

Cytologie a morfologie bakterií – cvičení

Mikroskopické techniky, makroskopické znaky kolonií

Markéta Štreitová
Bi-OB-MI, 3. ročník
Skupina II., 2009/2010

Téma:

1) Úvod do mikroskopování

2) Morfologie buňky

3) Makrofoto kolonií

Ve cvičení jsem pracovala s kmeny:

Lactobacillus brevis CCM 3805

Serratia marcescens CCM 303

Haloarcula hispanica CCM 3601

1) Úvod do mikroskopování

Preparáty: • nativní – využití různé světlolomnosti částic

(pozorování ve fázovém nebo Nomarského kontrastu)

– skutečný tvar a velikost buňky, pohyb, růst,
množení, obtížně barvitelné buněčné útvary

• barvené: typy barvení:

Bez fixace buněk:- negativní – světlé buňky na tmavém pozadí

nefixujeme tzn. nedochází k deformaci

tvaru a velikosti buňky

- jednoduché (vitální test) – tvar buňky, vitalita

S fixací buněk: - diferenciační - rozlišení struktur

- diagnostické - identifikace

Pozorujeme:

- v jasném poli (barvené preparáty) – viz Morfologie buňky
- ve fázovém kontrastu (nativní preparáty)
- v Nomarského kontrastu (nativní preparáty)

Fázový kontrast

Obraz je vytvářen interferencí paprsků fázově posunutých i neposunutých (závisí na indexu lomu – n prostředí, kterým paprsek prochází). Rozdíly ve fázi → změna kontrastu. Na strukturách s vyšším n (hustší část buňky) se paprsky ohýbají více (tyto struktury září).

- pozorování nativního preparátu
- zářící spory
- buňky nejsou deformovány

Nomarského kontrast

= diferenční interferenční kontrast (DIC) dle Nomarského

Interferenční mikroskop: skládá dva obrazy ze dvou paprsků (procházejících objektem a jdoucích mimo objekt) → dva vzájemně kolmo polarizované obrazy.

- Nomarského destička v kondenzoru: rozdělení paprsku zdroje do dvou souběžných.
- interference dvou paprsků po průchodu preparátem zviditelní překrytí různých fázových posunů změnou jasů → **plastický 3D obraz (podle n částí buňky)**
 - pozorování buněčných struktur např. bičíků

Nativní preparát

Princip:

odlišná světlohmotnost částic v pozorovaném objektu – různé části buňky mají různé indexy lomu světla → vznikající obraz je výsledkem složení obrazů vln s pozunutou fází a vln odkloněných od preparátu.

Ukazuje skutečný tvar mikrobiální buňky neporušené zásahem fixace a barvení, můžeme pozorovat i pohyb .

Využití:

- zjišťování tvaru a struktury buněk, určování morfologických znaků
- pozorování růstu a množení, pohybu bakterií ,
- v diagnostické praxi: význam při studiu buněčných útvarů, které se obtížně barví.

Nativní preparát

Příprava:

Materiál a pomůcky:

Podložní a krycí sklíčko, kahan, kapátko, sterilní destilovaná voda, očkovací klička, filtrační papír, mikroskop s fázovým a Nomarského kontrastem (zn. Olympus), software pro snímání a analýzu obrazu Lucia G.

