

Téma č. 3 MIKROSKOPICKÉ PREPARÁTY



Otázky k zamyšlení:

Co je cílem diagnostického Gramova barvení? Jaké jsou hlavní rozdíly v přípravě a účelu preparátu barveného podle Grama a nativního preparátu? Jaké typy bakterií nelze Gramovým postupem barvit a proč?

Teoretická část:

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

- může mít podobu klasického **podložního sklíčka**, na kterém provádíme **diferenčové 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 barvený preparát na podložním sklíčku je před barvením buněk většinou **fixován** (v plameni nebo chemicky u rozměrnějších buněk kvasinek a mikroskopických hub)

- při pozorování suspenze nativního preparátu na podložním sklíčku přikládáme na kapku suspenze **krycí sklíčko, nefixujeme**

- další typ preparátu je užitečný při pozorování plísní, kvasinek či aktinomycet, kdy pozorujeme tzv. **sklíčkové kultury** (krycí sklíčko je vytaženo z agaru, ve kterém bylo během kultivace zapíchnuto pod úhlem 45° a v místě styku s agarem zaočkováno kulturou tvořící mycelium; je tudíž kulturou porostlé – na krycím sklíčku následně hodnotíme substrátové a vzdušné mycelium) nebo kultury narostlé na celofánu (některé kultury prorůstají medium, pro pozorování jsou těžko odejmutelné, na celofánu se s nimi snadno manipuluje)

- K čemu slouží různé typy barvení buněk?

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

- **Co je sledováno fixací preparátu?**

Podstatou fixace je vysrážení buněčných koloidů (zejména bílkovin). Fixací nátěru buněk dosáhneme toho, že lépe přilnou ke sklíčku (nespláchnou se tak aplikací barviva či rozpouštědla) a rovněž lépe přijmou barvivo.

- **Čeho se vyvarovat při fixaci preparátu?**

Abychom buňky neuvařili, fixujeme až ve chvíli, kdy je nátěr buněk suchý. Když sklíčko držíme za okraje a třikrát jej protáhneme nesvítivou částí plamene. Sklíčko držíme nátěrem nahoru (proto je doporučeno pracovní plochu sklíčka po vytažení z ethanolu označit štítkem či popsat). Barvíme chladné sklíčko.

- **Co když jsme buňky kultivovali v tekutém cukerném prostředí?**

Pokud nechceme v plameni získat karamel, musíme buňky od media zcentrifugovat a následně promýt vodou či pufrem.

- **Pokud víme, že bakterie fixujeme nejčastěji plamenem, fixujeme tak i kvasinky a plísně?**

Tyto buňky jsou větší než buňky bakterií, z čehož logicky vyplývá, že tepelná fixace již příliš mění jejich tvar. Proto se většinou fixují chemikáliemi.

Několik stručných informací o chemické povaze barviv:

Jsou to zředěné vodné roztoky organických barviv a to obvykle soli. **Bazická barviva mají barevný kationt, kyselá aniont.** Při barvení bakterií se většinou používají prve zmíněná; příkladem je **krystalová violet**, **methylenová modř**, **safranin**, **bazický fuchsin**, **malachitová zeleň**. Můžeme výsledek barvení ještě zvýraznit? **Moření** (např. fenolem, taninem) má účinek zesílení barvení, neboť mořidlo má roli prostředníka s vyšší afinitou k buňce a zároveň k barvivu, než je afinita buňky k samotnému barvivu.



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).

