

## Mikroskopický preparát

- 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 barvený preparát na podložním sklíčku je při barvení buněk většinou **fixován** (v plameni)
    - u nativního preparátu (pozorování suspenze) na podložní sklíčko přikládáme **krycí sklíčko**, **nefixujeme**
    - 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).

- **K čemu slouží různé typy barvení buněk?**

Barvivem zvýrazníme **tvár buňky** (**jednoduché barvení buněčné stěny**), či zjistíme, zda je **živá** (**vitální test**). Její **struktury** rozlišujeme **diferenciačním barvením** a to jak morfologické útvary (spory, stěny), tak chemické složky (barvení volutinu, glykogenu, škrobu..). **Diagnostické barvení** nám pak pomáhá **identifikaci** (Gramovo, acidorezistentní...).

- **Co je sledováno fixací preparátu?**

Nesnažíme se buňky ušetřit neblahého pocitu z barviva, ale jejich usmrcením dosáhneme toho, že **lépe přilnou ke sklíčku** (nespláchnou se tak aplikací barviva či rozpouštědla) a rovněž lépe přijmou barvivo.

- **Čeho se vyvarovat při fixaci preparátu?**

Abychom buňky neuvařili, fixujeme až ve chvíli, kdy je nátěr buněk suchý. Když sklíčko držíme za okraje a třikrát jej protáhneme nesvítivou částí plamene, musíme si pamatovat, na které straně jsou buňky a sklíčko držíme nátěrem nahoru (proto je doporučeno pracovní plochu sklíčka po vytažení z ethanolu označit štítkem či popsát). Barvíme chladné sklíčko.

- **Co když jsme buňky kultivovali v tekutém cukerném prostředí?**

Pokud nechceme v plameni získat karamel, musíme buňky od media zcentrifugovat a následně promýt vodou či pufrem.

- **Pokud víme, že bakterie fixujeme nejčastěji plamenem, fixujeme tak i kvasinky a plísně?**

Tyto buňky jsou větší než buňky bakterií, z čehož logicky vyplývá, že tepelná fixace již příliš mění jejich tvar. Proto se většinou fixují chemikáliemi.

### Několik stručných informací o chemické povaze barviv

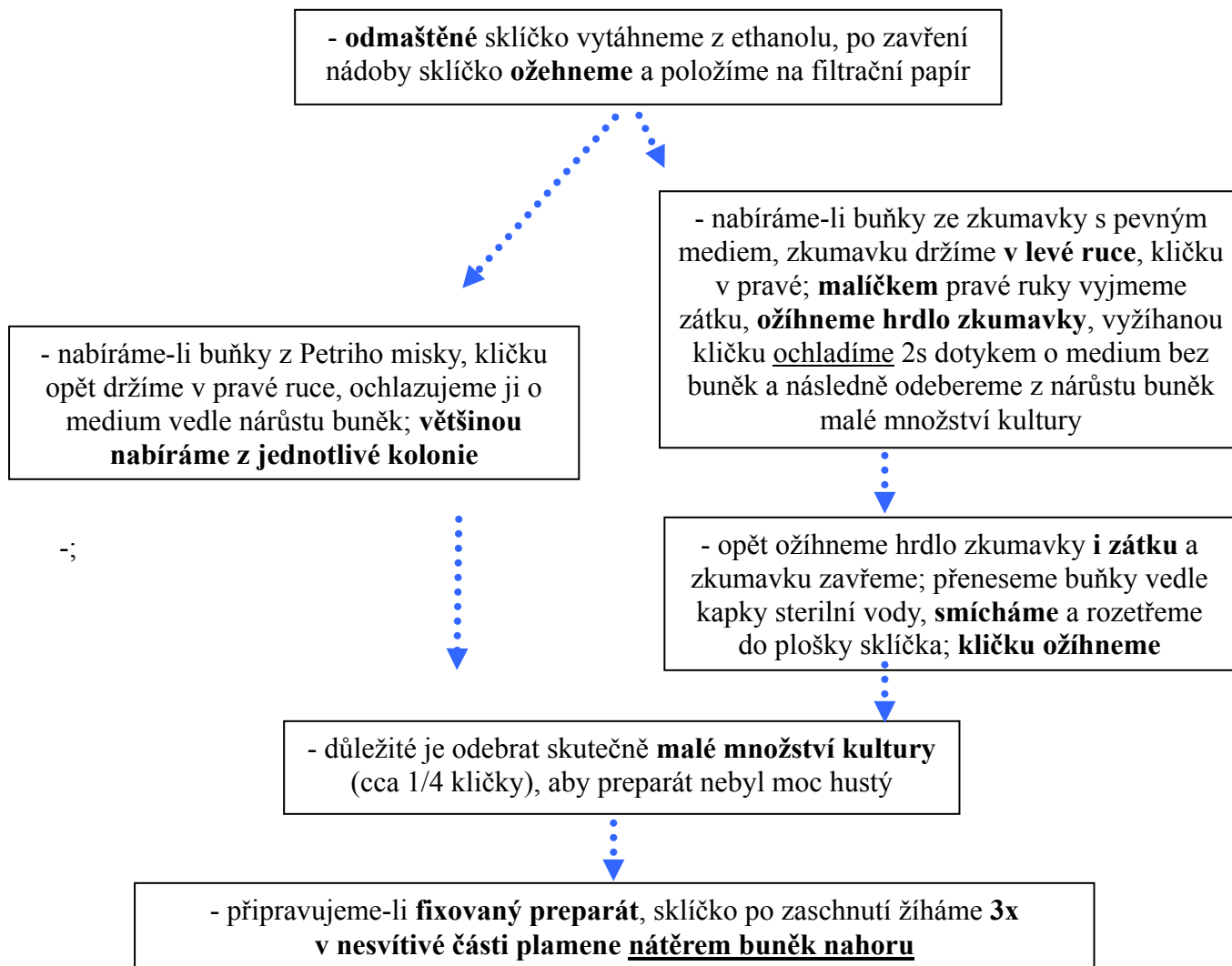
Jsou to zředěné vodné roztoky organických barviv a to obvykle soli. **Bazická barviva mají barevný kationt, kyselá aniont**. Při barvení bakterií se většinou používají prve zmíněná; příkladem je **krystalová violeť, methylenová modř, safranin, bazický fuchsin, malachitová zeleň**. Jak můžeme výsledek barvení ještě zvýraznit? **Moření** (např. fenolem, taninem) má účinek zesílení barvení, neboť mořidlo má roli prostředníka s vyšší afinitou k buňce a barvivu, než je afinita buňky k barvivu.