Bakteriální kmeny: *Haloarcula hispanica* CCM 3601

Postup práce: - **aseptická práce při nanášení buněk na sklíčko**

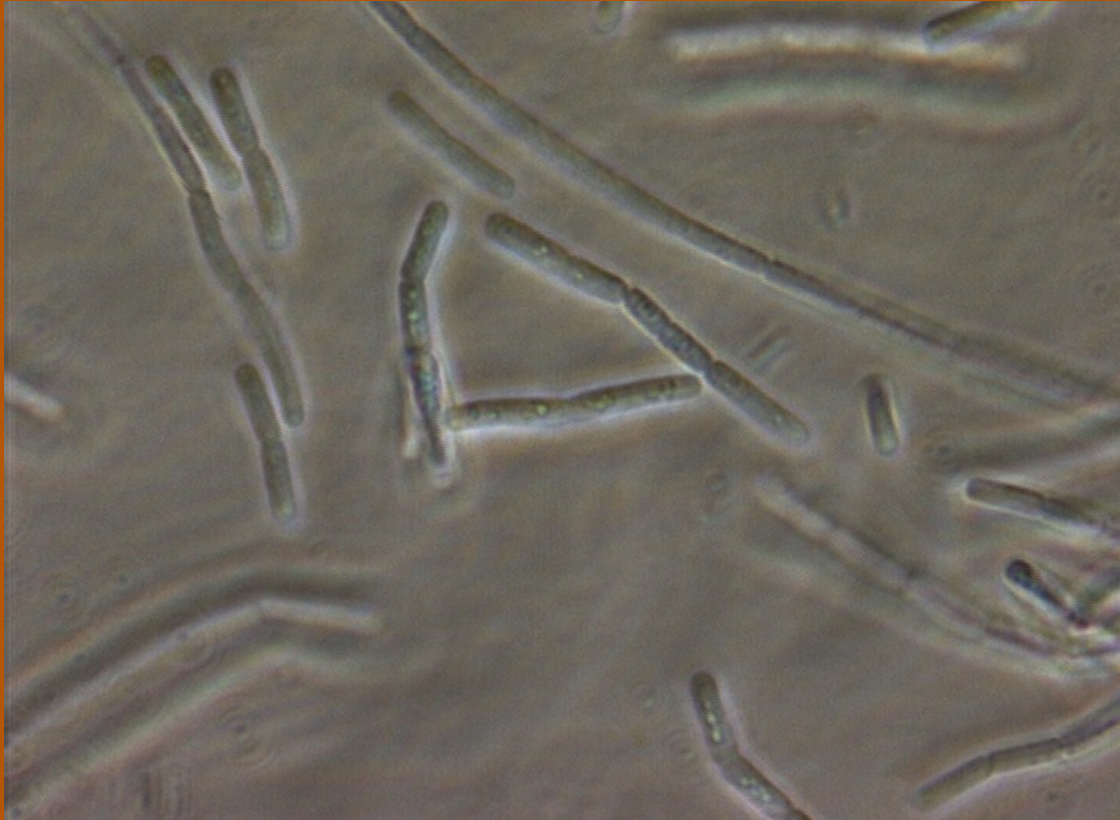
- dobře očištěné podložní sklíčko vyjme z alkoholu, uzavřeme nádobu s ethanolem protáhneme sklíčko plamenem a položíme na tmavší podložku
- doprostřed sklíčka nanese kapku sterilní destilované vody
- ožehnutou a vychladlou očkovací kličkou vneseme do kapky nepatrné množství kultury (asi ¼ kličky), pečlivě rozmícháme
- kultury nesmíme nanést do kapky mnoho aby preparát nebyl hustý
- 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).
- přebytečnou 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 nebo 100x – celkové zvětšení tedy 600x nebo 1000x).

Závěr: Pozorovali jsme rozdíly mezi fázovým a Nomarského kontrastem, které byly viditelné zejména u sporulujících druhů (spory jasně zářily). Ve fázovém kontrastu bylo kolem buněk viditelné tzv. halo. V mém preparátu s rodem *Haloarcula* (má se jednat o pleomorfní tyčky) byly přítomny kokovité buňky. To mohlo být způsobeno záměnou preparátu nebo kontaminací vzorku. Proto uvádím fotografie jiných druhů.

