

Cvičení 2

23.10. (8:00 – 12:00h) a 30.10. (8:00 – 12:00h)

Téma: Struktury vnější (pouzdro) a vnitřní (barvení spor, volutinu, tuků, škrobu)

Strukturální (diferenciační) barvení se používá k identifikaci bakterií (struktury jako diagnostické znaky) a ke studiu struktur samotných. Př: barvení endospor, pouzder a bičíku (flagely).

1) 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 media mangan).

K čemu je barvení endospor dobré? Diagnostické Gramovo barvení určí G⁺ a G⁻ typ buněčné stěny; souběžné barvení spor u suspektních sporulujících druhů zvýrazní: **tvár a umístění spory v buňce**, což je dalším charakteristickým znakem napomáhajícím identifikaci. Příkladem jsou vždy **oválné** spory *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *Clostridium botulinum*, **kulaté** spory *Clostridium tetani* či *B. sphaericus*, cylindrické či elipsoidní spory dalších druhů. U velikosti spor hodnotíme, **zda a kde vykluje buňku**.

Uložení v buňce: terminální = na konci tyčinky (*C. tetani* jakoby paličky),

B. stearothermophilus

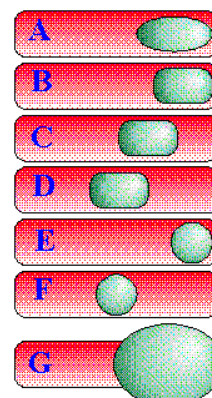
centrální (*C. histolyticum*, *C. novyi*, *C. septicum*, *B. anthracis*, *B. cereus*)

subterminální = paracentrálně = mezi středem a pólem buňky, většinou.

(*C. botulinum*, *C. sporogenes*, *B. brevis*)

Endospory jsou vytvářeny malým počtem **převážně G⁺ bakterií** rodů *Bacillus* (aerobní tyčky), *Clostridium*, *Thermoactinomyces*, *Desulfotomaculum* (anaerobní tyčky), *Sporosarcina* (aerobní koky), *Sporolactobacillus*, *Oscillospira*, *Thermoactinomyces*... Výjimečně však endospory nacházíme i u některými G⁻ bakterií! (Př: *Coxiella burnetii*, původce Q-horečky).

Pozorovat neobarvené endospory můžeme **fázovým** (zářící spory) a **Nomarského kontrastem** (plastický povrch buňky); **jednoduchým barvením** nevidíme spory samotné (obarvíme pouze buněčnou stěnu), jen vyklenutí buňky (způsobené přítomností spor). **Přímo obarvit endosporu** ve stadiu vzniku kortexu je možné pouze **za horka** (prospora je však pro barvivo ještě propustná!).



Možné umístění endospory a případné vyklenutí buňky jako identifikační znak

Kmeny:

Paenibacillus alvei CCM 2051T

Bacillus circulans CCM 2048T

A dále:

Mikroorganismy: <i>Bacillus cereus</i> CCM 2010	1, 1 + Mn
<i>Bacillus subtilis</i> CCM 1615	1 + Mn
<i>Bacillus thuringiensis</i> CCM 19	1 + Mn
<i>Bacillus sphaericus</i> CCM 1615	1, 1 + Mn
<i>Bacillus megaterium</i> CCM 2007	1, 1 + Mn
<i>Bacillus polymyxa</i> CCM 1459	14
<i>Sporosarcina ureae</i> CCM 860	1 + U + Mn

