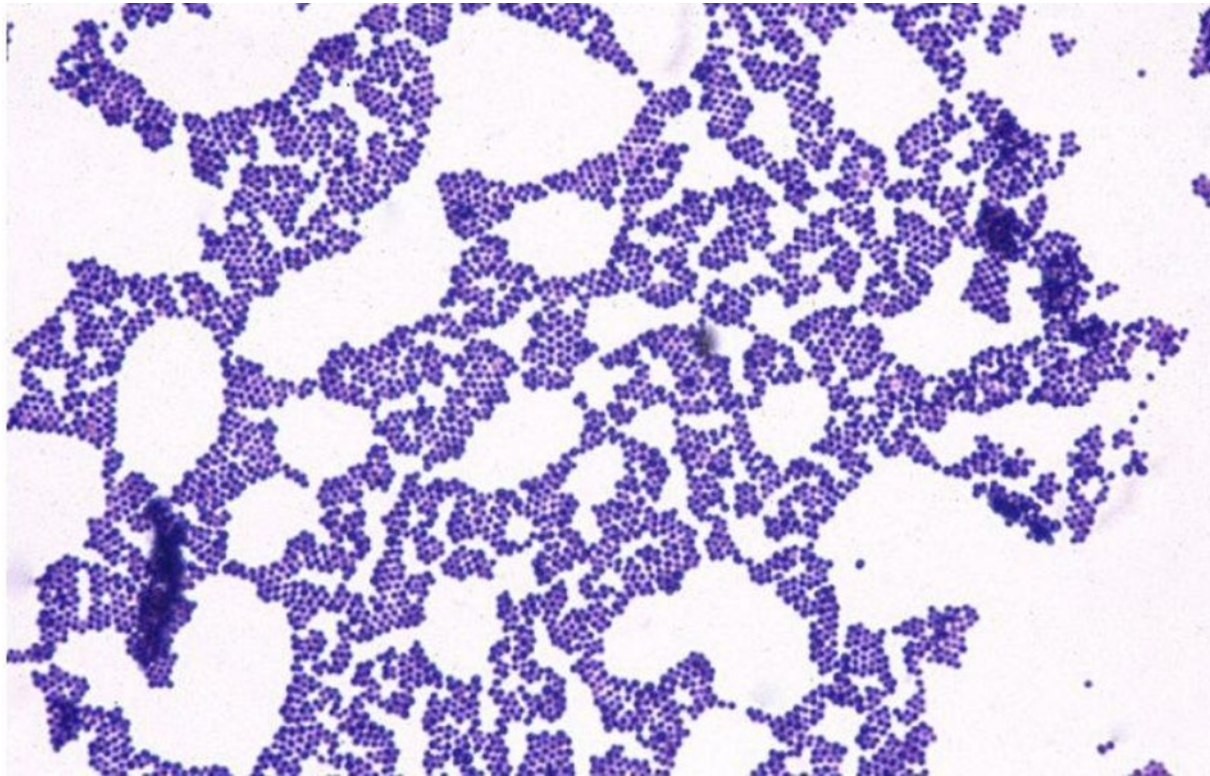


Makroskopické pozorování mikroorganismů, Gramovo barvení



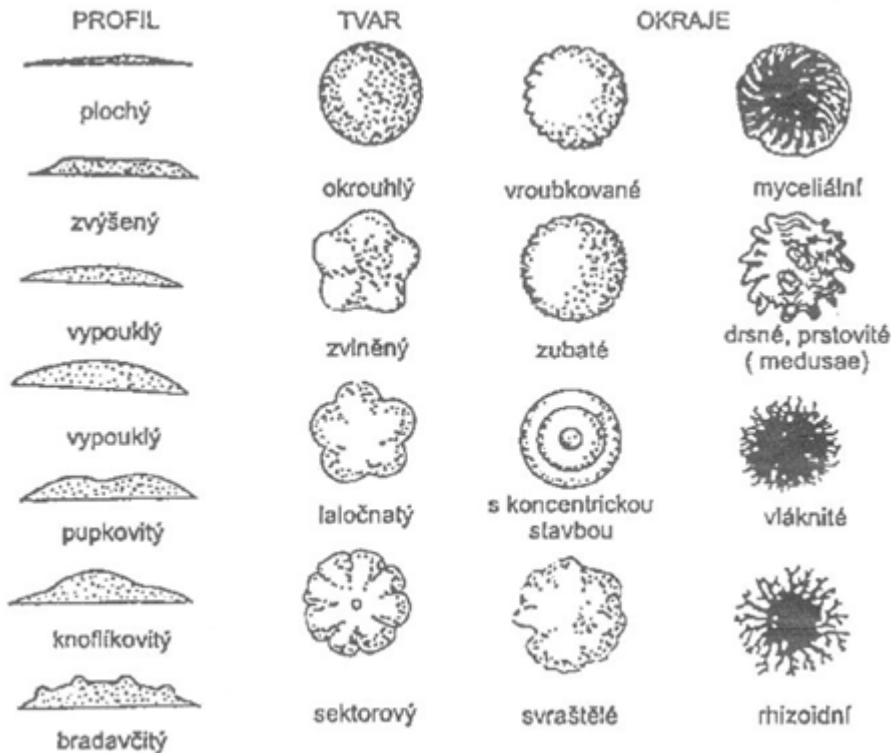
Očkování kultur, sterilita práce

- Sterilita vs kontaminace?
- Misky – jednotlivé kolonie?
- Misky – mix - jednotlivé kolonie?
- Šikmý agar (uchovávání)
- Bujón – zákal, blanka povrchvé útvary (mázdra)?



Tvary kolonií

Při správně provedeném křížovém roztěru můžeme pozorovat na plotně jednotlivé kolonie. Hodnotíme jejich barvu, tvar, profil a okraje...



- Velikost (průměr; mm)
- Tvar – kolonie pravidelná kulatá, oválná, nepravidelně laločnatá, vláknitá, rhizoidní, plazící se