Fázový kontrast



B. thuringiensis CCM 19, řetízky tyček se zakulacenými konci, světlé útvary uvnitř buněk zde nejsou spory.
Zv. 1000x.

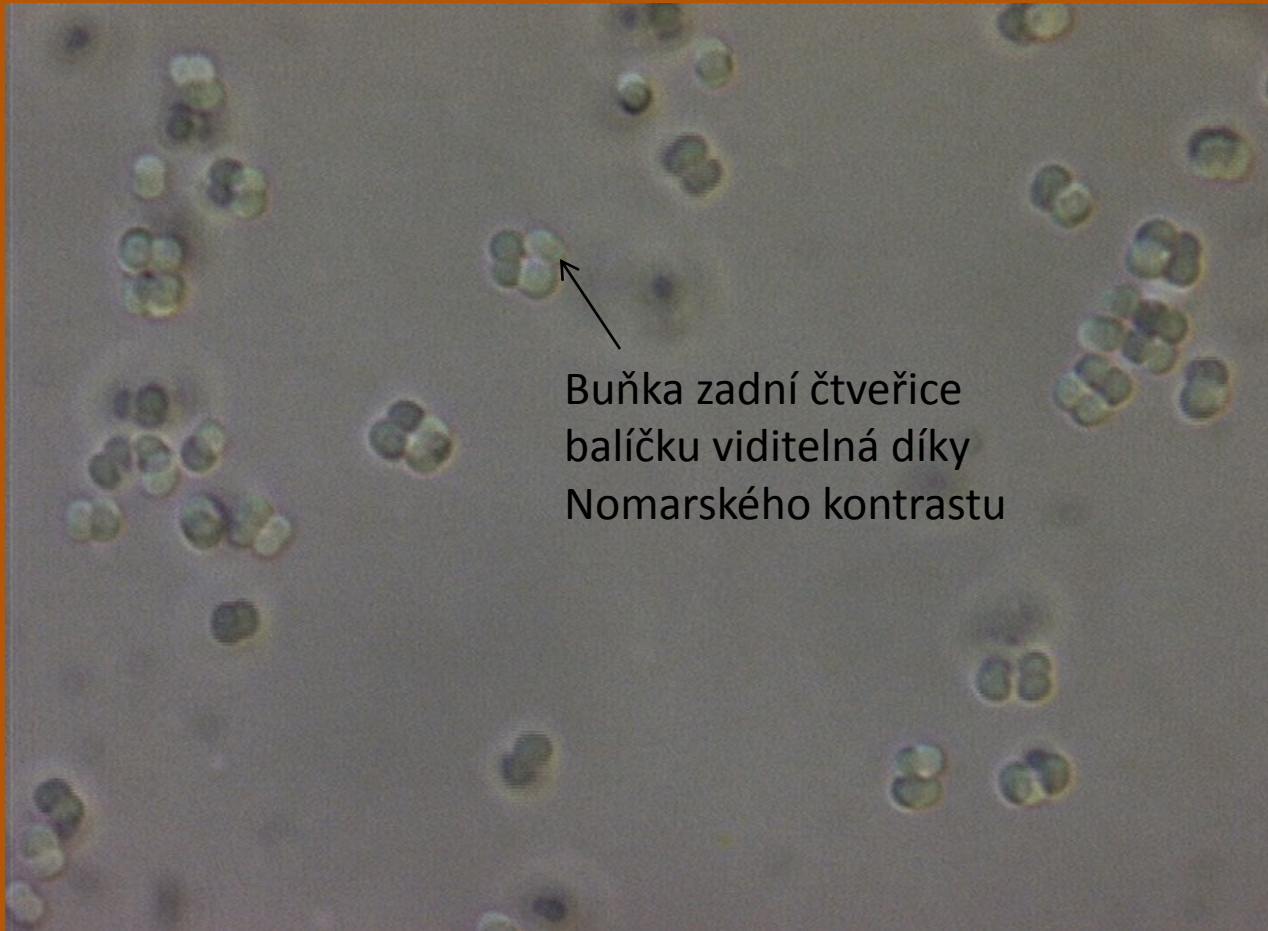
Nomarského kontrast



Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* CCM 7190.

Řetízky tyček. Zv. 1000x.

Nomarského kontrast



Buňka zadní čtveřice
balíčku viditelná díky
Nomarského kontrastu

Sporosarcina ureae CCM 860.

Nepravidelné koky v balíčcích (sarcinách).Zv. 1000x.

Srovnání technik



S. cerevisiae, zv. 1000x.



B. circulans, zv. 1000x.



Sporosarcina ureae, zv. 1000x.

