



Makroskopické a mikroskopické pozorování mikroorganismů

Dnešní práce

Makroskopické pozorování:

- ▶ Odečítání morfologie bakteriálních kultur z minulého cvičení



Mikroskopické pozorování:

- ▶ Gramovo barvení
- ▶ Pozorování preparátů

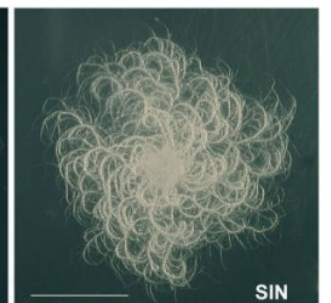
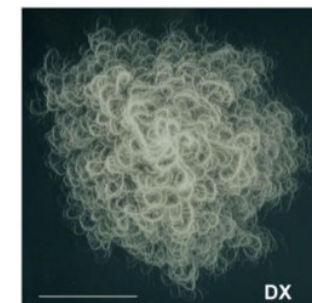
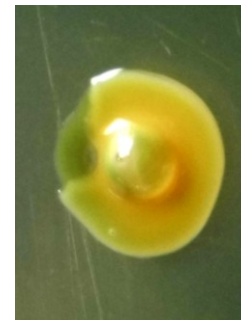
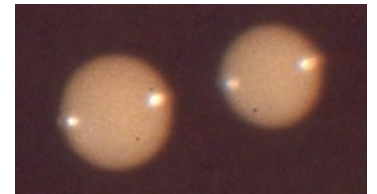




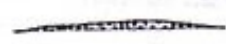
Makroskopické pozorování

Odečítání morfologie bakteriálních kultur

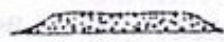
- ▶ Při povedeném křížovém roztěru jsou na misce viditelné jednotlivé kolonie
- ▶ Hodnotíme jejich :
 - ▶ **Tvar** (kruhový, nepravidelný, vláknitý)
 - ▶ **Okraje** (hladké, zvlněné)
 - ▶ **Profil** (plochý, vypouklý, kráterovitý)
 - ▶ **Povrch** (lesklý, matný)
 - ▶ **Zbarvení**



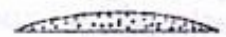
Profil:



plochý



zvýšený



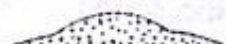
vypouklý



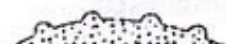
vypouklý



pupkovitý



knoflíkovitý



bradavčitý

Tvar:



okrouhlý



zvlňný



laločnatý



sektorový

Okraje:



vroubkované



zubalé



s koncentrickou stávkou



zvraštělé



myceliální



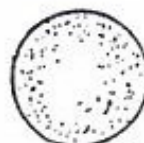
drsňé, prslovité
(capul medusae)