1) Nativní preparát – nebarvený (připravený ve fyziologickém roztoku, destilované vodě nebo připravený přímo z tekutého media s kulturou)

Význam přípravy nativního preparátu:

- zjišťování skutečného tvaru a struktury buněk neporušených fixací a barvením
- při pozorování růstu a množení, pohybu bakterií
- v diagnostické praxi má význam při studiu buněčných útvarů, které se obtížně barví

Princip:

mikroskopická technika nativního preparátu – **fázový kontrast** - využívá **odlišné světlolomnosti částic** v pozorovaném objektu – různé struktury buňky mají **různé indexy lomu světla** a vznikající obraz je výsledkem složení obrazů vln s pozunutou fází a vln odkloněných od preparátu

Postup: - aseptická práce při nanášení buněk na sklíčko

- dobře očištěné podložní sklíčko vyjmeme z alkoholu a protáhneme jej plamenem
- doprostřed sklíčka nanese kapku sterilní destilované vody
- ožehnutou a vychladlou očkovací kličkou vneseme do kapky nepatrné množství kultury a pečlivě rozmícháme
- kultury nesmíme nanést do kapky mnoho, aby preparát nebyl hustý
- kapka se neroztírá, překrývá se krycím sklíčkem, a to tak, aby v preparátu nebyly vzduchové bublinky (nepřikládáme svrchu na kapku, ale nejprve jednou hranou, nepřitlačujeme)
- přebytečnou kapalinu odsajeme filtračním papírem. Pokud pozorujeme buňky z tekutého media, pozorujeme přímo v mediu, bez ředění v kapce vody. Ihned mikroskopujeme **FÁZOVÝM KONTRASTEM** (objektiv 60x nebo 100x – celkové zvětšení tedy 600x nebo 1000x), protože takto připravený preparát rychle vysychá

- suspenze buněk se připravuje stejným způsobem, ale **kapka se neroztírá**, překrývá se krycím sklíčkem a to tak, aby v preparátu **nebyly vzduchové bublinky** (nepřikládáme svrchu na kapku, ale **nejprve jednou hranou**, nepřitlačujeme)



- přebytečnou kapalinu **odsajeme** filtračním papírem.



- pokud pozorujeme buňky z tekutého media, pozorujeme **přímo v mediu**, bez ředění v kapce. Ihned mikroskopujeme **FÁZOVÝM KONTRASTEM** (objektiv 60x nebo 100x s imerzí).



Pozorujeme: aktivní pohyb buněk (pokud mají bičíky) či pasivní pohyb unášením; aktivní pohyb sledujeme u mladých kultur (př: 18h *Bacillus subtilis*) z kapalné půdy - pozor - skleněná tyčinka láme bičíky. Po přikápnutí desinfekce (př: 0,5% ajatin) pohyb buněk ustává

2) Barvené preparáty

Význam přípravy barvených preparátů:

zjišťování typu buněčné stěny, tvaru buněk a uspořádání jejich shluků, přítomnosti a uložení spor, přítomnosti pouzder a vnitřních buněčných struktur (inkluze), při zjišťování životaschopnosti buněk

- tvar buňky – pro určení morfologie buňky a charakteristických shluků stačí **jednoduché barvení buněčné stěny** (např. krystalovou violetí) bez rozlišování grampozitivního či gramnegativního typu
- **vitální test** ukazuje poměr živých a mrtvých buněk v nefixovaném preparátu; vitální barvení je barvením mrtvých buněk neboť pouze ony barvivo přijímají či jej efluxními systémy nevyklučují (např. zředěnou Löfflerovu modř)
- struktury buňky rozlišujeme **diferenčním barvením** a to jak vnitřní a vnější morfologické útvary (spory, pouzdra, buněčné stěny), tak chemické složky (barvení volutinu, glykogenu, škrobu..)
- **diagnostické barvení** většinou fixovaného preparátu napomáhá identifikaci bakterií (Gramovo, acidorezistentní barvení karbolfuchsinem, barvení dle Giemsa...)
- **negativní barvení** je dalším příkladem barveného preparátu, který se však již nefixuje a nebarvíme na něm buňky, ale jejich okolí (tedy skličko samotné; např. tuší nebo nigrosinem). Využívá se pro měření přesné velikosti buněk nedeformovaných fixací a barvením