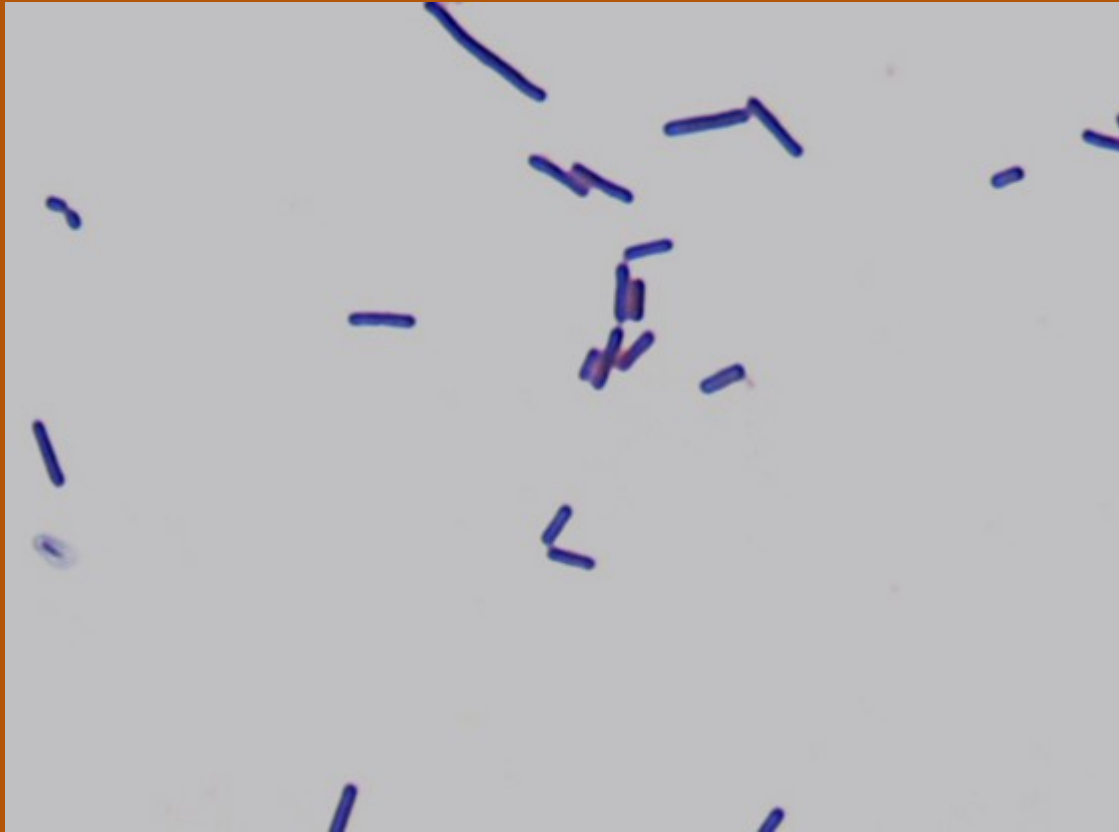
2) Morfologie buňky

Barvicí techniky dovolující pozorovat morfologii buněk (tj. vnější znaky buněk – velikost, tvar, popř. typ buněčné stěny):

- **Gramovo barvení** – barvitelné buňky zadržují barvivo krystalovou violeť v BS díky silné vrstvě peptidoglykanu, z BS gramnegativních buněk je barvivo vymyto dobarvením
- **negativní barvení** - obarvení pozadí, na něm vidíme světlé buňky; nezkresluje velikost buněk, po dobarvení nitra buňky můžeme odhalit případnou přítomnost pouzdra
- **jednoduché barvení buněčné stěny** (krystalová violeť, bez fixace) - velikost buňky
- **barvení buněčné stěny Chanceovou metodou** (krystalová violeť + kongo červeň) – dtto

