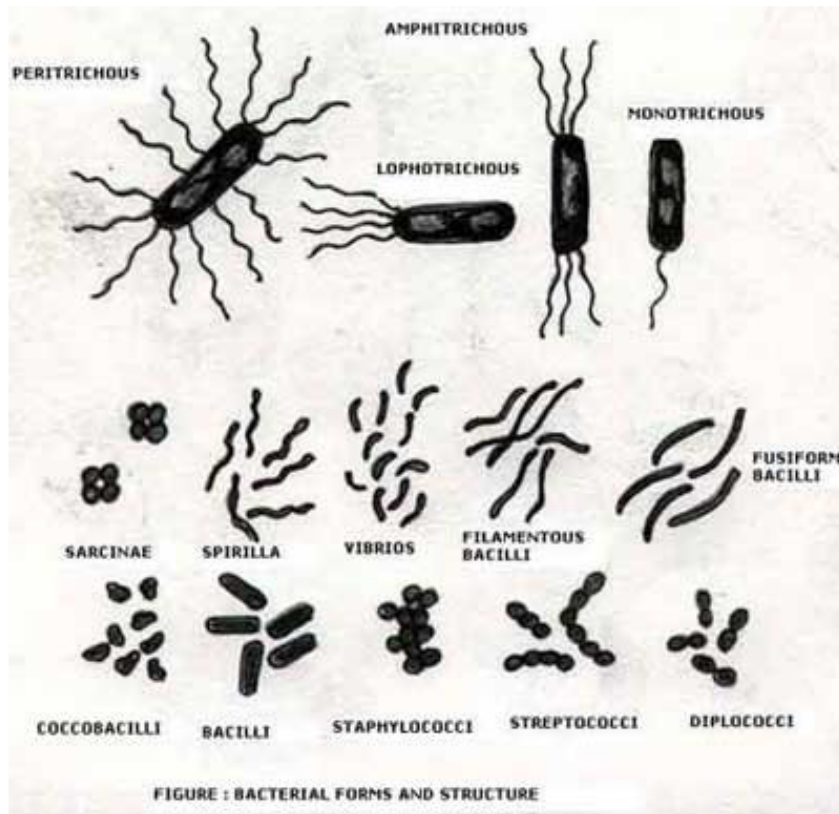
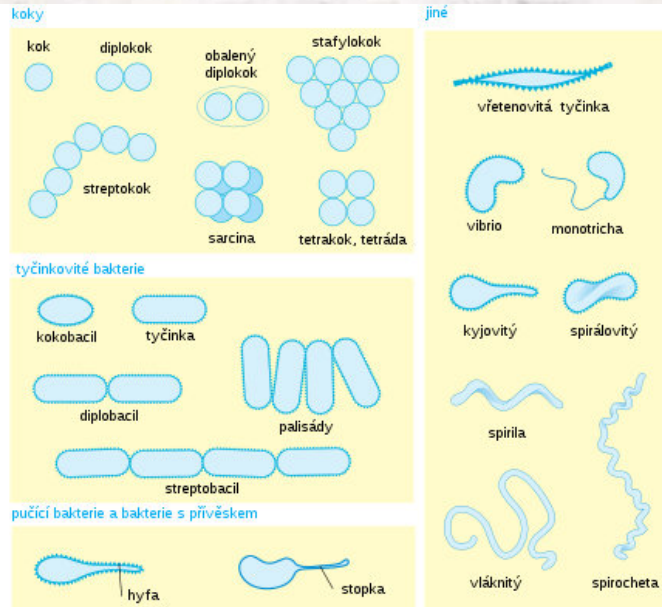


Figure 7.2 Common Bacterial Shapes.

