

Několik praktických rad pro hodnocení Morfologických a cytologických znaků

- pomáhají **IDENTIFIKACI** (rod i druh, př: plísně, mikrokoky - pigment)
- pomáhají při kontrole **kontaminace** kultury (posuzujeme dvě či více odlišných kolonií)
- pomáhají posouzení **fyziologického stavu** kultury

- makroskopické morfologické znaky: popis kolonií
- mikroskopické cytologické znaky – jen mikroskopické (vnitřní struktury, i preparace: fixace, barvení.); nativní preparát (pozorování fázovým kontrastem) barvené preparáty (zviditelní morfologii buňky a jejich struktur: Gramovo, Ziehl Nielsenovo, barvení struktur – spor, inkluzí..)

Makroskopické a mikroskopické znaky se hodnotí pospolu!

1) Morfologie – makroskopické znaky

Bakteriální druh – vzhled kolonie ovlivněn - typem živné půdy!! (př: *E. coli* na MHC či Endově)
- stářím kultury

Popis kolonií větš. na základních mediích: MPB, MPA; kvasinky, plísně – sladina.
Posouzení růstu na misce vždy doplňte mikroskopii.

a) charakter růstu v tekuté půdě – statická kultivace

- **difúzní zákal** – v celém objemu média, aerobní buňky
- **hrubé vločky** – také aerobní; *Staphylococcus*, některé bacily (dáno buněčnou stěnou, shlukováním buněk)
- **sedliny** – fakultativně anaerobní či anaerobní – *Lactobacillus*, kvasinky
- **blanka** – znamená špatnou smáčivost buněk či mycelia a držení vrstvičky silou povrchového napětí (před kultivací přidané povrchově aktivní látky tenzidy by tedy způsobily ponoření blanky; neionogenní tenzidy – neinhibující množení buněk – způsobí difúzní růst blankotvorných buněk); vyskytuje se u buněk tvořících většinou drsné vrásčité kolonie, aerobních; vzhled kožovitý (plísně), suchý vrásčitý křís (oxidativní kvasinky); u stárnoucí kultury blanka sedá!! (možná záměna se sedlinou)

Pozn.: „**mázdra**“ = povrchový útvar sedlinotvorných kvasinek, které kvašením vyčerpaly sacharidy a počaly aerobně využívat vlastní vyprodukovaný ethanol.

Kultivace v tekutém mediu může probíhat i na třepačce – lepší distribuce živin a kyslíku – pak tedy nehodnotíme charakter růstu

b) charakter růstu na šikmém agaru

Jak postupovat, abychom na šikmý agar naočkovali kulturu nejvhodněji pro pozorování charakteru růstu (Pozn: na šikmém agaru nehodnotíme jednotlivé kolonie, pouze okraje hádka; pracujeme s čistou kulturou – pro kontrolu čistoty je ale potřeba souběžně naočkovat křížový roztěr):

Pracujeme s předsušeným agarem (kondenzační voda by mohla rozrušit pravidelný nárůst buněk!!) (Zde rozdíl oproti uchovávání buněk na šikmém agaru, kdy je naopak kondenzační voda žádoucí pro dostatečnou vlhkost.)

Očkujte nejlépe: jehlou (ne kličkou – příliš široká, naberete mnoho buněk) rovná čára.

Kultivace: 24 - 48h (kvasinky 2-3 dny)

Takto můžeme posoudit: rychlost růstu, tvar nátěru: rovný plný, bodový, ostnitý, rhizoidní; profil nátěru – plochý, vypouklý); povrch nátěru – lesklý, drsný, suchý; konzistenci; pigmenty; exopigmenty - porovnejte rozdíl

c) Popis kolonie bakteriálního druhu na agaru Petriho misky

Kolonie je klon buněk narostlý z jednotlivé buňky očkovaného kmene.

Zjišťujeme: viz příloha „Morfologie kolonií“.

Nerovnosti růstu – způsobeny stářím kolonie.

Mukoidní (M) charakter růstu – vlhké slizovité a velmi lesklé kolonie tvořené opouzdrěnými buňkami (*Azotobacter*, *Leuconostoc*).

Hladké (S) kolonie – rovný okraj s nebo bez lesku u neopouzdrěných b.

Drsné (R) kolonie – suché s nerovnými okraji, liší se výškou vrásnění, rostou tak buňky tvořící řetízky, mycelia či pseudomycelia (*Bacillus*; kvasinky *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*; *Trichosporon*).

Změny M – S – R jsou důsledkem mutací.

Př: infekční materiál – většinou M-kmeny; po několika přeočkováních mutace v S-kmeny. Z nich M-forma zpátky těžko získatelná!

Mohou mít R genotypy hladké kolonie??:

- Fenotyp S, M a R ovlivněn složením media. Př: přítomnost 1) 20% zkvasitelných sacharidů podporuje S a M typy, R typy jsou na něm hladší. 2) Tenzidy způsobují hladké až lesklé fenotypy R typů.

d) Obrovské kolonie kvasinek a plísní

Kvasinky se očkují na vyšší vrstvu sladiny kapkou suspenze mladších buněk ve fyziologickém roztoku přeneseného očkovací kličkou.

Papily = vznik a pomnožení některých mutantů.

Sektory – genetická nejednotnost, sporulace.

e) Růst ve vpichu šikmého agaru MPA (u bakterií)

Určuje nároky MO na kyslík: aerobní MO rostou v horní části vpichu, anaerobní u dna a FANA po celé délce vpichu.

Jaké je stáří očkované kultury? Inokulum je 24h bujonová kultura.

2) Morfologie a cytologie – mikroskopické znaky

- hodnotí se TVAR, VELIKOST a USPOŘÁDÁNÍ buněk, přítomnost zvláštních „orgánů“ na buňce, způsob rozmnožování viditelný v preparátu
- bakterie vykazující růstové cykly mají v každém z cyklů jinou morfologii buněk či jiné složení buněčné stěny - tedy jiné imunologické vlastnosti

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).

Zdroje:

Šilhánková, Demnerová (1993): Návod pro laboratoře z mikrobiologie, VŠCHT, Praha

http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/index.html

<http://biomikro.vscht.cz/sylaby/biochmikrorg.htm>

Zkratky: b. - buňka, bakterie, MO – mikroorganismus, MPA – masopeptonový agar, MPB – masopeptonový bujon, FANA – fakultativně anaerobní