

2. Cvičení

Strukturální (diferenciační) barvení



Strukturální (diferenciační) barvení

- Používá se k identifikaci bakterií (struktury jako diagnostické znaky) a ke studiu struktur samotných
- Barvení spor, pouzder, bičíků
- Barvení inkluzí:
 - Volutinu
 - Tuku
 - Glykogenu



1. Pozorování spor

- Spory jsou nereproduktivní klidová stadia vznikající jako příprava na nepříznivé podmínky
- Mohou zůstat v „mateřské“ buňce (ta při sporulaci umírá) nebo se uvolnit do okolí
- Spory tvoří pouze některé, převážně G⁺ rody bakterií (*Bacillus*, *Clostridium* aj.)
- Jejich umístění v buňce, velikost a tvar slouží jako identifikační znak
- Jsou přítomny v kultuře určitého stáří



1.1. Barvení spor

- Velmi špatně přijímají barvivo → fixovaný preparát se barví malachitovou zelení za horka (5 minut se zahřívá nad kahanem)
- Buňka se dobarví kontrastním barvivem – safraninem nebo kongo-červení

Barvení spor

- Spory oválné, zduřující buňku

Spory subterminálně umístěné



Uvolněné spory

Paenibacillus alvei CCM 2051T

Spory centrálně umístěné

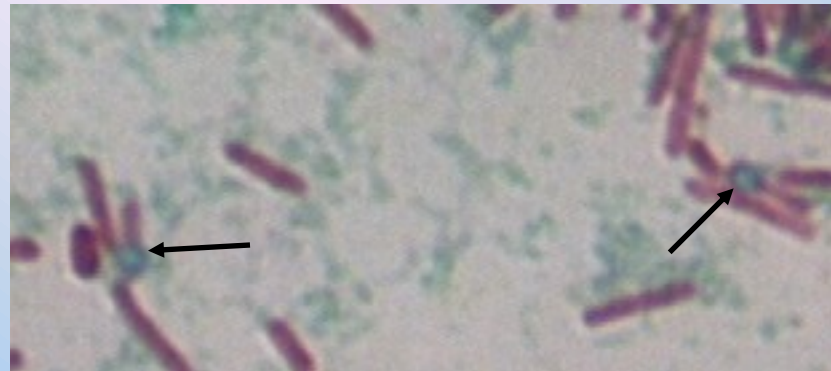


Paenibacillus polymyxa
CCM 1469

Barvení spor

- Spory kulaté, zduřující buňku

terminálně
umístěné



Bacillus sphaericus CCM 1615



1.2. Spory ve fázovém kontrastu

- Preparát je nativní a rychle připravený – nemusí se barvit
- Spory v preparátu září a jsou snadno pozorovatelné

Spory ve fázovém kontrastu

- Spory kulaté, terminálně umístěné
nezduřující buňku



zduřující buňku



B. sphaericus CCM 1615

B. megaterium
CCM 2007

Zvětšení 1000x



2. Pozorování pouzder

- Pouzdro je (oproti slizu) jasně ohraničená vnější struktura
- Chrání buňku před vysycháním, působením chemických látek, případně před imunitním systémem živočicha, ve kterém bakterie žije
- Samotné pouzdro se barví velmi špatně, proto barvíme pozadí a buňku uvnitř → pouzdro zůstane jako jediné neobarvené

2.1.1. Pouzdra – negativní barvení nigrosinem

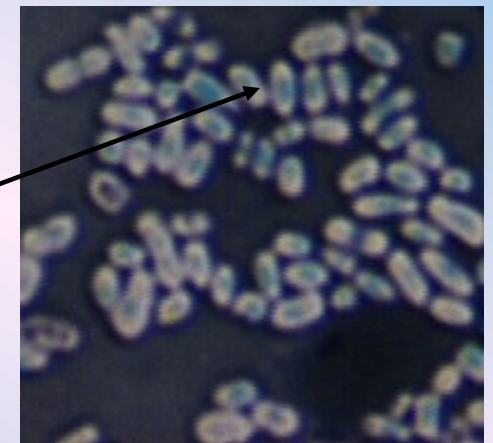
- Nefixovaný preparát
- Nigrosinem se obarví pozadí
- Roztokem methylenové modři se dobarví buňky uvnitř pouzder

Dvě kokovité buňky (tmavé) ve společném pouzdře (bílé) na šedém pozadí



Azotobacter vinelandii
CCM 289

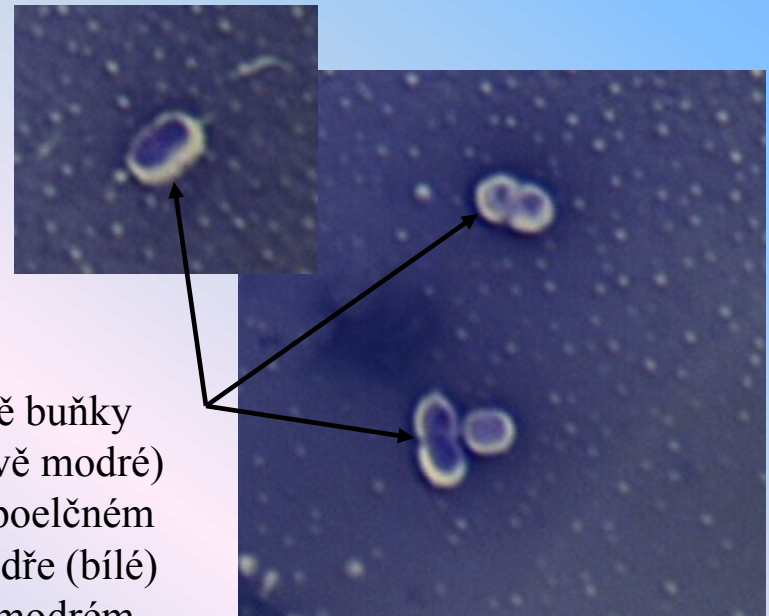
Oválné buňky (modré) v pouzdře (bílé) na šedém pozadí



