

**DETEKCE BAKTERIÍ
PREPARÁTY
LUCIA G
MAKROFOTO**

Iva Jaborníková
23.10.2012

Použité kultury, se kterými jsem pracovala:

- ◉ *Bacillus mycoides* CCM 145
- ◉ *Lactobacillus brevis* CCM 3805T
- ◉ *Micrococcus luteus* CCM 169
- ◉ *Mycobacterium phlei* CCM 5639
- ◉ *Corynebacterium glutamicum* CCM 2428

MIKROSKOPIE

- Ve cvičení jsme pracovali se světelným mikroskopem, při světelné mikroskopii je možno dosáhnou maximální zvětšení 1500x a max. rozlišení 200 nm

METODY MIKROSKOPOVÁNÍ:

FÁZOVÝ KONTRAST

- ◉ umožňuje pozorování živých objektů v nativním stavu bez barvení
- ◉ vzhledem k **malému kontrastu** nejsou rozeznány detaily objektů mezi strukturami s podobnou propustností světla
- ◉ hustou absorbující část preparátu vidíme jako světlou
- ◉ cílená změna fáze vlnového pole, neovlivněného vyšetřovaným předmětem, vzhledem k fázi pole ovlivněného tímto předmětem
- ◉ pomocí této metody dosáhneme kontrastního obrazu fázového předmětu tj. předmětu, který prakticky neovlivňuje amplitudu vlnového pole, které jím prochází, ale ovlivňuje pouze jeho fázi (např. bakterie, buňky apod.)
- ◉ výhodou této metody je, že **nepoškozuje** živé biologické objekty a umožňuje jejich pozorování v čase.

Postup:

- ◉ Do kapky vody nanese se na kličce buňky, překryjeme krycím sklíčkem
- ◉ Pozorujeme pod fázovým kontrastem objektivem 100x, pod imerzí

METODY MIKROSKOPOVÁNÍ:

NORMANSKÉHO KONTRAST

- ⊙ skládání 2 obrazů ze 2 paprsků
 - a) procházejících objektem
 - b) jdoucích mimo objekt-> 2 obrazy vzájemně kolmo polarizované
- ⊙ Normanského destička v kondenzoru rozděluje paprsek do dvou souběžných.
- ⊙ Plastický 3D obraz podle indexu lomu různých částí buňky.

LUCIA G

je softwarový systém pro analýzu barevného obrazu. Systém umožňuje komunikaci mezi snímacím zařízením (kamerou), snímací (grabbovací) kartou a počítačem

BARVENÍ BUNĚK:

GRAMOVO BARVENÍ

Barvení bakterií jako identifikační metoda.

Postup:

- ◉ suspenzi z kultury mikrobů rozetřeme na čisté podložní sklíčko, necháme dobře zaschnout a fixujeme 3x projetím plamenem
- ◉ ponoříme do roztoku krystalové violeti a necháme působit 30 sekund
- ◉ barvivo opláchneme slabým proudem vody (2s)
- ◉ preparát ponoříme do Lugolova roztoku na 30 sekund.
- ◉ opláchneme slabým proudem vody (2s)
- ◉ překryjeme ethanolem (nebo acetonem), maximálně 15-20 sekund
- ◉ opláchneme slabým proudem vody a gramnegativní b. dobarvíme safraninem 1 minutu
- ◉ osušíme mezi dvěma filtračními papíry a mikroskopujeme pod imerzním objektivem (celkové zvětšení 1000x)

BARVENÍ BUNĚK:

NEGATIVNÍ BARVENÍ

- ◉ Negativním barvením obarvíme okolí buněk, nikoli buňky samotné. Využívá se pro měření přesné velikosti bakteriální buňky. Nabarví se totiž jen pozadí (sklíčko), nikoli buňka samotná. Tím není velikost buňky deformována fixací ani barvivem.
- ◉ Postup:
- ◉ asepticky přeneseme 1 kličku bakteriálních buněk do malé kapky destilované vody, vedle se přidá malá kapka nigrosinu
- ◉ kapky se rozetřou jemným tahem druhého sklíčka (přiloženého pod úhlem 45° po celé ploše podložního skla), druhé sklíčko ožihneme
- ◉ bez oplachování se nechá zaschnout na vzduchu
- ◉ důležité: vytvořit jen tenký film barviva s dostatečně zředěnými buňkami
- ◉ pozorujeme pod imerzí (Z 1000x)
- ◉ Pozorování: neobarvené buňky na šedém pozadí

TYPY BUNĚČNÉ STĚNY

- ◉ **Gramnegativní typ buněčné stěny:** peptidoglykan 10%, 2nm, porózní výplň mezi cytoplazmatickou membránou a vnější membránou, 2 periplazmatické prostory. Modré barvivo se v porózní vrstvě nena váže, vymývá se etanolem -> následně se buňky obarví safraninem
- ◉ **Grampozitivní typ buněčné stěny:** peptidoglykan 40nm, 90%, hydrofobní struktura. Mezi polymerem je voda. Do hydratované vrstvy se dostává barvivo krystalové violeti, Lugolův roztok fixuje přímo na strukturách. Organické rozpouštědlo poté dehydratuje vrstvu. Barvivo zůstává pevně vázáno, nedobarví se dál safraninem.

MAKROFOTO KOLONIÍ

Zvětšení: lupa 10x

- ◉ *Bacillus mycoides* CCM 145 (G+ tyčka)