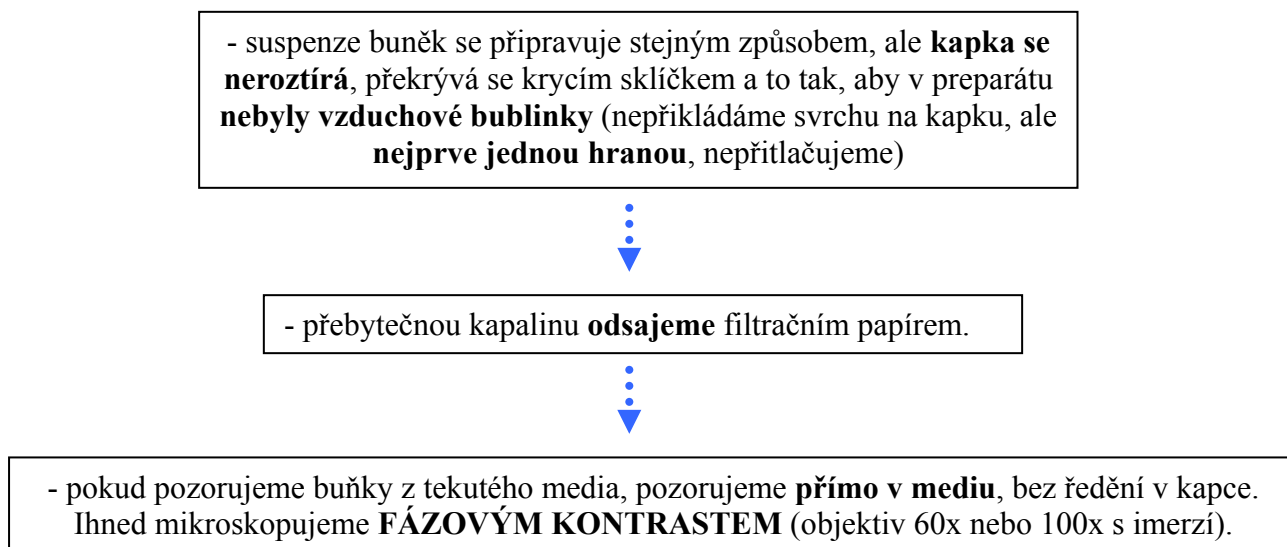
**Fixace i barvení mírně buňku deformují! Charakteristický tvar zůstává, ale pro měření přesné velikosti buněk nutno využít nefixovaný preparát negativně obarvený (barví se jen okolí buňky, nikoli ona samotná (viz d)).**

