

# Protokol č.1:

## Makrofoto, mikroskopické preparáty, mikroskopické techniky



Simona Valášiková, jeseň 2012

# 1) MAKROFOTO

U izolovaných mikrobiálnych kolónií môžeme v rámci **makroskopickej morfológie** hodnotiť ich:

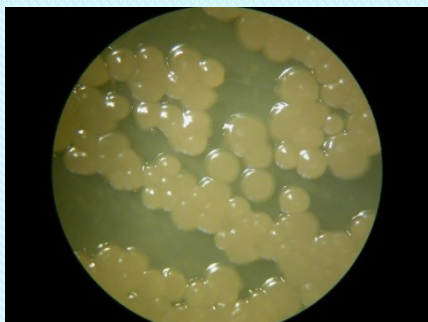
- **tvar:** okrúhly, nepravidelný (laločnatý, zvlnený,...)
- **farbu:** bezfarebná, pigmentovaná
- **profil:** plochý, zvýšený, vypuklý, pupkovitý, gombíkovitý
- **okraje:** hladké, vrúbkované, zubaté, rhizoidné, vláknité
- **povrch:** hladký, lesklý, matný, drsný
- **transparentiu:** priehľadná, priesvitná, nepriehľadná

## Makrofoto vybraných MO z úlohy IX.



### ***Azotobacter vinelandii* CCM 289**

**veľkosť kolónií:** stredne veľké  
**povrch:** lesklý  
**okraje:** pravidelné (hladké)  
**profil:** zvýšený  
**farba:** žltozelená



### ***Sporosarcina ureae* CCM 860**

**veľkosť kolónií:** drobné  
**povrch:** matný  
**okraje:** pravidelné (hladké)  
**profil:** plochý  
**farba:** béžová



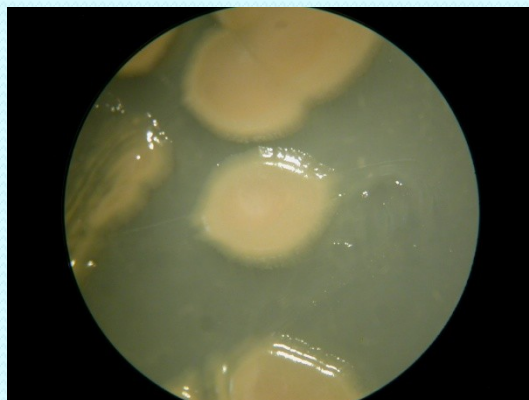
### ***Leuconostoc mesenteroides* CCM 1803**

**veľkosť kolónií:** obrovské (nie izolované)  
**povrch:** lesklý  
**okraje:** pravidelné (hladké)  
**profil:** zvýšený  
**farba:** hnedá  
+ výrazný zápach

