

Preparát

- nativní - pozorování skutečného tvaru, pohybu
- fixovaný barvený - barvení buněčné stěny nebo struktur, buňky jsou usmrcené fixací nad plamenem nebo chemicky (etanolem nebo acetonem), usmrcené buňky lépe přijímají barvivo a lépe přilnou k podložnímu sklíčku

Zdroje:

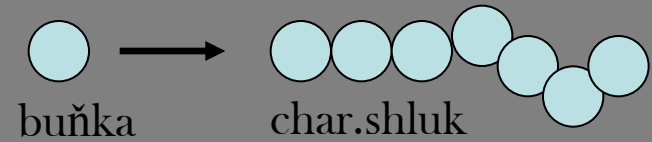
Mikrofoto preparátů předmětu Bi7340 (rok 2007)

<http://www.microbelibrary.org/Gram%20Stain/details.asp?id=2028&Lang=>

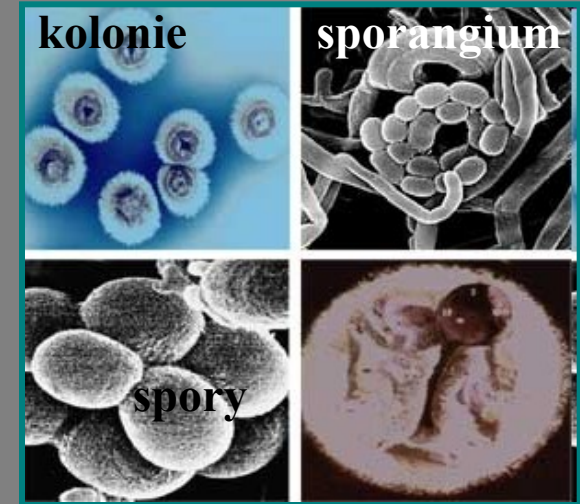
!!Atlas mikroorganismů:

<http://www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/mikr.htm>

Morfologie



- Buňky
- Charakteristických shluků buněk
- Extracelulárních útvarů (spory, konidie, sporangia, pouzdra..)
- Bakteriální kolonie



Většinou druhově charakteristické
= identifikační znak

Pozor na: fázi růstového cyklu!

endospory vyklenující buňku

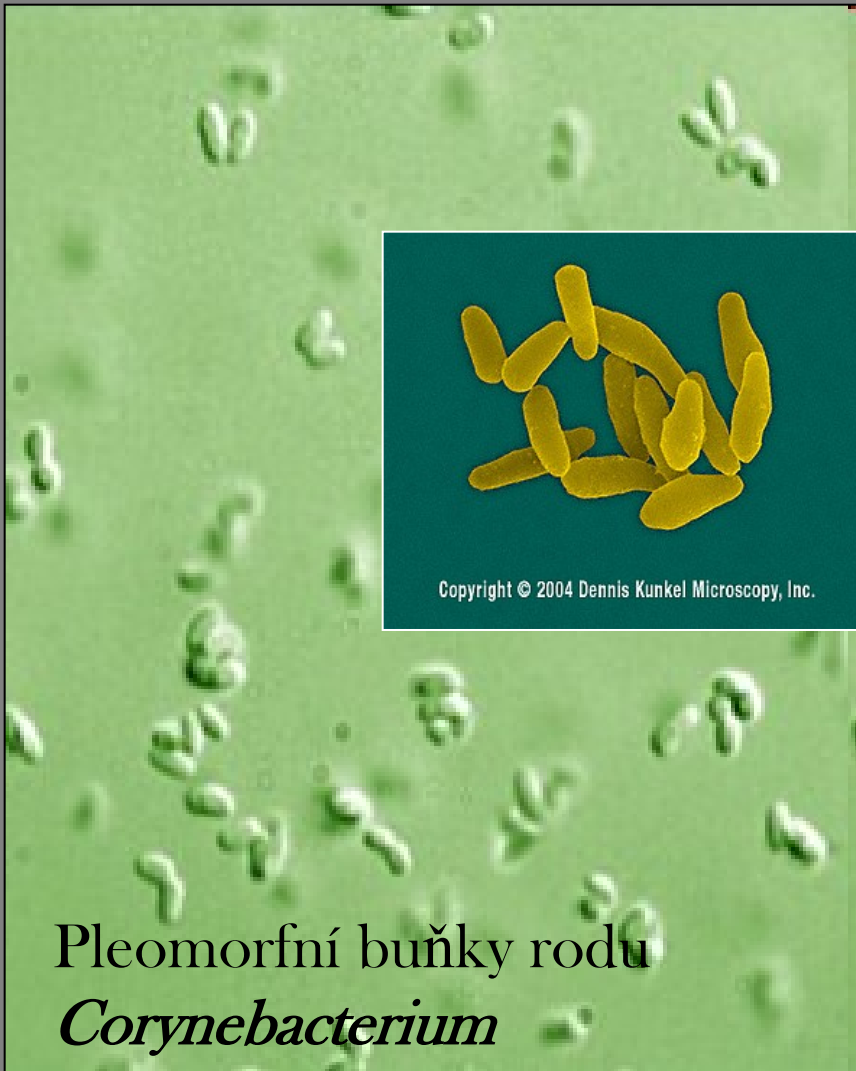
stáří kultury

pleomorfní buňky

*Clostridium
botulinum*



endospora



Copyright © 2004 Dennis Kunkel Microscopy, Inc.

Pleomorfní buňky rodu
Corynebacterium

Acidorezistentní buňky:

Odmítají Gramovo barvení

Odmítají se po nabarvení odbarvit ethanolem i kyselinou. Př: *Corynebacterium*, *Nocardia*...

Morfologie pleomorfních buněk.

Další potíže:

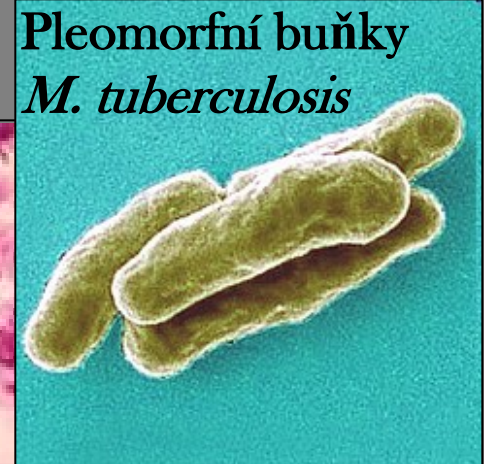
Jsou barvitelné Gramem?

Haemophilus - ano

Bez b.s.

Mykobakteria, mykoplazmata - nikoli

Mykolové kys

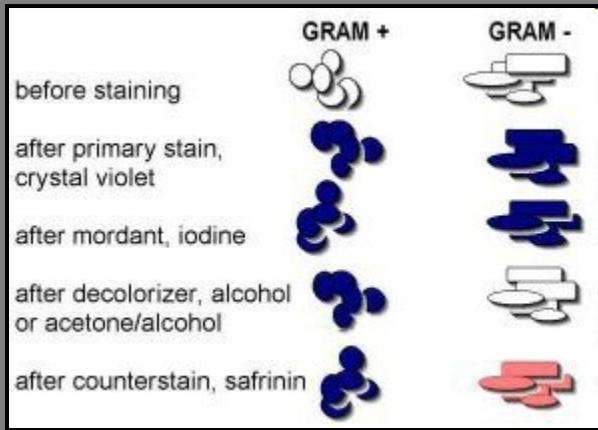


Pleomorfní buňky
M. tuberculosis



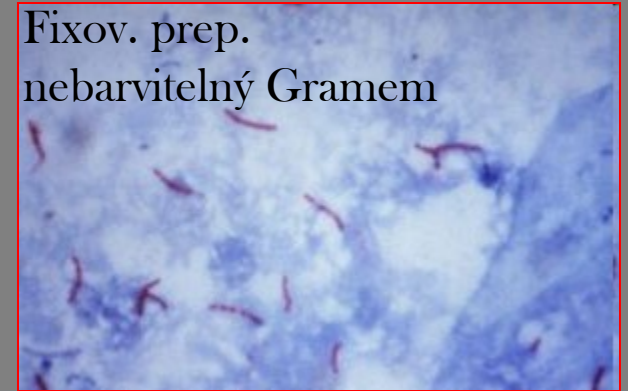
Mycobacterium avium-intracellulare

Acidorezistentní barvení buněk histologického řezu lymfatické uzliny



Je neznámý vzorek vůbec barvitelný Gramem?
Není gramlabilní?

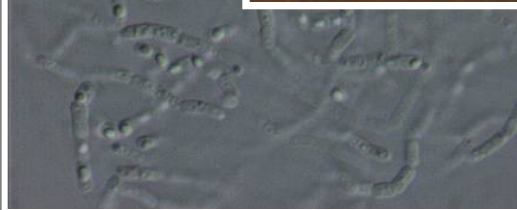
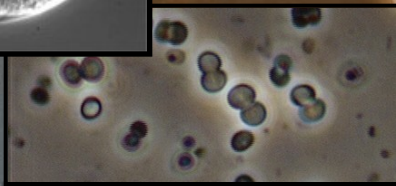
Fixov. prep.
nebarvitelný Gramem



Mycobacterium tuberculosis
Zeihl-Neelsonovo barvení (červeně)



S barevným filtrem

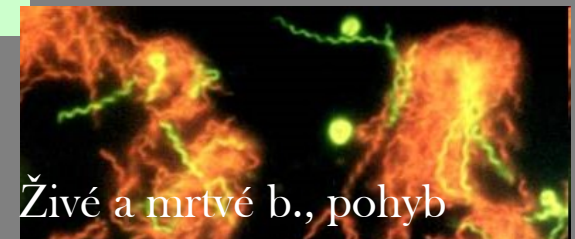


C1
mikroskopie?
Typ preparátu
Typ mikroskopie
(typ b. stěny,
průkaz struktur,
růstového cyklu)



Fixov. prep. - tvar a typ b.

Živý (nativní) preparát bez fixace - vidíme nedeformovaný tvar buňky, spory, morfologii seskupení buněk, pohyb buněk



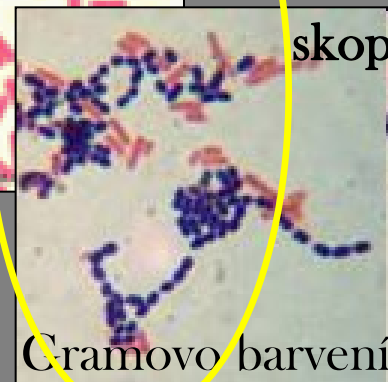
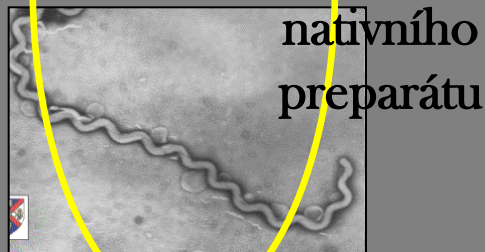
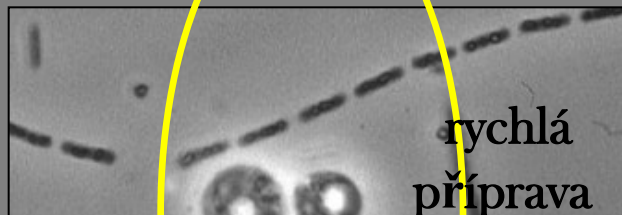
Živé a mrtvé b., pohyb

Morfologie buňky

• PREPARÁT

- co chceme vidět? - podle toho preparát a typ mikroskopie

tvár buňky - fázový kontrast, barvený fixovaný prep.
a struktura



Světelná
Fázový kontrast
Fluorescenční
Elektronová...

světelná
mikro-
skopie

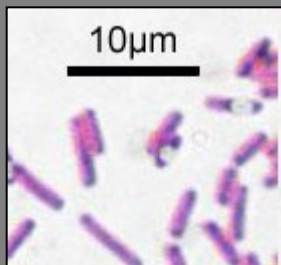
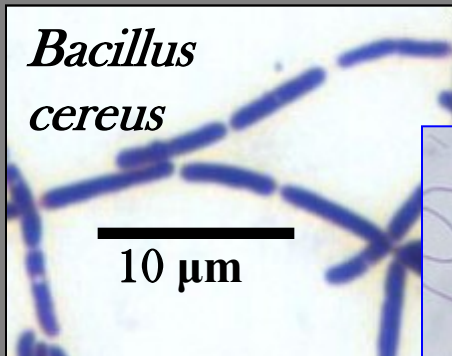
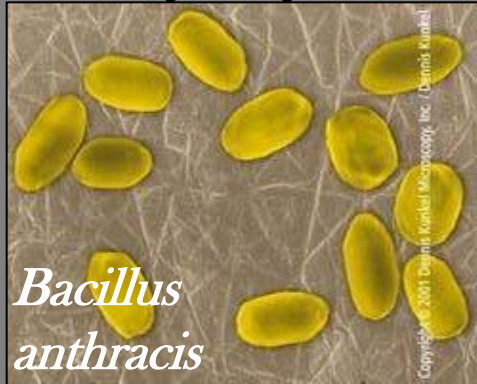
pohyb buňky - fázový kontrast, fluorescence

barvené struktury - pomáhají identifikaci (PHB, síra)

typ buněčné stěny - Gramovo a acidorezistentní b.

