

Pozorování bakteriálních endospor **a negativní barvení**

Cíl:

Nativní preparát – tvar, velikost a umístění endospor
(fázový kontrast)

Negativně barvený preparát – pozorování skutečné velikosti a tvaru
buňky, tvorby řetízků, pouzder, kapsulí

Barvení pouzder – Kongo červeň, metylenová modř

Kultury k pozorování:

Bacillus megaterium CCM 2007

Bacillus sphaericus CCM 1615

Paenibacillus polymyxa CCM 1459

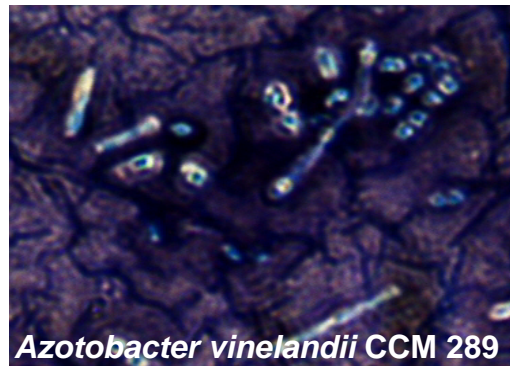
Bacillus cereus CCM 2010

Bacillus thuringiensis CCM 19

Negativní barvení

- Obarvení pozadí, buňky nezbarvené, obrys v obarveném pozadí → stanovení pouzder, slizů, velikost buňky

– *Nigrosinem*

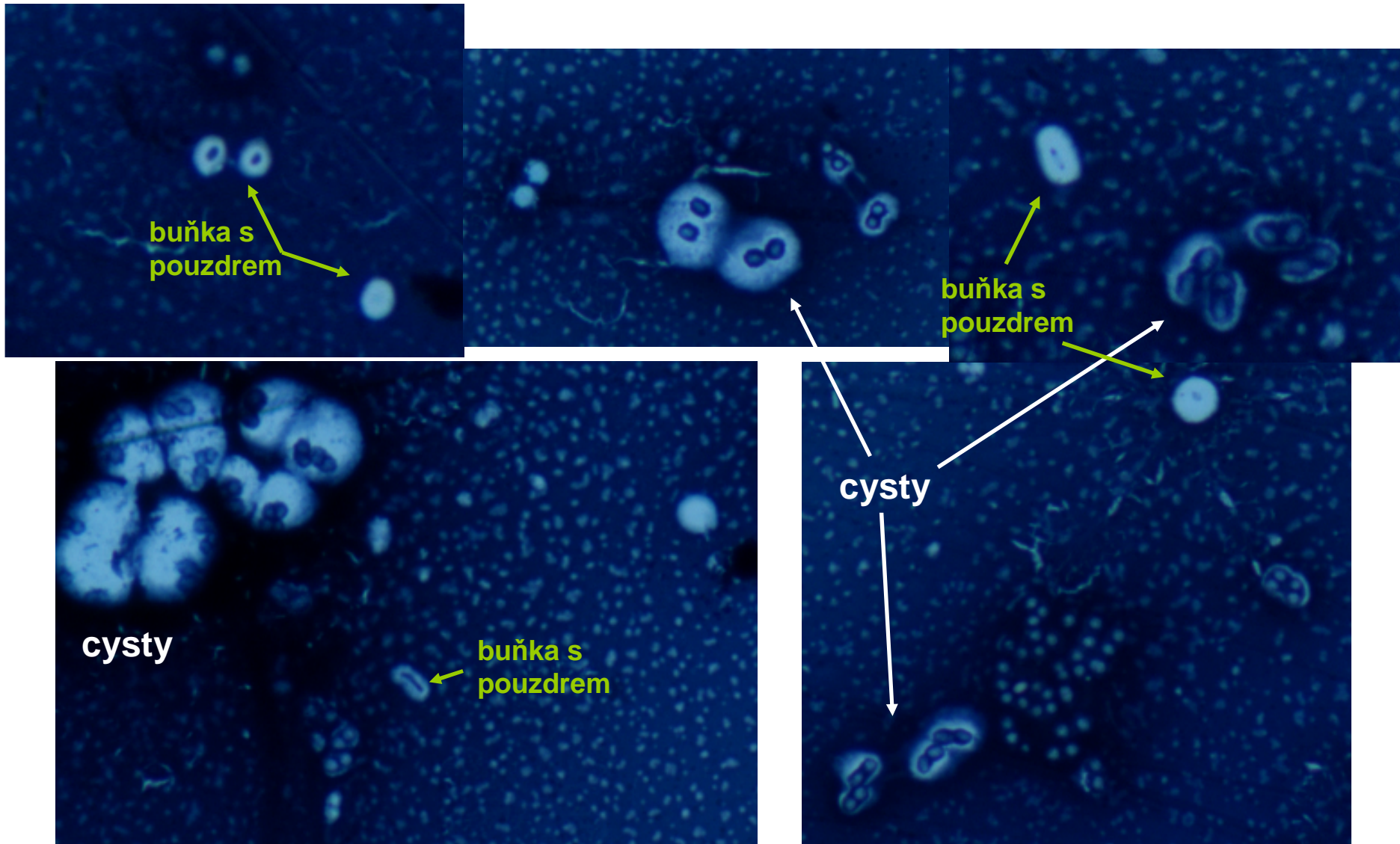


- Pouzder a kapsulí

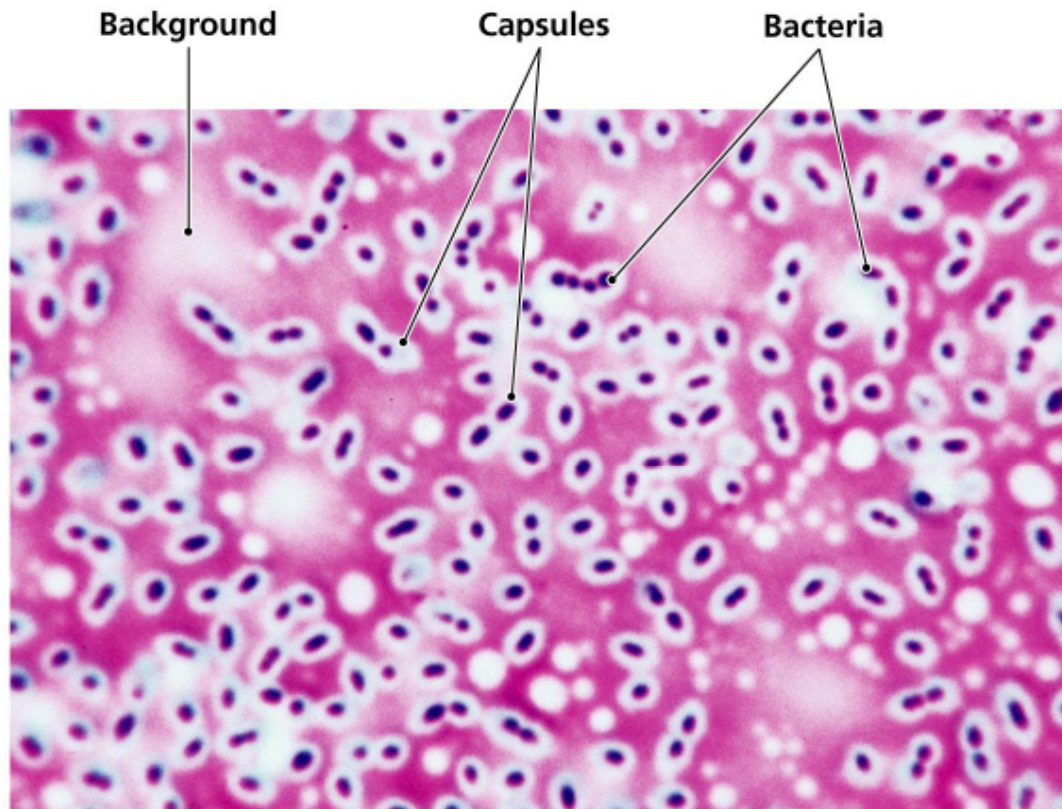
Pouzdro: polysacharidy; hlavně u klinických izolátů, chrání před vysycháním a nepříznivými faktory, látková výměna s vnějším prostředím, maskování antigenu, větší odolnost, faktor virulence

Negativní barvení

(Kongo červeň+methylenová modř)

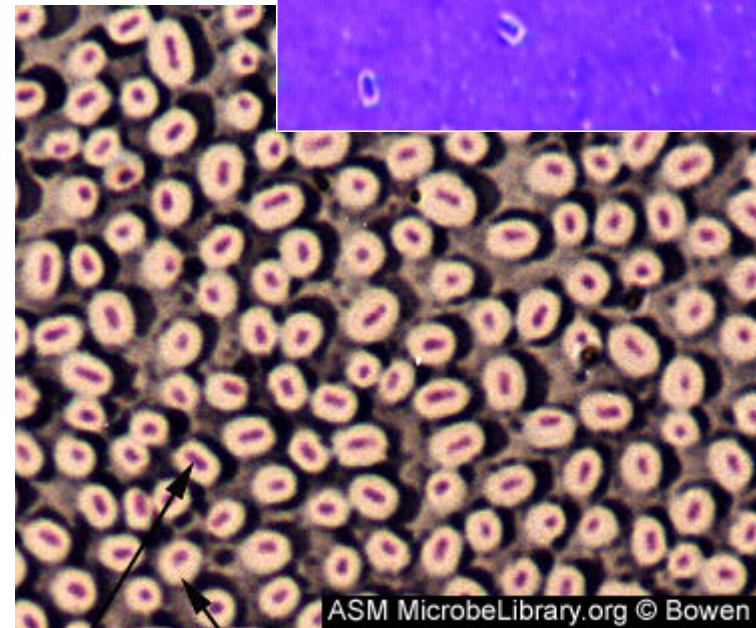
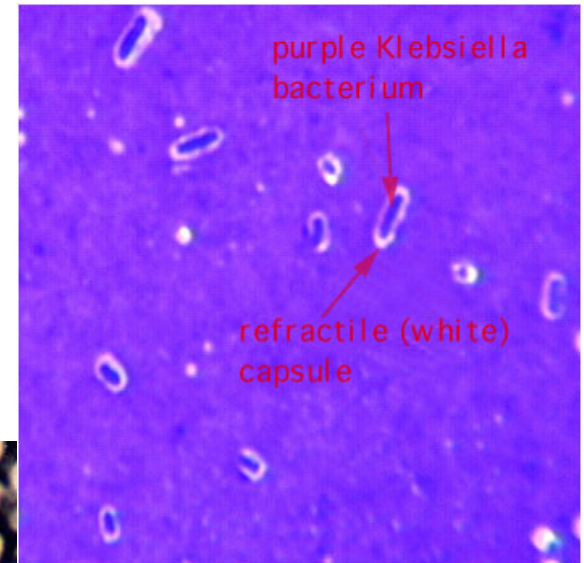