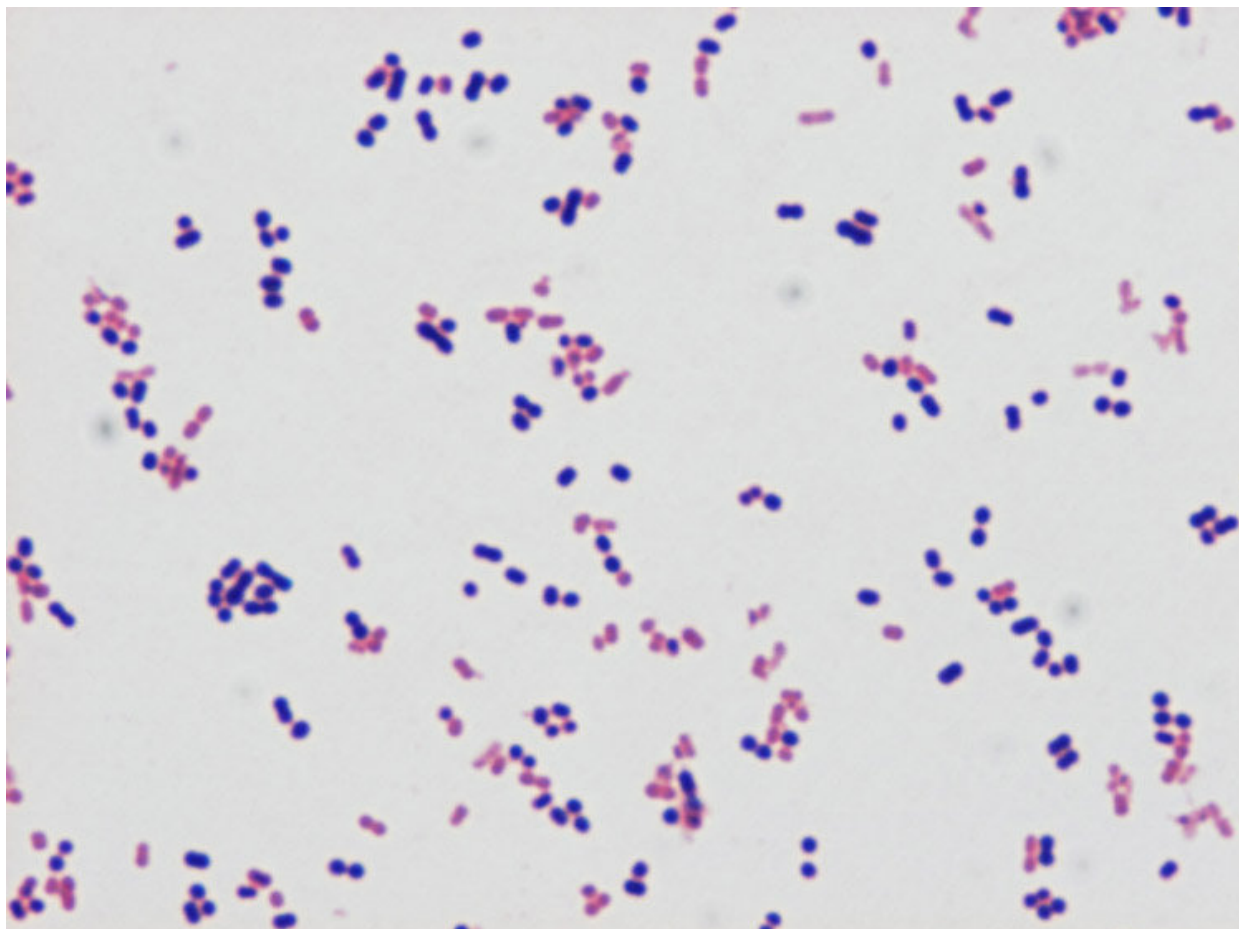
Shape	Arrangement
Spherical	<p>diplococcus (pairs)</p> <p>streptococcus (chains)</p> <p>staphylococcus (random or grapelike clusters)</p> <p>micrococcus (square groups of four cells)</p>
Rod-shaped	<p>streptobacillus (chains)</p>
Spiral	<p>sarcina (cubical packets of eight cells)</p>
Incomplete spiral	<p>vibrio (pl., vibrios)</p>
Irregular or variable shape	<p>pleomorphic</p>



Mikroskopický preparát

	G+/-	tvar buňky	charakteristické shluky/dvojice/tetrády
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954			
<i>Pseudomonas putida</i>			
<i>Serratia marcescens</i> CCM 303			
<i>Kocuria rosea</i> CCM 839			
<i>Micrococcus luteus</i> CCM 169			
<i>Bacillus cereus</i> CCM 2010			
<i>Staphylococcus aureus</i> SA 812			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			

Gramlabilní kultura (*Acinetobacter*)