## Makrofoto zástupcov rodu *Bacillus*



*B. megaterium* CCM 2007



*B. sphaericus* CCM 1615



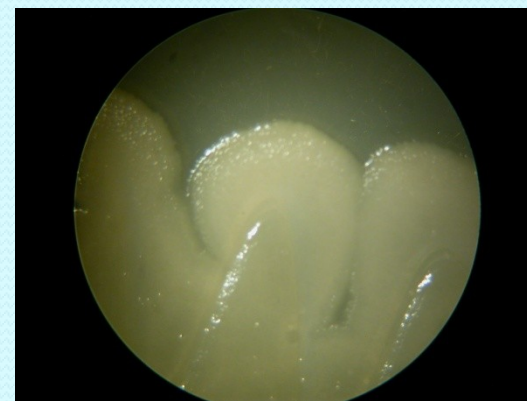
*B. mycoides* CCM 145



*B. subtilis* CCM 2216



*B. thuringiensis* CCM 19

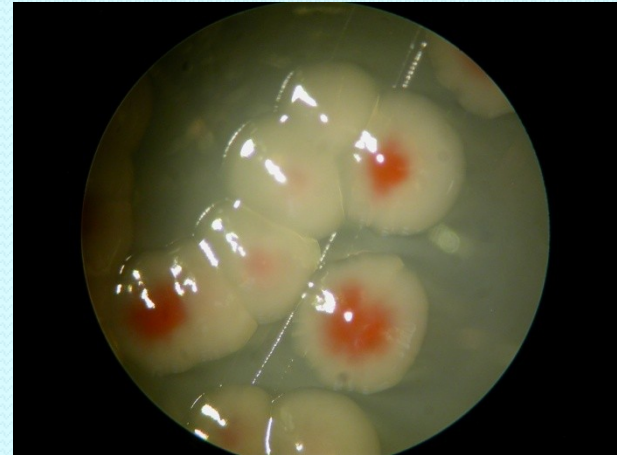


*B. cereus* CCM 2010

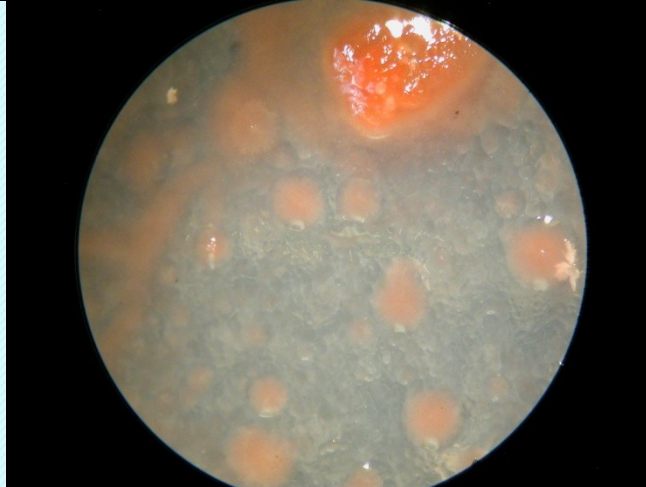
# Makrofoto zástupcov domény *Bacteria*, *Archaea* a kvasiniek (eukar.org.)



**kvasinka:**  
*Saccharomyces cerevisiae*



**Bacteria:**  
*Serratia marcescens*  
CCM 303



**Archaea:** *Haloarcula hispanica* CCM 3601T

## 2) MIKROSKOPICKÉ PREPARÁTY

- Niektoré morfológické znaky mikroorganizmov je potrebné posudzovať v mikroskopickom preparáte.
- Pre posúdenie **skutočného tvaru** živej bunky a štruktúry buniek neporušených fixáciou a farbením, ďalej na pozorovanie **rastu, množenia a pohybu** baktérií apod. pripravujeme **natívny preparát**.
- **Farbené preparáty** sa využívajú pri zisťovaní **typu BS, tvaru buniek a usporiadania ich zhlukov**, prítomnosti a uložení **spor, púzdier a inklúzií** a taktiež pri zisťovaní **životaschopnosti** buniek.
- Medzistupeň medzi vitálnymi a fixovanými preparátmi tvorí pozorovanie nesfarbených buniek na kontrastnom pozadí, čo nám umožňujú **negatívne farbené preparáty**. Využívajú sa pre **meranie presnej veľkosti** buniek nedeformovaných fixáciou a farbením. Nefarbíme bunky, ale ich okolie (napr. nigrosinom).

# Gramovo farbenie

- **Gramovo farbenie** je jednou z najdôležitejších diagnostických metód pri identifikácii baktérií – rozlišuje baktérie
  - **grampozitívne**, ktoré sa farbja modrofialovo
  - **gramnegatívne**, ktoré sa farbja červenoružovo.
- Podstata grampozitivity tkvie v odlišnom zložení bunkovej steny.
- Jedná sa o farbenie fixovaného preparátu a následné morenie buniek roztokom jódu. Vzniká komplex farbivo-jód-BS, ktorý sa tvorí v G+ aj v G- baktériách. Rozdiel vzniká pri premývaní preparátu alkoholom, z G- sa komplex vymýva (odfarbujú sa) a G+ si sfarbenie ponechávajú (komplex zostáva zachytený v BS). Pre zvýraznenie rozdielu sa G- baktérie dofarbujú kontrastným farbivom.
- U **gramlabilných MO** je Gramova reakcia závislá na fyziologickom stave bunky a na zložení kultivačného prostredia. Gramova reakcia je najspôľahlivejšia u mladej bakteriálnej kultúry (< 24h), staršie kultúry nemusia zadržovať primárne farbivo a výsledky nie sú presné.