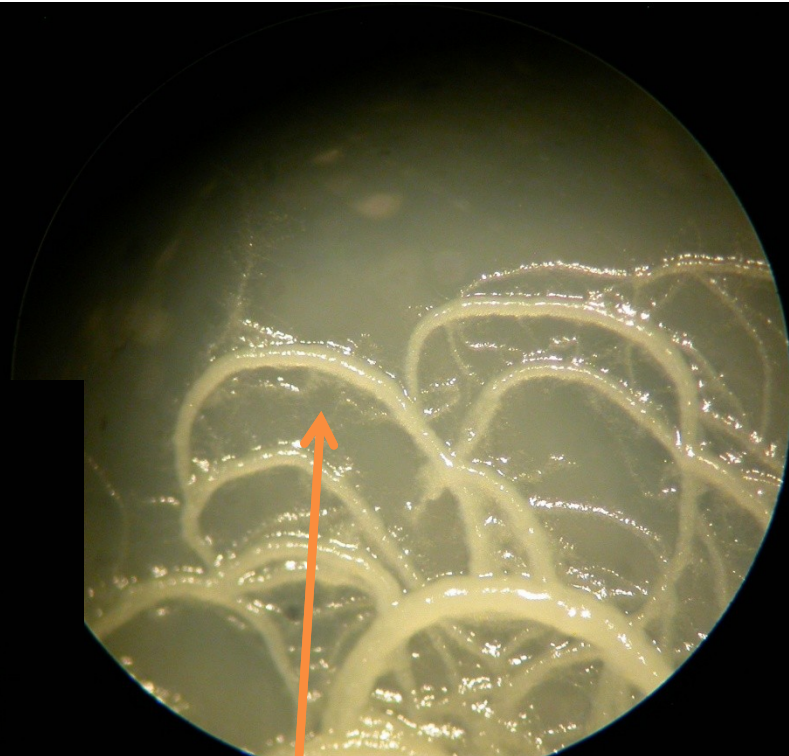
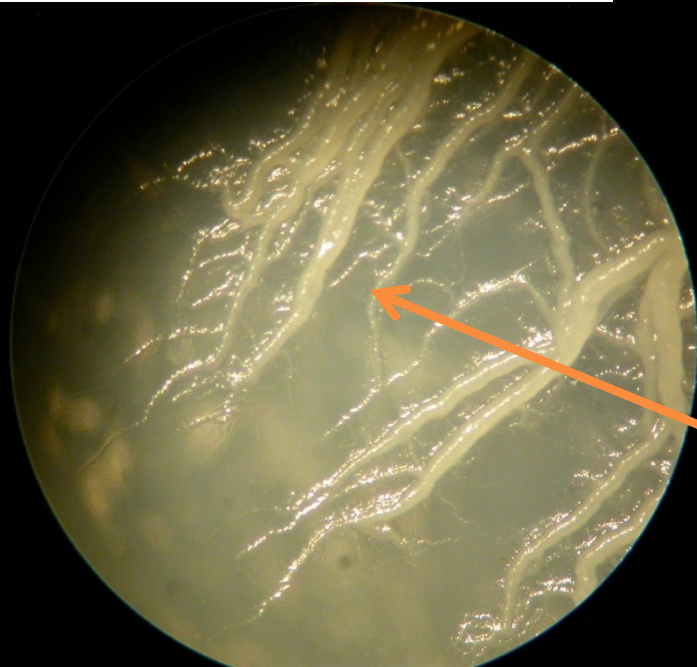
Makroskopický vzhled:

Tvar: vláknitý

Barva: krémová

Okraje: vláknité

Profil: plochý



Vláknitý růst kolonií

MAKROFOTO KOLONIÍ

- ◉ *Lactobacillus brevis*
CCM 3805T

Zvětšení: lupa 10x

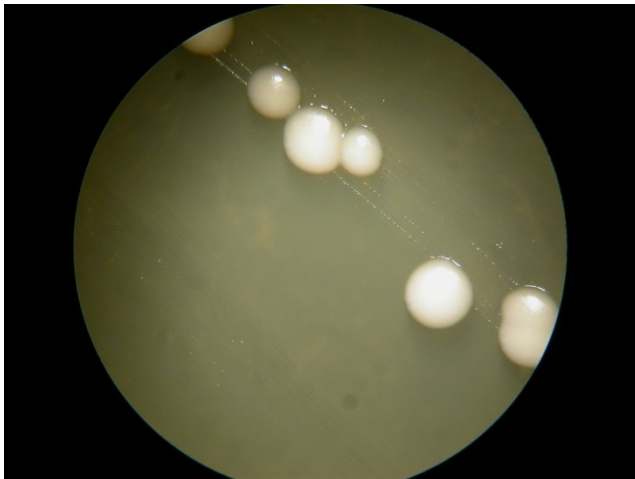
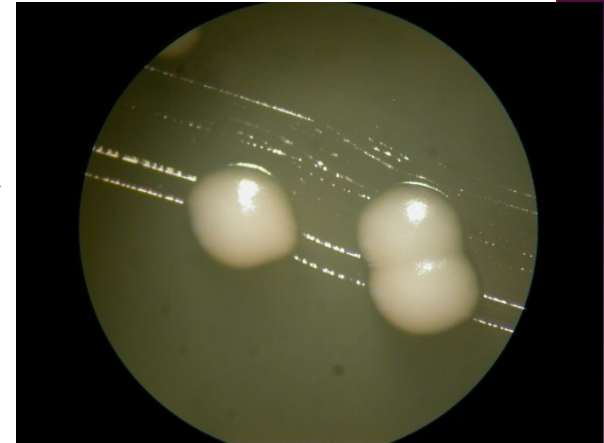
Makroskopický vzhled:

Tvar: kruhový

Barva: bílá

Okraje: hladké

Profil: zvýšený



MAKROFOTO KOLONIÍ

Zvětšení: lupa 10x

- ◉ *Micrococcus luteus* CCM 169

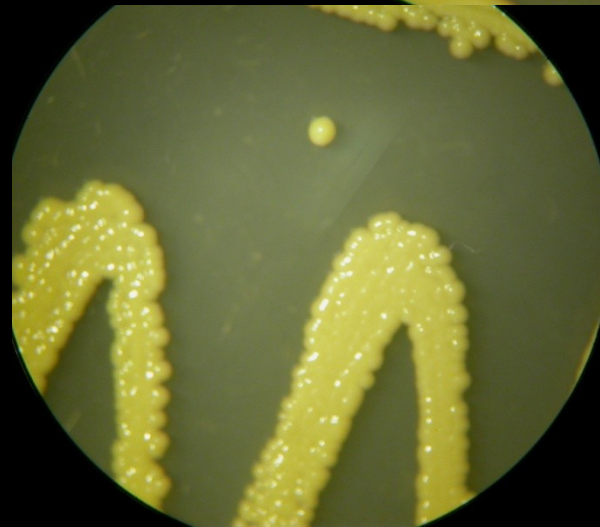
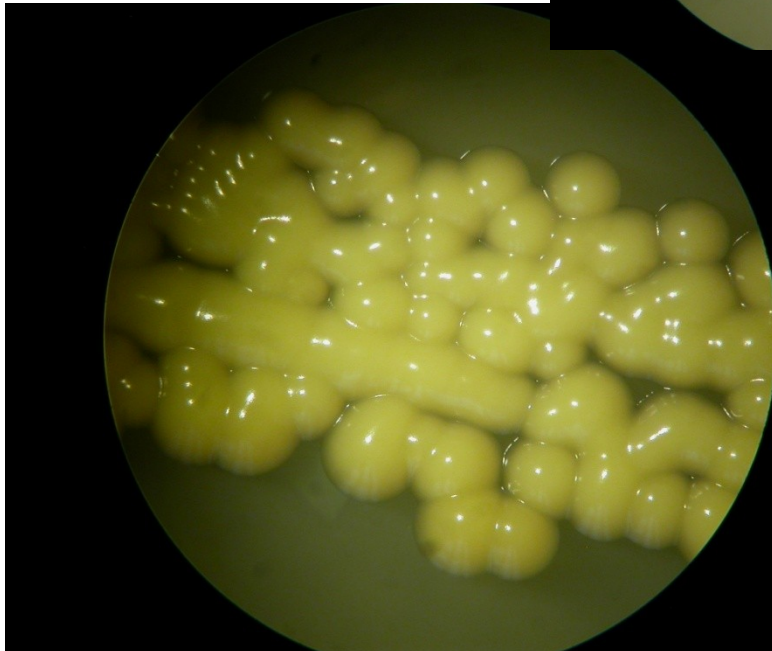
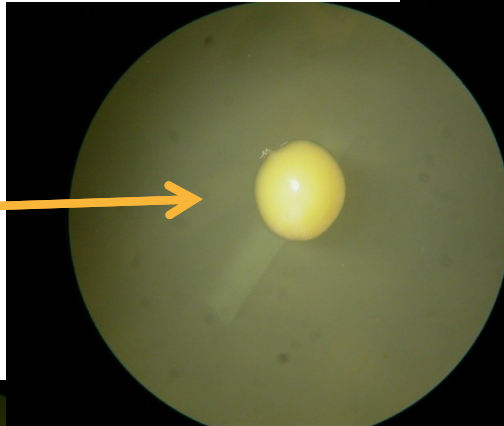
Makroskopický vzhled:

Tvar: kruhový

Barva: žlutá

Okraje: hladké

Profil: zvýšený



MAKROFOTO KOLONIÍ

- ◉ *Mycobacterium phlei*
CCM 5639

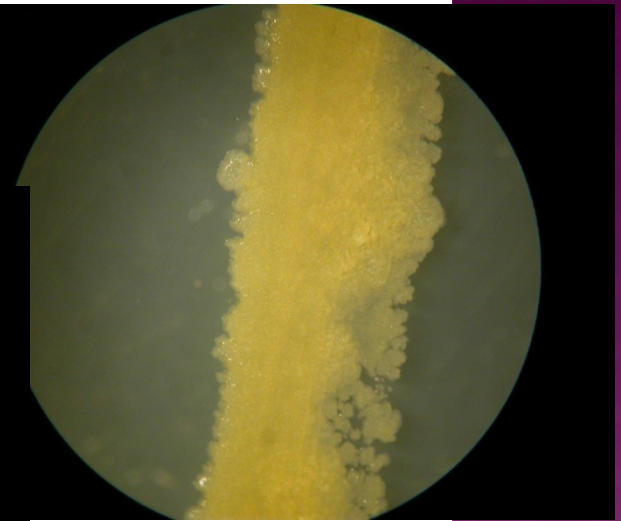
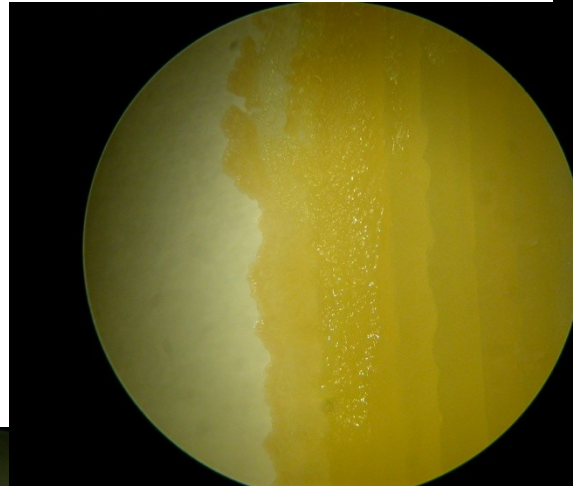
Makroskopický vzhled:

Tvar: nepravidelný

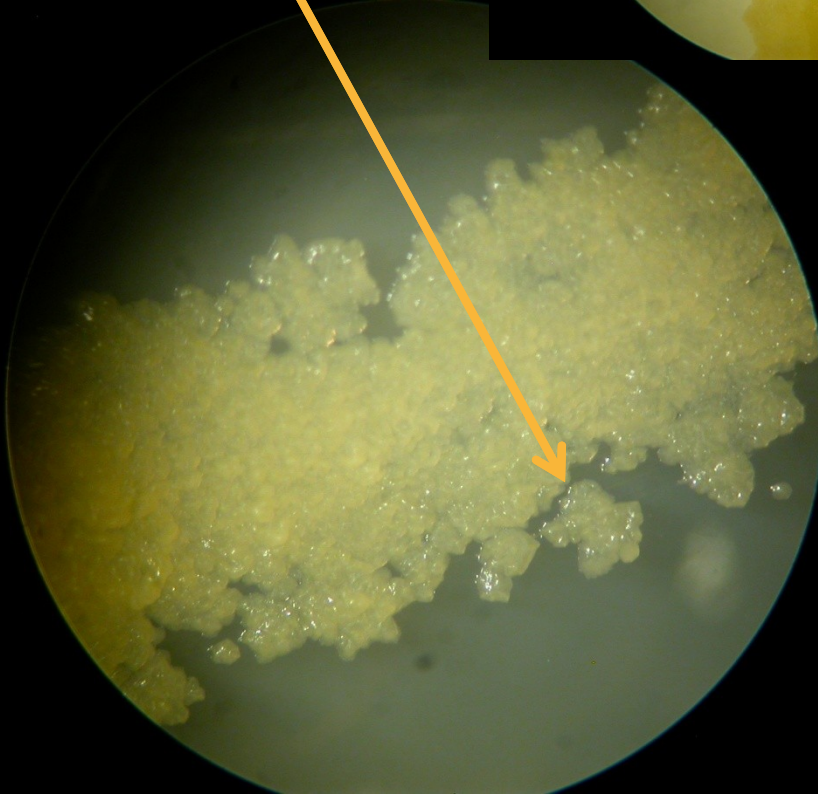
Barva: žlutá

Okraje: vláknité

Profil: knoflíkový



Zvětšení: lupa 10x

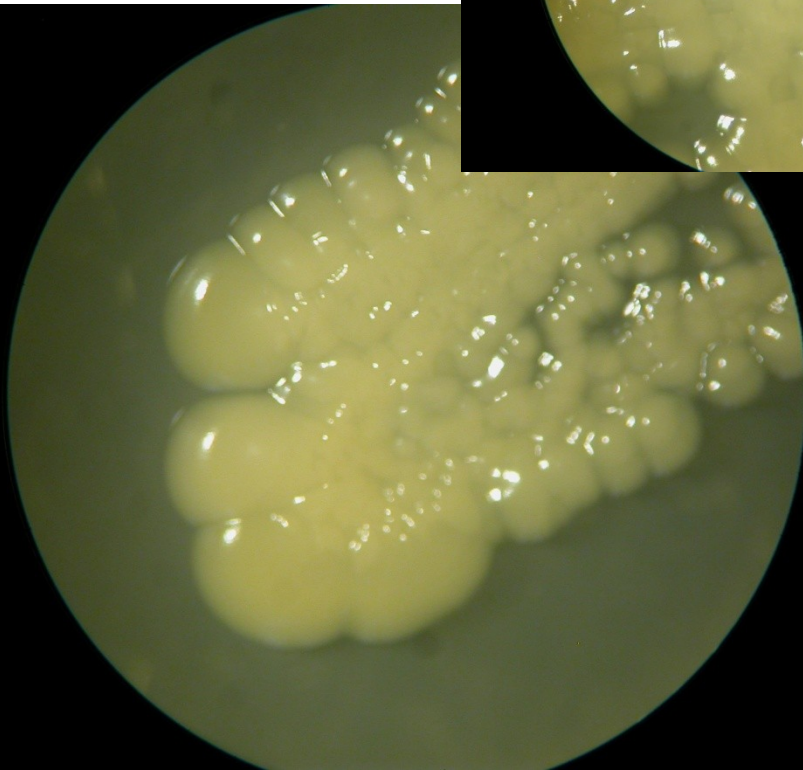
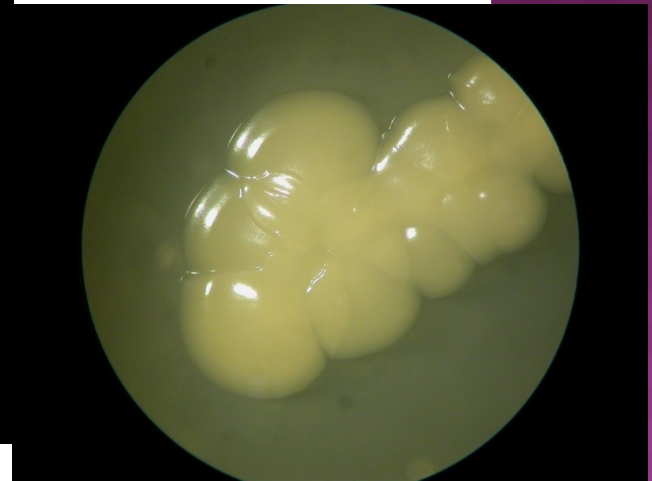
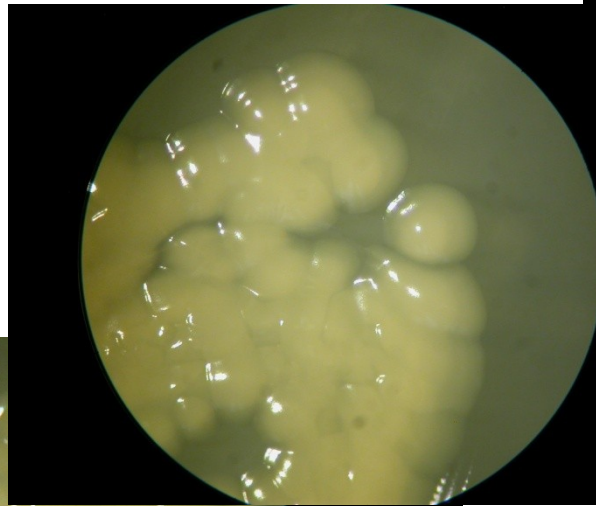
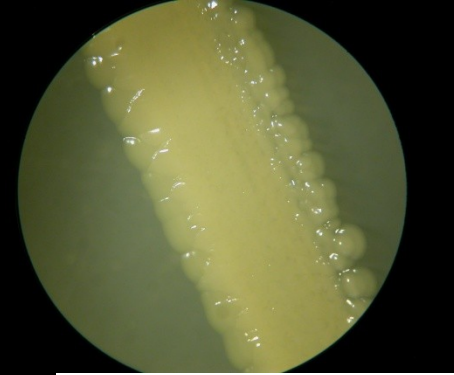


MAKROFOTO KOLONIÍ

- ◉ *Corynebacterium glutamicum* CCM 2428

Makroskopický vzhled:

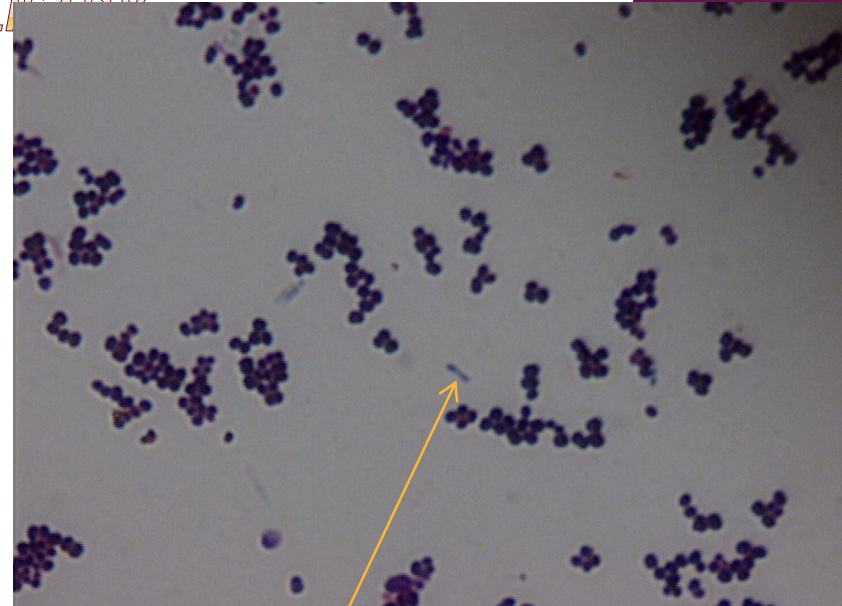
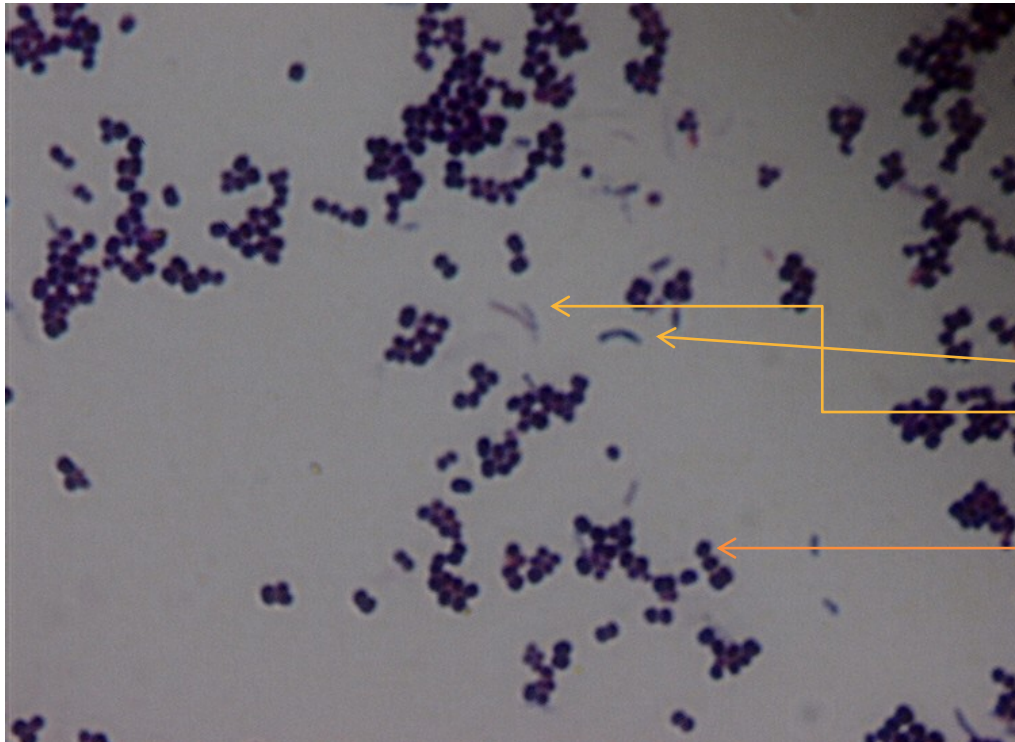
Tvar: kruhový
Barva: krémová
Okraje: hladké
Profil: zvýšený