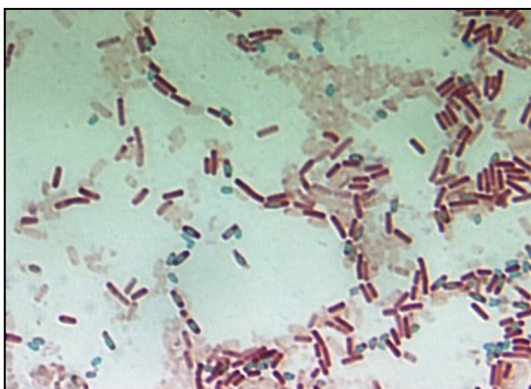
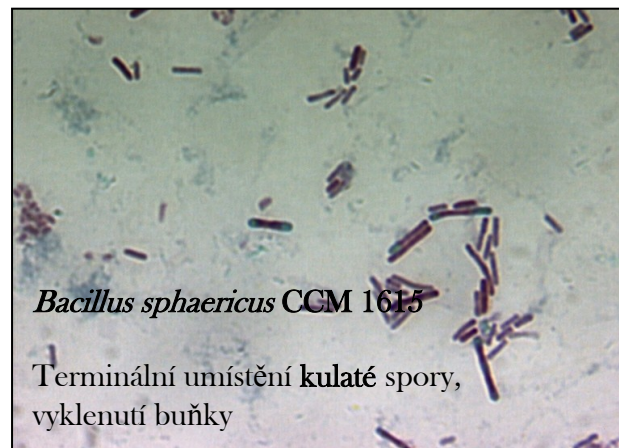
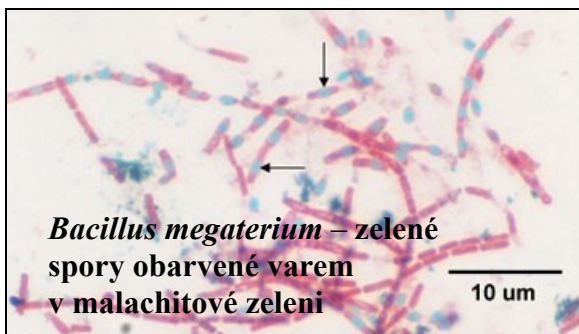
U = urea, přídavek močoviny v médiu
Mn = MnSO₄ · H₂O v médiu

- **Barvení malachitovou zelení - Schaefferova-Fultonova metoda**

- 1) Uschlý nátěr buněk na sklíčko fixujeme trojím protažením v plameni
- 2) Převrstvíme malachitovou zelení
- 3) Zahříváme 5 minut do výstupu par, doplňujeme barvivo
- 4) Opláchneme vodou
- 5) Dobarvíme kontrastním barvivem - safraninem nebo kongo – červení (převrstvením 5 min)
- 6) Opláchnout vodou, usušit, pozorujeme pod imerzí

Pozorování: Spory jsou zelené, ostatní buněčný obsah červený.

- **Fázový kontrast – nativní nebarvený preparát – zářící spory!! (morfologie i umístění; rychlý postup zviditelnění spor)**



Bacillus cereus CCM 2010

Centrálně umístěné **oválné** spory

2) pouzdra

Klebsiella pneumoniae CCM 4985

Azotobacter vinelandii CCM 289

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 media 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 a 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 pouzder

1)

- rozmícháme kapku tuše nebo nigrosinu 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

- 2)
- a. Na sklíčko kápněte Kongo červeň a suspendujte v ní kulturu *A. vislandii*.
 - b. Suspenzi rozetřete po povrchu sklíčka a nechejte dobře zaschnout.
 - c. Převrstvěte na několik sekund kyselinou chlorovodíkovou, potom kyselinu slejte, zbytek osušte filtračním papírem a dosušte na vzduchu.
 - d. Převrstvěte na 3 minuty metylenovou modří, slejte a usušte volně na vzduchu.
 - e. Pozorujte imerzním objektivem modré buňky, světlá pouzdra a modré pozadí.
- 3) horkým karbolfuchsinem – ale je karcinogenní, nebudeme používat

3) 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*.

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

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.

Postup:

Barvení nativního preparátu

- vedle krycího sklíčka nativního preparátu kápneme Lugolův roztok

Pozorování: 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 (mořidlo fixující v buněčné stěně krystalovou violet) a v dalších technikách úpravy preparátů.

amyloidní reakce - modrání stěn orgánů obsahujících škrob v látkách obsahujících jód