Gramovo barvení – ukázky

Micrococcus luteus CCM 169

-Grampozitivní kok

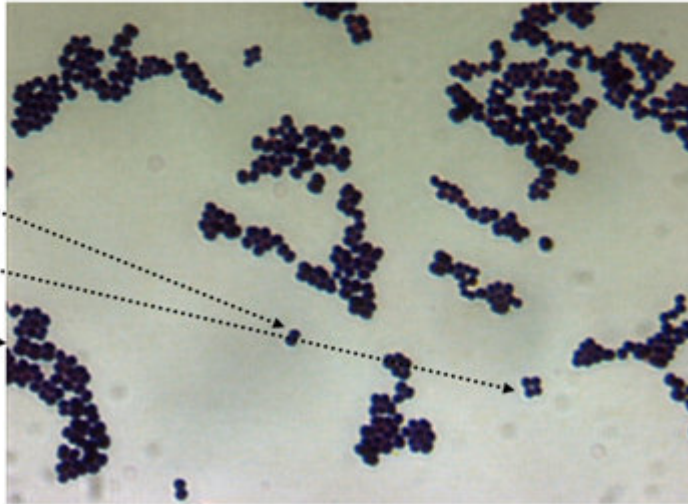
zv. 1000×

Preparát:

DVOJICE

ČTVEŘICE

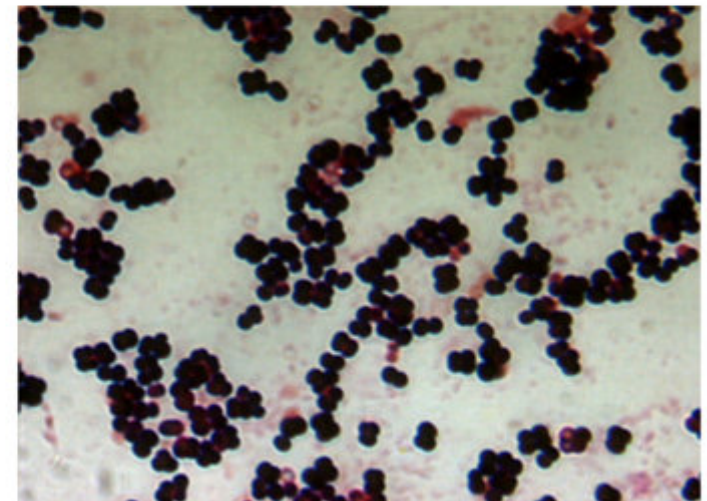
SHLUKY



Sporosarcina ureae CCM 860

G+ koky

Preparát:
Sarciny
(= balíčky
po 8)
Dvojice
Shluky



Bacillus thuringiensis CCM 19



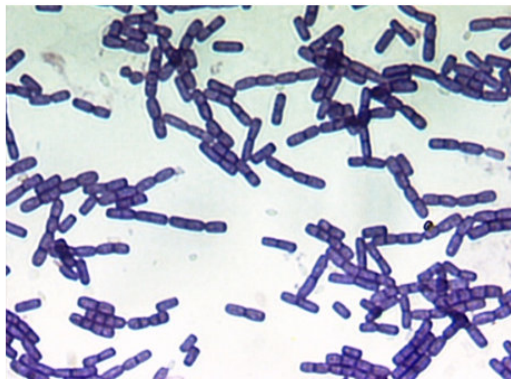
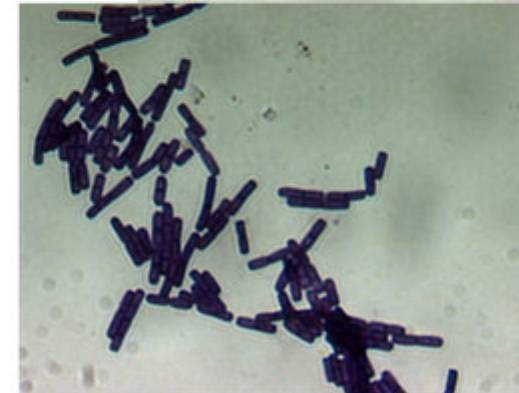
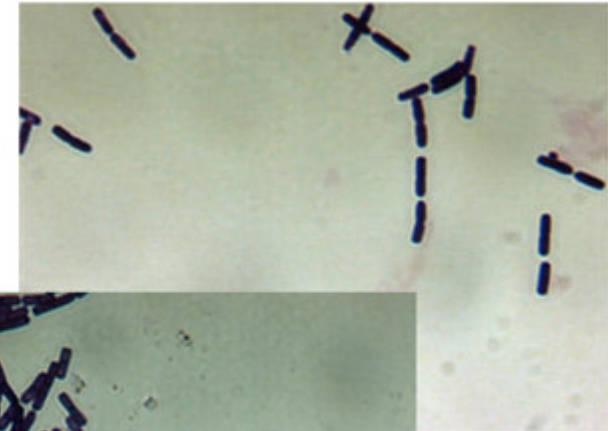
Bacillus cereus CCM 2010