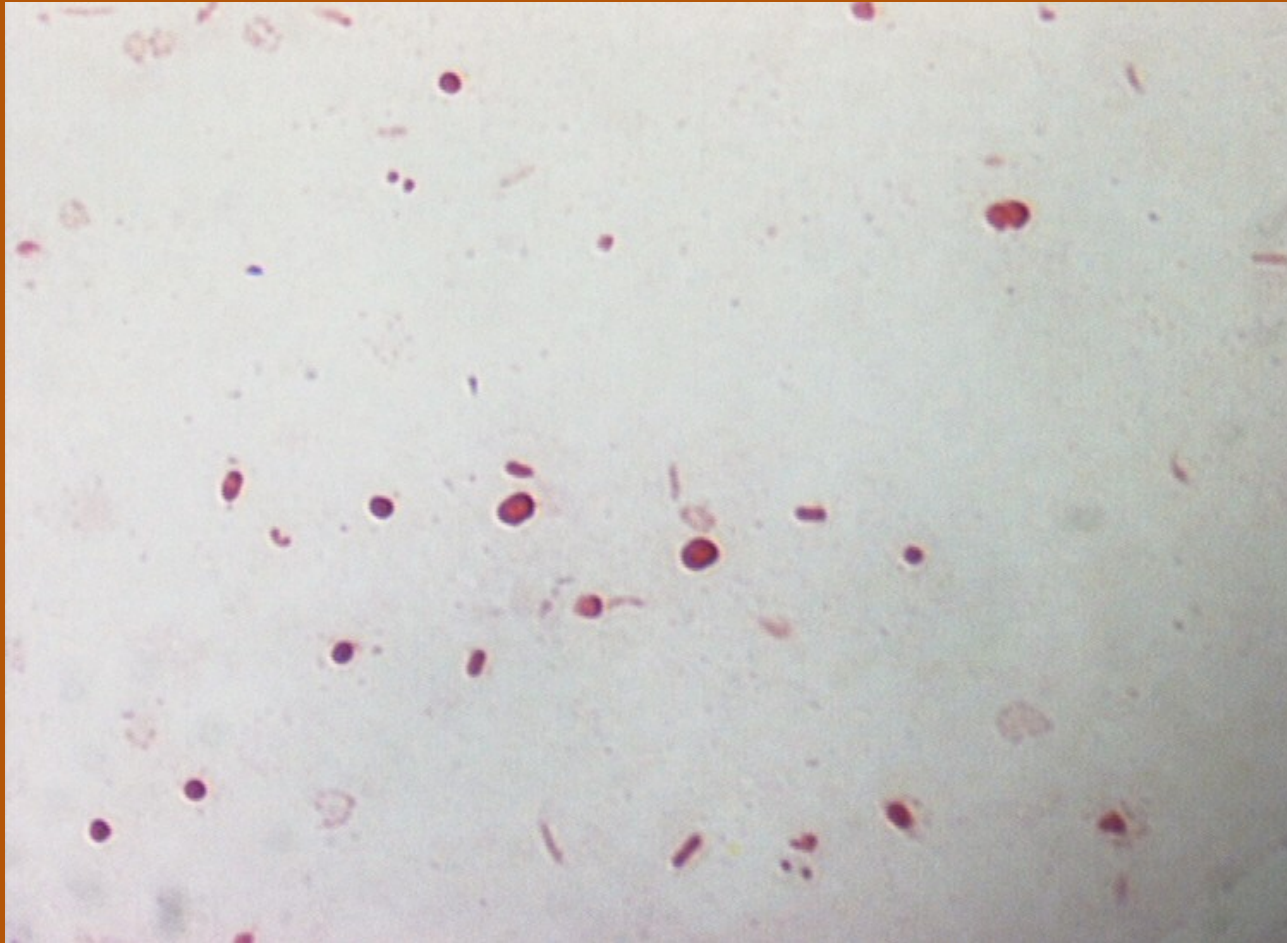
Pozorujeme v jasném poli

Gramovo barvení



Lb. brevis CCM 3805, grampozitivní, krátké i dlouhé tyčky,
jednotlivě nebo v krátkých řetězcích