# Preparáty farbené podľa Grama

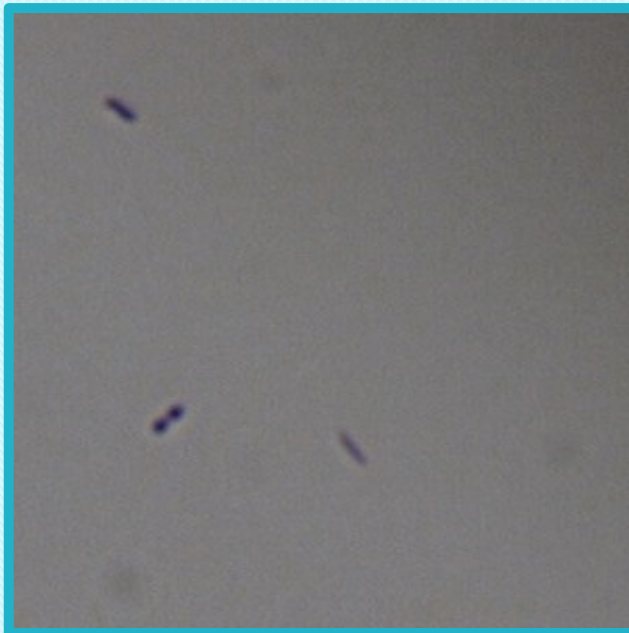
Úloha č. 9: G+ koky alebo krátke tyčinky



*Azotobacter vinelandii*

G- krátke tyčinky

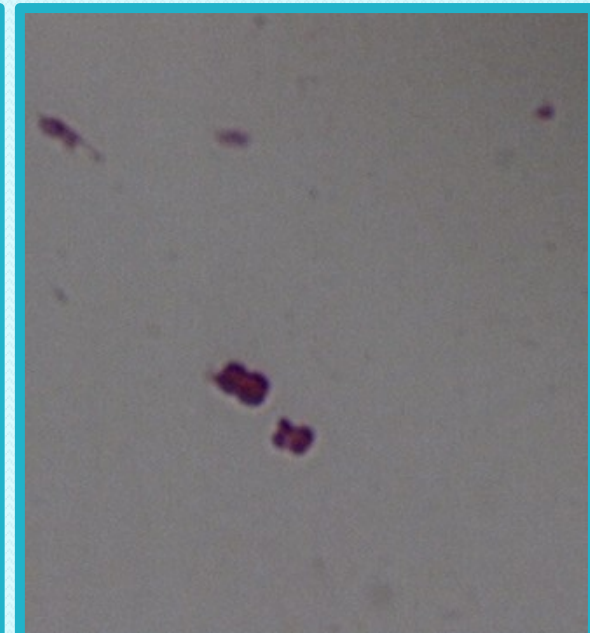
CCM 289, zv 1000x



*Leuconostoc mesenteroides*

G+ koky (diplokok)

CCM 1803, zv 1000x



*Sporosarcina ureae*

G+ koky (tetrády, balíčky)

CCM 860, zv 1000x



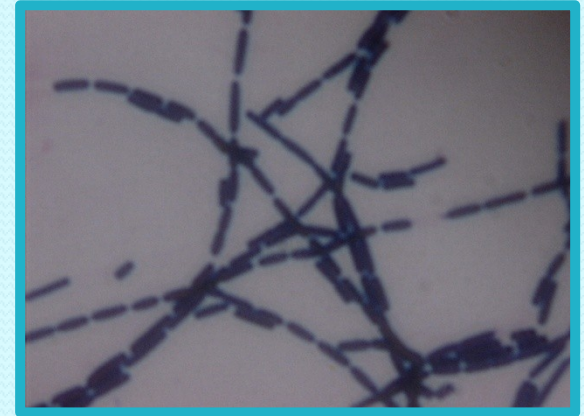
Úloha č. 1: Porovnanie rôznych tvarov bakteriálnych buniek v rámci jedného rodu, Gramovo farbenie → *Bacillus*