Negativní barvení - pouzdro



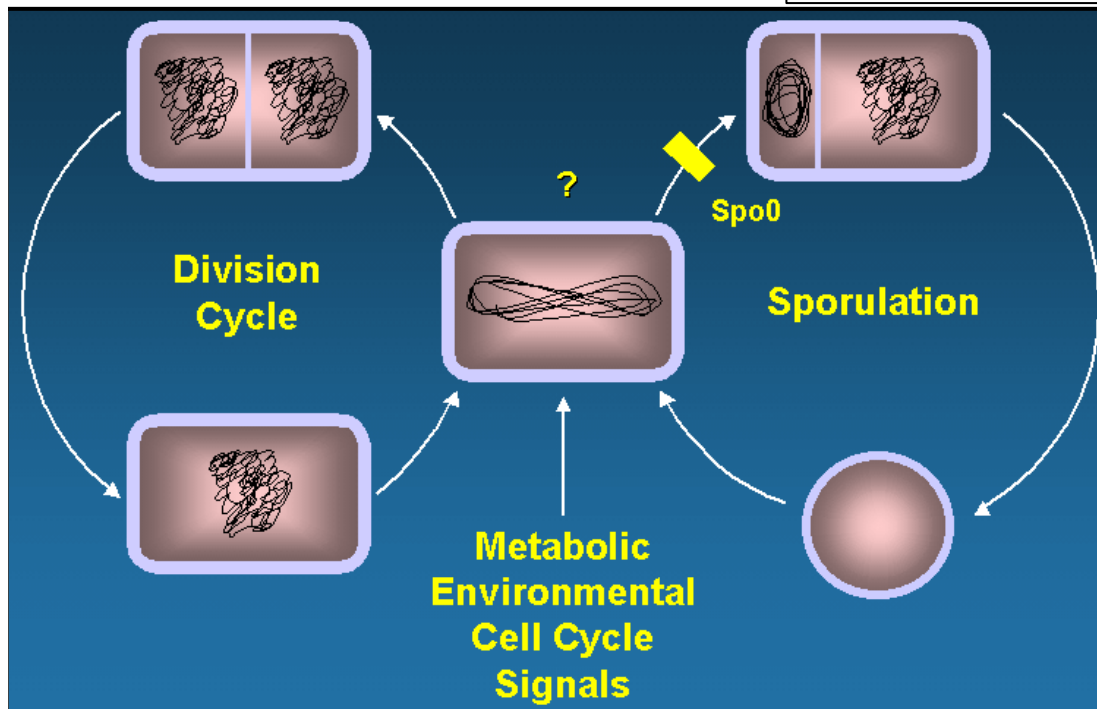
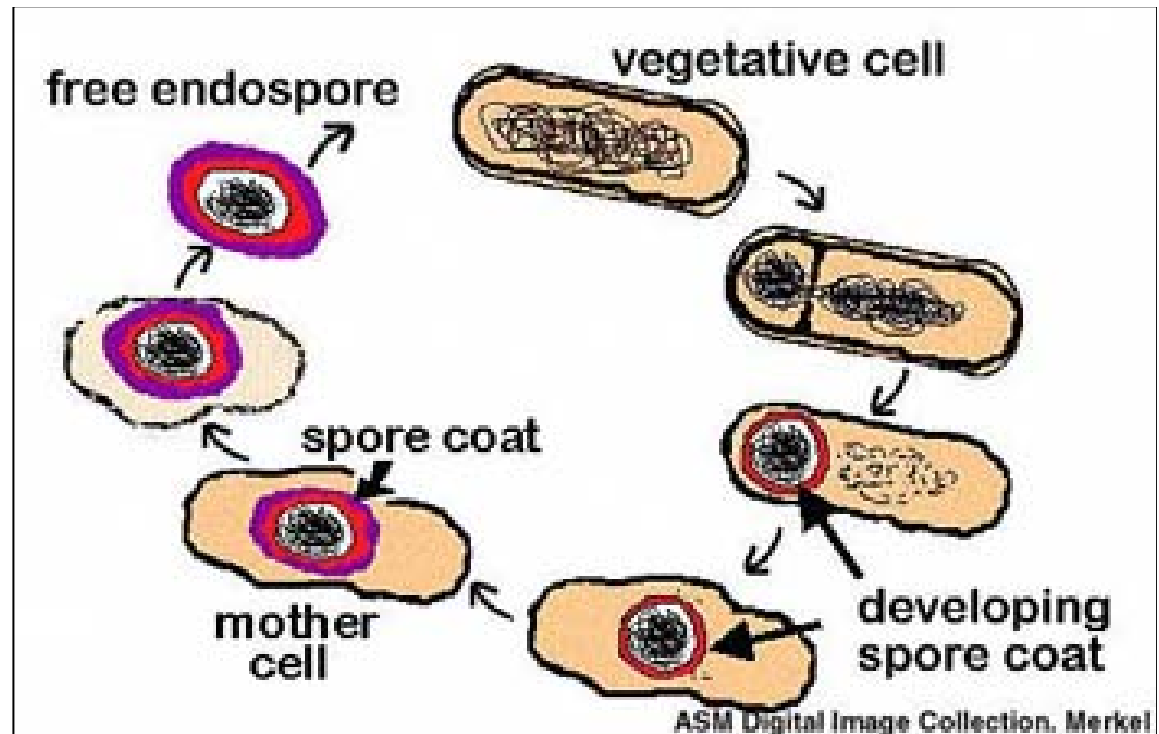
LM 5 μm

Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.



- **Růstový cyklus**

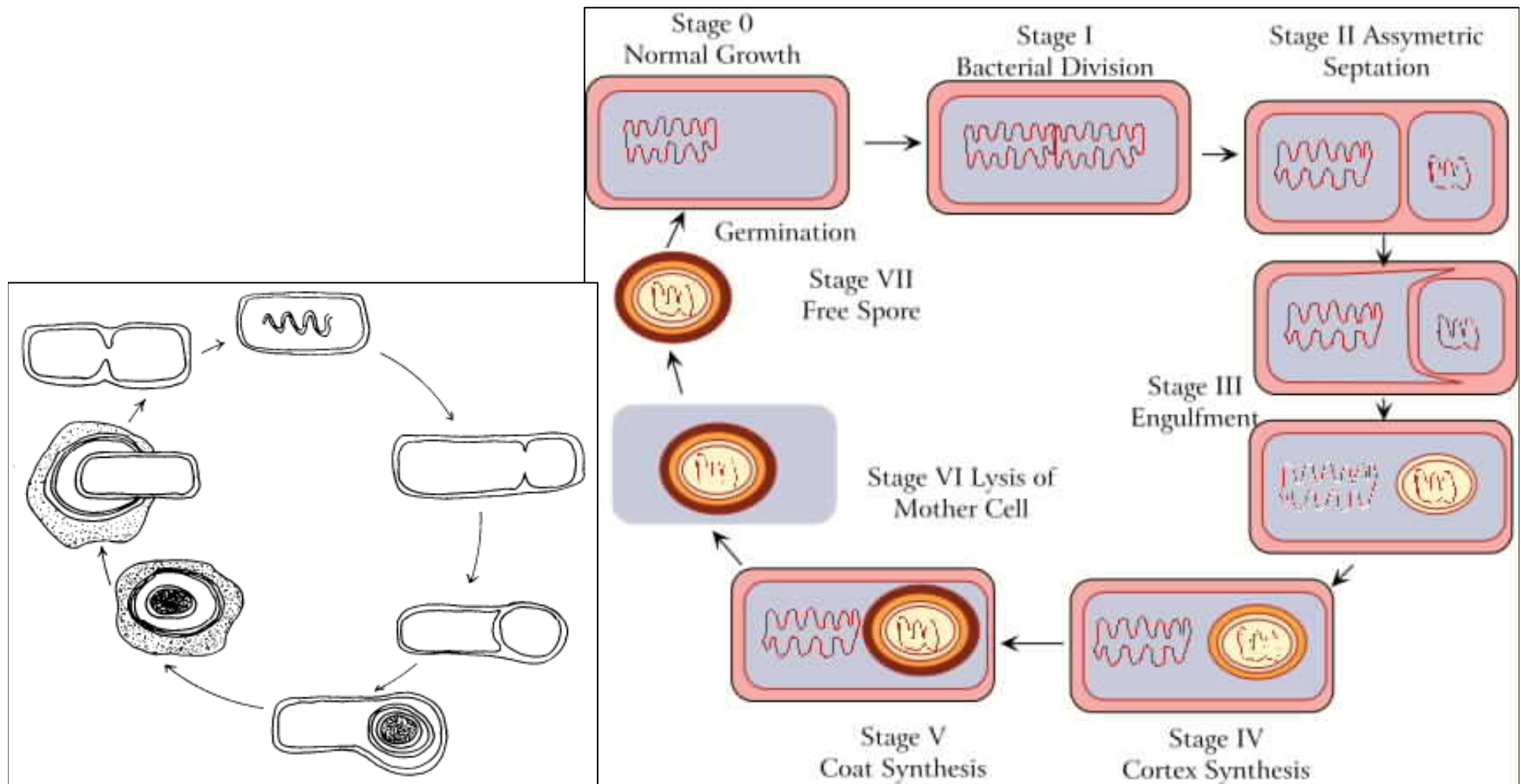
- asymetrický
- binární dělení



buněčné formy:

- vegetativní buňka
- spora
- cysta

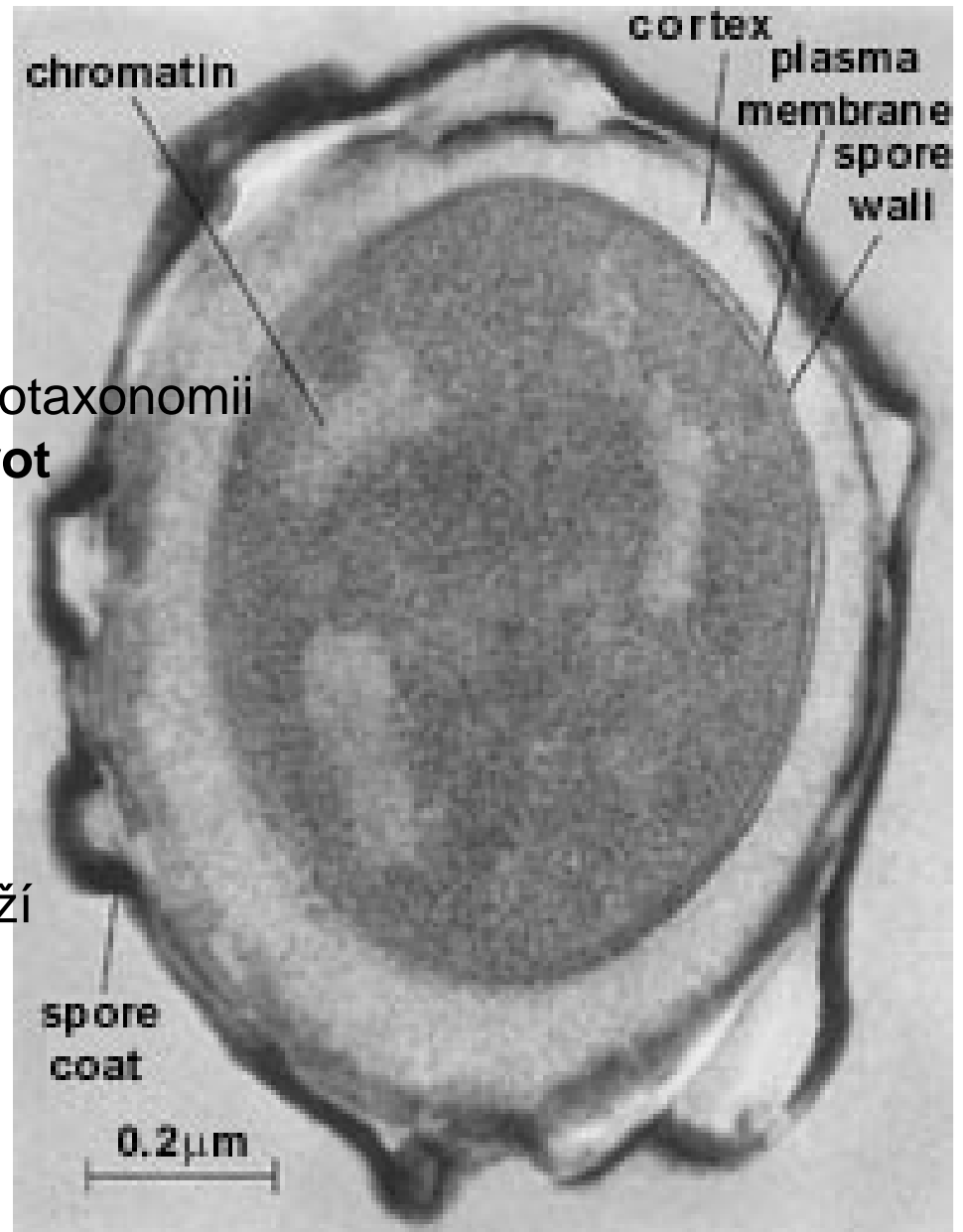
- Sporulace **NENÍ** odpověď na nepříznivé podmínky, ale přípravou na ně!!!!
- sporulují převážně G+ rody



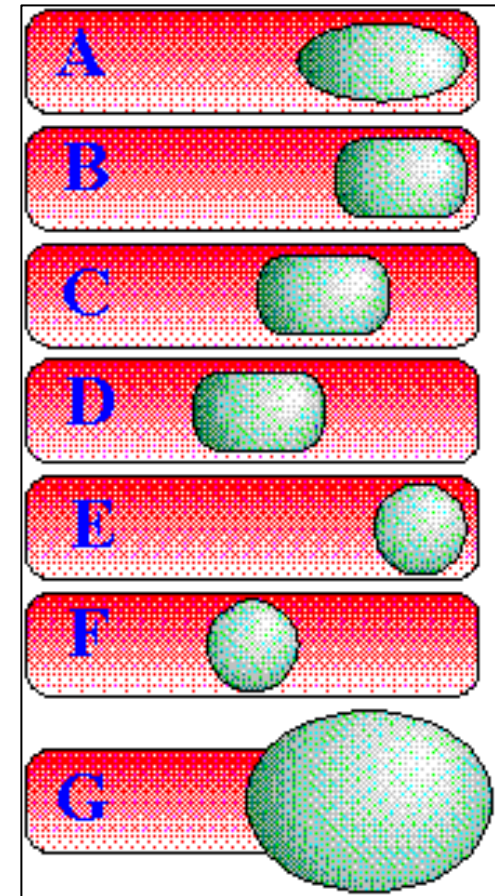
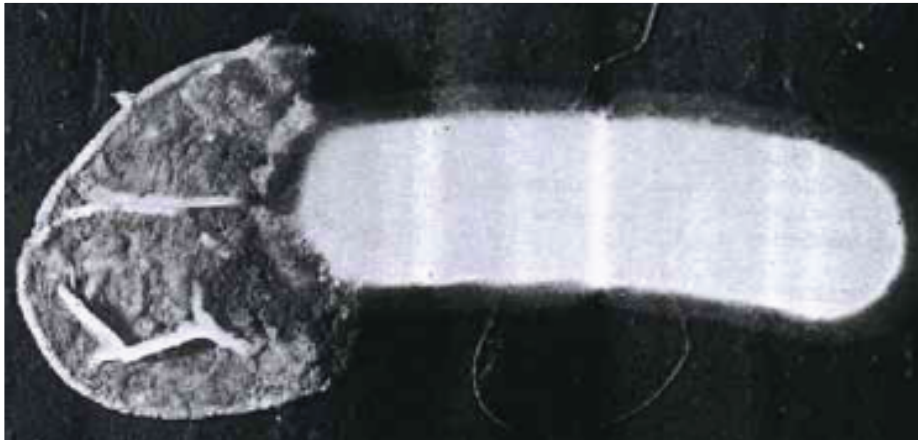
Spora – klidové stadium

Dipikolinát - termorezistence
Proteiny stabilizující DNA
Odlišný peptidoglykan
Reparační enzymy při germinaci

- **bílkoviny pláště** – význam v chemotaxonomii
- **pouze 1 spora v buňce u prokaryot**
- často toxigenní a alergenní (kontaminace potravin), ale i pro vakcinaci, bioinsekticid
- ověření sterilizace
B. stearothermophilus – spory vydrží při 120°C až 12 min
- značná odolnost



- umístění spory a tvar– důležitý taxonomický znak
Bacillaceae – 3 morfologické skupiny

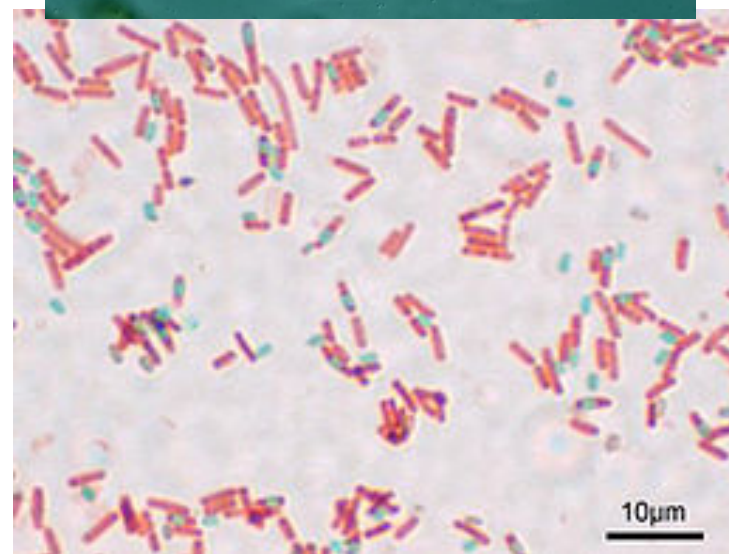
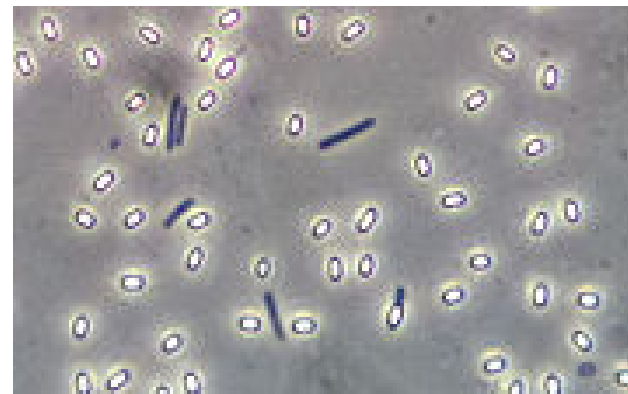