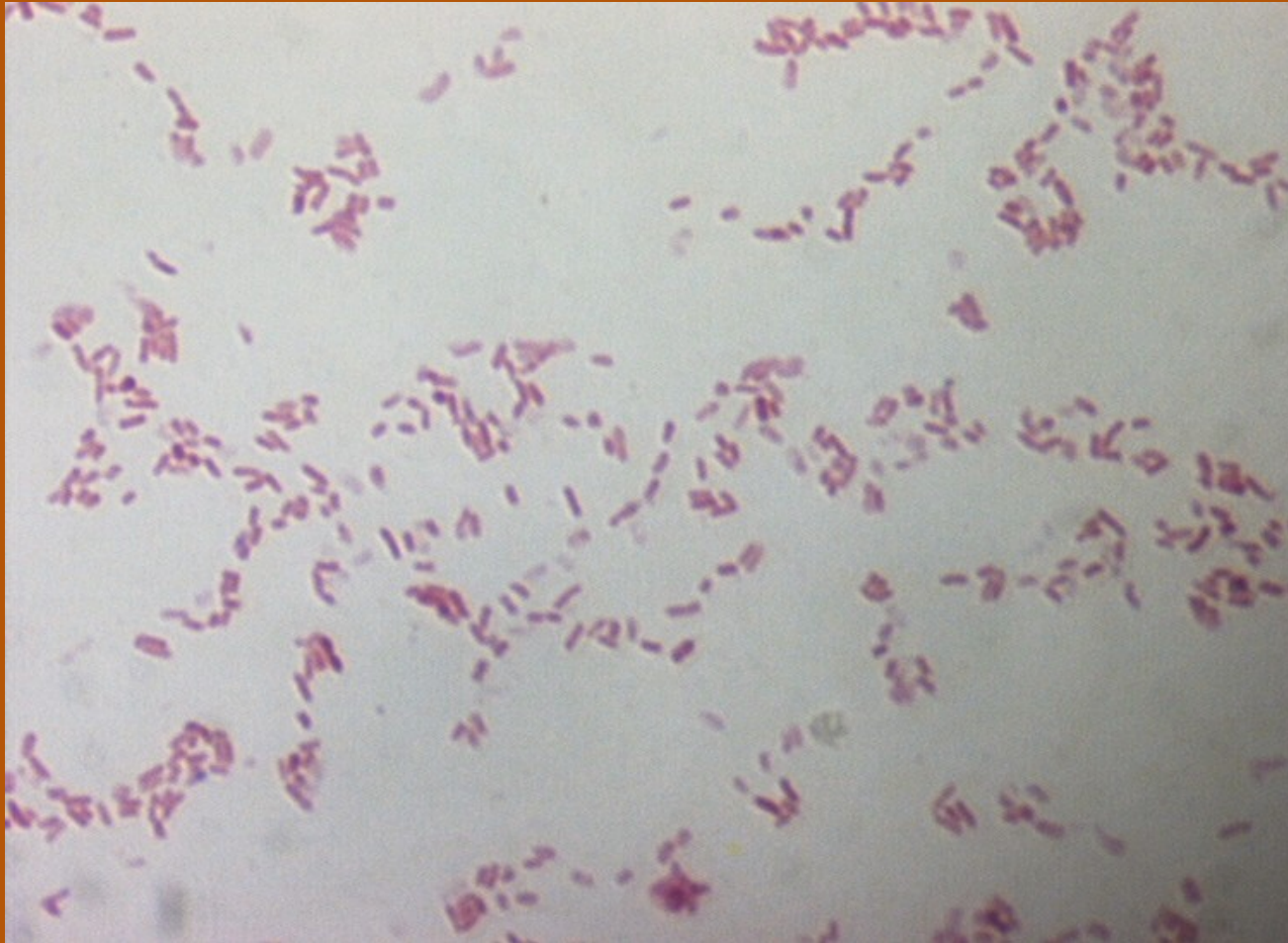
Gramovo barvení



Haloferax mediterranei CCM 3361, gramnegativní, značně pleomorfní buňky.

Zv. 1000x.

Gramovo barvení



Serratia marcescens CCM 303, gramnegativní, drobné tyčky, jednotlivě.
Zv. 1000x.

Další preparáty



Streptococcus mutans CCM 7409,
grampozitivní, krátké tyčky až
kokotyčky po dvou nebo v řetězcích



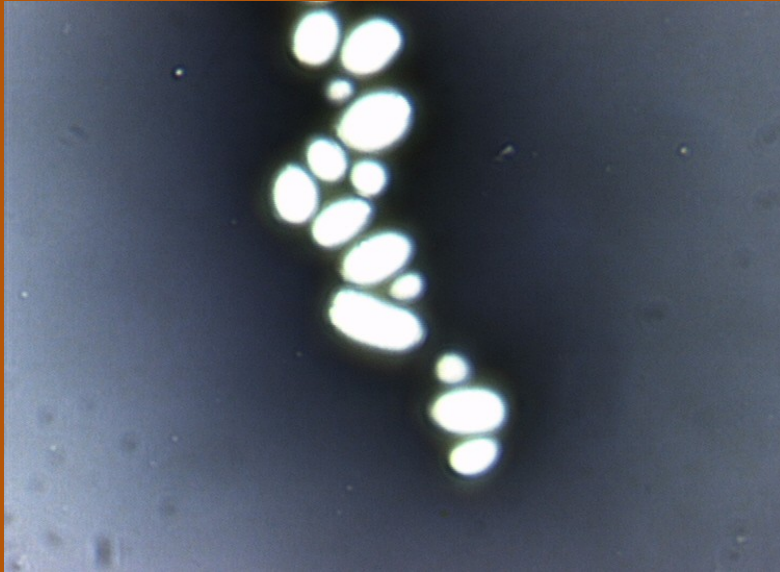
B. thuringiensis CCM 19,
grampozitivní tyčky tvořící řetězky