-Gram pozitivní tyčka
zv. 1000×

Preparát:
DVOJICE

JEDNOTLIVÉ
BUŇKY

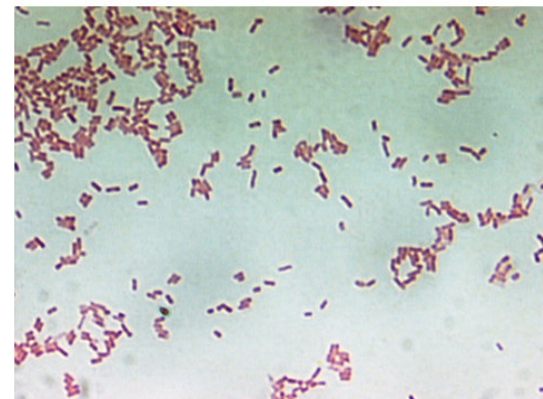
ŘETÍZKY



Bacillus cereus CCM 2010
(G+ tyčky)

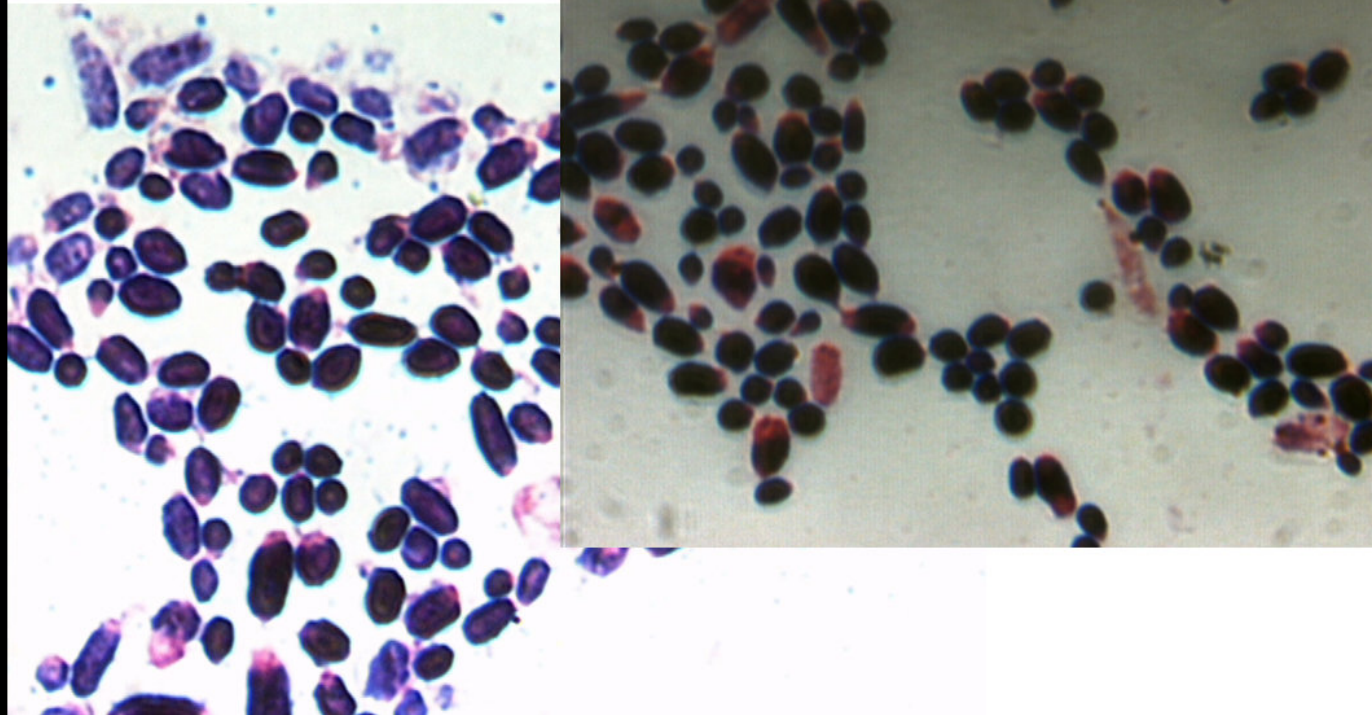
Escherichia coli (G- krátké tyčky)

