

Náplň cvičení 1 Návod pro protokoly

Osnovy přednášek a sylaby najdete na následující adrese:

<http://www.sci.muni.cz/mikrob/cytologieosn.html>

Ukázky protokolů (ve WORDU i v powerpointu) pak:

https://is.muni.cz/auth/elearning/warp.pl?fakulta=1431;obdobi=3584;kod=Bi7330;qurl=%2Fel%2F1431%2Fpodzim2006%2FBi7330%2Findex.qwar p;zpet=https:%2F%2Fis.muni.cz%2Fauth%2Fucitel%2Fwarp_predmet_v yber.pl%3Ffakulta%3D1431%3Bobdobi%3D3584%3Bkod%3DBi7330;zpet_text=Zp%C4%9Bt%20na%20v%C3%BDb%C4%9Br%20osnov

Ve cvičeních větš. nebudeme dělat nákresy, výsledky se ukládají v podobě fotek z programu LUCIA.

Kmeny mikroorganismů pro cvičení 1 a 2

(ke každé úloze 2-3 preparáty své nebo spoluautorů, do každého protokolu pak psát pouze kmeny v něm zobrazené)

Bacillus thuringiensis CCM 19 (G+ tyčky)

Arthrobacter crystallopoietes CCM 2386 (G+ tyčky)

Serratia marcescens CCM 303(G- tyčka)

Azotobacter vinelandii CCM 289 (slizovité kolonie, pouzdra)

Leuconostoc mesenteroides CCM 1803 (slizovité kolonie, pouzdra)

Bacillus sphaericus CCM 1615 (G+ tyčky)

Bacillus mycoides CCM 145 (G+ tyčky)

Sporosarcina ureae CCM 860 – G+ tetrády

Bacillus cereus CCM 2010 (G+ tyčky)

Bacillus megaterium CCM 2007 (G+ tyčky)

Bacillus subtilis CCM 2216 (G+ tyčky)

Streptomyces griseus ssp. griseus CCM 2386 – vlákna, G+

Nocardia carnea CCM 2756 – pro makrofoto kolonií

Saccharomyces cerevisiae – kvasinka, eukaryotní buňka, pro fázový kontrast

Micrococcus luteus CCM 169 - G+ kok

Protokol č.1: Mikroskopické techniky

Mikroskopický preparát:

Některé morfologické znaky mikroorganismů je třeba posuzovat v mikroskopickém preparátu. Pro posouzení skutečného tvaru živé buňky, pohybu bakterií a pod. připravujeme nativní preparát. Vývoj a růst mikroorganismů pozorujeme zpravidla v tzv. vlhké komůrce, kde jsou sledované buňky umístěny ve visuté kapce. Pro diferencované vybarvení některých buněčných struktur nebo k rozlišení živých a mrtvých buněk připravujeme vitálně barvené preparáty. Mezistupeň mezi vitálními a fixovanými preparáty tvoří pozorování nezbarvených buněk na kontrastním pozadí - negativně barvené preparáty. Fixované a barvené preparáty nám umožňují lepší rozlišení jednotlivých typů bezbarvých bakteriálních buněk, jejichž tvar a struktura jsou bez předchozího barvení v optickém mikroskopu málo zřetelné.

1) Jasně pole: - barvené preparáty

a) Gramovo barvení 2-3 preparáty s popisem morfologie buňky
(příklad grampozitivní i gramnegativní buňky, tyčky, koky)

Ukázka rozdílů ve struktuře buněčné stěny

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 plísni a kvasinek se provádí pouze při speciálních typech barvení a její postup bývá součástí barvicí metodiky.

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

Gramovo barvení:

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.

Organismy:

24 hodinové bakteriální kultury

Pomůcky:

Barvicí roztoky - krystalová violet' (R2), Lugolův roztok (R3), karbolfuchsin (R4), etanol, očkovací klička, odmaštěná podložní skla

Postup:

- * Připravíme nátěr bakteriální kultury, dokonale vysušíme
- * Fixujeme plamenem
- * Převrstvíme krystalovou violetí - 30s
- * Barvivo slijeme, preparát krátce opláchneme vodou - 2s
- * Převrstvíme Lugolovým roztokem - 30s
- * Barvivo slijeme, preparát krátce opláchneme vodou - 2s

- * Preparát odbarvujeme etanolem nebo acetonem 20 - 30s
- * Opláchneme vodou - 2s
- * Dobarvíme zředěným karbolfuchsinem 30 - 60s
- * Preparát znovu opláchneme tekoucí vodou a osušíme mezi filtračními papíry.
- * Pozorujeme pod olejovou imerzí.

Hodnocení :

Pozorujeme mikroskopem při zvětšení 40x a 100x, u zvětšení 100x použijeme olejovou imerzi.