Negativní barvení



Bacillus cereus CCM 2010, krátké tyčky s rovnými nebo zakulacenými konci; jednotlivě, po dvou nebo v řetězcích. Zv. 1000x.

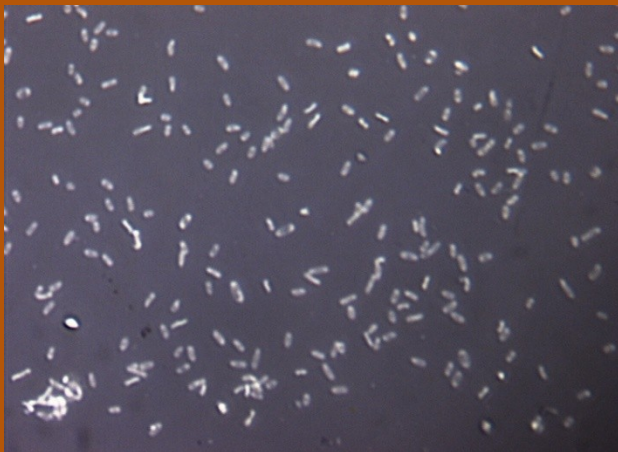
Negativní barvení



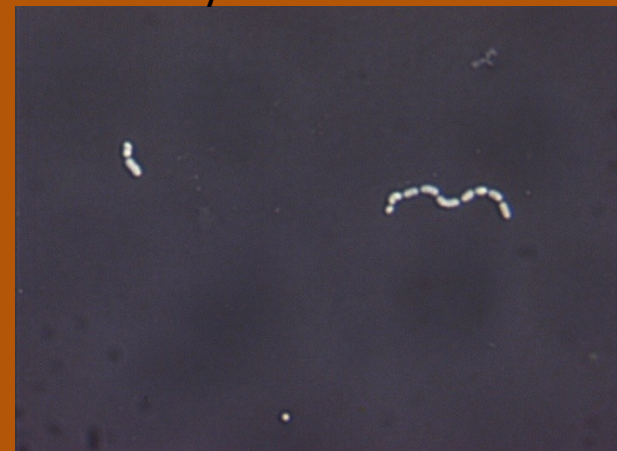
S. cerevisiae, pleomorfní velké buňky.
Zv. 1000x.



Sporosarcina ureae CCM 860 ,
koky ve čtveřicích. Zv. 1000x.



Serratia marcescens
CCM 303,
drobné tyčky,
jednotlivě.
Zv. 1000x.



Lb. casei ssp.
casei
CCM 7088,
drobné tyčky,
jednotlivě.
Zv. 1000x.

3) Makrofoto kolonií

U kolonií můžeme pozorovat:

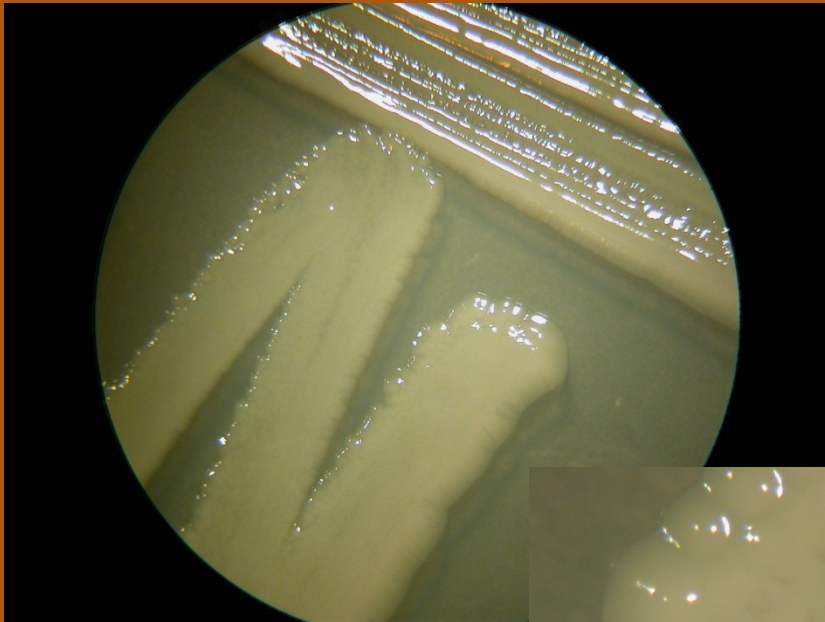
- Velikost (průměr; mm)
- Tvar – kolonie pravidelná kulatá, oválná, nepravidelně laločnatá, vláknitá, rhizoidní, plazící se
- Profil – kolonie vyvýšená, plochá, pupkovitá, miskovitá ...
- Okraje – pravidelné, filiformní, laločnaté, okrouhlé ...
- Povrch – hladký, lesklý (S – fáze), matný, drsný (R- fáze),
- Transparence – průhledná, průsvitná, neprůsvitná kolonie
- Barva - kolonie bezbarvá, či pigmentovaná: našedlá, bělavá, žlutá ...

Další znaky popisované na bakteriální kolonii:

- Vůně, zápach – po jasmínu, žluklém másle, ovocný ...
- Tvorba mycelia
- Změny media – dvorec zbarvení, hemolýzy, precipitátu
- Konzistence – zjišťuje se bakteriální kličkou (viskózní, mazlavá, drobivá, zarůstá do agaru)

Makrofotografie kolonií

Pořízené fotoaparátem fotoaparát Nikon Coolpix 4500



***Serratia marcescens* CCM 303**

Tvar: kulatý

Profil : vypouklý

Okraje: hladké

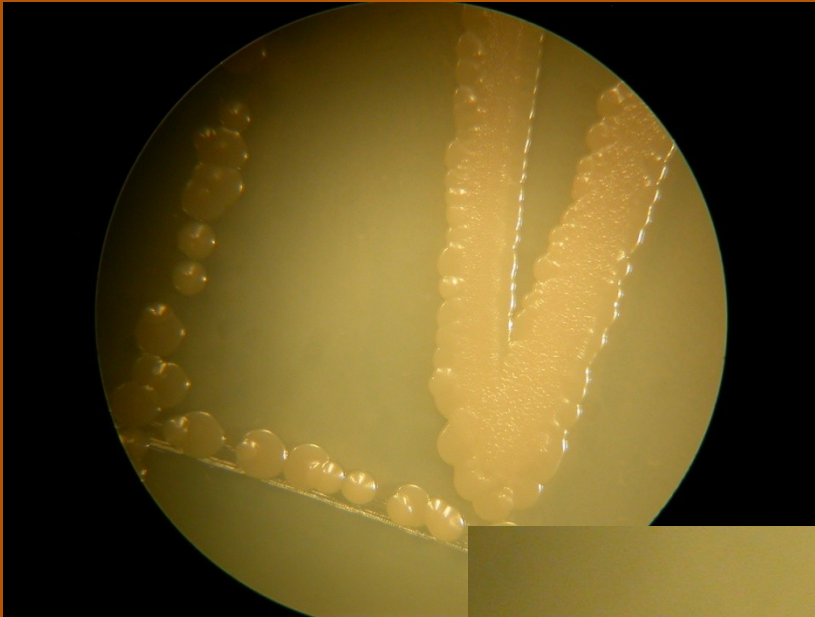
Povrch: lesklý

Transparence: neprůsvitná kolonie

Barva : bílý pigment



Makrofotografie kolonií



Sporosarcina ureae CCM 860

Tvar: kulatý

Profil : plochý

Okraje: hladké

Povrch: lesklý

Transparence: průsvitná kolonie

Barva : tělová