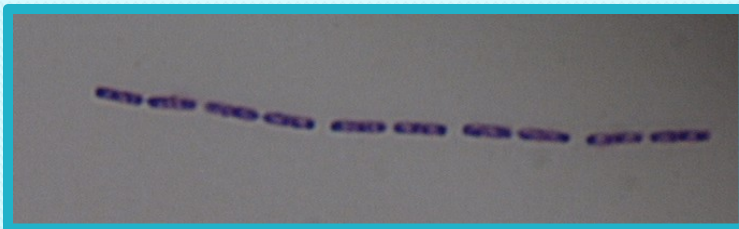
*Bacillus megaterium* CCM 2007



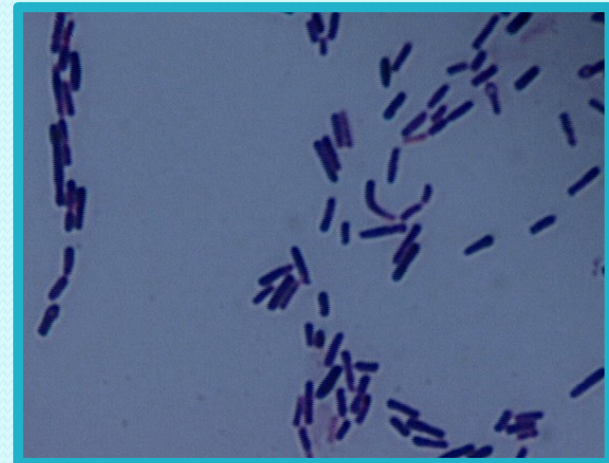
*Bacillus cereus* CCM 2010



*Bacillus mycoides* CCM 145



*Bacillus thuringiensis* CCM 19



*Bacillus sphaericus* CCM 1615



*Bacillus megaterium* CCM 2007

Negatívne farbenie

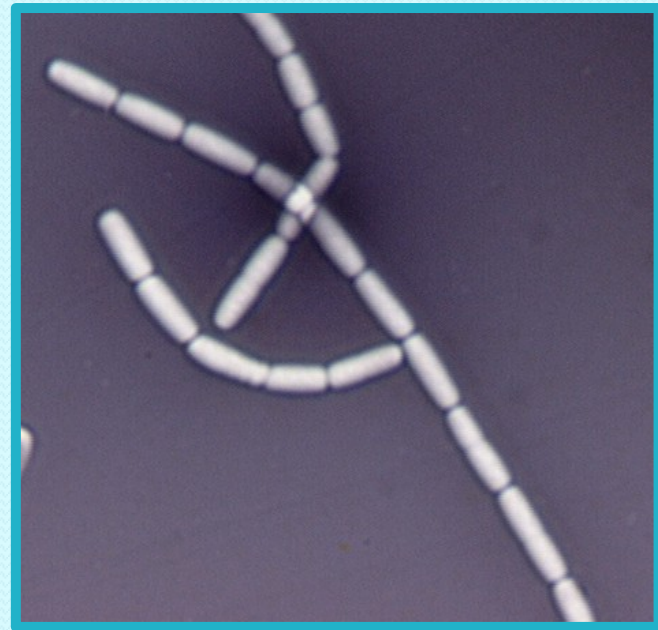
→ *Bacillus*



*Bacillus cereus* CCM 2010



*Bacillus sphaericus* CCM 1615

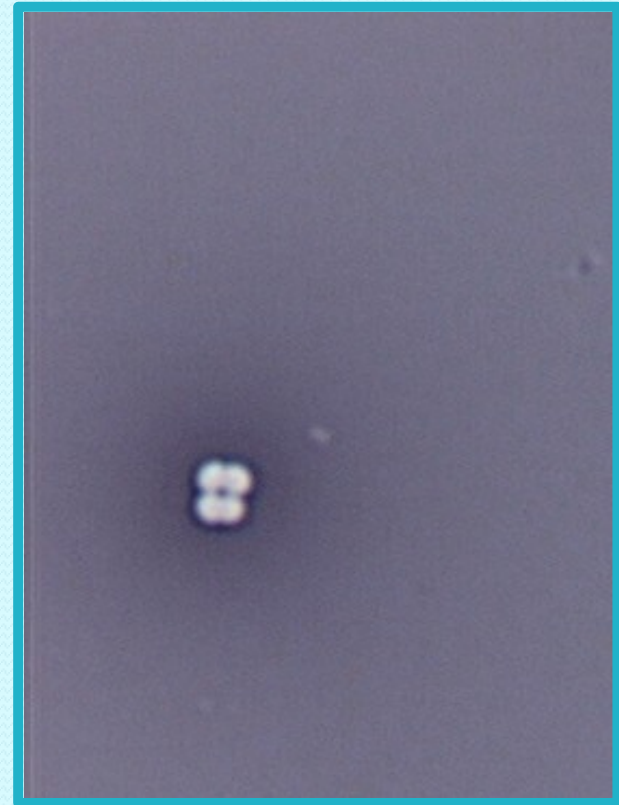


*Bacillus mycoides* CCM 145

Negatívne farbenie → **G+ koky**



*Leuconostoc mesenteroides* CCM 1803  
dvojice, retiazky



*Sporosarcina ureae* CCM 860  
tetrády

# 3) MIKROSKOPICKÉ TECHNIKY

Mikroskopické preparáty môžeme pozorovať:

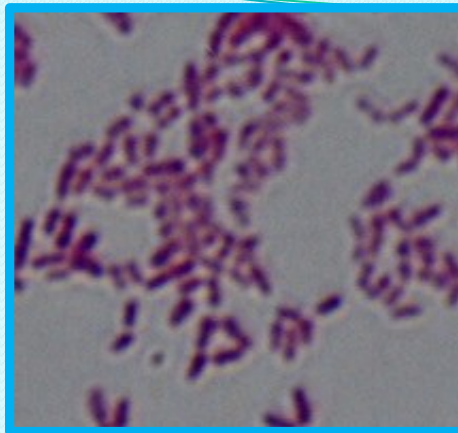
- v **jasnom poli** (farbené preparáty)
- vo **fázovom kontraste** (natívne preparáty)