Zvětšení: lupa 10x

GRAMEM NEBARVITELNÉ BAKTERIE - SMÍŠENÝ PREPARÁT *MICROCOCCUS LUTEUS* + *MYCOBACTERIUM PHLEI*, *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* - PALIČÁKY

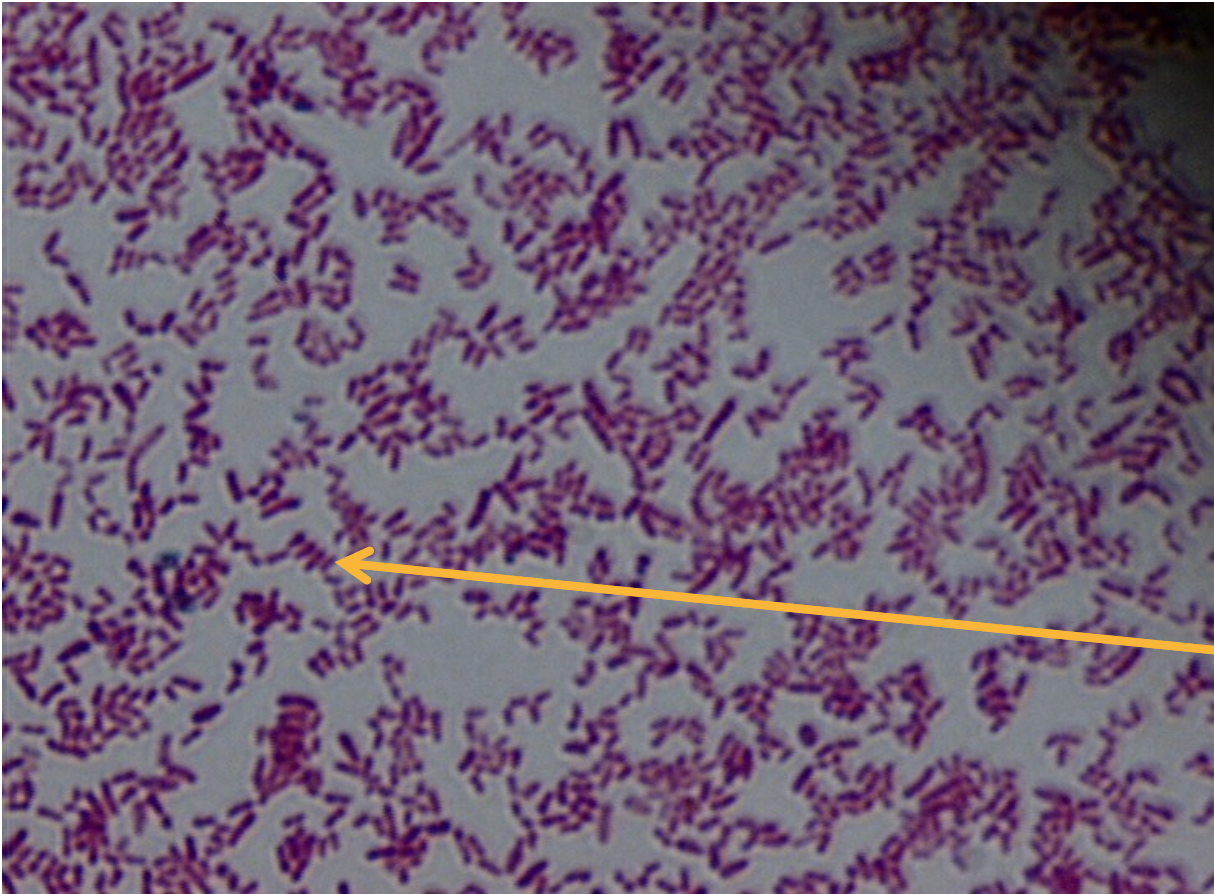
Micrococcus luteus CCM 169 + *Mycobacterium phlei* CCM 5639
Celkové zvětšení 1000x



Neobarvené Mycobacterium

G+ Micrococcus

GRAMEM NEBARVITELNÉ BAKTERIE - SMÍŠENÝ PREPARÁT
MICROCOCCUS LUTEUS + *MYCOBACTERIUM PHLEI*,
CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM - PALISÁDY



Tvorba palisád

- ◉ *Corynebacterium glutamicum*
- ◉ Celkové zvětšení 1000x

SROVNÁNÍ VZHLEDU BUNĚK BACILŮ - GRAMOVO BARVENÍ

- Charakteristika bakterií rodu *Bacillus*

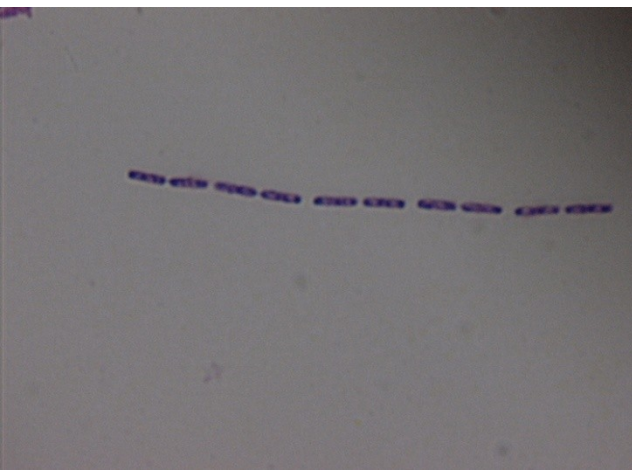
- ◉ tyčky různé délky, ve dvojicích, v řetězcích
- ◉ grampozitivní
- ◉ endospory oválné, kulaté - uloženy centrálně, paracentrálně, subterminálně, terminálně, laterálně
- ◉ peritrichální bičíky
- ◉ optimální růstová teplota 15 - 55 °C
- ◉ fakultativně anaerobní
- ◉ široká diverzita fyziologických schopností (pH, teplota, salinita), chemoorganotrofní
- ◉ patogenní, potravinové otravy, entomopatogenní
- ◉ tvar endospory i mateřské buňky - znaky využitelné v taxonomii (tři morfologické skupiny)