- Profil – kolonie vyvýšená, plochá, pupkovitá, miskovitá ...
- Okraje – pravidelné, filiformní, laločnaté, okrouhlé ...
- Povrch – hladký, lesklý (S – fáze), matný, drsný (R- fáze),
- Transparence – průhledná, průsvitná, neprůsvitná kolonie
- Barva - kolonie bezbarvá, či pigmentovaná: našedlá, bělavá, žlutá ...

Další znaky popisované na bakteriální kolonii:

Vůně, zápach – po jasmínu, žluklém másle, ovocný ...

Tvorba mycelia

Změny media – dvorec zbarvení, hemolýzy, precipitátu

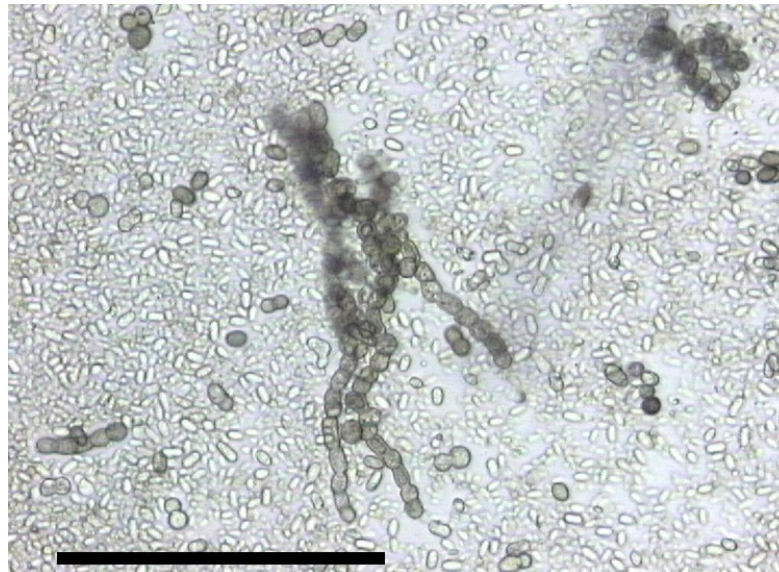
Konzistence – zjišťuje se bakteriální kličkou (viskózní, mazlavá, drobná, zarůstá do agaru)