U jednoho bakteriálního rodu různý vzhled char. tvaru buňky!

- Př: tyčky bacilů

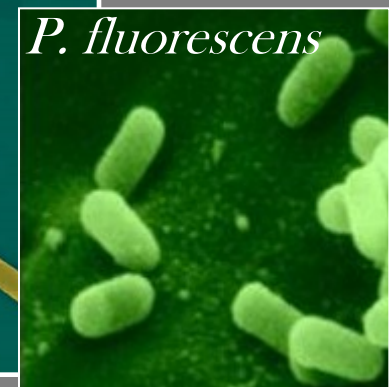


Bacillus subtilis

- *Haemophilus*



- *Pseudomonas*



Posuzujeme-li vzhled buňky určitého bakteriálního druhu, je třeba si uvědomit:

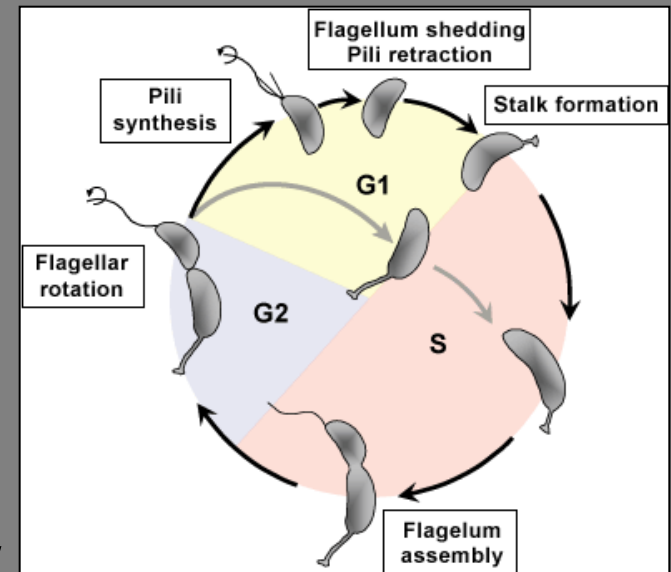
1) Prochází tento druh růstovými cykly?

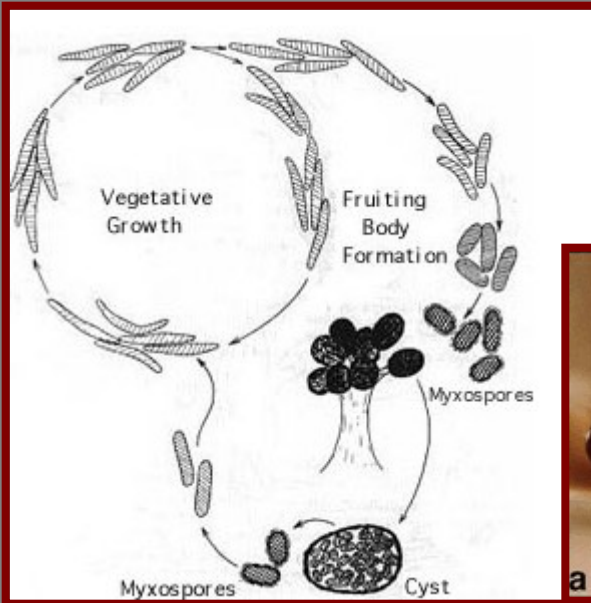
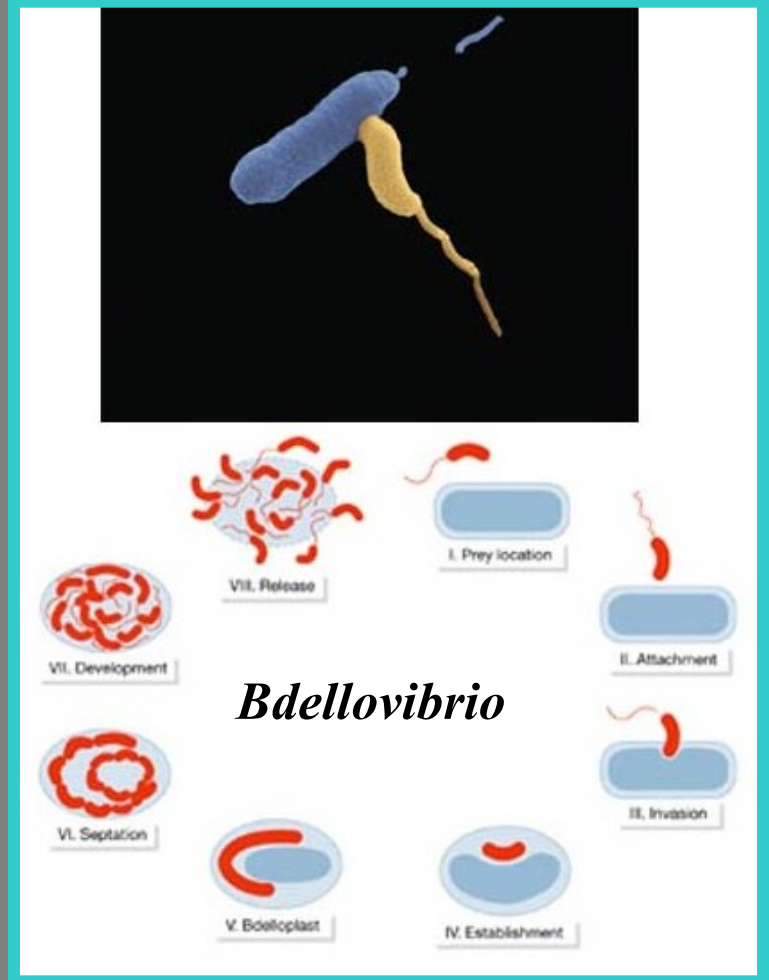
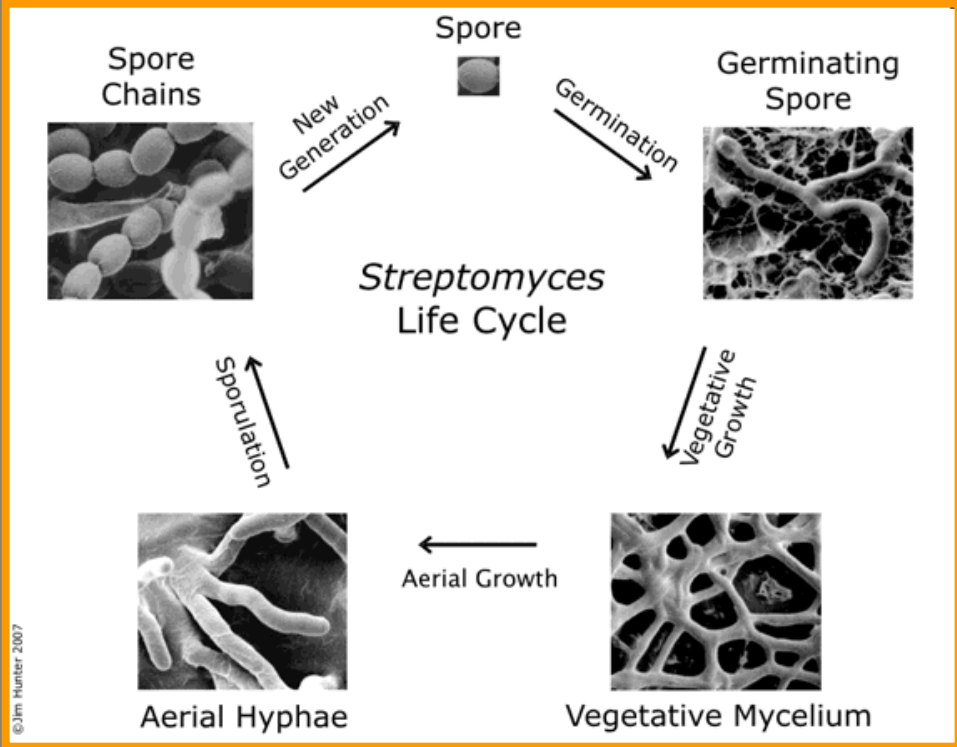
- v každém z nich má pak buňka jinou morfologii!

Př: *Chlamydia* *Bdellovibrio*, *Streptomyces*, *Caulobacter*, myxobakterie....

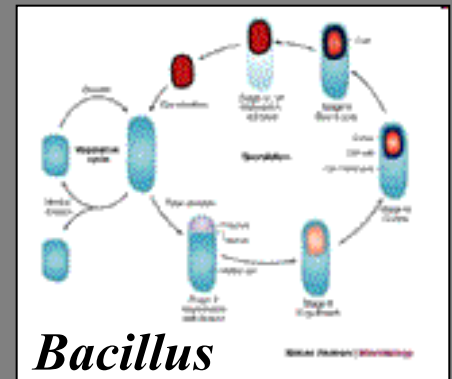
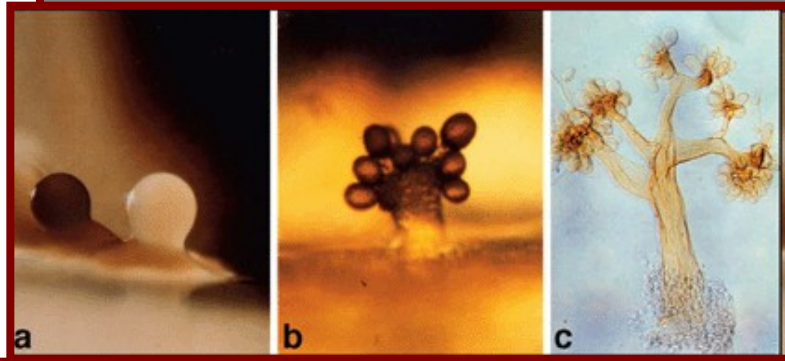
Mění se nejen vzhled buňky, ale buňka v cyklech prochází typickou změnou vnitřních struktur.

Buněčný cyklus
Caulobacter crescentus



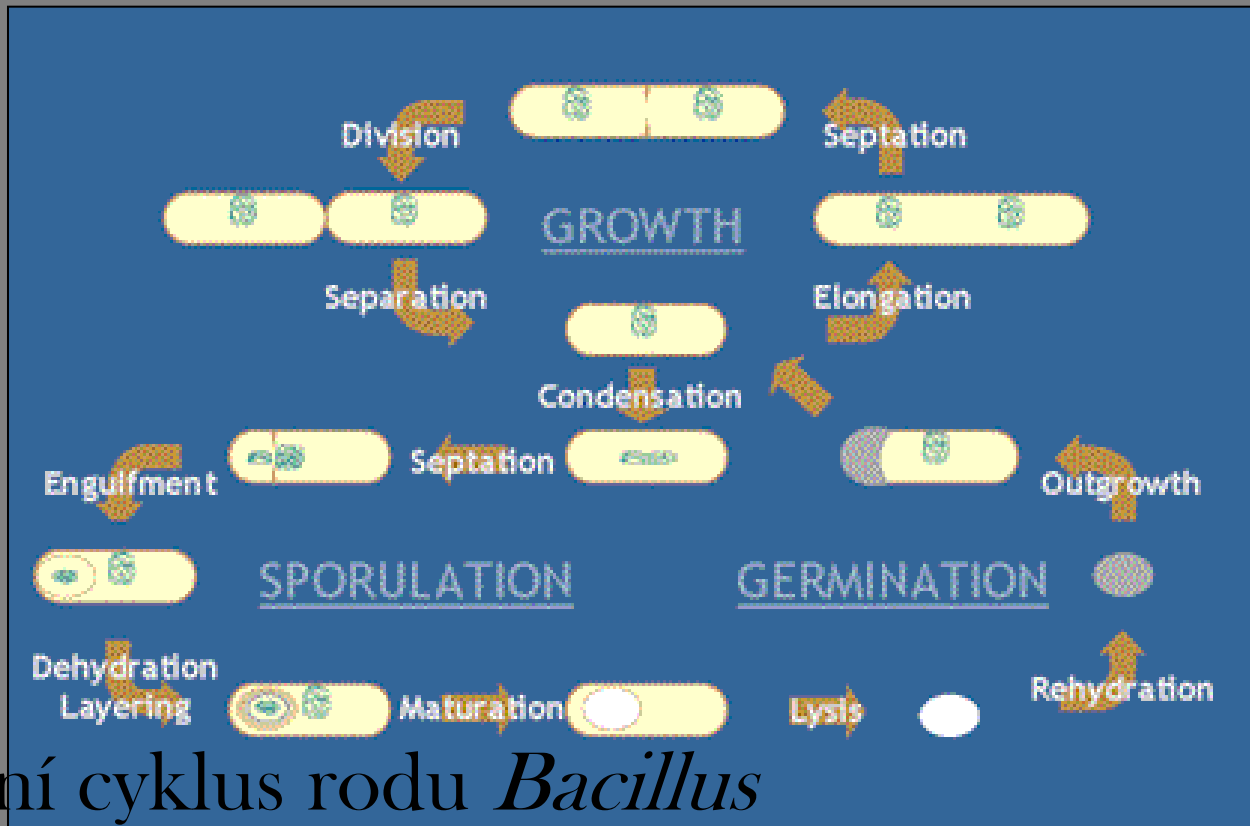


Myxobakterie



Bacillus

Morfologie buňky vprostřed buněčného cyklu



Životní cyklus rodu *Bacillus*

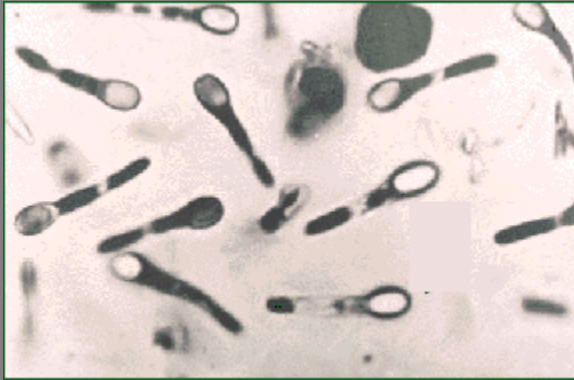
- u některých jeho druhů i u jiných rodů navíc různá barvitelnost