SROVNÁNÍ VZHLEDU BUNĚK BACILŮ - GRAMOVO BARVENÍ

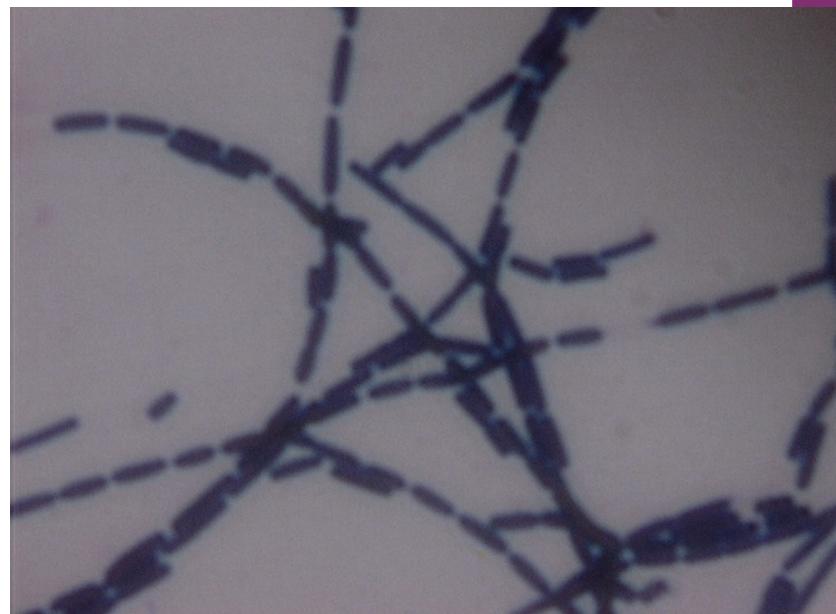


Bacillus cereus CCM 2012

Bacillus thuringiensis CCM 19



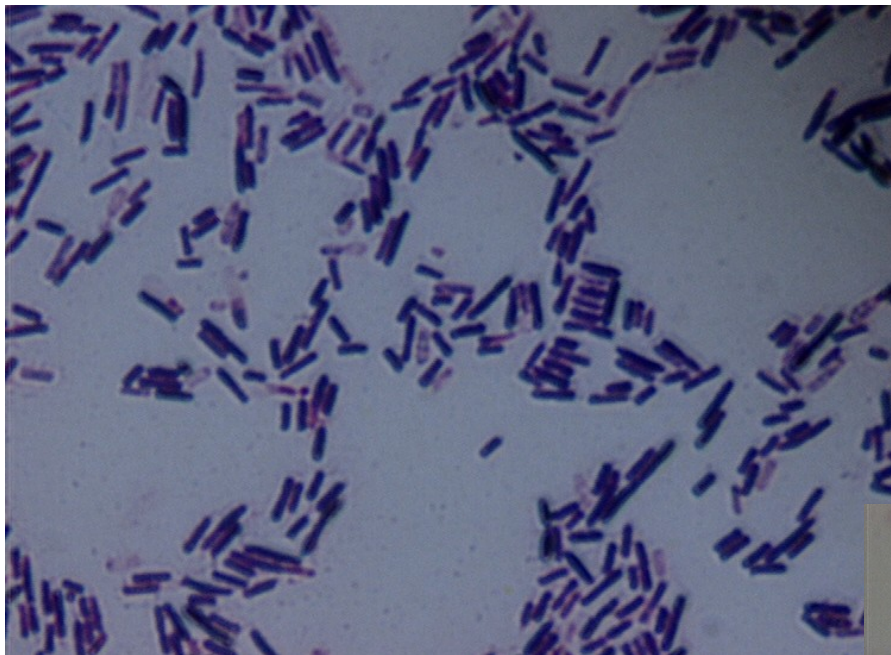
Celkové zvětšení 1000x



Bacillus mycoides CCM 145

SROVNÁNÍ VZHLEDU BUNĚK BACILŮ - GRAMOVO BARVENÍ

Celkové zvětšení 1000x



Bacillus sphaericus CCM 1615

Bacillus megaterium CCM 2007



SROVNÁNÍ BUNĚK LAKTOBACILŮ - NEGATIVNÍ BARVENÍ

- Charakteristika bakterií rodu *Lactobacillus*

- ◉ grampozitivní, fakultativně anaerobní nebo mikroaerofilní tyčky nebo kokotyčky
- ◉ uspořádání v palisádách nebo krátkých řetězcích
- ◉ striktně fermentativní typ metabolismu
- ◉ netvoří spory
- ◉ většinou jsou nepohyblivé a neprodukují pigmenty
- ◉ komplexní nutriční požadavky
- ◉ optimální teplota 30 - 40 °C
- ◉ optimální pH 5,5 - 6,2
- ◉ v potravinách živočišného i rostlinného původu, nápoje, znečištěná voda, kysané zelí, mikroflóra teplokrevných
- ◉ kataláza negativní