Klíčení spory

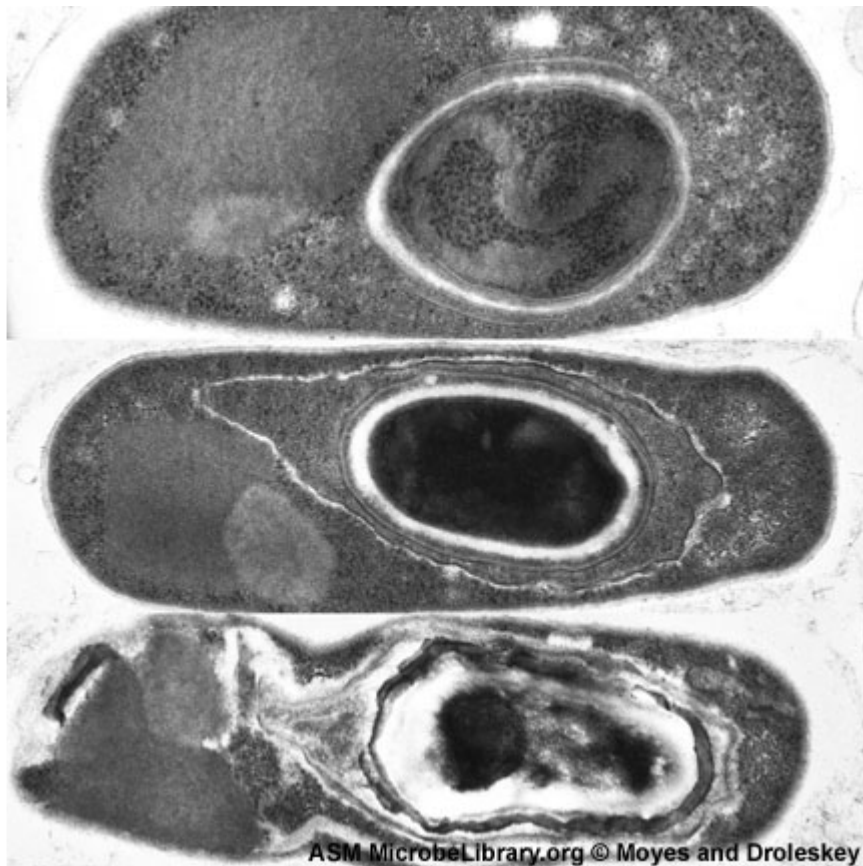
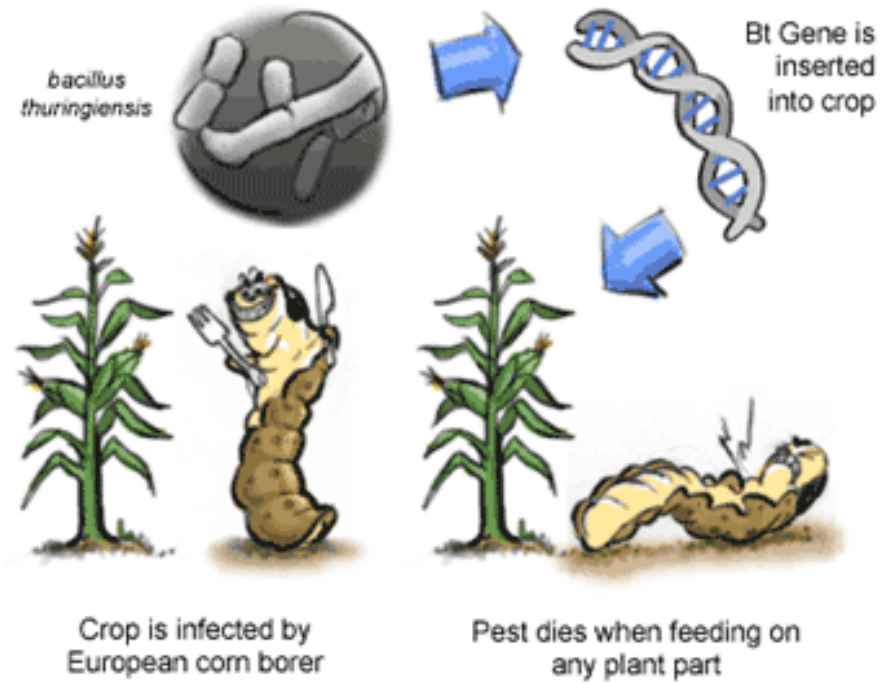
- přítomnost vody, aminokyselin, vitamínů, zahřátí, ...)
- asi 10 min (aktivace spory, vlastní klíčení, diferenciační fáze)
- inhibice klíčení v mediu: D-alanin, $MgCl_2$

Pozorování spor

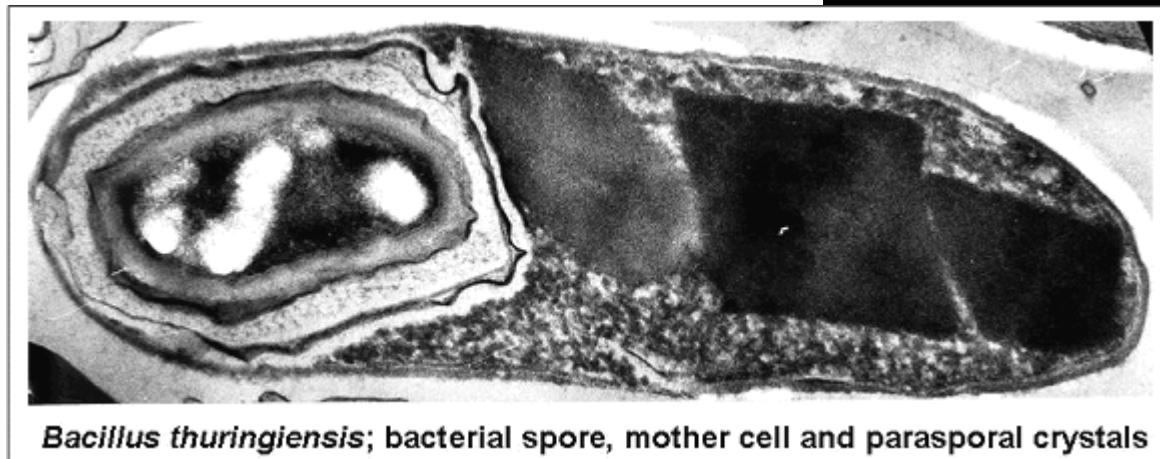
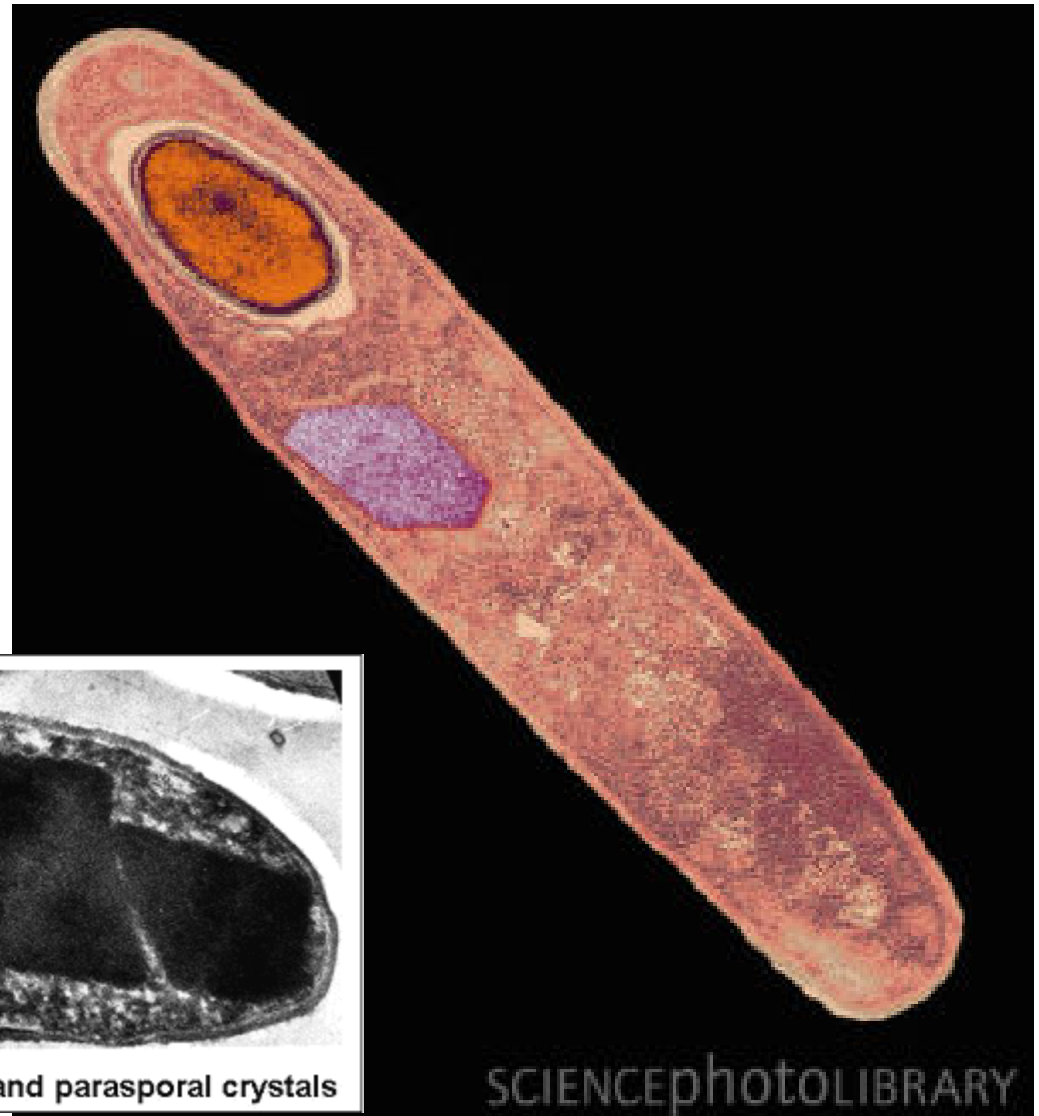
- **Fázový kontrast**
(barvitelné a světlolomné až po vzniku kortexu spory, předtím je při fázovém kontrastu nelze vidět)
- **Nomarského kontrast**
– plastický povrch buňky
- **barvení buněčné stěny**
– jen pro pozorování vyklenutí
- spory jsou barvitelné za tepla,
barvení Schaffer-Fulton (jasné pole)