Gramem při různém stáří buněk - až gramlabilní

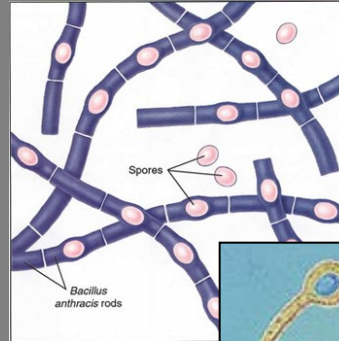
→ při popisu preparátu nutno uvažovat stáří buněk!

2) Vytváří posuzovaný druh endospory?

- v preparátu pak mohou měnit tvar buněk!



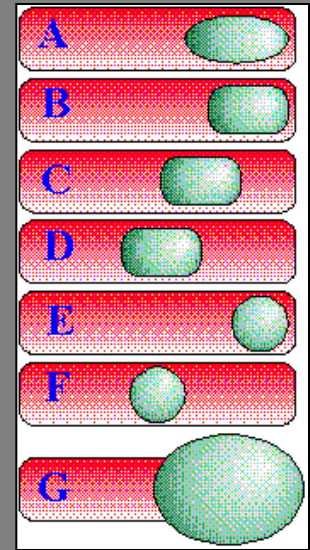
Clostridium difficile



Bacillus anthracis

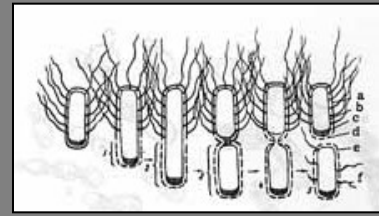


Clostridium tetani



„Voják umírající na tetanus“
Sir Charles Bell
lukovité prohnutí zad (opisthotonus)
křečovitý výraz
Originál je k vidění:
Royal College of Surgeons
of Edinburgh, Scotland.

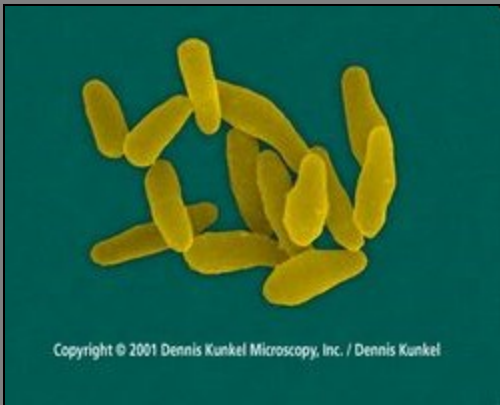
3) Stárnutím mění buňky tvar



4) Závislost tvaru buňky na vnějším prostředí

- živiny, tlak, osmolarita...

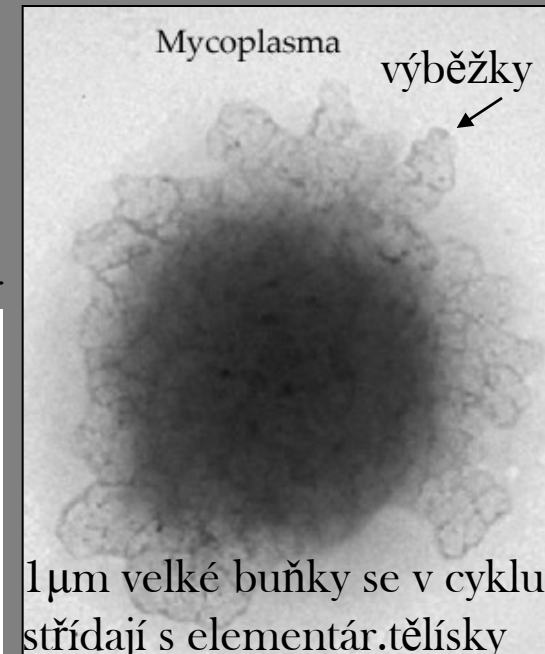
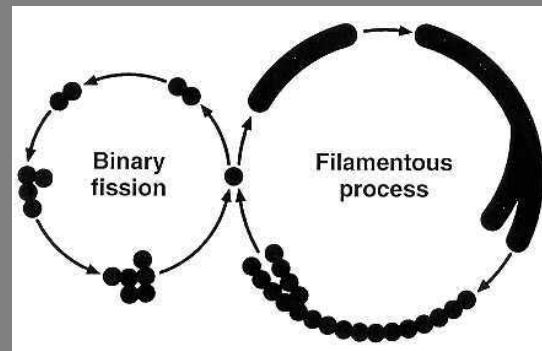
5) pleomorfní buňky - př. rody *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Haemophilus*, *Mycoplasma*



Copyright © 2001 Dennis Kunkel Microscopy, Inc. / Dennis Kunkel

Corynebacterium

Pleomorfní mykoplazmata:
nejmenší bakteriální
buňky (0,2 - 0,3 μm);
bez buněčné stěny! Poté:
Nepůsobí betalaktamy
Osmoticky stabilní v host.b.



Morfologie bakt. kolonií

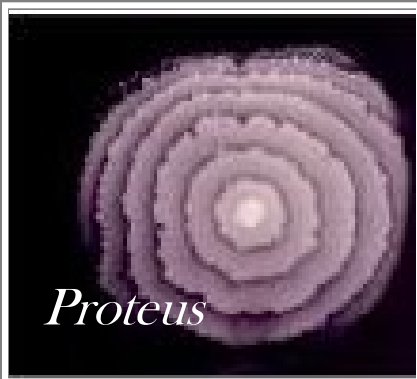
- potřeba zvážit typ media, ne kterém kolonie hodnotíme!
kultivace - zda vůbec kultivovatelné?? - sledování typu kolonií

Př: sledování morfologie kolonií

- univerzální media, jiný vhled na selektivním - zda vůbec růst či ne? barevná reakce?)

S-, R- a M-formy

sledování pohybu terasovitě kolonie (Př: *Proteus*)

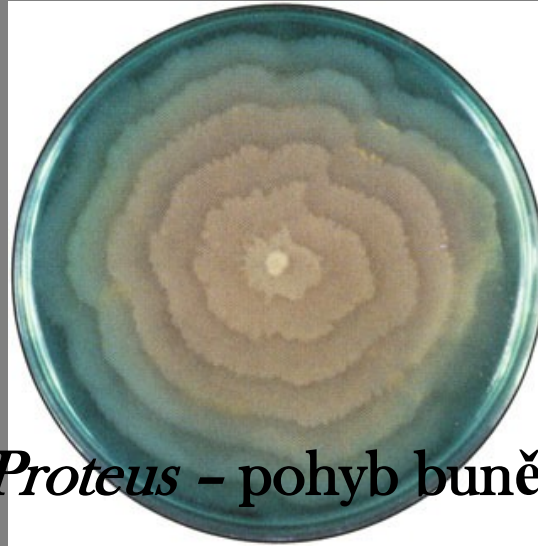


Morfologie bakteriálních kolonií

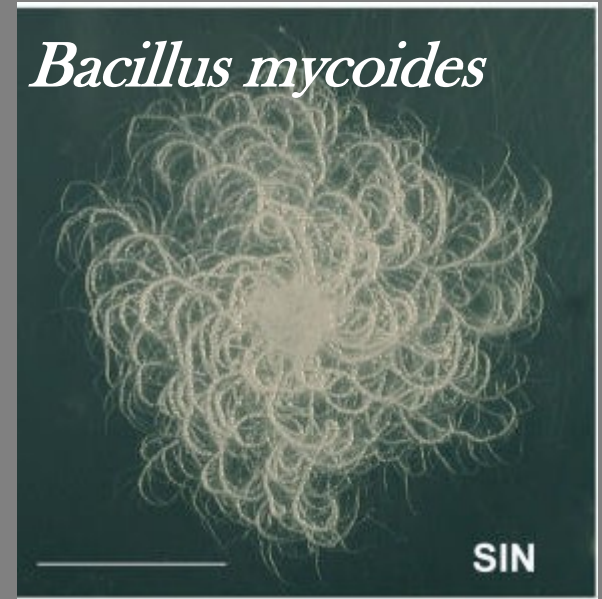
I. na základních půdách



Nocardia



Proteus – pohyb buněk



Bacillus mycooides



Streptomyces



Streptomyces



Serratia marcescens

E.coli na agaru EMB (Eosin Methylene Blue Agar)

Bakteriální kolonie na
II. diagnost. půdách



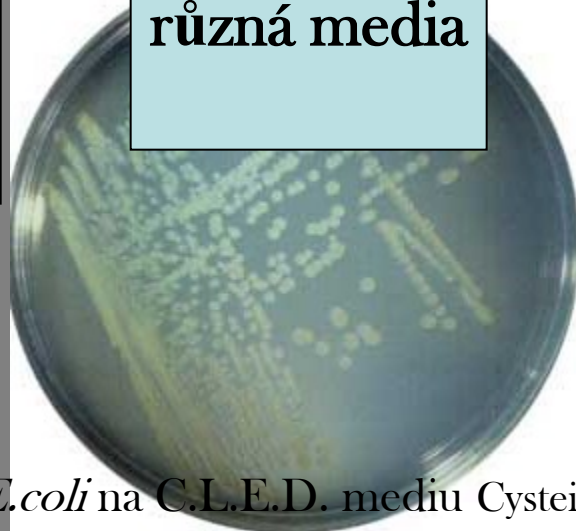
Jeden druh
bakterie
různá media



E.coli na krevním agaru



E.coli na MacConkey agaru



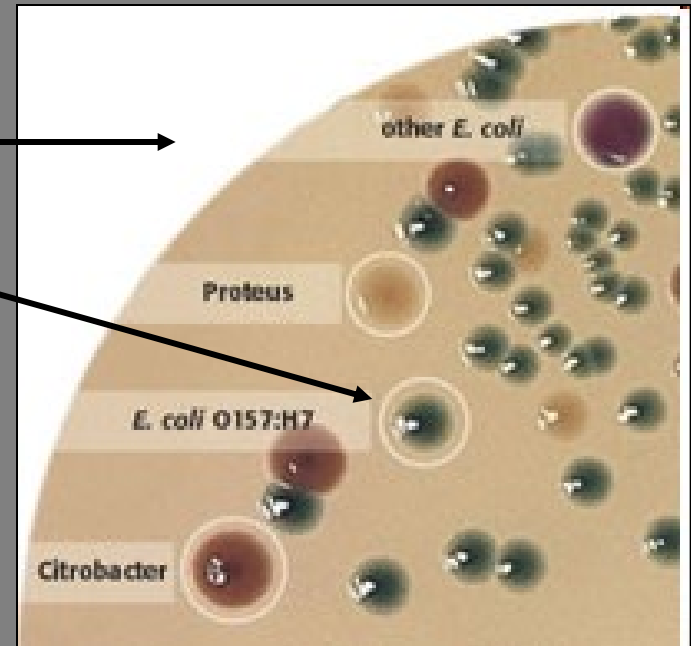
E.coli na C.L.E.D. mediu Cysteine Lactose Electrolyte Deficient Agar



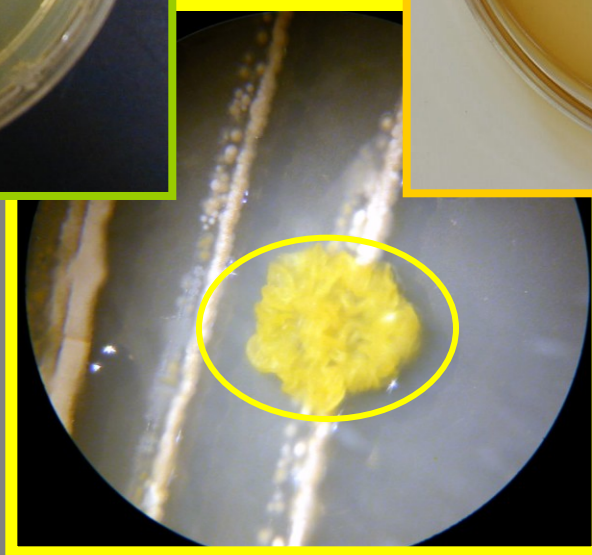
Bakteriální kolonie na III. selektivních půdách

O157:H7 ID Agar

medium selektivní až na kmen!
Detekce kmene *E. coli* O157:H7
proti jiným kmenům *E. coli*



Kontaminace na misce!