- v **Nomarského kontraste** (natívne preparáty)

## Fázový kontrast

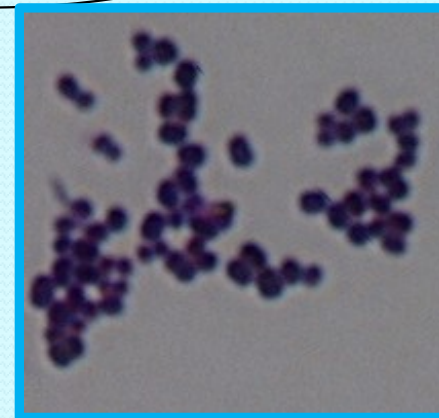
- Obraz je vytvorený interferenciou lúčov fázovo posunutých aj neposunutých (závisí na indexe lomu prostredia)
- Rozdiely vo fázi svetla sú prevedené na zmenu kontrastu
- V hustej absorbujúcej časti preparátu dôjde k čiastočnej absorpcii vlnovej dĺžky a ku zmene amplitúdy, čo zachytíme ako zmenu intenzity svetla → vidíme ju ako svetlú
- Umožňuje pozorovať živé objekty v natívnom stave bez farbenia, zviditeľňuje žiariace bakteriálne spóry



jasné pole (Gram.f.)



jasné pole (Gram.f.)

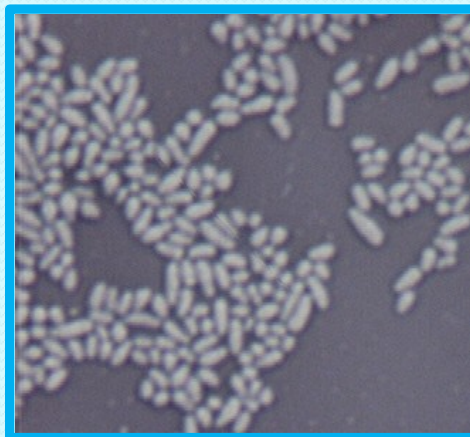


jasné pole (Gram.f.)



fázový kontrast

***Bacillus thuringiensis* CCM 19**



fázový kontrast

***Corynebacterium glutamicum* CCM 2428**



fázový kontrast

***Micrococcus luteus* CCM 169**