B. thuringiensis



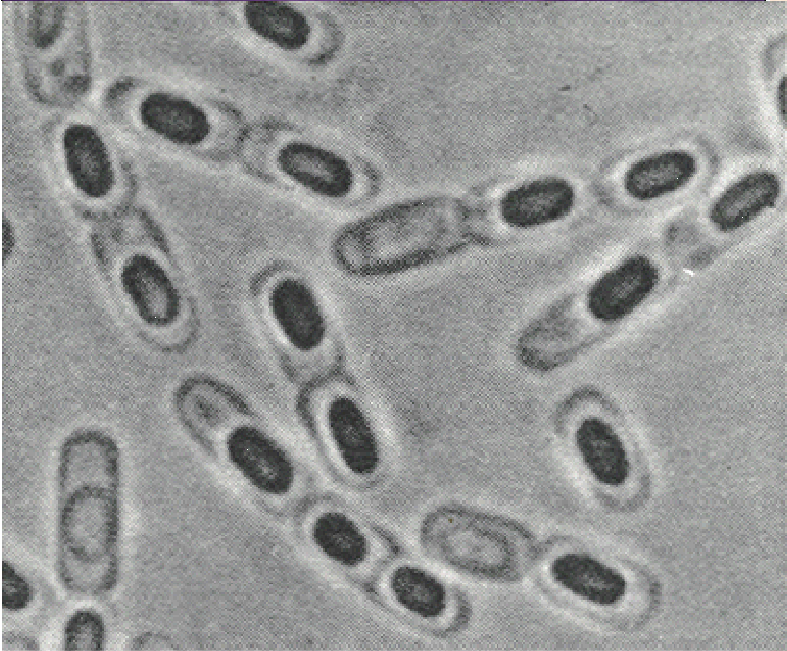
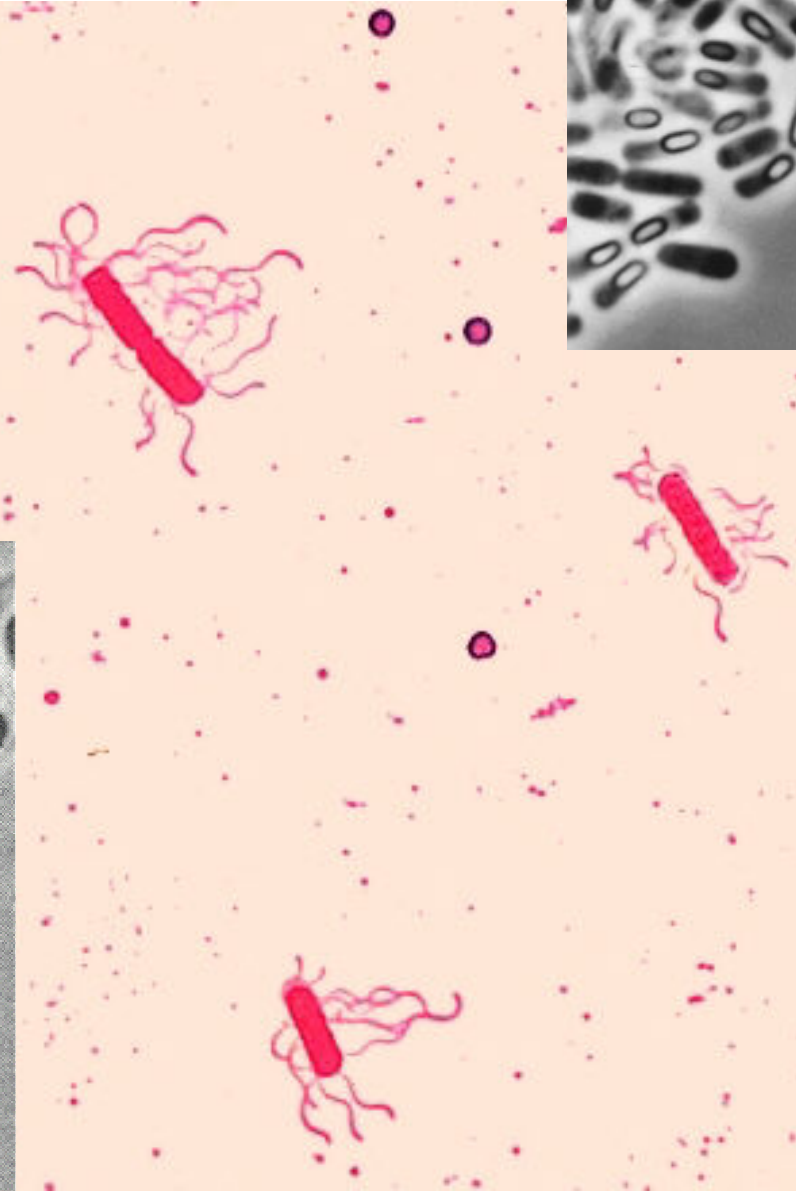
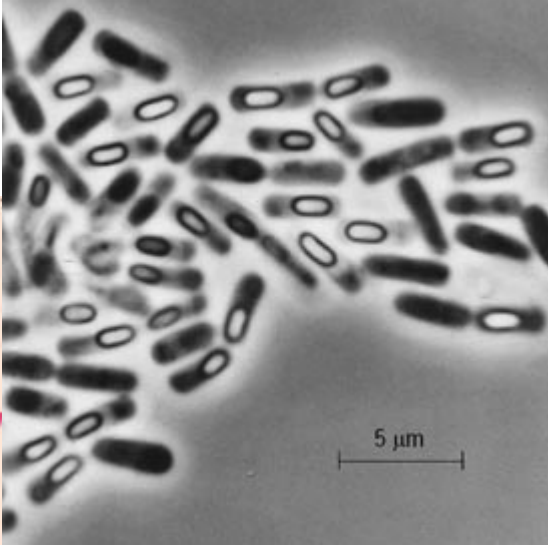
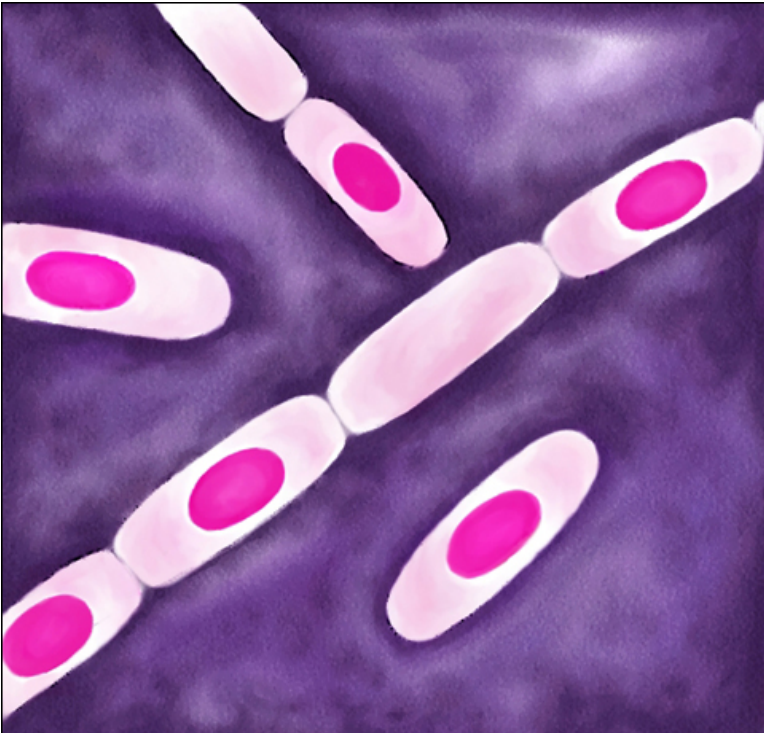
B. thuringiensis



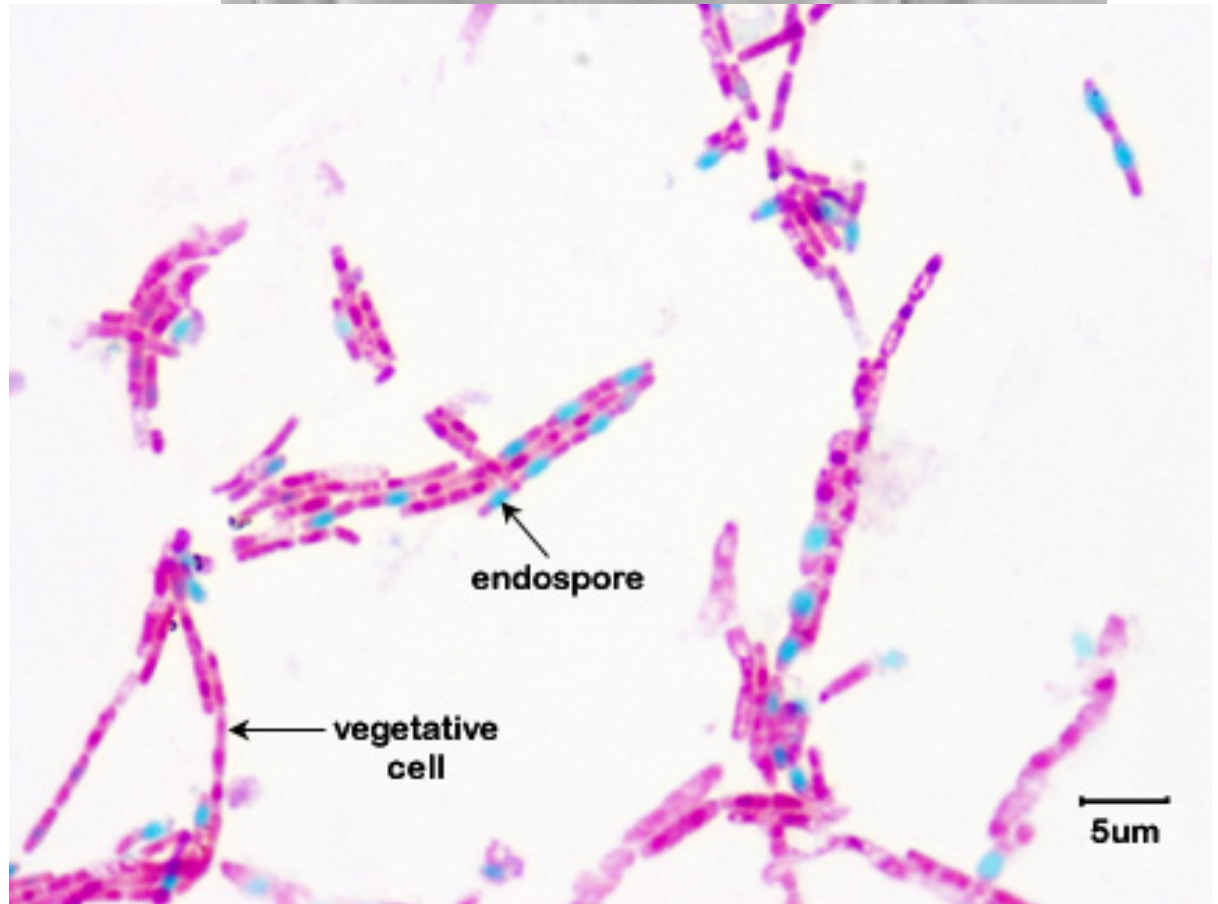
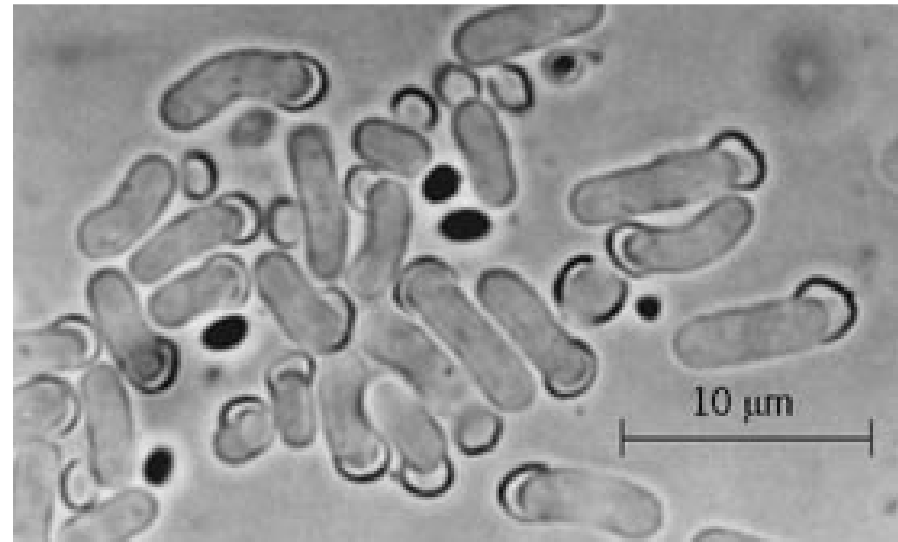
Bacillus thuringiensis; bacterial spore, mother cell and parasporal crystals