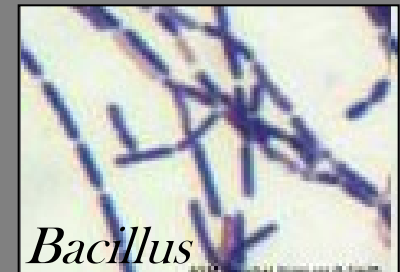
Morfologie charakteristických shluků buněk

- typické shluky napomáhají identifikaci

řetízky koků: *Streptococcus*



řetízky bacilů: *Bacillus*

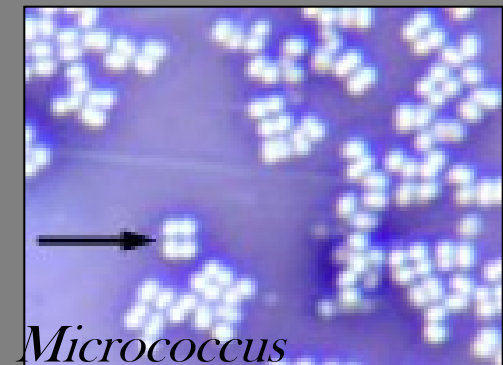
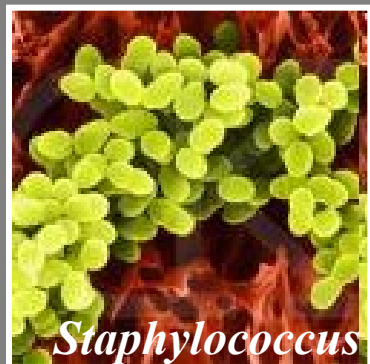


palisády: *Corynebacterium*

tetrády koků: *Micrococcus*

balíčky = sarciny *Sarcina*

hrozníčky: *Staphylococcus*



Suchý objektiv:

Paprsek vystupující z preparátu pod úhlem α se na rozhraní mezi krycím sklíčkem a vzduchem láme od kolmice a nemůže se již podílet na tvorbě obrazu.

menší index lomu

menší numerická apertura

vyšší rozlišovací mez

$n = 1$

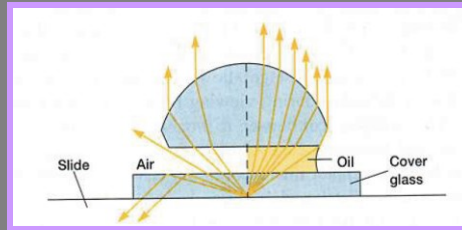
$$NA = \max 1$$

Pro žlutozelené světlo:

$$\lambda = 550 \text{ nm}$$

$$NA = 0,95$$

$$\text{Rozlišovací mez} = 0,6 \mu \text{ m}$$



Rozlišovací mez

$$\delta = \lambda / n \cdot \sin \alpha$$



R. Hook - po 1.olejová lampa
Kapalina zvyšuje účinek
světla

Imerzní objektiv:

Paprsek přecházející ze skla do imerzního prostředí svůj směr nemění a může se podílet na tvorbě obrazu.

Imerzní prostředí - kapalina o stejném n jako krycí sklíčko.

Často cedrový olej ($n = 1,52$).

Imerze umožňuje korigovat některé opt. vady mikroskopu.

větší index lomu

vyšší úhel α

vyšší numerická apertura

nižší rozlišovací mez

$$NA = 1,2 - 1,4$$

žlutozelené světlo:

$$\text{Rozlišovací mez} = 0,4 \mu \text{ m}$$

Jasně pole – barvené preparáty

- pozorování světelným mikroskopem
- max zvětšení 1500krát, max rozlišení 200 nm
- pozorování pod imerzí – mokré pracovní prostředí umožňuje větší zvětšení, zvyšuje numerickou aparaturu, soustřeďuje světelné paprsky

Gramovo barvení

Slouží pro rozlišení G+, G- a pro určení tvaru buněk samotných (koky, kokotyčky, tyčky, spirily, pleomorfní buňky, vlákna) a také jejich uspořádání do charakteristických útvarů (balíčky, řetízky bacilů i koků, tetrády, sarciny)

Grampozitivní – tmavě fialové až modročerné zbarvení - komplex barviva a jódu není vyplaven

Gramnegativní – červené nebo růžové zbarvení - komplex barviva a jódu je odbarven etanolem nebo acetonem a buňky jsou **dobarveny safraninem**

Micrococcus luteus CCM 169

-Grampozitivní kok

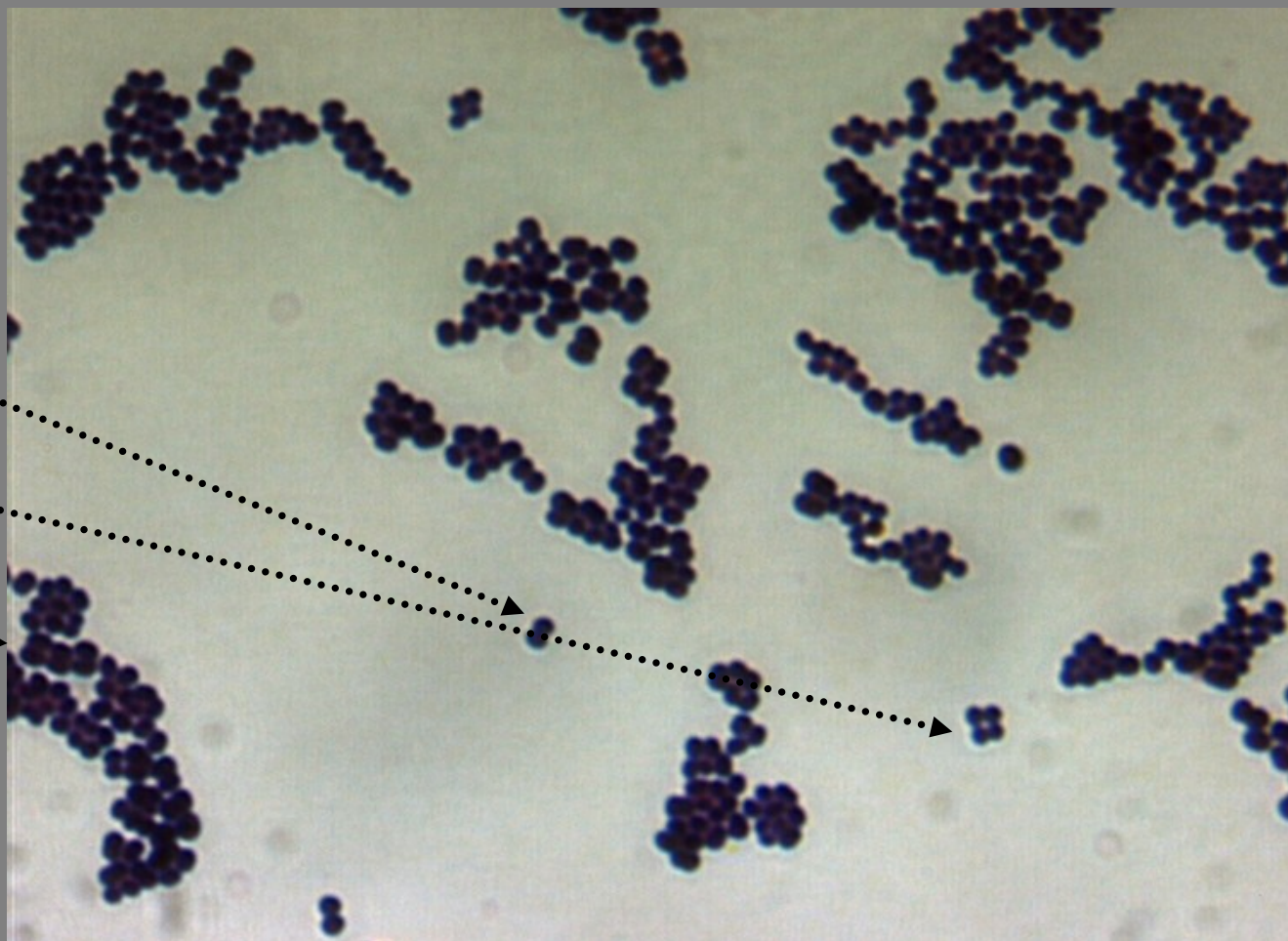
zv. 1000

Preparát:

DVOJICE

ČTVEŘICE

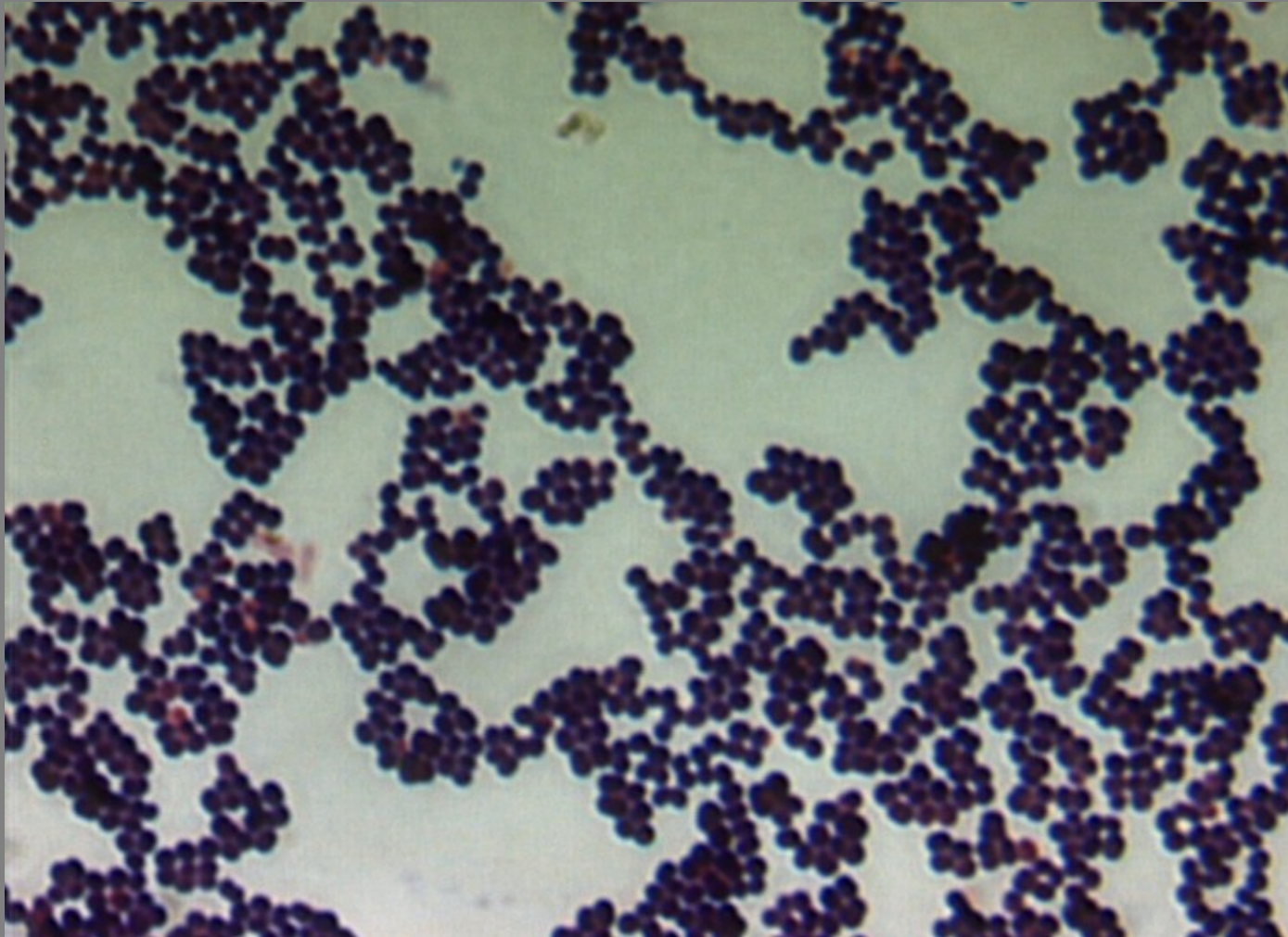
SHLUKY



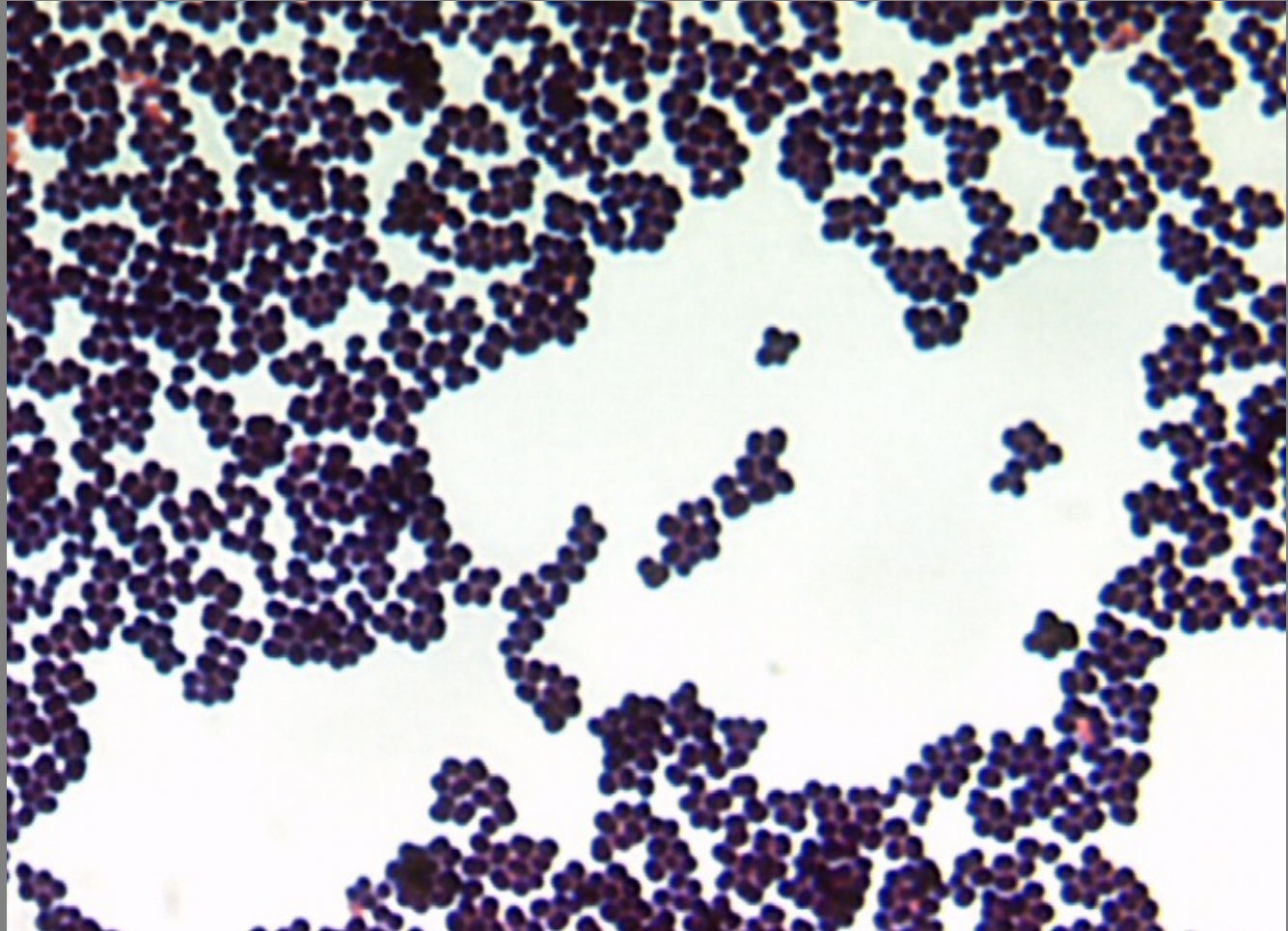
Jaké bakteriální rody Gramovým barvením neobarvíme? Jedná se o rody bez buněčné stěny (mykoplazmata), spirálovité bakterie, dále o silně acidorezistentní rody (např. mykobakteria):

- *Borrelia burgdorferi* (fig [1](#), [2](#))
- *Borrelia recurrentis* (fig [1](#))
- *Bartonella henselae* (fig [1](#), [2](#))
- *Chlamydia trachomatis* (fig [1](#), [images of elementary bodies](#), [images of reticulate bodies](#))
- *Chlamydophila pneumoniae* ([images of elementary bodies](#), [images of reticulate bodies](#))
- *Chlamydophila psittaci* ([images of elementary bodies](#), [images of reticulate bodies](#))
- *Coxiella burnetii* (fig [1](#), [2](#))
- *Ehrlichia chaffeensis* (fig [1](#), [2](#))
- *Anaplasma phagocytophilum* (formerly; *Ehrlichia phagocytophilum* or *E. equi*; Fig. [1](#))
- *Legionella* sp. (fig [2](#))
- *Leptospira* sp. (fig [1](#), [2](#))
- *Mycobacterium bovis* (fig [1](#))
- *Mycobacterium tuberculosis* (fig [1](#), [2](#) thanks to Anders Olav Lande, [3](#))
- *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* (fig [1](#) thanks to Anders Olav Lande)
- *Mycobacterium kansasii* (fig [1](#))
- *Mycobacterium leprae* (fig [1](#), [for a close up](#) thanks to Anders Olav Lande)
- *Mycobacterium marinum* (fig [1](#))
- *Rickettsia rickettsii* (Fig. [1](#): scroll down to bottom of the page. [2](#))
- *Orientia tsutsugamushi* (formerly; *Rickettsia tsutsugamushi*; Fig. [1](#))
- *Treponema pallidum* (fig [1](#), [2](#), [3](#))

***Micrococcus luteus* CCM 169**



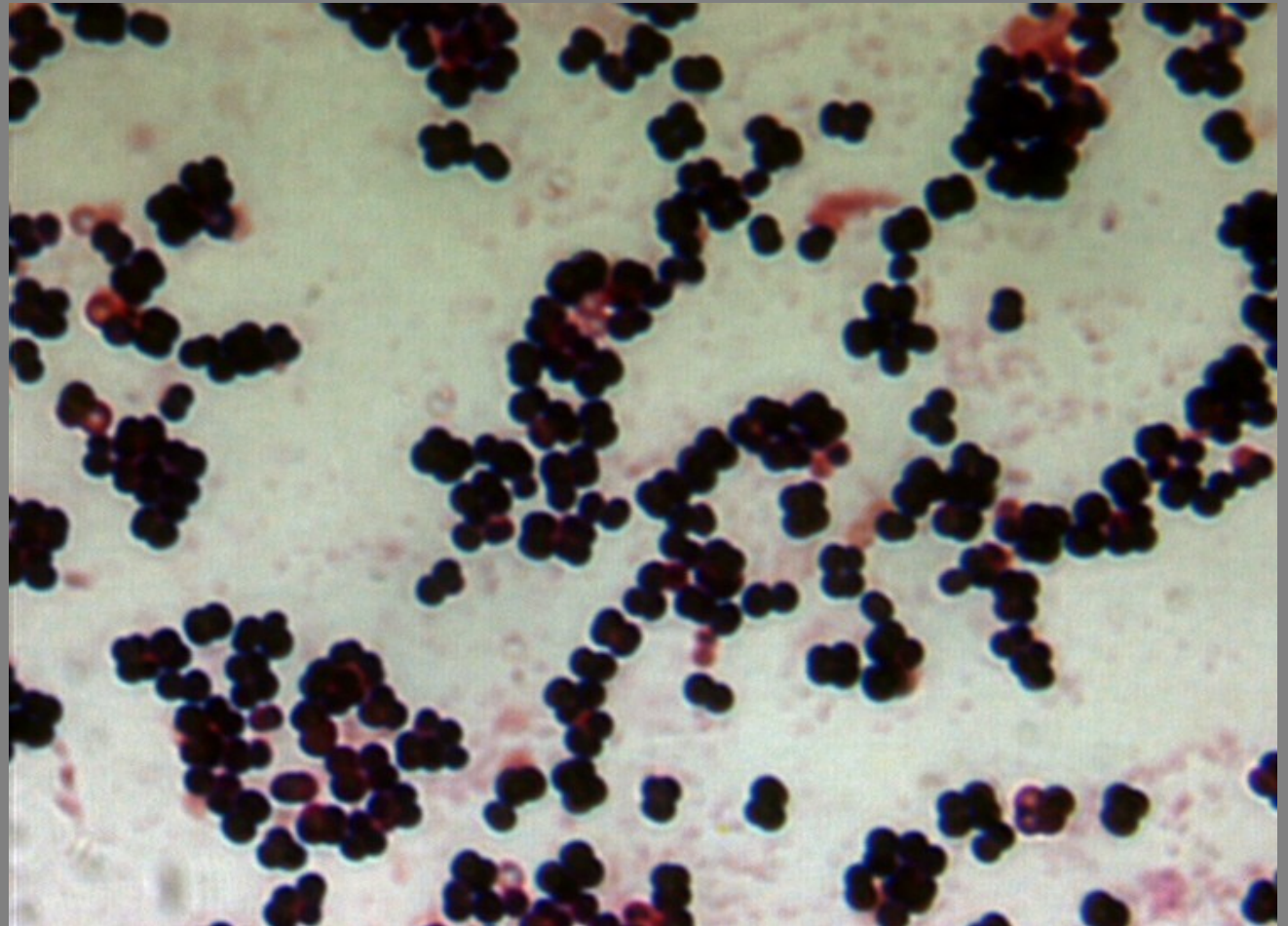
Micrococcus luteus CCM 169



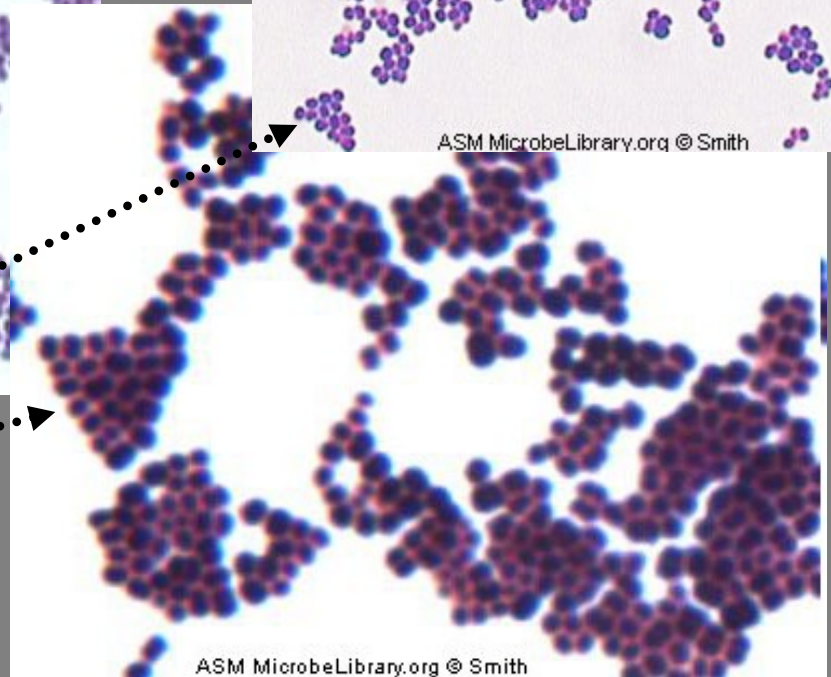
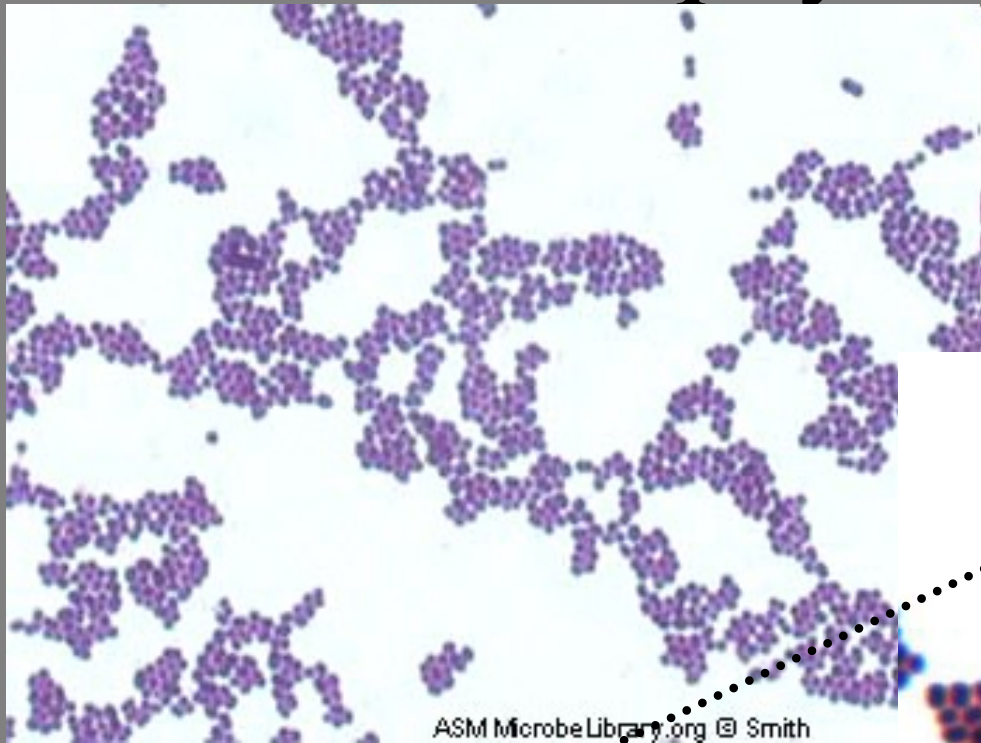
Sporosarcina ureae CCM 860

