

Protokol č.3
Barvení struktur buňky

Inkluze

Zásobní látky nebo produkty metabolismu nebo uložení nepotřebné látky z vnějšku a prozatím bez funkce (kvasinky a stafylokoky hromadí vitamíny). Bez membrány nebo s membránou - není biologická – není to dvojvrstva fosfolipidů. Je jednovrstevná, tvořená bílkovinou + lipidem nebo bílkovinou + polysacharidem.

Mikroorganismy: *Saccharomyces cerevisiae*

***B. cereus* CCM 2010**

***B. megaterium* CCM 2007**

Volutin – barvení polychromatickou methylenovou modří :

Polyfosfátová granula – volutin - komplex při nadbytku ATP. Až 500 molekul, nerozpustný ve vodě, vazba vyžaduje ATP. Nikdy není zdrojem energie, jen fosforu.

Počet: 1 – mnoho, podle metabolismu. Vysoký počet je v době před přechodem do klidového stadia (známka sporulace), společně s glykogenem se objevuje ve starších buňkách.

Postup:

- nátěr buněk se usuší na vzduch
- převrstvení polychromatickou methylenovou modří (= Löfflerova vyzrálá alespoň 12 měsíců) na 1-3 min
- opláchneme a osušíme

Pozorování pod imerzí: purpurová volutinová zrna a lehce namodralá cytoplazma

V roce 1904 inkluze volutinu poprvé pozoroval MEYER u druhu *Spirillum volutans*. O složení volutinových inkluzí se dlouho nic nevědělo. V roce 1959 je WIDRA považoval za polyfosfáty v kombinaci s ribonukleovou kyselinou a lipoproteiny, až v roce 1963 MARTINEZ pomocí frakcionované centrifugace a chemické analýzy určil, že se jedná o poly- β -hydroxymáselnou kyselinu.

Tuk – barvení Sudanem III. (0,1% roztok Sudanu III v ethanolu a glycerolu):

V buňce se vyskytuje buďto rozptýlený ve vakuolách nebo zabudovaný v membránách.

Shromažďuje se v přítomnosti kyslíku.

V buňce běžně 2-3%.

Tyto intracelulární inkluze se vyskytují zejména u kvasinek a mikromycet.

Nejčastěji se k jejich barvení používá sudan III. (0,1 g sudanu III. se rozpustí ve směsi 50 ml glycerolu a 50 ml 100 % ethanolu, který musí být bezvodý), z něhož se kapka smíchá s kapkou suspenze s mikroorganismy a přikryje se krycím sklíčkem. Do 20 – 30 minut se tuk zbarví do růžovo červená (barvivo se rozpustí v tuku).

Postup:

- smíchání buněk s barvivem
- působení 10-30 minut
- překrytí krycím sklíčkem

Pozorování: cihlově červené kapičky tuku

Buněčná stěna – barvení Chanceovou metodou:

- nátěr na sklíčko
- fixace
- převrstvení 1% krystalovou violetí, působení 2 minuty, oplach vodou, osušit
- převrstvení 2% kongo červení, 30 – 60s, osušit

Glykogen:

- 160 – 300 nm, rozpustný polymer glukózy s α -1,4-vazbami a α -1,6 větvením na každém 8-10tém monomeru. Může tvořit až 50% sušiny. Ve světelném mikroskopu není viditelný. Může a nemusí mít membránu. Barvení lugolovým roztokem. Počet: 1-10. Bakteriální glykogen je silně větvený. Slouží jako pohotová rezerva.

Barvení nativního preparátu

- vedle krycího sklíčka nativního preparátu kápneme Lugolův roztok
- pozorujeme bezprostředně hnědá granula glykogenu

Lugolův roztok - roztok KI a jódu ve vodě; přidáním chloralhydrátu dostaneme Melzerovo činidlo.

Lugolovo činidlo (též **Lugolův jódový roztok**) je činidlo skládající se z 1 % jódu a 2 % jodidu draselného (KI) v destilované vodě. Jodid draselný je přidáván pro zlepšení rozpustnosti jódu ve vodě. Činidlo bylo poprvé připraveno francouzským fyzikem J. G. A. Lugolem v roce 1829.

Lugolovo činidlo je používáno jako povrchové antiseptikum a dezinfekce. Lugolovo činidlo se používá taky jako indikátor přítomnosti organických látek, zejména škrobů - v jejich přítomnosti mění barvu do modrofialové až černé. Barvicích schopností činidla je využíváno v Gramově barvení a dalších technikách úpravy preparátů.

amyloidní reakce - modrání stěn orgánů obsahujících škrob v látkách obsahujících jód (Melzerovo činidlo)

E. Barvení pouzder

- Na sklíčko kápněte Kongo červeně a suspendujte v ní kulturu *A. vislandii*.
- Suspenzi rozetřete po povrchu sklíčka a nechejte dobře zaschnout.
- Převrstvěte na několik sekund kyselinou chlorovodíkovou, potom kyselinu slejte, zbytek osušte filtračním papírem a dosušte na vzduchu.
- Převrstvěte na 3 minuty metylénovou modří, slejte a usušte volně na vzduchu.
- Pozorujte imerzním objektivem modré buňky, světlá pouzdra a modré pozadí.