SCIENCEPHOTOLIBRARY

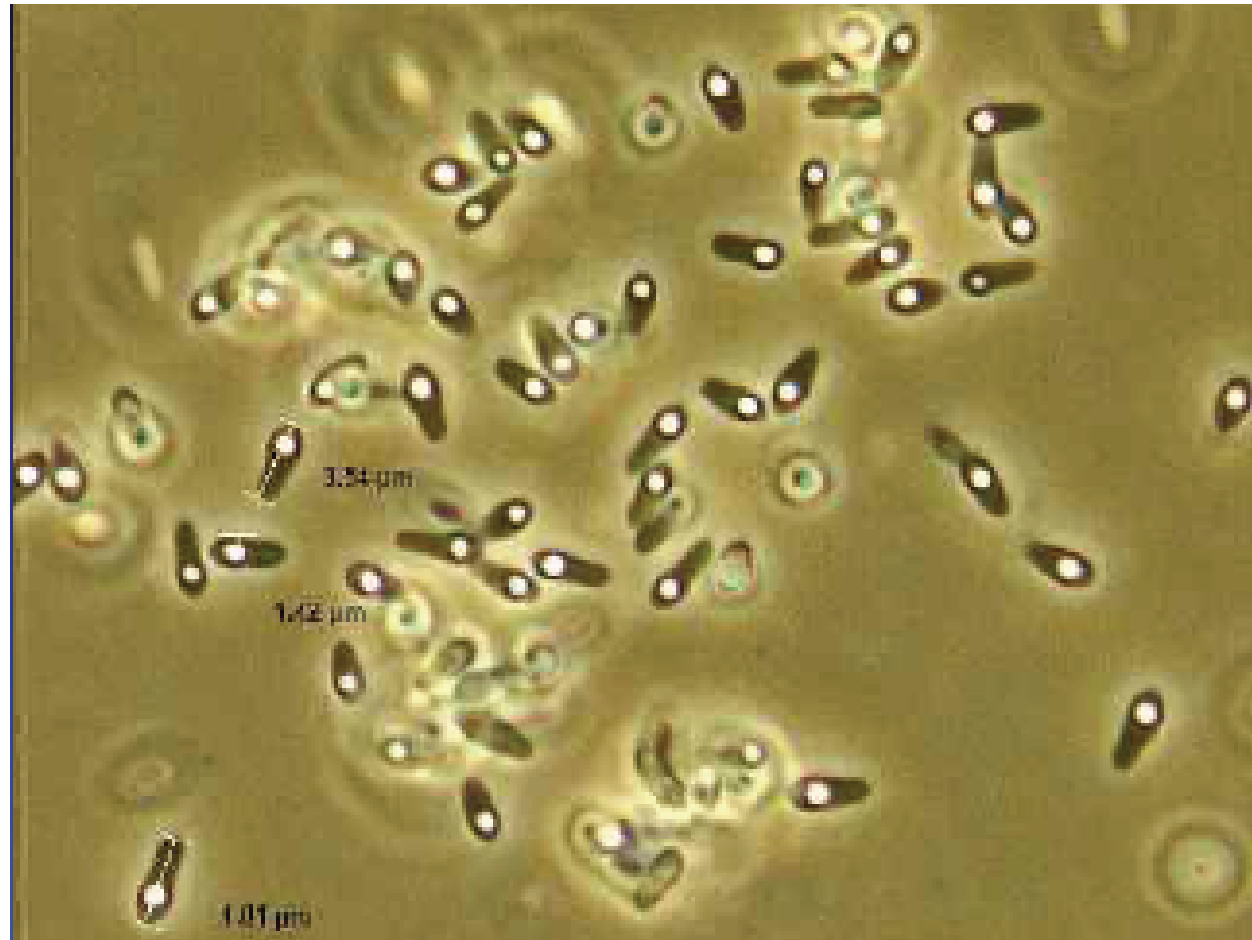
B. cereus



B. megaterium



B. sphaericus



Postup

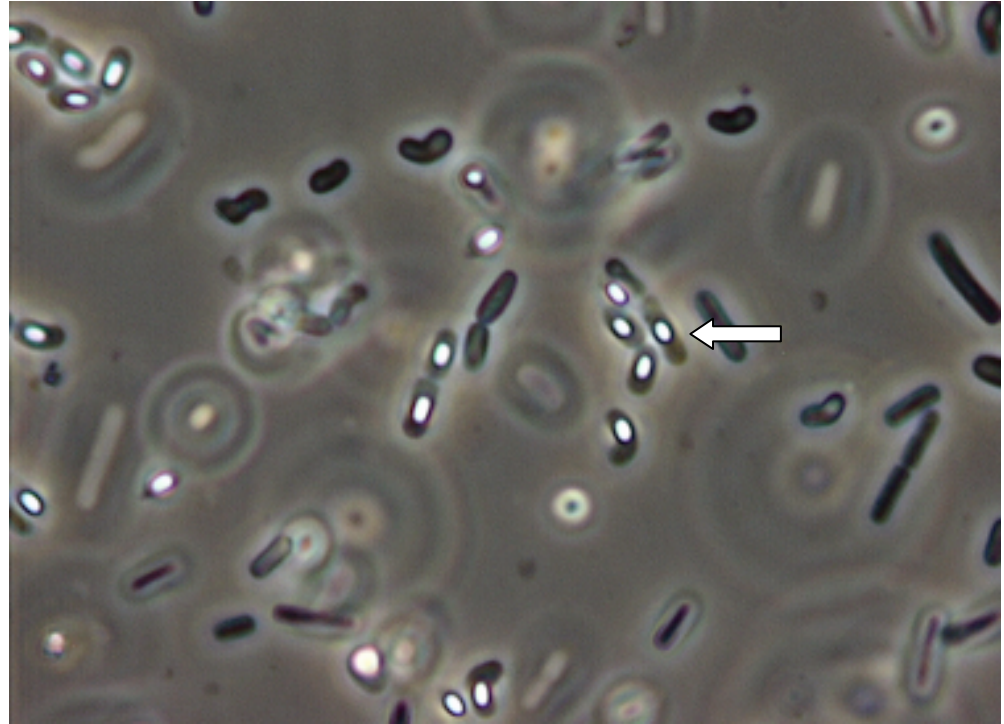
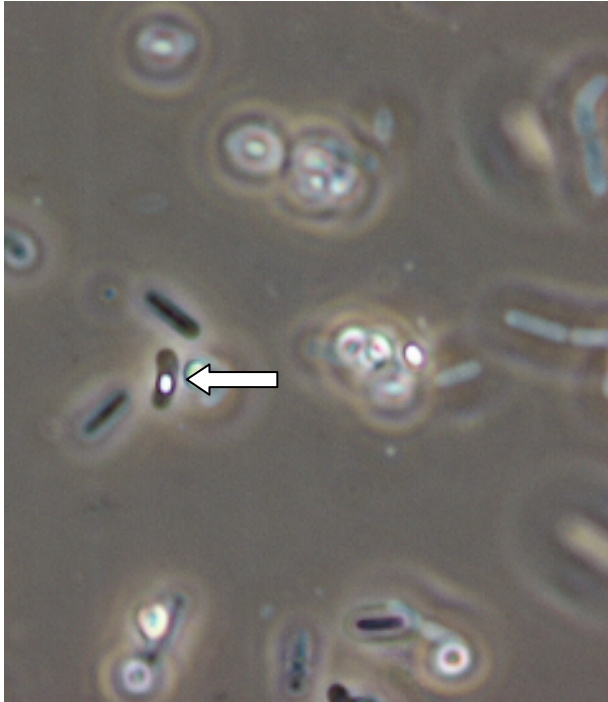
- **Negativní barvení – nigrosin**
 - do kapky vody nanést kličku kultury (*Azotobacter* nebo *Bacillus*)
 - přidat kapku nigrosinu
 - rozmíchat, rozetřít druhým sklíčkem a nechat zaschnout
 - pozorovat s imerzí v jasném poli (1000x)
- **Barvení pouzder (*Azotobacter*) Kongo červení**
 - do kapky Kongo červeně nanést bakteriální kulturu a rozetřít po sklíčku
 - po zaschnutí se preparát na několik sekund převrství HCl, která se následně slije
 - preparát se osuší filtračním papírem, převrstvit na 3 min metylenovou modří
 - barvivo slít a pozorovat s imerzí v jasném poli (1000x)
- **Nativní preparát (*Bacillus*)**
 - do kapky vody rozmíchat kličku kultury, přikrýt krycím sklem
 - pozorovat do 5 min při fázovém kontrastu (1000x)