Klebsiella pneumoniae
CCM 4985

2.1.2. Pouzdra – negativní barvení kongo-červení

- Buňky resuspendujeme v kapce kongo červeně, rozetřeme a necháme zaschnout
- Převrstvíme HCl, slijeme, necháme zaschnout
- Dobarvíme methylenovou modří



Dvě buňky
(tmavě modré)
ve společném
pouzdrě (bílé)
na modrém
pozadí

Azotobacter vinelandii CCM 289

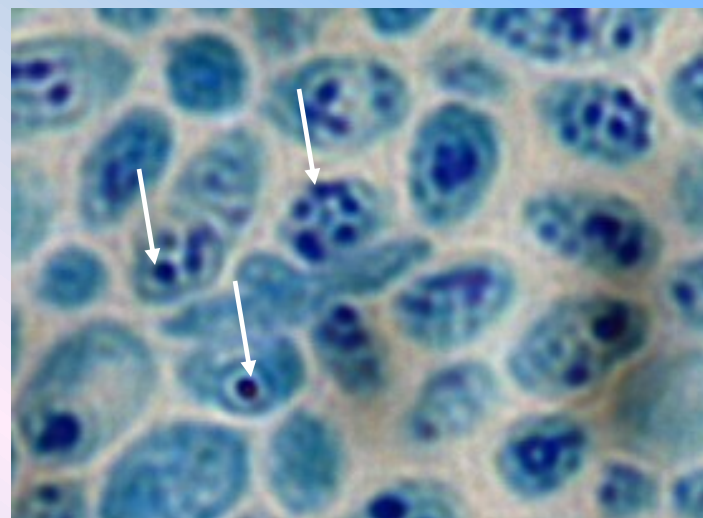


3. Barvení inkluzí

- Jsou to vnitrobuněčně uložené zásobní látky či metabolity nebo jiné látky, které se mohou uplatnit v metabolismu
- Bez membrány nebo s jednovrstevnou (nebiologickou) membránou
- Např.:
 - Volutin (zásoba fosforu, mnoho před sporulací)
 - Tuk
 - Glykogen (zdroj rychle dostupné energie)

3.1. Barvení inkluzí - volutin

- Ušchlý nefixovaný nátěr buněk se převrství převrstvení polychromatickou methylenovou modří
- Po 1-3 min opláchneme a osušíme

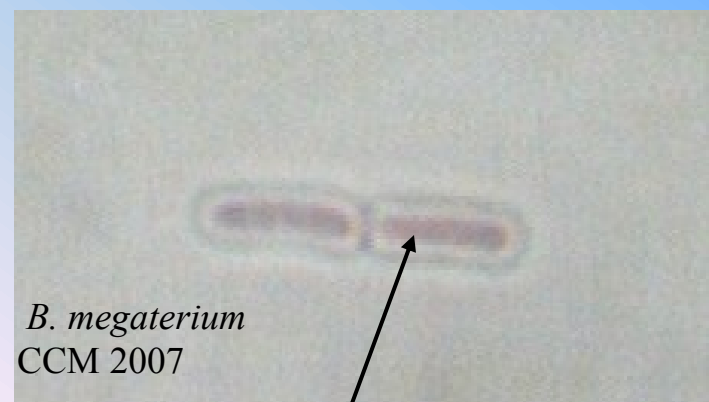


Saccharomyces cerevisiae

volutinová zrna
(tmavě modrá až
purpurová) uvnitř
buněk (světle modrá
CPL)

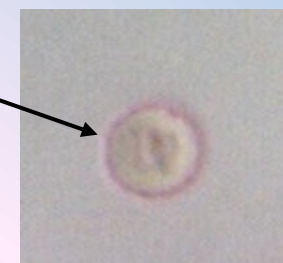
3.2. Barvení inkluzí - tuk

- V buňce přítomen ve vakuolách, ale i strukturní v membránách
- Kapku vody s buňkami smícháme s kapkou roztoku barviva sudan III a necháme 30min pod krycím sklíčkem



Růžový tuk
intracelulárně

i v membráně



Saccharomyces
cerevisiae

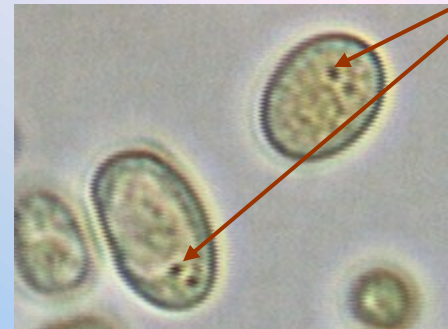
3.3. Barvení inkluzí - glykogen

- V buňce je s membránou (mnohem více) i bez ní
- Připravíme nativní preparát a až pod mikroskopem přikápneme lugolův roztok



B. cereus CCM 2010

Hnědý glykogen (ve vakuolách) uvnitř buněk



Saccharomyces cerevisiae