2-3 x 0,4-0,6 um

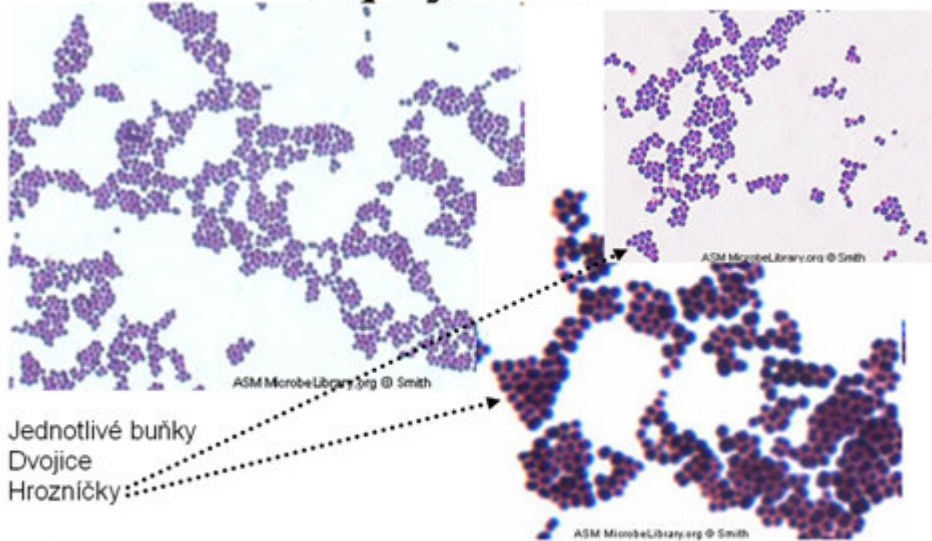


Saccharomyces cerevisiae -

eukaryotický typ b., barví se grampozitivně!!



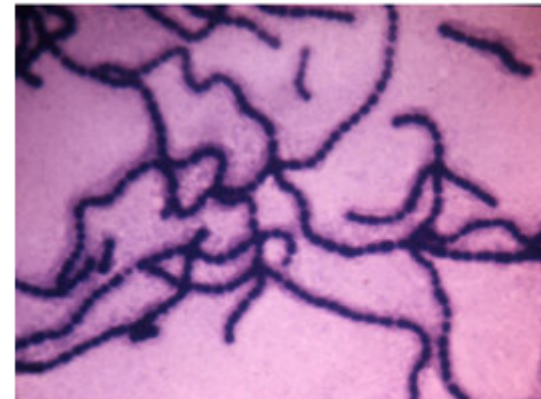
Staphylococcus



Jednotlivé buňky
Dvojice
Hrozníčky

Zdroj:
<http://www.microbelibrary.org/Gram%20Stain/details.asp?id=2028&Lang=>

Streptococcus



Jednotlivé buňky
Různě dlouhé řetězky



Postup

- Zhodnocení růstu z minulého týdne
(roste x neroste x kontaminace)
- Zhodnocení morfologie **kolonií** (velikost, tvar, profil, okraje, povrch, transparence, pigmentace, vůně, změny média, ...)
- **Tekuté půdy** (sediment, blanka, zákal, vločky, zbarvení)
- **Gramovo barvení** (čistá + směsná kultura) + pozorovat všechny kultury ve cvičení (zápočet!)
- Nativní preparát (fázový kontrast)
- Pozorování pod mikroskopem
- Vyhodnocení G+ x G-, tvar buňky (kok, tyčka, spirily, hvězdice, prostéky, pupeny,..) + uspořádání (diplokoky, streptokoky, tetrády, sarciny, hrozníčky,..)