G+ koky

Preparát:
Sarciny
(= balíčky
po 8)
Dvojice
Shluky



Staphylococcus

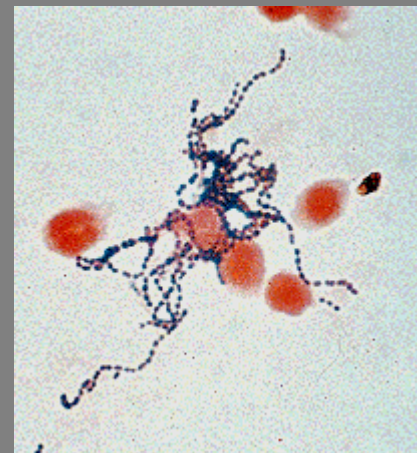
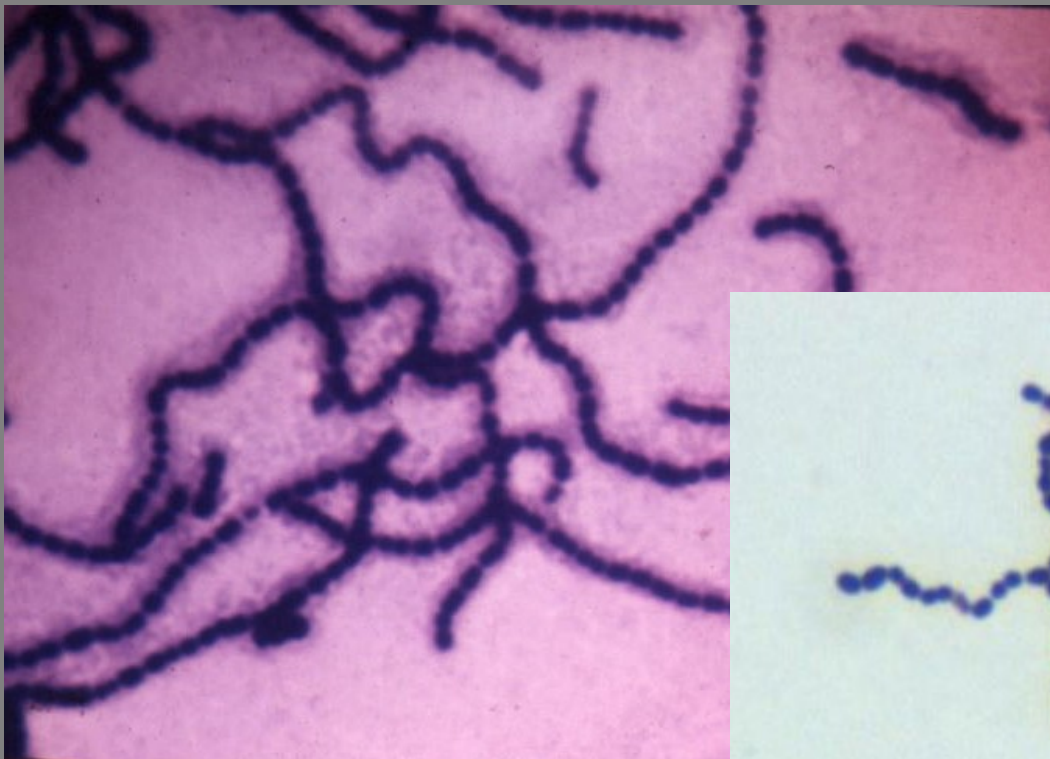


Jednotlivé buňky
Dvojice
Hrozníčky

Zdroj:

<http://www.microbelibrary.org/Gram%20Stain/details.asp?id=2028&Lang=>

Streptococcus



Jednotlivé buňky
Různě dlouhé řetízky

Bacillus cereus CCM 2010

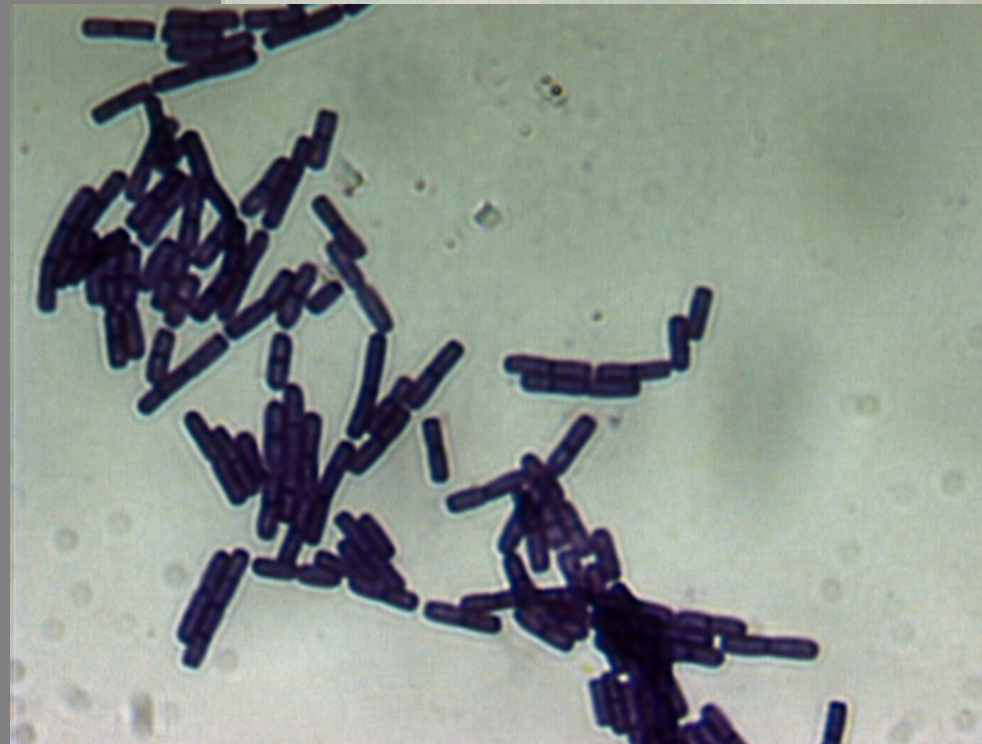
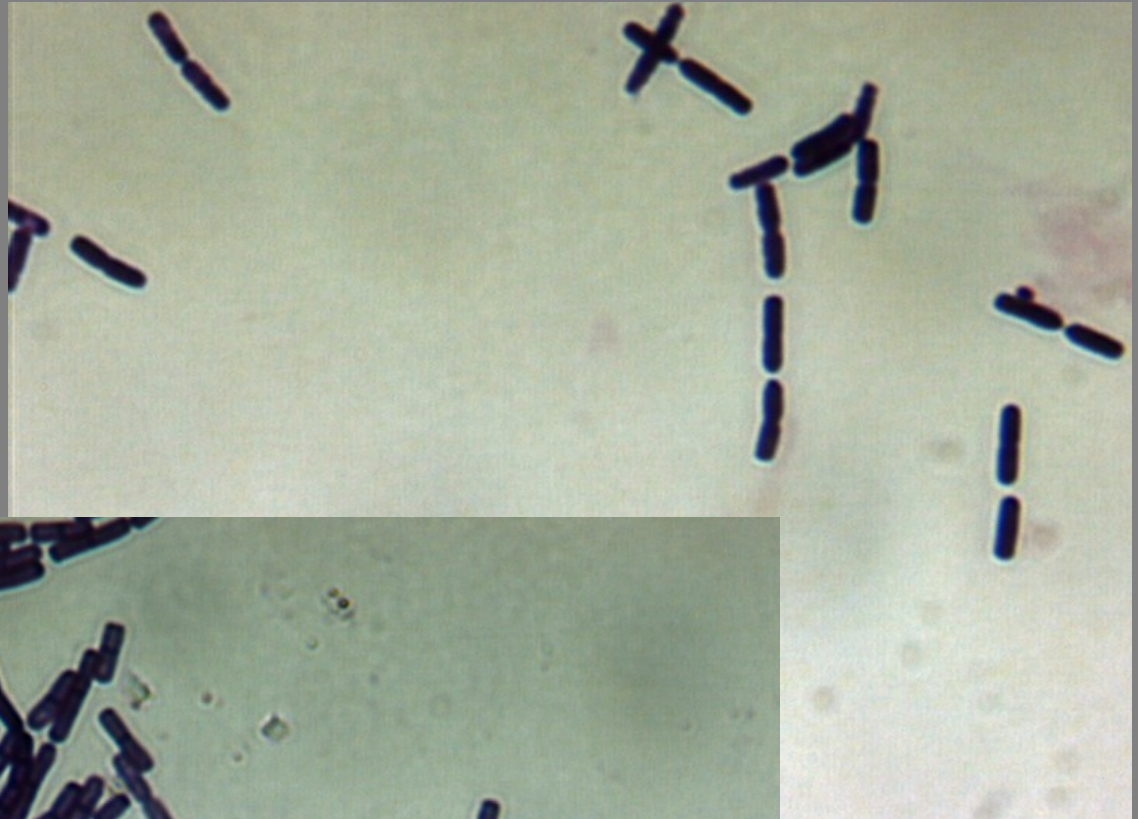
-Grampozitivní tyčka

zv. 1000

Preparát:
DVOJICE

JEDNOTLIVÉ
BUŇKY

ŘETÍZKY



Bacillus cereus CCM 2010



Bacillus megaterium CCM 2007

Preparát:
Jednotlivé
buňky
(velké)