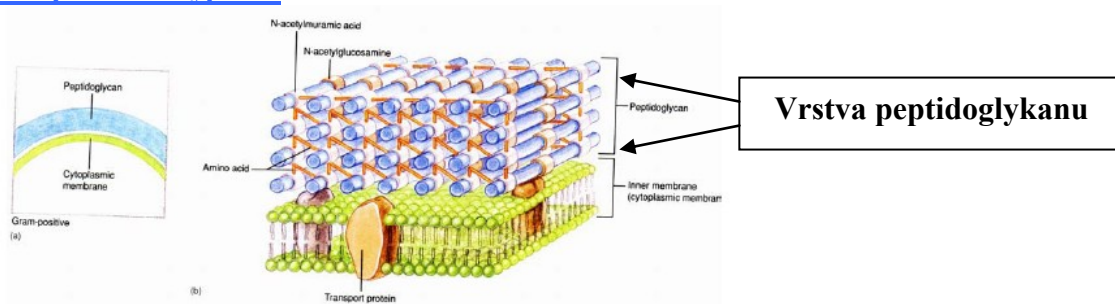
Princip:

- preparát před barvením fixujeme (kromě barvení negativního, vitálního testu..)
- k barvení mikroorganismů se používají zředěné vodné roztoky organických barviv

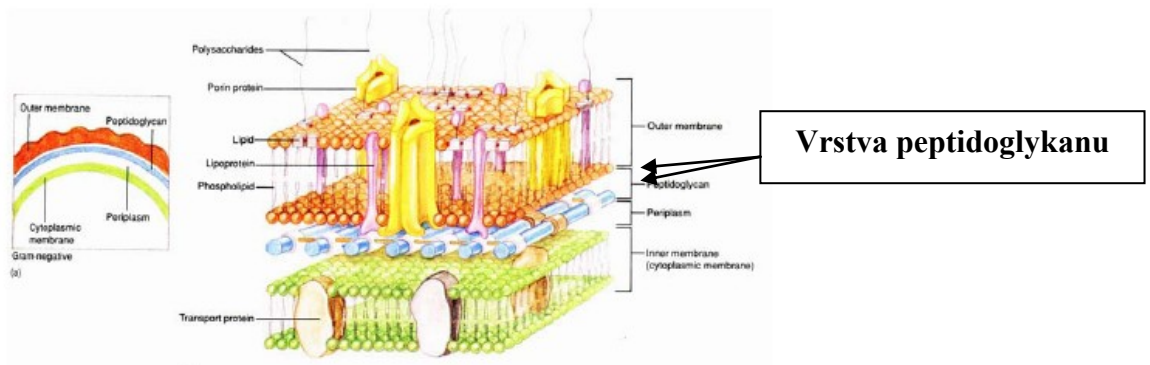
Význam Gramova barvení

je jednou z nejdůležitějších diagnostických metod při identifikaci bakterií; rozlišuje skupinu grampozitivních G+ (barví se modrofialově) a gramnegativních G- buněk (barví se červenorůžově) a udává některé fyziologické a chemické vlastnosti buňky. Podstata rozdílného chování při Gramově barvení nebyla dosud uspokojivě objasněna, s největší pravděpodobností se zde však uplatňují rozdíly ve složení buněčné stěny obou skupin bakterií.

Grampozitivní typ BS:



Gramnegativní typ BS:



Princip:

- jde o barvení fixovaného preparátu krystalovou violetí a následné moření buněk jódem v roztoku KI. Vzniká komplex barvivo-jód-buněčná stěna. Tento komplex se tvoří v G+ i v G- bakteriích. **Rozdíl vzniká při promývání preparátu organickým rozpouštědlem (acetone nebo alkoholem)**. Z G- bakterií se komplex vymývá a odbarvují se, G+ bakterie si zbarvení ponechávají. Pro zvýraznění rozdílu se **G- bakterie dobarvují** jiným kontrastním barvivem (např. bazickým safraninem)

- Gramova reakce závisí na fyziologickém stavu buňky (proto používáme kultury určitého stáří) a na složení kultivačního media
- ztráta grampozitivity: mechanickým poškozením, UV zářením, kyseliny, zásady, rozpouštědla
- existují i mikroorganismy, které se někdy barví pozitivně, někdy negativně, označujeme je jako gramlabilní G±.