- ***B. sphaericus*** – kulaté, terminální, ztlušťují buňku
- ***B. thuringiensis*** – oválné, subterminální, nevyklenují
- ***B. cereus*** – centrální, oválné, nevyklenují
- ***B. megaterium*** – kulaté, subterminální, nezduřují
- ***Paenibacillus polymyxa*** – centrální, velké, vyklenující

Fázový kontrast

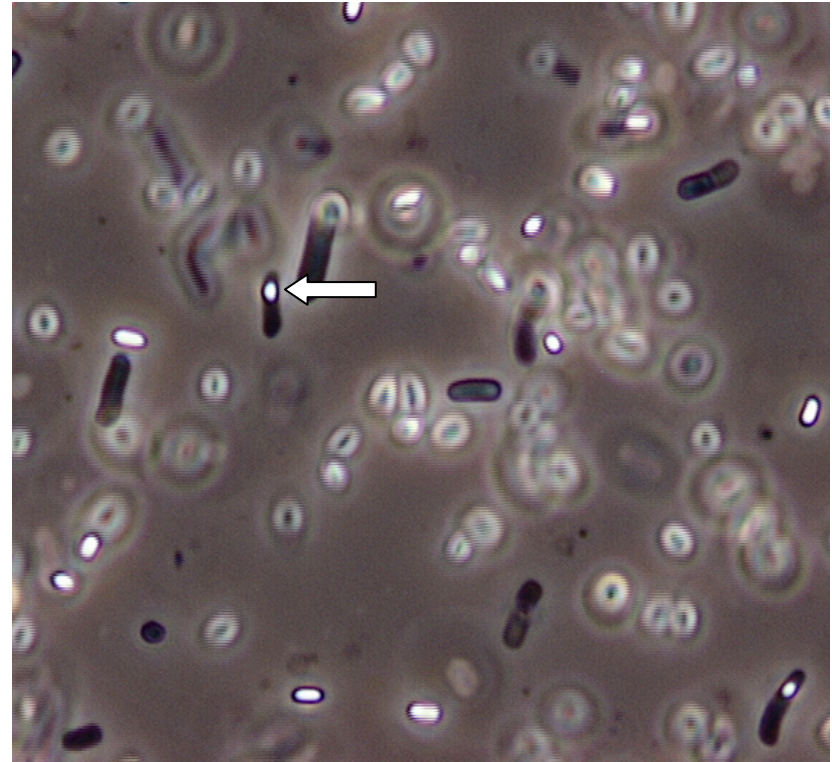
-

fotky ze cvičení



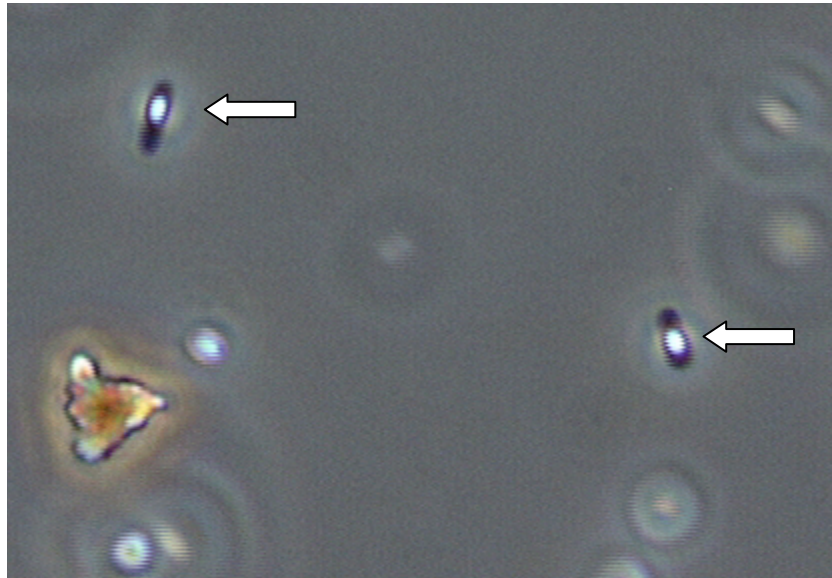
Bacillus cereus

- centrální, oválné, nevyklenují



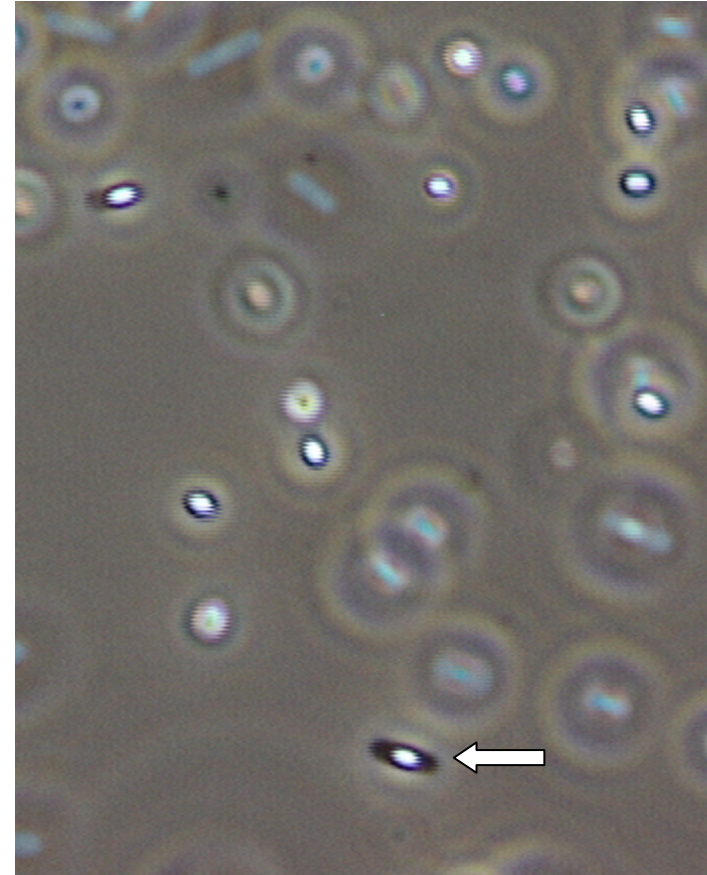
Bacillus megaterium

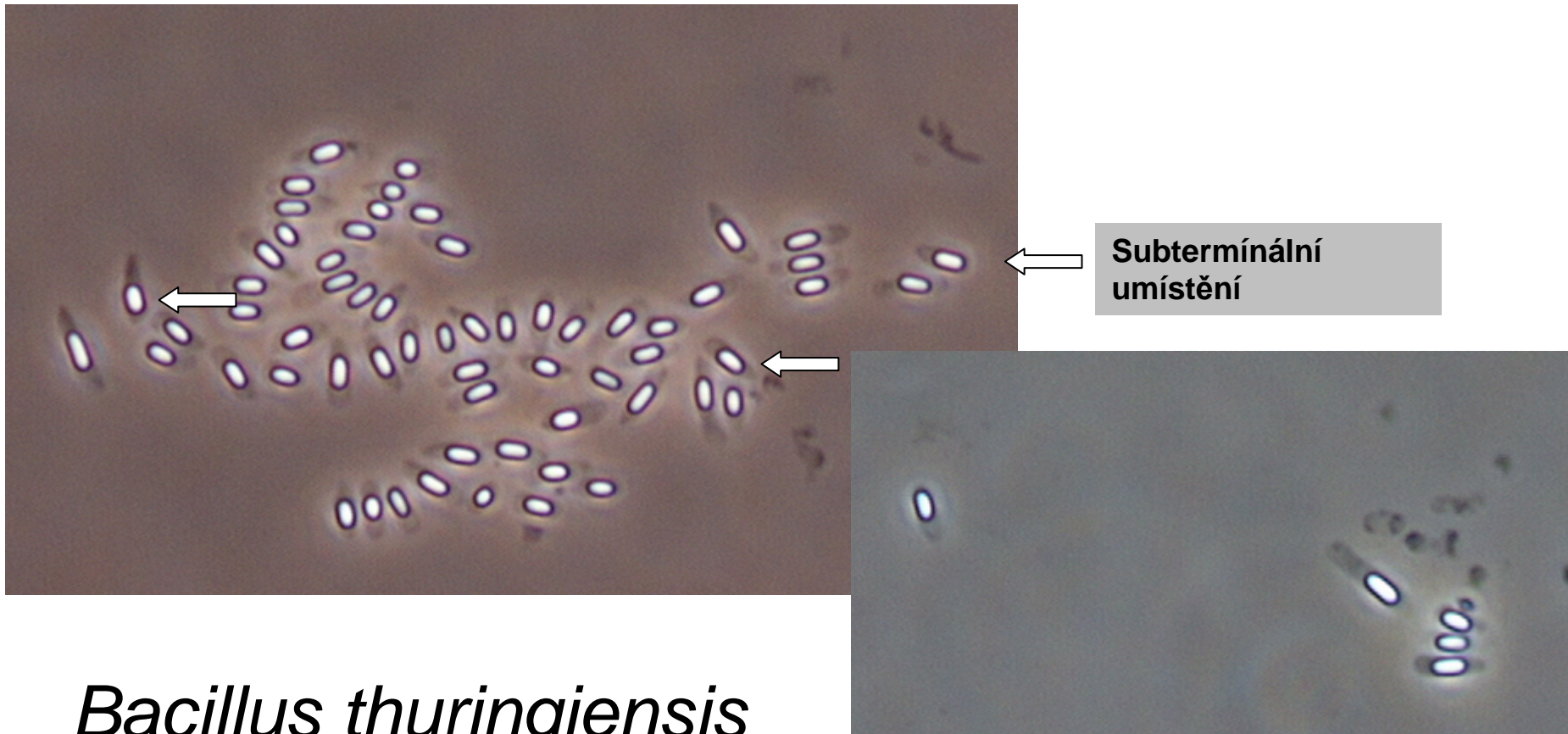