Dvojice

Řetízky

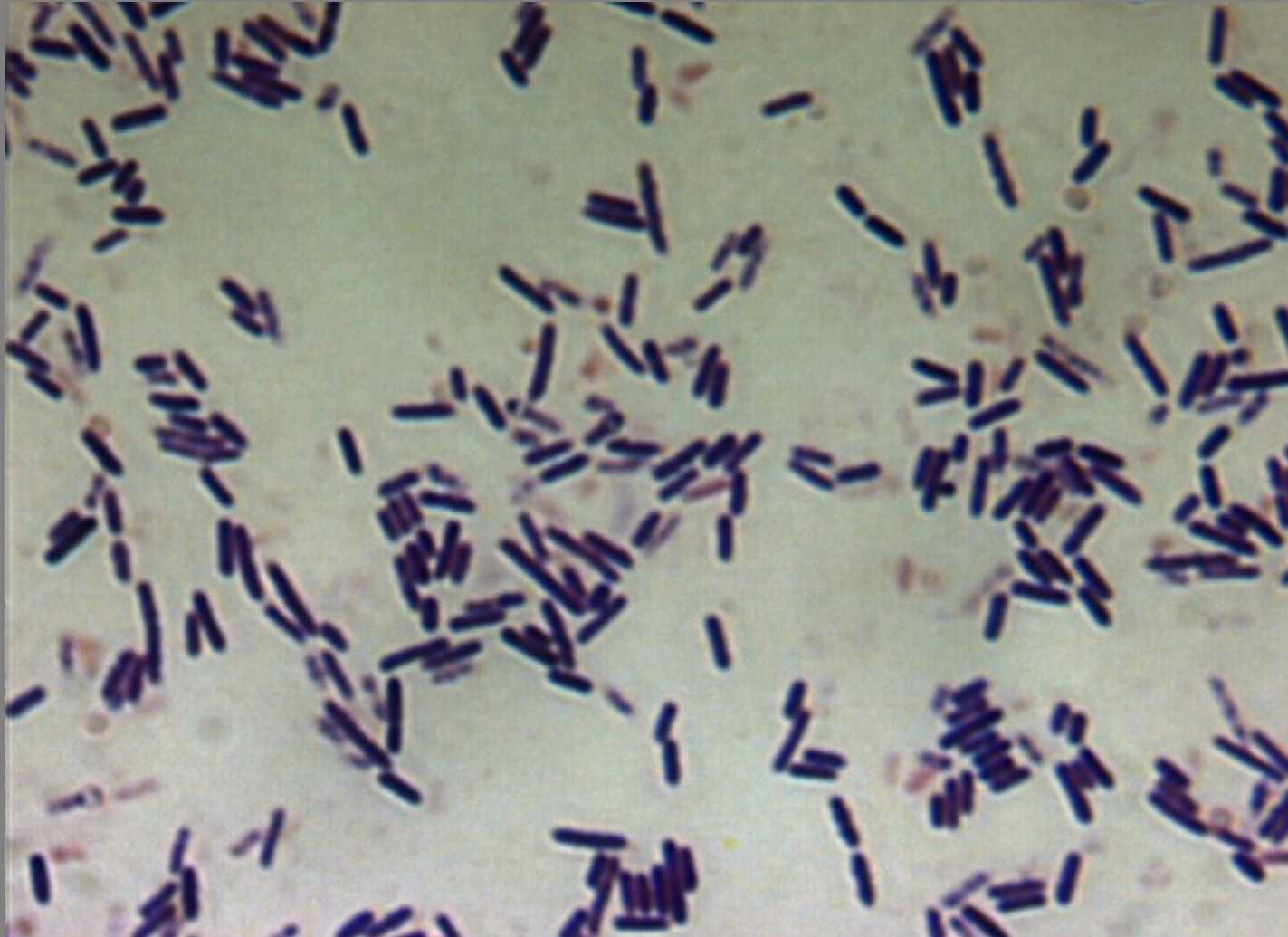


Bacillus thuringiensis CCM 19



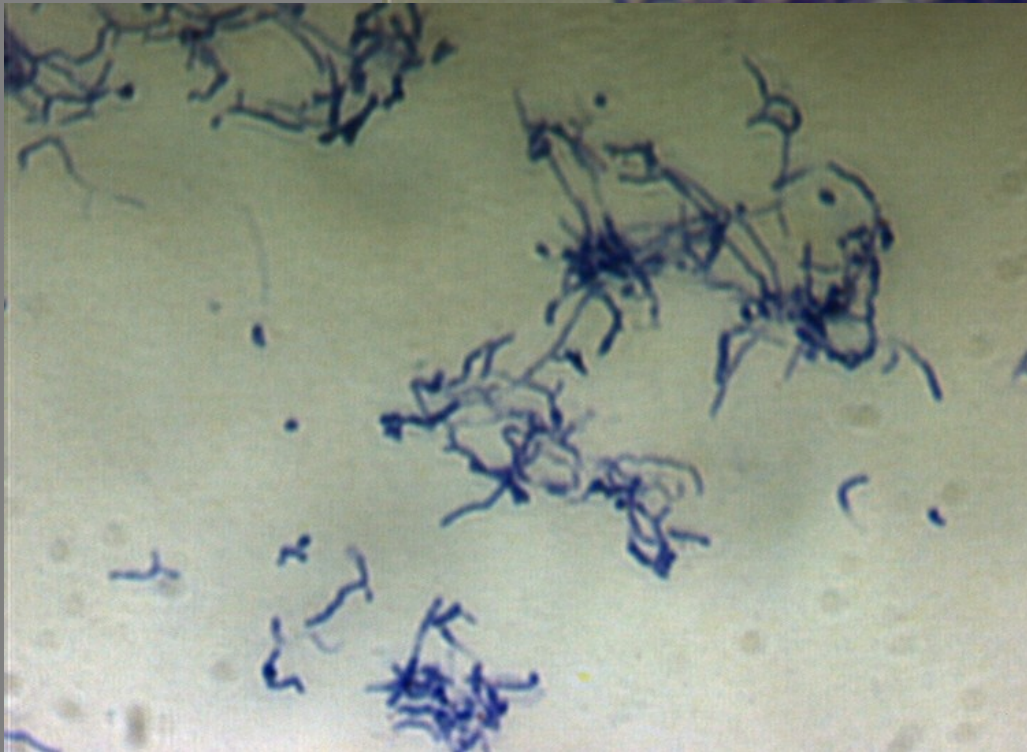
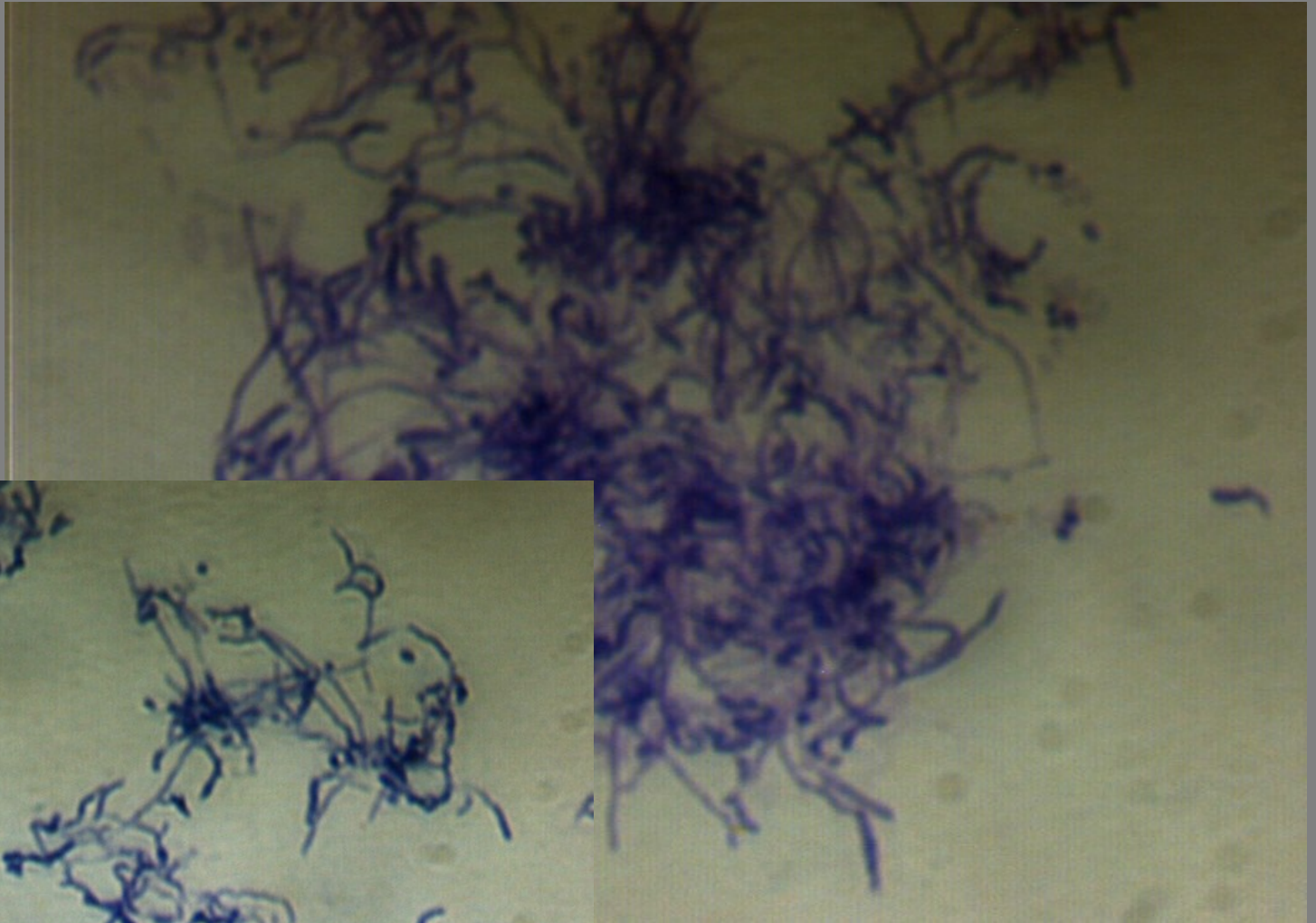
Bacillus sphaericus CCM 1615

G+ tyčky



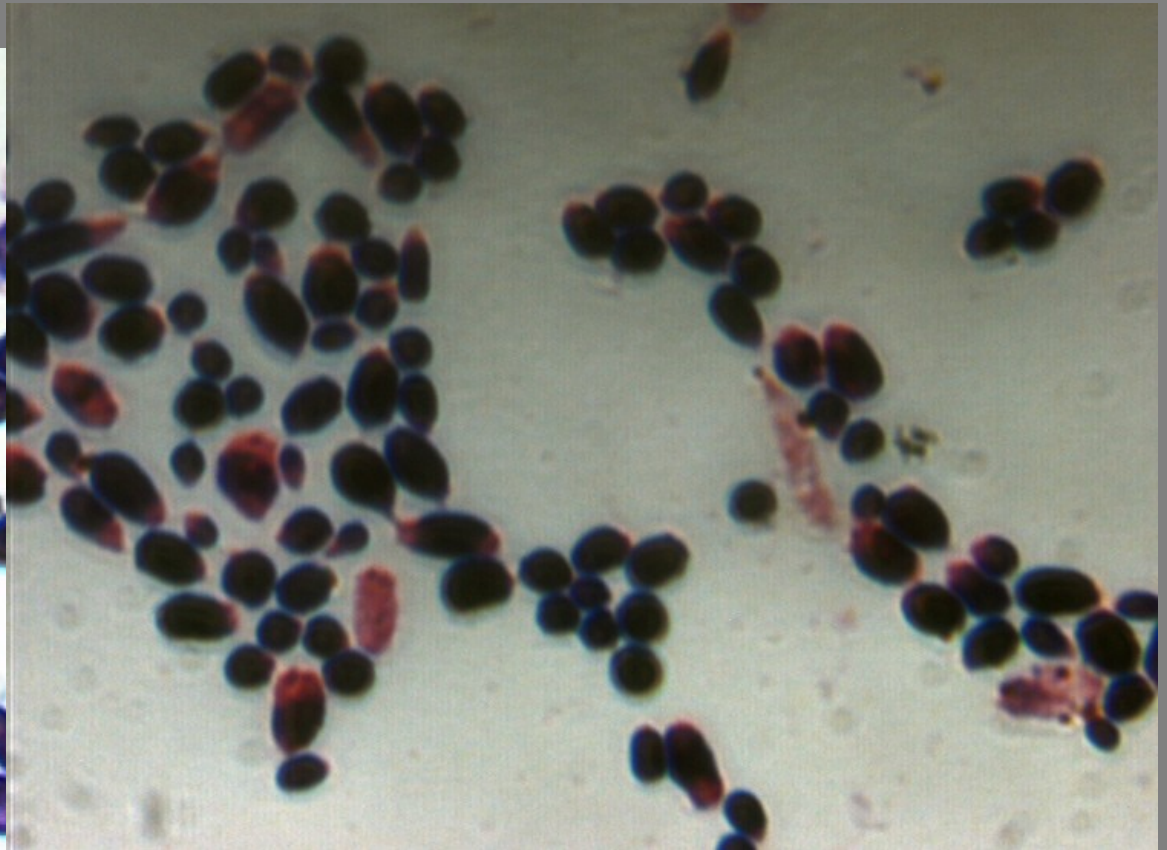
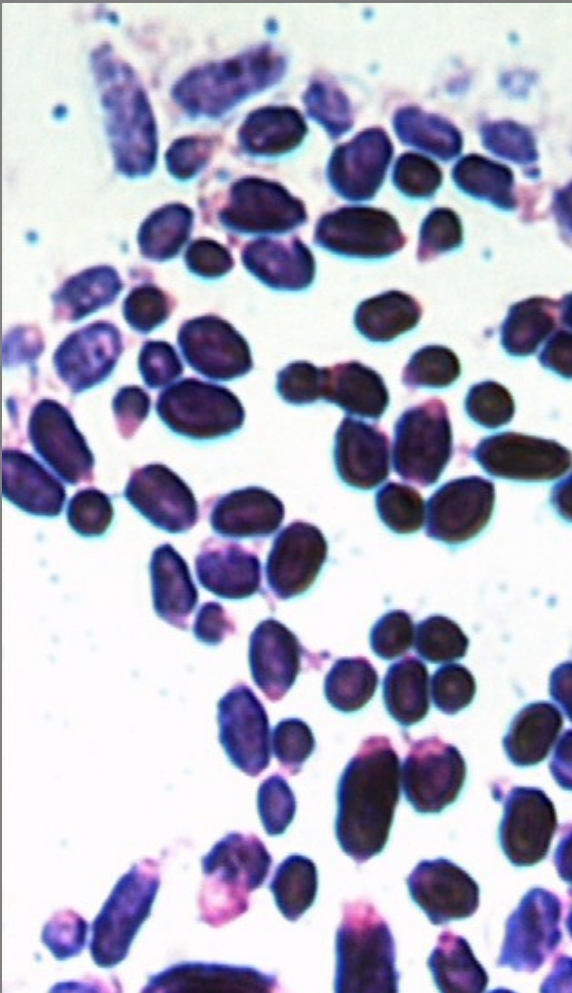
Streptomyces griseus ssp. *griseus* CCM 2386

G+ vlákna
zv. 1000×



Saccharomyces cerevisiae -

eukaryotický typ b., barví se grampozitivně!!