U gramnegativních buněk odbarvovací činidlo rozpustí vnější lipopolysacharidovou vrstvu a komplex krystalové violeti s jódem se vymyje přes tenkou vrstvu peptidoglykanu. Gramova reakce je nejspolehlivější u mladé bakteriální kultury (méně než 24 h), zatímco starší kultury nemusejí zadržovat primární barvivo a výsledky nejsou přesné.

Nejčastější chyby:

- příliš silný nátěr buněk na sklíčku
- sušení nedostatečně suchého preparátu - t.j. uvaření buněk
- příliš dlouhé odbarvování alkoholem nebo acetone

Jaké bakteriální rody Gramovým barvením neobarvíme?

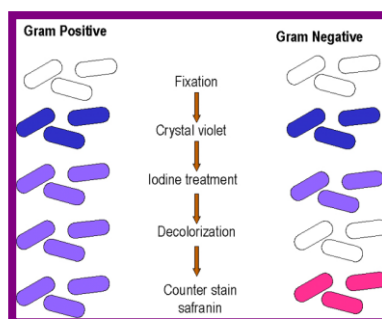
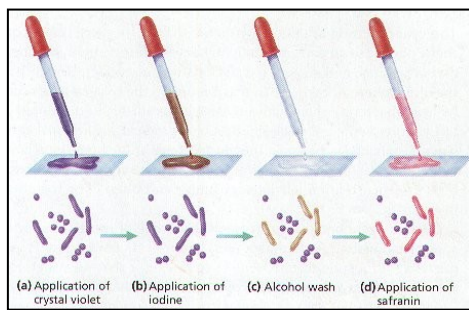
Jedná se o rody bez buněčné stěny (mykoplazmata), spirálovité bakterie, dále o silně acidorezistentní rody (např. mykobakteria):

- *Borrelia burgdorferi* (fig [1](#), [2](#))
- *Borrelia recurrentis* (fig [1](#))
- *Bartonella henselae* (fig [1](#), [2](#))
- *Chlamydia trachomatis* (fig [1](#), [images of elementary bodies](#), [images of reticulate bodies](#))
- *Chlamydophila pneumoniae* ([images of elementary bodies](#), [images of reticulate bodies](#))