Mikroskopické preparáty

Nativní preparát

Nefixovaný, nebarvený

- 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



Barvené preparáty

- Barvivem zvýrazníme tvar buňky
- či zjistíme, zda je živá (vitální test)
- struktury rozlišujeme diferenciačním barvením a to jak morfologické útvary (spory, membrány, buněčná stěna), tak chemické složky (barvení volutinu, glykogenu, škrobu.)
- diagnostické barvení pak pomáhá identifikaci (Gramovo, acidorezistentní)

Fixování 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
- Fixujeme až ve chvíli, kdy je nátěr buněk suchý - 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
- Kvasinky a plísně jsou větší než buňky bakterií a tepelná fixace již příliš mění jejich (většinou se fixují chemikáliemi)

Gramovo barvení

- je jednou z nejdůležitějších diagnostických metod při identifikaci bakterií
- rozlišuje skupinu grampozitivních **G+** (barví se modrofialově)
- gramnegativních **G-** buněk (barví se červenorůžově) a udává některé fyziologické a chemické vlastnosti buňky

G⁺ = modro-fialová barva (crystal violet) G⁻ = červená barva (safranin)

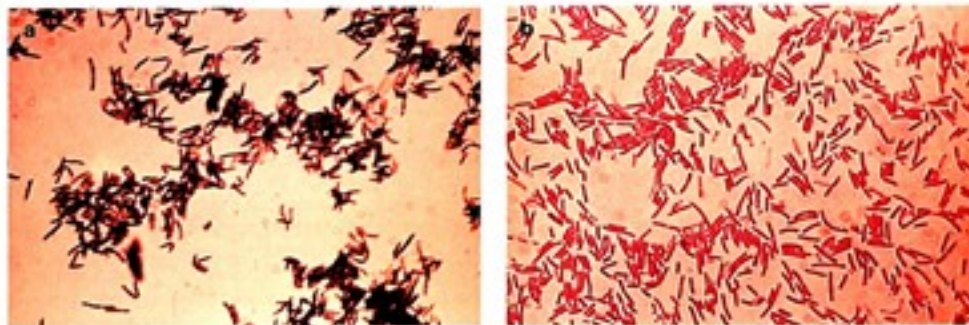
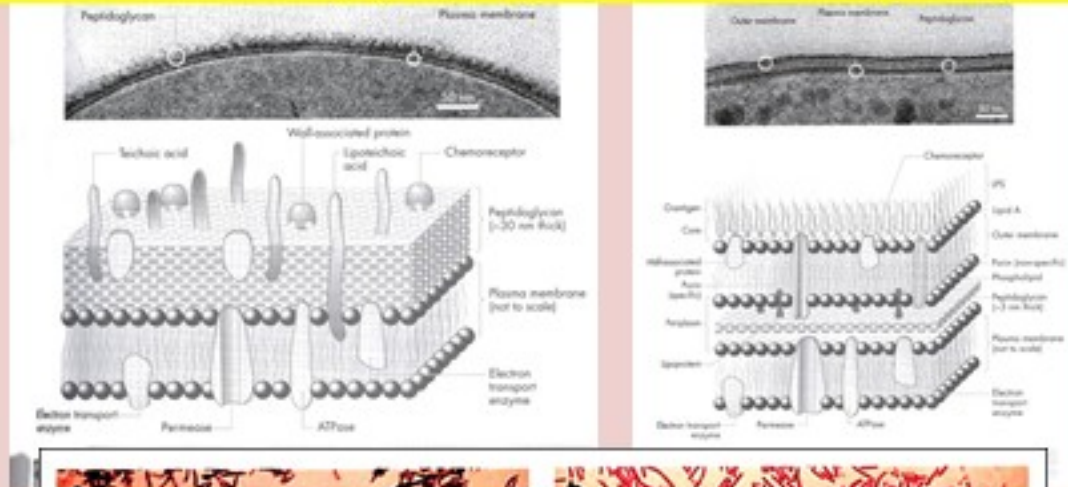


FIGURE 2.13 Typical gram-positive (blue) and gram-negative (red) bacteria identified by the Gram stain.

