

Mikroskopický preparát

- Jakou podobu může mít **mikroskopický preparát**, který pod mikroskopem hodnotíme??
 - klasické **podložní sklíčko**, na kterém provádíme diferencovné 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 preparát na podložním sklíčku je při barvení buněk většinou fixován (v plameni)
 - u nativního preparátu (pozorování suspenze) na podložní sklíčko přikládáme **krycí sklíčko**
 - při pozorování plísní, kvasinek či aktinomycet pozorujeme **sklíčkové kultury** (krycí sklíčko je vytaženo z agaru, ve kterém bylo během kultivace zapíchnuto pod úhlem 45° a je tudíž kulturou porostlé - hodnotí se pak na něm najednou substrátové i vzdušné mycelium) nebo kultury narostlé na celofánu (některé kultury prorůstají medium, jsou těžko pro pozorování odejmutelné, na celofánu se s nimi snadno manipuluje).

- **K čemu slouží různé typy barvení buněk?**

Barvívem zvýrazníme tvary buněk (jednoduché barvení), či zjistíme, zda je živá (vitální test). Její struktury rozlišujeme diferenciacním barvením a to jak morfologické útvary (spory, stěny), tak chemické složky (barvení volutinu, glykogenu, škrobu..). Diagnostické barvení nám pak pomáhá identifikaci (Gramovo, acidorezistentní..).

- **Co je sledováno fixací preparátu?**

Nesnažíme se buňky ušetřit neblahého pocitu z barviva, ale jejich usmrcením 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, musíme si pamatovat, na které straně jsou buňky a 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. Jak můžeme výsledek barvení ještě zvýraznit? Moření (např. fenolem, taninem) má účinek zesílení barvení, neboť mořidlo má roli prostředníka s vyšší afinitou k buňce a barvivu, než je afinita buňky k 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 (viz d)).

Základní typy preparátů a postupy přípravy preparátů:

a) aseptická práce při nanášení buněk na sklíčko

- odmaštěné sklíčko vytáhneme z ethanolu, po zavření nádoby sklíčko ožehněme a položíme na filtrační papír
- nabíráme-li buňky ze zkumavky s pevným mediem, zkumavku držíme v levé ruce, sklíčko v pravé;

malíčkem pravé ruky vyjmeme zátku, ožihneme hrdlo zkumavky, vyžihanou kličku ochladíme 2s dotykem o medium bez buněk a následně odebereme z nárůstu buněk malé množství kultury; opět ožihneme hrdlo zkumavky i zátku a zkumavku zavřeme; přeneseme buňky vedle kapky sterilní vody, smícháme a rozetřeme do plošky sklíčka; kličku ožihneme

- nabíráme-li buňky z Petriho misky, kličku opět držíme v pravé ruce, ochlazujeme ji o medium vedle nárůstu buněk; většinou nabíráme z jednotlivé kolonie
- důležité je odebrat skutečně malé množství kultury (cca 1/4 kličky), aby preparát nebyl moc hustý
- připravujeme-li fixovaný preparát, sklíčko po zaschnutí žiháme 3x v nesvítivé části plamene nátěrem buněk nahoru

b) nativní preparát

- 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). Přebytkovou 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)

Pozorujeme: aktivní pohyb buněk (mají tedy bičíky) či pasivní pohyb unášením; aktivní pohyb sledujeme u mladých kultur (př: Bacillus subtilis 18h) z kapalně půdy - pozor na práci se skleněnou tyčinkou - láme bičíky. Po přikápnutí desinfekce (př: 0,5% ajatin) ze strany sklíčka pohyb buněk ustává.

c) jednoduché bavení

- zaschnutý nátěr buněk na sklíčko fixujeme
- po vychladnutí nátěr pokryjeme roztokem krystalové violeti na 15-20s nebo karbolfuchsinem 30s
- opláchneme slabým proudem vody a to tak, že sklíčko je téměř ve svislé poloze a pramínek vody dopadá nad barvenou plošku
- po osušení preparátu mezi filtračními papíry pozorujeme pod imerzním olejem a imerzním objektivem (100x, celkem Z 1000x)

Všimáme si: tvar buněk, vyklenutí (způsobeno sporami?? vyklenují centrálně či terminálně?) poměru šířky a délky buněk

Co ovlivňuje vzhled buněk v preparátu: stáří kultury?? živná půda?? zvětšení??

d) negativní barvení - NEFIXOVANÝ PREPARÁT

Využívá se pro měření **přesné velikosti** bakteriální buňky. Nabarví se totiž jen pozadí (sklíčko), nikoli buňka samotná. Tím **není deformována** fixací ani barvivem.

Barvivo: roztok nigrosinu nebo kongo červeně

Důležité: vytvořit jen tenký film barviva s dostatečně zředěnými buňkami.