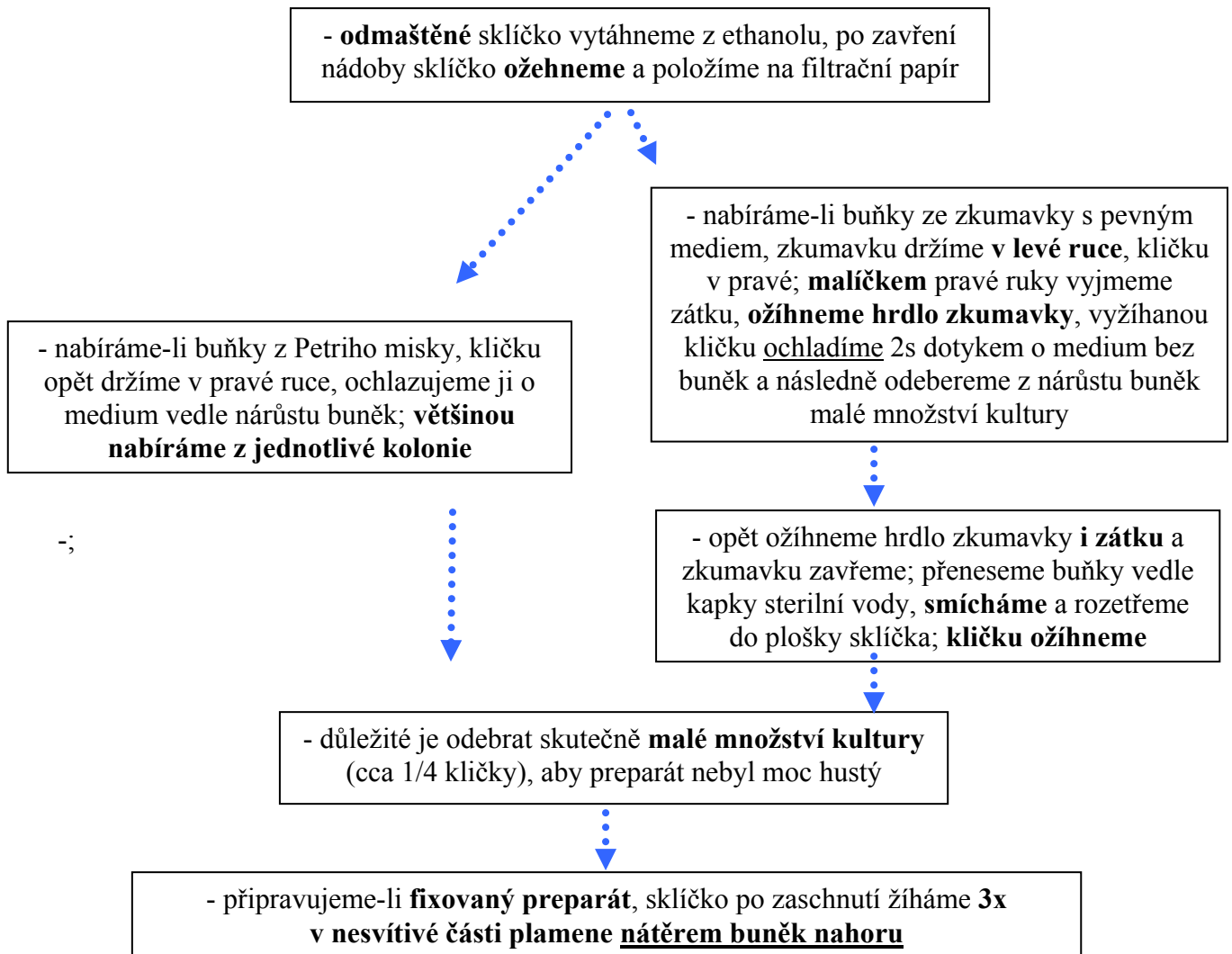
- *Chlamydophila psittaci* ([images of elementary bodies](#), [images of reticulate bodies](#))
- *Coxiella burnetii* (fig [1](#), [2](#))
- *Ehrlichia chaffeensis* (fig [1](#), [2](#))
- *Anaplasma phagocytophilum* (formerly; *Ehrlichia phagocytophilum* or *E. equi*; Fig. [1](#))
- *Legionella* sp. (fig [2](#))
- *Leptospira* sp. (fig [1](#), [2](#))
- *Mycobacterium bovis* (fig [1](#))
- *Mycobacterium tuberculosis* (fig [1](#), [2](#) thanks to Anders Olav Lande, [3](#))
- *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* (fig [1](#) thanks to Anders Olav Lande)
- *Mycobacterium kansasii* (fig [1](#))
- *Mycobacterium leprae* (fig [1](#), [for a close up](#) thanks to Anders Olav Lande)
- *Mycobacterium marinum* (fig [1](#))
- *Rickettsia rickettsii* (Fig. [1](#): scroll down to bottom of the page. [2](#))
- *Orientia tsutsugamushi* (formerly; *Rickettsia tsutsugamushi*; Fig. [1](#))
- *Treponema pallidum* (fig [1](#), [2](#), [3](#))

Postup:

- suspenzi z kultury mikrobů rozetřeme na čisté podložní sklíčko, necháme dobře zaschnout a fixujeme plamenem
- ponoříme do roztoku krystalové violeti a necháme působit 30 sekund
- barvivo opláchneme slabým proudem vody (2s)
- preparát ponoříme do Lugolova roztoku na 30 sekund.
- opláchneme slabým proudem vody (2s)
- překryjeme ethanolem (nebo acetonem), maximálně 15-20 sekund
- opláchneme slabým proudem vody a buňky dobarvíme safraninem 1 minutu (takto se dobarví pouze buňky gramnegativní, u kterých došlo k vyplavení krystalové violeti, gramnegativní nikoli; safraninem však dobarvujeme každý preparát, i když předpokládáme přítomnost grampozitivních buněk – předem nevíme, o jaký typ buněčné stěny se v preparátu jedná)
- osušíme mezi dvěma filtračními papíry a mikroskopujeme pod imerzním objektivem (zvětšení 1000x)



Obecný postup přípravy barvených preparátů:



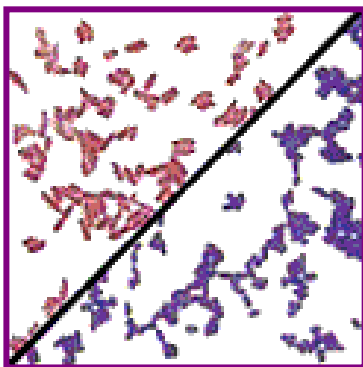
Materiál a použité bakteriální kmeny:

- 24 hodin staré kultury sledovaných bakterií
- roztok krystalové violeti
- Lugolův roztok
- alkohol
- safranin
- podložní a krycí sklíčko
- filtrační papír
- sterilní destilovaná voda
- kapátko
- bakteriologická klička

Hodnocení:

- každý dle svého bakteriálního kmene.

G+ bakterie jsou modrofialové, G- bakterie jsou červené



Grampozitivní typ buněčné stěny:

peptidoglykan 40 nm, 90 %, hydrofobní struktura. Mezi polymerem je voda. Do hydratované vrstvy se dostává barvivo krystalové violeti, Lugolův roztok fixuje přímo na strukturách. Organické rozpouštědlo poté dehydratuje vrstvu. Barvivo zůstává pevně vázáno, stěna se dál **nedobarví safraninem.**

Gramnegativní typ buněčné stěny:

peptidoglykan 10 %, 2 nm, porózní výplň mezi cytoplazmatickou membránou a vnější membránou. Barvivo se v porózní vrstvě nenačpe, odmyvá se.

Závěr:

Vydařil se experiment? Pokud ne, proč? K čemu slouží různé typy barvení buněk? Jaké typy preparátů rozlišujeme? Co je sledováno fixací preparátu? Jaký význam má Gramovo barvení a z jakých důvodů se nemusí povést?

Odkazy:

Atlasy:

<http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/biologi/english/> - po výběru kategorie rolovat lištu vpravo

<http://www.cdc.gov/az/a.html>

<http://www.pf.chiba-u.ac.jp/english/egallery-index.htm>

<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>

<http://www.geocities.com/CapeCanaveral/3504/gallery.htm>

BACTERIAL VIDEOS

<http://shapiro.bsd.uchicago.edu/bacterialvideos.html>

Výslovnost v angličtině:

<http://www.kcom.edu/faculty/chamberlain/website/studio.htm>

Mikroskopie:

<http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/svetelnamikroskopie.htm>

Virtuální mikroskopování [<http://www.olympusmicro.com/primer/virtual/virtual.html>]

Optical microscopy primer introduction [<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/>]

Vlnová optika [<http://www.sweb.cz/radek.jandora/f11.htm>, <http://www.aldebaran.cz/studium/fyzika/vlny.html>]

Mikroskopie na Hamburgské univerzitě [<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e03/03.htm>]

Souhrnný článek v anglickém jazyce [[Optical microscopy.pdf](#)]