## Základní typy preparátů a postupy přípravy preparátů:

### a) aseptická práce při nanášení buněk na sklíčko



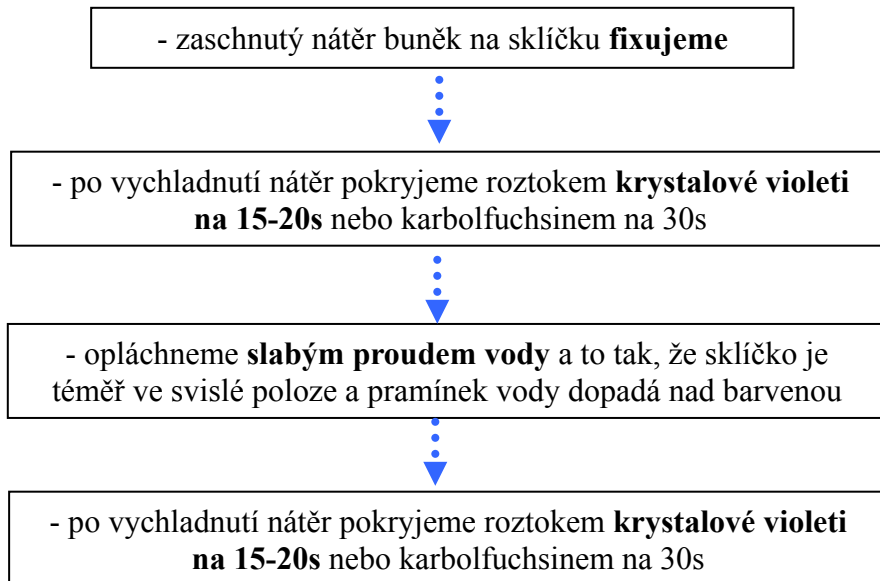
### b) nativní preparát





**Pozorujeme:** aktivní pohyb buněk (mají tedy bičíky) či pasivní pohyb unášením; aktivní pohyb sledujeme u mladých kultur (př: *Bacillus subtilis* 18h) z kapalné půdy - pozor na práci se skleněnou tyčinkou - láme bičíky. Po přikápnutí desinfekce (př: 0,5% ajatin) ze strany sklička pohyb buněk ustává.

### c) jednoduché bavení



Všimáme si: tvar buněk, vyklenutí (způsobeno sporami nebo pleomorfii buňky?? vyklenují spory buňku centrálně či terminálně?), dále poměru šířky a délky buněk  
Co ovlivňuje vzhled buněk v preparátu: stáří kultury?? živná půda?? zvětšení??

### d) negativní barvení - NEFIXOVANÝ PREPARÁT

- Využívá se pro měření **přesné velikosti** bakteriální buňky. Nabarví se totiž jen pozadí (skličko), nikoli buňka samotná. Tím **není deformována** fixací ani barvivem.

Barvivo: roztok nigrosinu nebo kongo červeně

Důležité: vytvořit jen tenký film barviva s dostatečně zředěnými buňkami.

#### Postup:

##### I) nigrosin

- asepticky přeneseme 2-3 kličky bakteriální suspenze z tekutého media na podložní sklo
- přidáme kapku nigrosinu, rozmícháme kličkou a rozetřeme jemným tahem druhého sklička (přiloženého pod úhlem 45° po celé ploše podložního skla), druhé skličko ožihneme
- nefixujeme, pozorujeme pod imerzí (Z 1000x)
- správný preparát by měl být tmavě šedý
- můžeme stejnou kulturu porovnat s postupem c)



Co ovlivňuje výsledek: tloušťka vrstvy barviva (silný nános může po zaschnutí praskat), koncentrace barviva

##### II) kongo červeně

- 2-3 kapky bujony s buňkami se rozmíchají s kapkou kongo červeně, rozetřeme do tenkého nátěru (druhým skličkem) a necháme zaschnout, bez fixace
- opláchneme 1% HCl, ihned slijeme setřesením ze sklička, **NEOPLACHUJEME**
- pozorujeme pod imerzí (objektiv 100x) a opět můžeme stejnou kulturu porovnat s postupem c)

### e) 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).

### f) 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 považovat 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 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 buněk

##### 1)

- rozmícháme kapku tuše 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)

**E. Barvení pouzder**

- a. Na sklíčko kápněte Kongo červeně a suspendujte v ní kulturu *A. vislandii*.
- b. Suspenzi rozetřete po povrchu sklíčka a nechte 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 metylénovou modří, slejte a usušte volně na vzduchu.
- e. Pozorujte imerzním objektivem modré buňky, světlá pouzdra a modré pozadí.

3) horkým karbolfuchsinem – ale je jedovatý, nebudeme používat

g) Gramovo barvení

- pozor na uvaření buněk na sklíčku, na hustý preparát a na dlouhé odbarvování ethanolem!

h) trvalý preparát

- po odstranění imerzního oleje opláchnutím xylenem a po osušení zakápneme nátěr kanadským balzámem a přikryjeme čistým krycím sklíčkem. Jemně tlačíme na sklíčko 2-3minuty. Necháme zaschnout 2 týdny.