Grampozitivní organismy jsou zbarveny tmavě fialově až modročerně, gramnegativní bakterie jsou červené nebo růžové. Tvar buněk zakreslíme do protokolu, vyhodnotíme jejich grampozitivitu či gramnegativitu.

b) Barvení pouzder kongočervení – Azotobacter, Leuconostoc

= negativní barvení pozadí, nefixujeme

Buňky jsou pro tento preparát kultivovány ve spec.mediu s 20% sacharózy

Některé druhy bakterií tvoří za vhodných podmínek slizovité obaly kolem svých buněk. Jsou složeny především z polysacharidů, jsou silně hydratované a chrání buňku proti nepříznivým podmínkám. Slizovité obaly se vyskytují ve formě ostře ohraničených pouzder (kapsulí) nebo se difúzně zředí do prostředí. Na agarových vrstvách rostou tyto bakterie ve formě mukózních kolonií. Tato forma může spontánní mutací přecházet na formu, která sliz netvoří. Polysacharidové obaly znesnadňují izolaci bakterií, neboť se na nich zachycují buňky jiných druhů. Důkaz tvorby pouzder je založen na špatném pronikání některých sloučenin slizovitou vrstvou.

Negativní barvení tvoří přechod mezi pozorováním nezbarvených živých organismů a fixovaným barveným preparátem. Metoda spočívá v obarvení pozadí, buňky zůstávají nezbarvené, jejich obrysy jsou orámovány barvivem. Používá se k mikroskopickému stanovení pouzder a slizů a k měření velikosti bakteriálních buněk, tedy v případech, kdy nemůžeme preparát fixovat, protože by došlo ke změně velikosti buněk a k deformaci pouzder.

- * 2. Barvení Kongo-červení: Na sklíčko se kápne kapka Kongo-červeně a přímo v ní se suspendují buňky. Suspenze se rozetře po povrchu sklíčka a nechá zaschnout. Převrstvíme na několik sekund HCl, slijeme, přebytečnou HCl (neoplachujeme) ,osušíme filtračním papírem a dosušíme na vzduchu.

Hodnocení:

Pozorujeme pod imerzí 1.červené buňky, růžová pouzdra a šedé pozadí, 2.modré buňky, světlá pouzdra a modré pozadí. Zakreslit!

2) Nomarského diferenciální interferenční kontrast

Nativní preparát, popis:

Velké buňky, rozdíly kontrastu dle různého indexu lomu různých částí buňky

Př: Saccharomyces a bacily 2 – 3 obrázky

6.1.1. Příprava nativního preparátu

Postup :

- * Podložní sklo vyjme z alkoholu, přidržíme nad plamenem a položíme na tmavou podložku
- * Do středu sklíčka nanese kapku sterilní vody a vyžihanou 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, rozeřtým 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.

3) Fázový kontrast

Nativní preparát

Popis: Velké buňky, spory bacillus cereus (dvoudenní kultura), haló efekt

Bacily, sporosarcina 2 – 3 preparáty

Mikroskopické techniky: barvení

- Organismus je fixován na sklíčko protažením přes plamen
- Barvivo je aplikováno na fixovaný organismus
- Barvivo barví jen určité buněčné součásti nebo určité organismy
- Pozitivní barviva**
 - Afnita k buněčným komponentám
 - Buňky fixovány
- Negativní barviva**
 - Nepronikají do buňky
 - Poskytují kontrastní tmavé pozadí
 - Znázornění povrchových struktur živých buněk

Jednoduché barvení

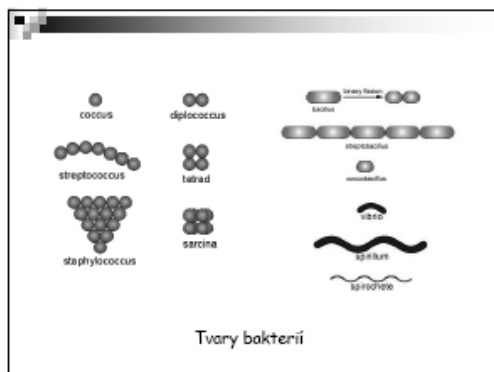
- Aplikováno pouze jedno barvivo
- Metylenová modř**
 - Bazilické barvivo s pozitivním nábojem
 - Váže se na povrch buňky, nukleové kyseliny (negativní náboj)
 - Neodhaluje vnitřní strukturu
- Kyselá barviva**
 - Negativní náboj
 - Eosin, fuchsin, Kongo červen
 - Barví bazilické komponenty (bazilické proteiny)
- Sudánská čern**
 - Rozpustná v tukích, barvení lipidů v buňce

Diferenciální barvení

- Barvení dle Grama
- Barvení fuchsinem
- Slouží k identifikaci
 - Určitých skupin bakterií
 - Určitých buněčných struktur

Tvary bakterií

- Tři základní tvary:
 - Koky (průměr 0.5-1.0 μm)
 - Tyčinky – bacily (šířka 0.5-1.0 μm , délka 1.0-4.0 μm)
 - Spirály (délka 1 μm až 100 μm)
- Některé mají přechodný tvar (kokobacily)
- Jiné tvary
 - Čtvercové
 - Hvězdičkovité
 - Vřetenovité
 - Lalokovité
 - Mnohotvaré
 - Vláknité



Tvar



Okraje



Profil



Podle účelu barvení rozlišujeme:

- ✓ **Jednoduché barvení**, které slouží k rozlišení tvarů buněk.
- ✓ **Diferenciální barvení**, které slouží k rozlišení jednotlivých morfologických útvarů (jádra, spory) nebo chemických složek buněk (volutin, zrna, škrob, tuk).
- ✓ **Diagnostické barvení**, které slouží jako pomůcka k identifikaci mikroorganismů (např. Gramovo barvení).