Differentiation of bacteria based on retention or loss of a crystal violet-iodine complex and counterstaining with safranin

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 (acetonem 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)
- U gramnegativních buněk odbarvovací činidlo rozpustí vnější lipopolysacharidovou vrstvu a komplex krystalové violeti s jódem se vymyje přes tenkou vrstvu peptidoglykanu

Nejčastější chyby:

- příliš silný nátěr buněk na sklíčku
- sušení plamenem nedostatečně suchého preparátu - tj. uvaření buněk
- příliš dlouhé odbarvování alkoholem nebo acetonem



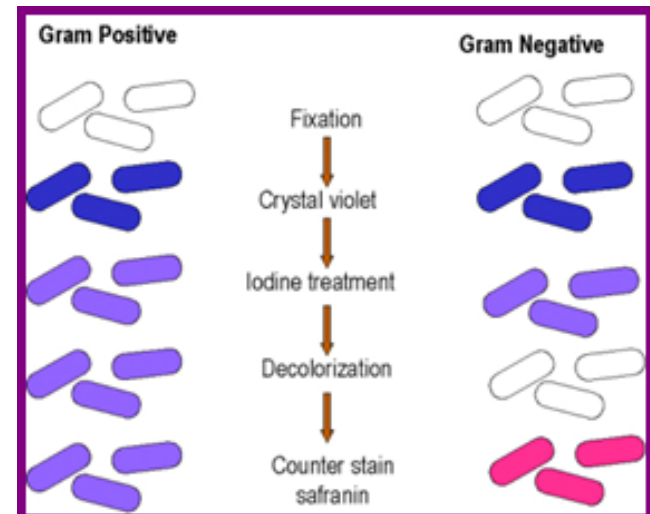
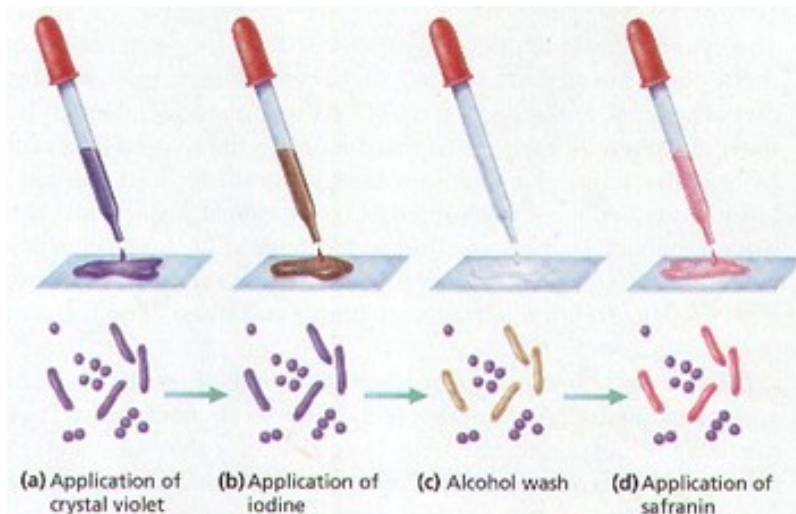
G-



G+

Postup:

- **suspenzi** z kultury mikrobů **rozetřeme na čisté** podložní sklíčko (označíme stranu sklíčka) 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
- buňky **dobarvíme safraninem 1 minutu** (takto se dobarví pouze buňky gramnegativní, u kterých došlo k vyplavení krystalové violeti)
- osušíme mezi dvěma filtračními papíry a mikroskopujeme pod imerzním objektivem (zvětšení 1000x)



DĚKUJI ZA POZORNOST