Postup:

I) nigrosin

- asepticky přeneseme 2-3 kličky bakteriální suspenze z tekutého media na podložní sklo
- přidáme kapku nigrosinu, rozmícháme kličkou a rozetřeme jemným tahem druhého sklíčka (přiloženého pod úhlem 45° po celé ploše podložního skla), druhé sklíčko ožihneme
- nefixujeme, pozorujeme pod imerzí (Z 1000x)
- správný preparát by měl být tmavě šedý
- můžeme stejnou kulturu porovnat s postupem c)

Co ovlivňuje výsledek: tloušťka vrstvy barviva (silný nános může po zaschnutí praskat), koncentrace barviva

II) kongo červeně

- 2-3 kapky bujony s buňkami se rozmíchají s kapkou kongo červeně, rozetřeme do tenkého nátěru (druhým sklíčkem) a necháme zaschnout, bez fixace
- opláchneme 1% HCl, ihned slijeme setřesením ze sklíčka, NEOPLACHUJEME
- pozorujeme pod imerzí (objektiv 100x) a opět můžeme stejnou kulturu porovnat s postupem c)

e) barvení spor

Pamatujte, že chcete-li hodnotit morfologii buňky tvořící spory a morfologii spor samotných, musíte mít kulturu určitého stáří. Kupříkladu u rodu *Bacillus* to jsou 2-3 dny staré kultury. V důsledku mutací dochází i k neustálé obměně výbavy genů – sporotvorná bakterie může v důsledku mutace v genu nutném pro sporulaci tuto schopnost ztratit – což ztěžuje identifikaci preparátu.

Některé suplementy v mediu sporulaci podporují (u hůře spirálujících kmenů můžete přidat do média mangan).

f) barvení pouzder

Polysacharidové či bílkovinné pouzdro je pro bakterii v každém případě výhra. V prostředí ji chrání proti vysychání a jedům, v živočišném těle bakterii dokonale maskuje před imunitní odpovědí. Bakteriální rody tvořící pouzdra na první pohled na misce poznáte díky charakteristického mohutně slizovitého vzhledu, velké kolonie se téměř rozplývají po mediu a za kličkou se táhnou.

- Jak v preparátu rozpoznat sliz od pouzdra? Pouzdro je jasně oddělené od prostředí, sliz je naopak více rozptýlen kolem buňky.
- Lze tvorbu pouzdra podpořit? Vysoké množství sacharidů v mediu či prostředí zintenzivňuje tvorbu pouzdra (do média přidáváme cukry..).
- Může buňka ztratit schopnost pouzdro tvořit? Schopnost tvorby pouzdra je možné ztratit, opět mutací – z původní mukózní M formy se stává R forma (reverzibilní, drsná) až S forma, která již pouzdro není schopna tvořit.
- Je možné pouzdro jednoduše nabarvit? Stejně jako spory, i zde bychom museli buňky s pouzdry povařit v barvivu. Chceme-li ale pouzdro zvýraznit, nemusíme jej barvit, stačí, když v preparátu nabarvíme vše ostatní krom něho: tedy buňku a okolí buňky. Pouzdro je pak v preparátu nezbarveno a je výrazně světlé.
- Jak můžeme buňku pod pouzdrem v preparátu vidět? Jak již bylo řečeno, jednoduše nabarvíme okolí buňky (= negativní barvení) a buňku samotnou.

Postup:

I – obyčejné negativní barvení

- do větší kapky vody přeneseme vyžíhanou kličkou malé množství buněk ze slizovité kolonie
- kapku smícháme s kapkou barviva šedou suspenzi přikryjeme krycím sklíčkem
- zbytek tekutiny odsajeme a pozorujeme pod objektivem 60x nebo 100x bez imerze se silným zacloněním irisové clonky
- šedavé buňky jsou obklopeny bílými pouzdry a pozadí je tmavé

II – negativní barvení a barvení buněk

- rozmícháme kapku tuše s kapkou vody, do suspenze přeneseme trochu buněk a rozetřeme po plošce sklíčka
- zaschlý nátěr pokryjeme na 3 min roztokem methylenové modře (R 6), opláchneme a osušíme
- pozorujeme 100x
- modré buňky jsou obklopeny světlými pouzdry

g) Gramovo barvení

- pozor na uvaření buněk na sklíčku, na hustý preparát a na dlouhé odbarvování ethanolem!

h) trvalý preparát

- po odstranění imerzního oleje opláchnutím xylenem a po osušení zakápneme nátěr kanadským balzámem a přikryjeme čistým krycím sklíčkem. Jemně tlačíme na sklíčko 2-3minuty. Necháme zaschnout 2 týdny.