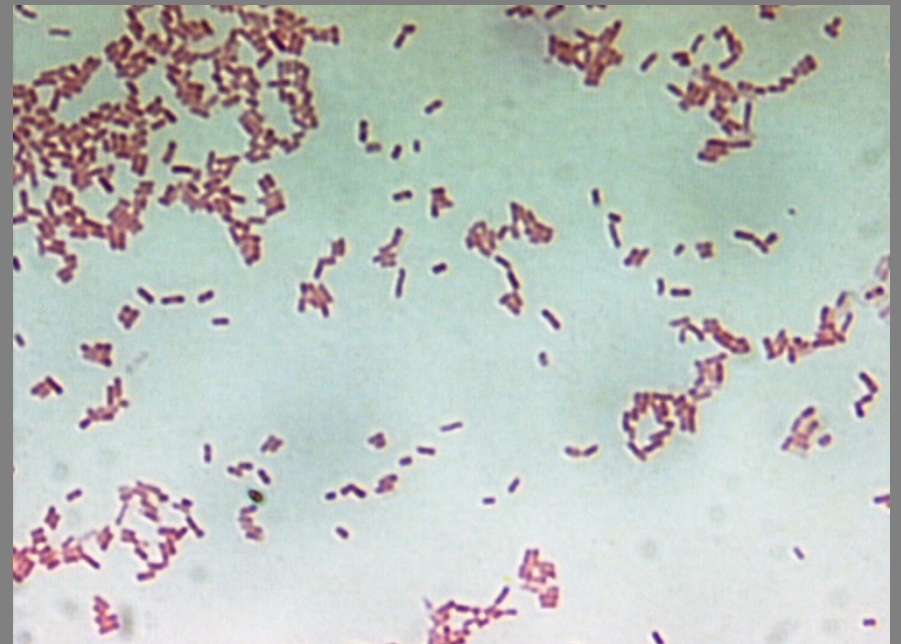




Bacillus cereus CCM 2010
(G+ tyčky)

Escherichia coli (G- krátké tyčky)

2-3 x 0,4-0,6 μm



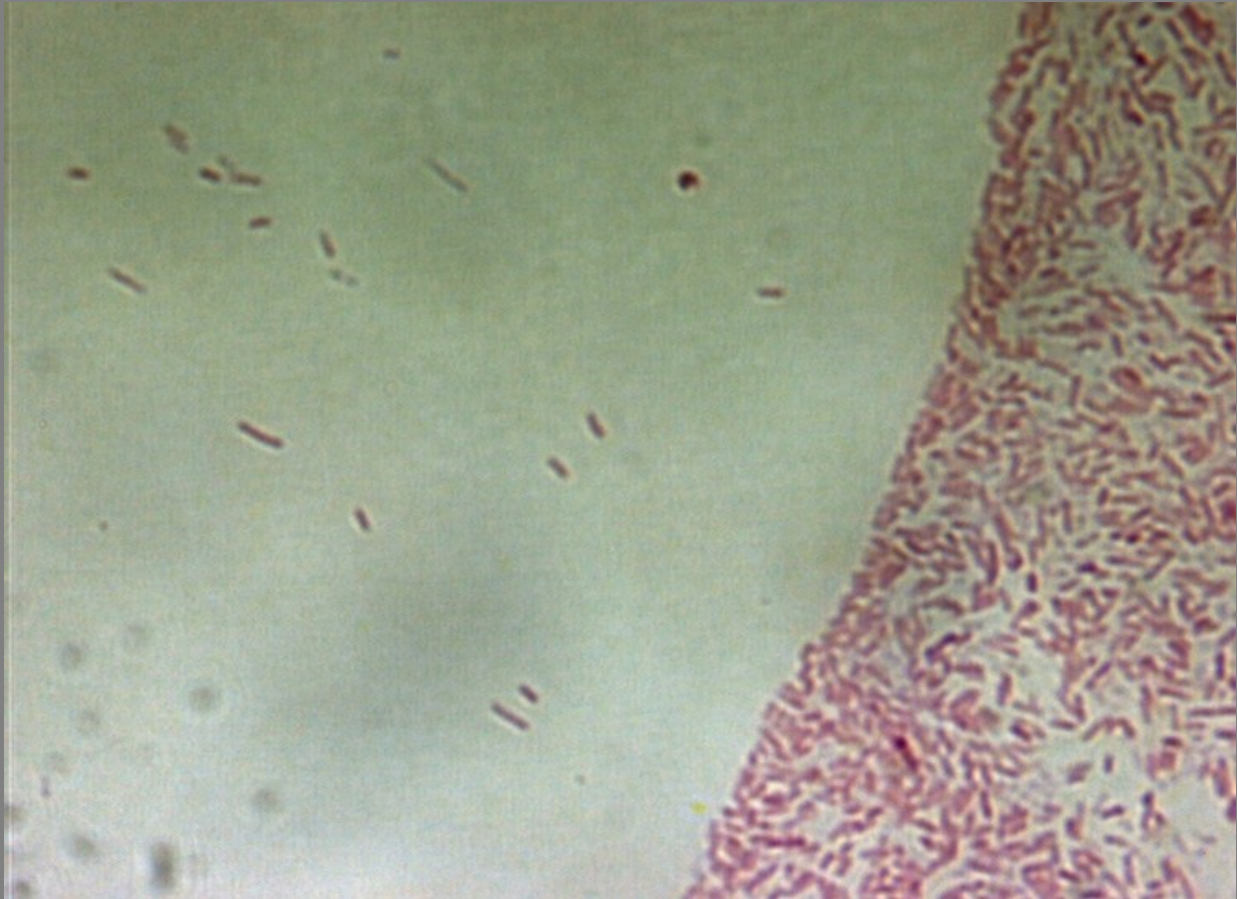
Serratia marcescens CCM 303

-Gramnegativní tyčka

zv. 1000

Preparát:

Jednotlivé
drobné
tyčinky



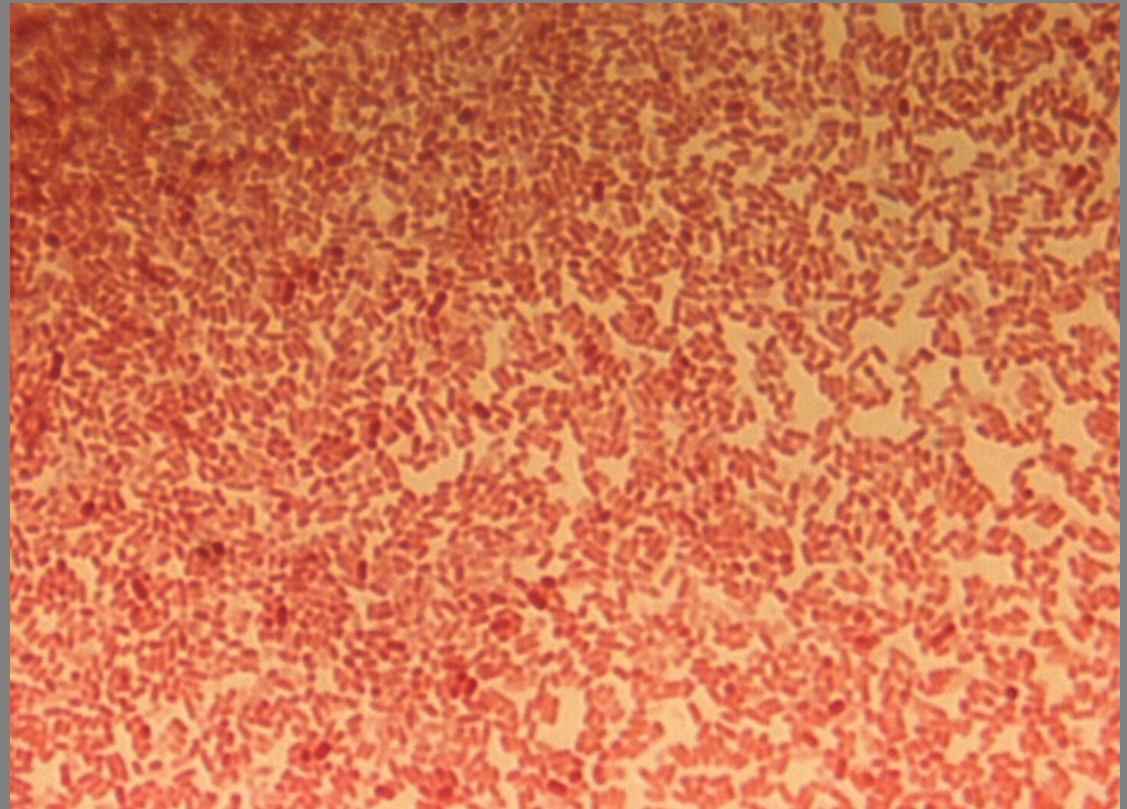
Serratia marcescens CCM 303

Gramnegativní tyčka

zv. 1000×

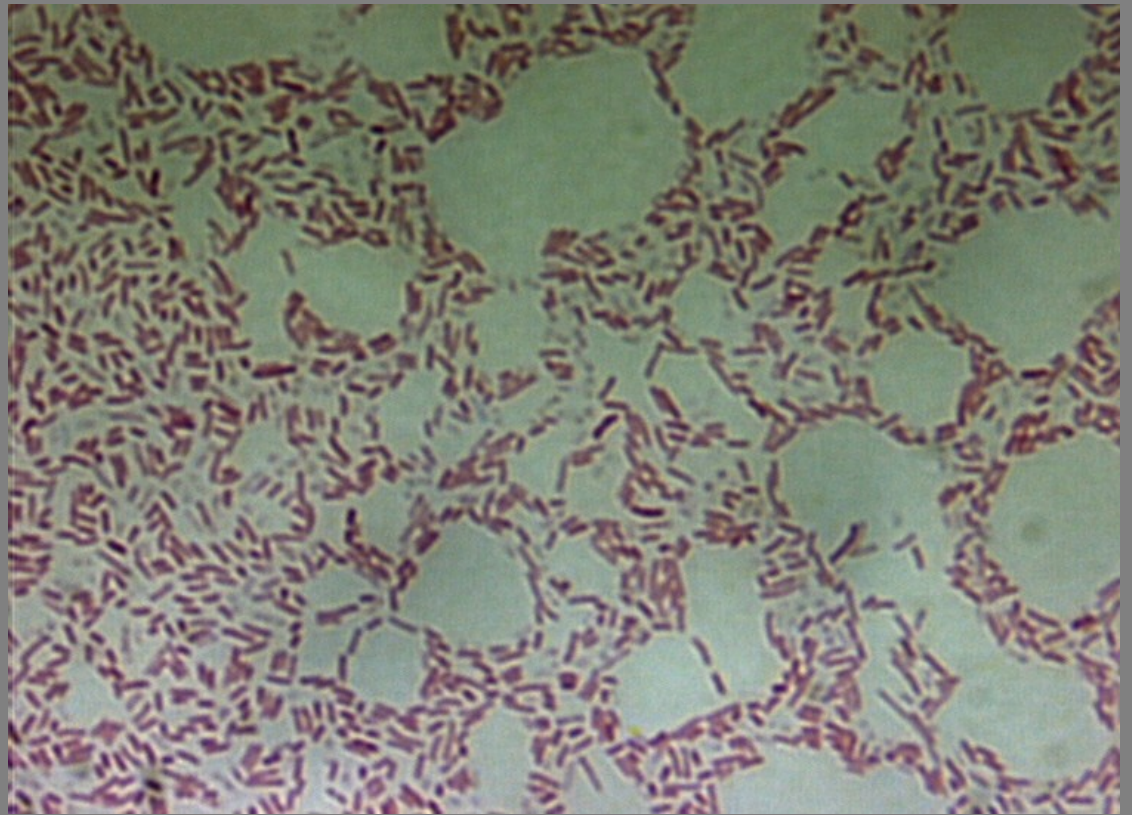
Preparát:

Jednotlivé
drobné
tyčinky



Serratia marcescens CCM 303

G- tyčka
zv. 1000×



Pseudomonas fluorescens CCM 2115

G- tyčky