SROVNÁNÍ BUNĚK LAKTOBACILŮ - NEGATIVNÍ BARVENÍ

Celkové zvětšení 1000x

Lactobacillus curvatus CCM 7558T



tvorba krátkých řetízků

Lactobacillus brevis CCM 3805T

- Tvorba řetízků méně častá



Lactobacillus casei subsp. *casei* CCM 7088T



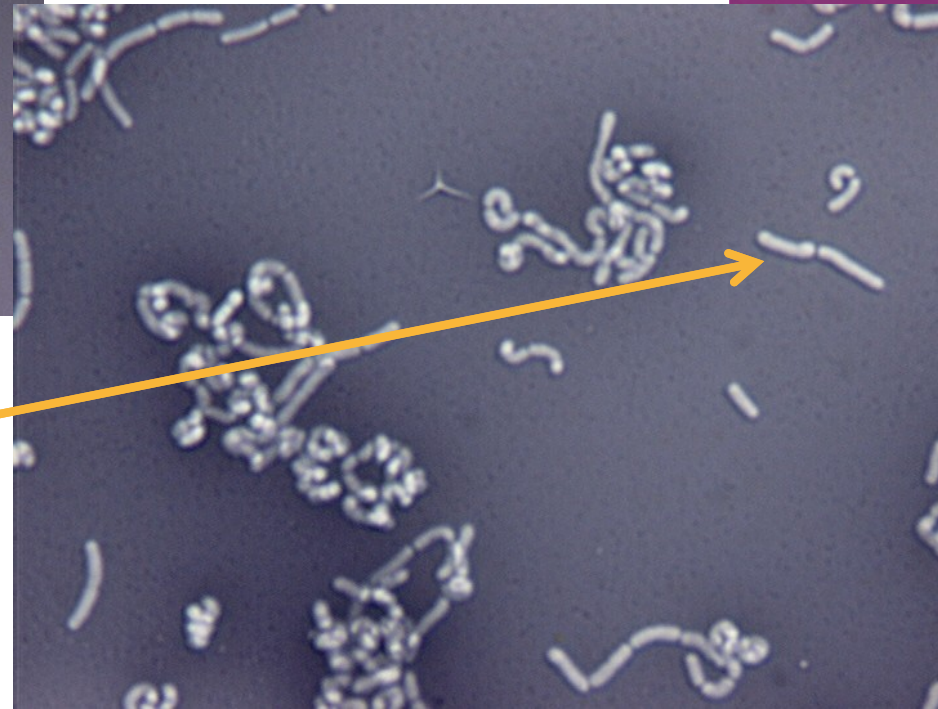
SROVNÁNÍ BUNĚK LAKTOBACILŮ - NEGATIVNÍ BARVENÍ

Celkové zvětšení 1000x



Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* CCM 7190T

dlouhý řetízek



Lactobacillus rhamnosus CCM 1825T

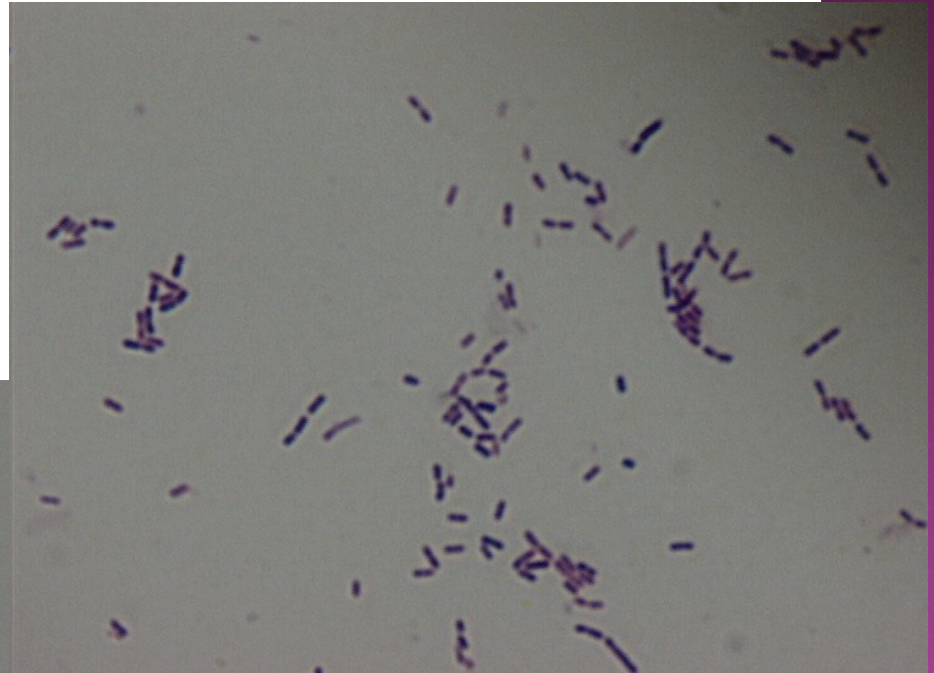
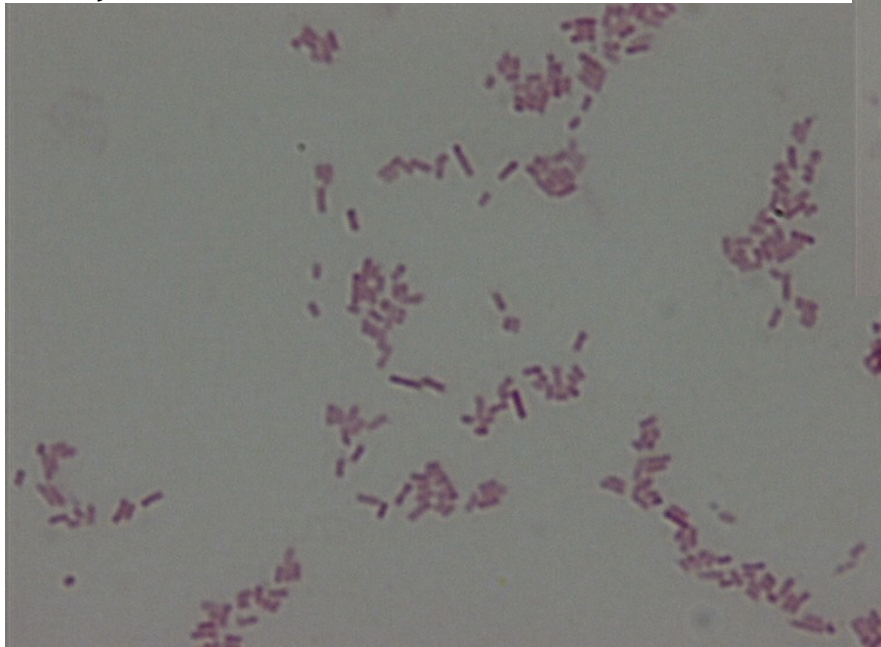
delší tyčky