- kulaté, subterminální, nezduřují



Bacillus subtilis

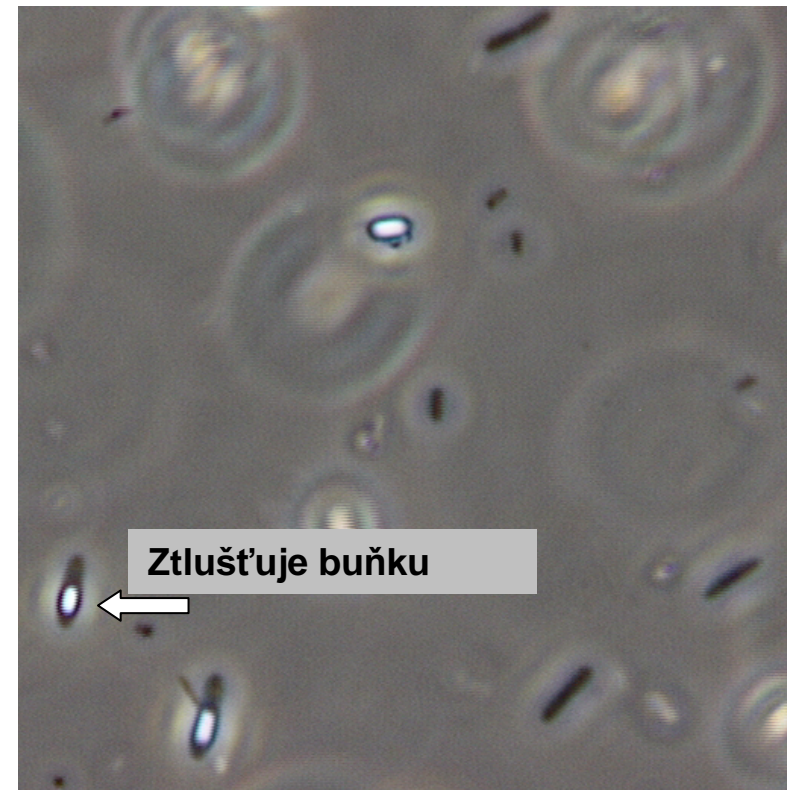
- Oválné, neztlušťuje buňku





Bacillus thuringiensis

– oválné, subterminální, nevyklenují

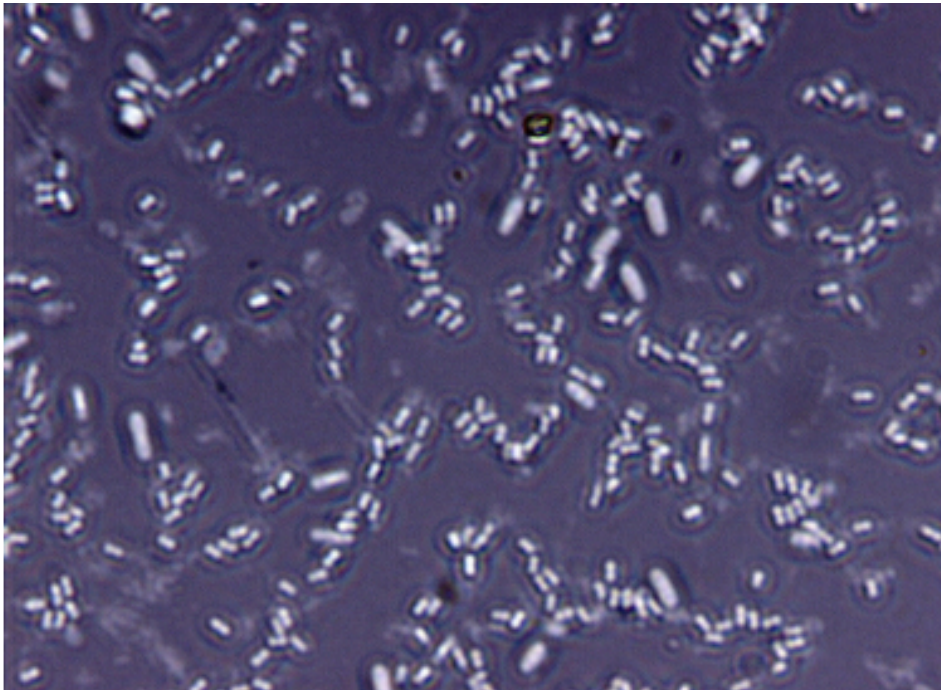


Paenibacillus polymyxa

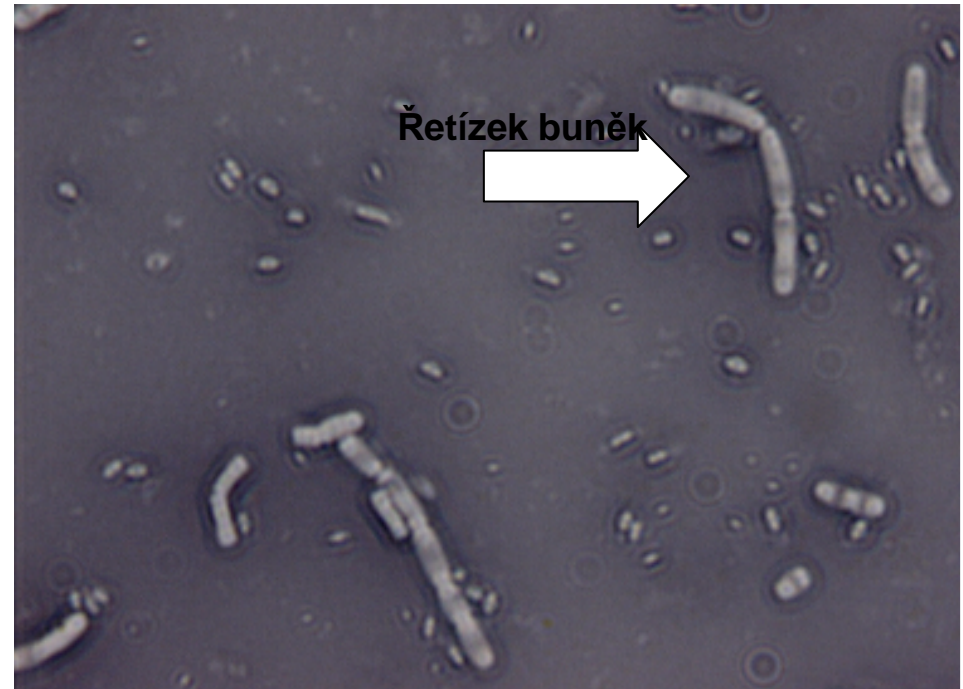
- centrální, velké, vyklenující

Negativní barvení - nigrosin

Bacillus subtilis

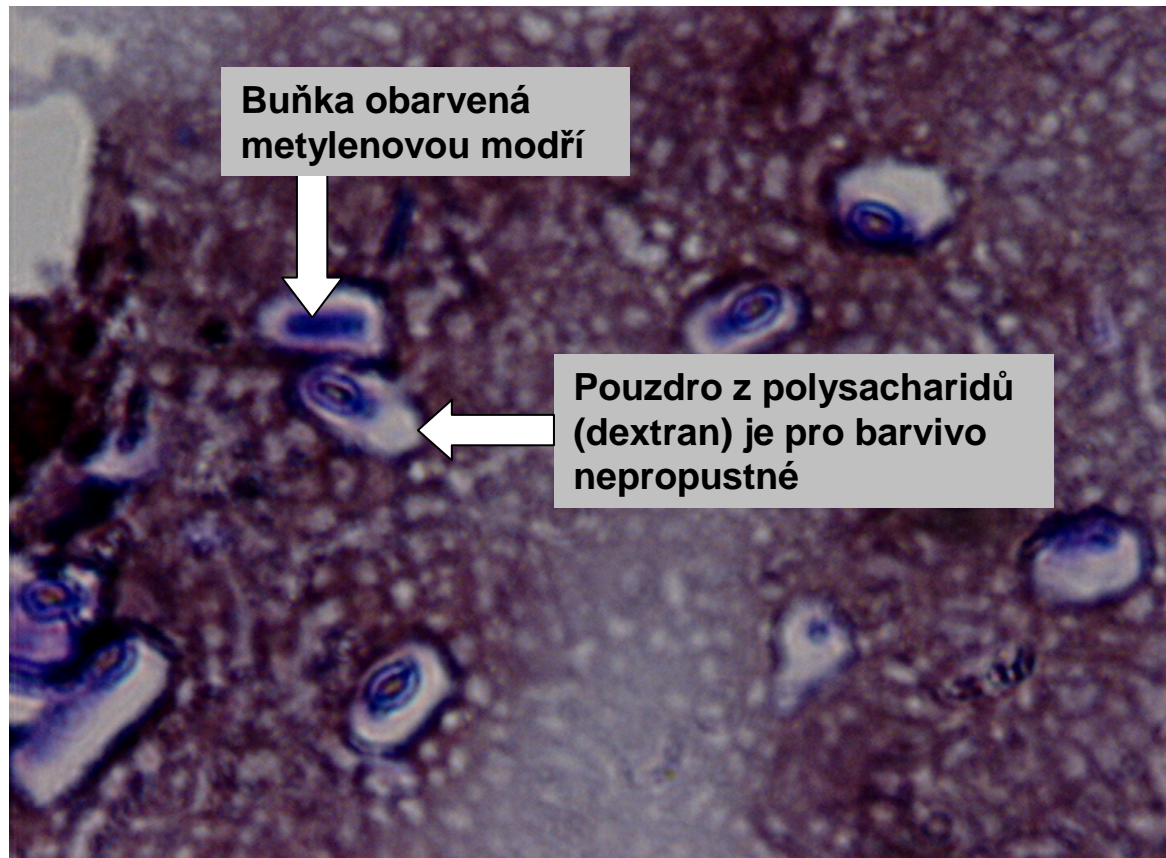


Bacillus thuringiensis



Barvení pouzdra – Kongo červeň

Azotobacter



Negativní barvení

(Kongo červeň+methylenová modř)