SROVNÁNÍ G+ A G- KULTURY

Celkové zvětšení 1000x

Escherichia coli CCM 3954

G- tyčinka



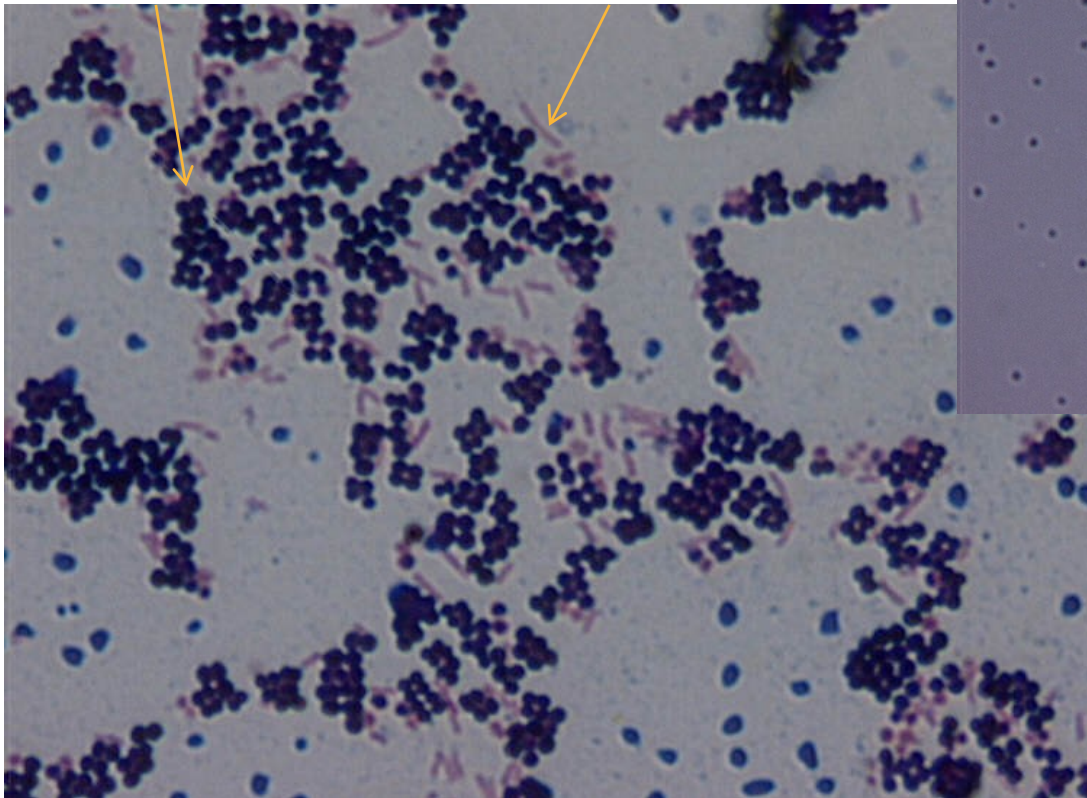
Lactobacillus curvatus CCM 7558T

G+ tyčinka

MIKROSKOPICKÉ TECHNIKY

○ Jasné pole:

Micrococcus luteus CCM 169 + *Escherichia coli* CCM 3954

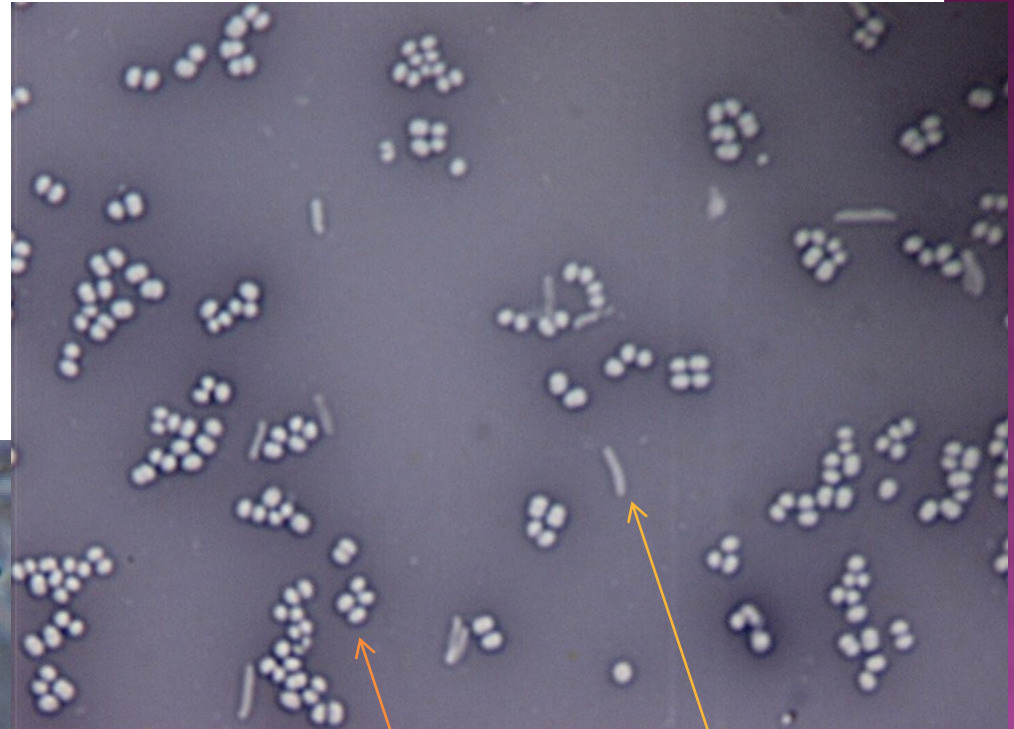
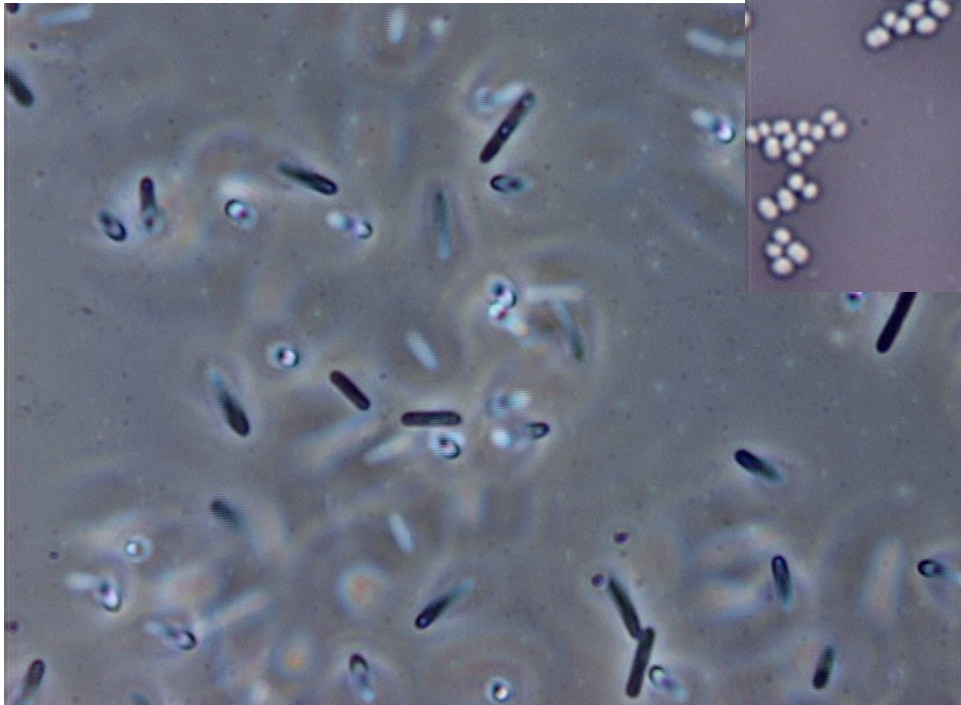


Bacillus sphaericus CCM 1615

MIKROSKOPICKÉ TECHNIKY

○ Fázový kontrast

Bacillus sphaericus CCM 1615



Micrococcus luteus CCM 169
+ *Mycobacterium phlei* CCM 5639