vláknité

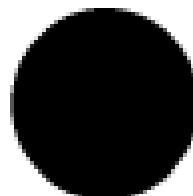


rizoidní

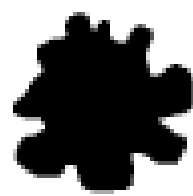


hladké

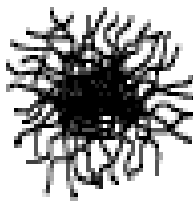
Tvar



Kruhový



Nepřavidelný

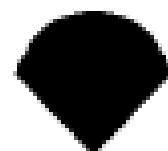


Vláknitý

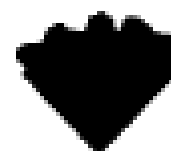


Rizoidní

Okraje



Hladbé



Vlnité



Vláknité



Zkroucené



Laločnaté

Profil



Zvýšený



Vypouklý



Plochý



Knoflíkovitý

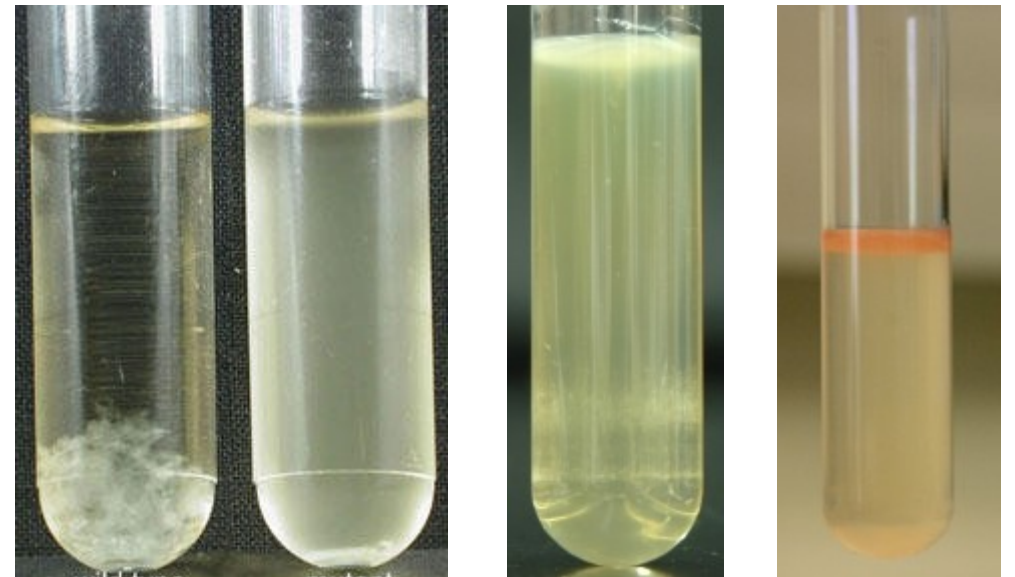


Kráterovitý

Obr. 2: Tvary bakteriálních kolonií (Rosypal, 1981)

Tekuté půdy

- ▶ Nelze prokázat čistotu dané kultury
- ▶ Hodnocení přítomnosti mikroorganismů :
 - ▶ **Blanka**
 - ▶ **Zákal**
 - ▶ **Vločky**
 - ▶ **Sediment**
 - ▶ **Zbarvení**





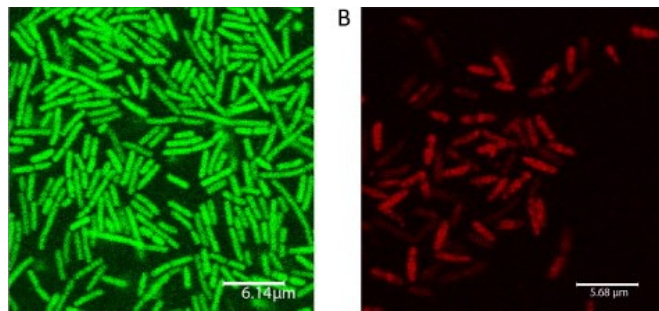
Mikroskopické pozorování

Mikroskopické pozorování MO

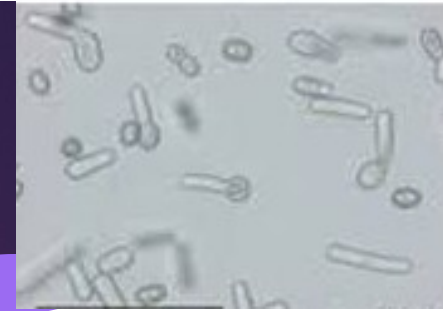
Podložní sklíčko

- ▶ **Nativní preparát** – nefixuje se
- ▶ **Diferenciační barvení** buněk nebo jejich složek (většinou se fixuje) – vidíme spory, pouzdra, buněčnou stěnu, glykogen, škrob
- ▶ **Diagnostické barvení** – pro identifikaci bakterií (Gramovo, acidorezistentní, dle Giemsy)
- ▶ **Vitální barvení** – rozliší živé a mrtvé buňky (obarví se mrtvé buňky)
- ▶ **Negativní barvení** – nefixuje se, barví se okolí buněk, ne buňky
- ▶ **Sklíčkové kultury** – pro plísně a kvasinky, sklíčko se kultivuje v agaru pod 45 °, je porostlé kulturou

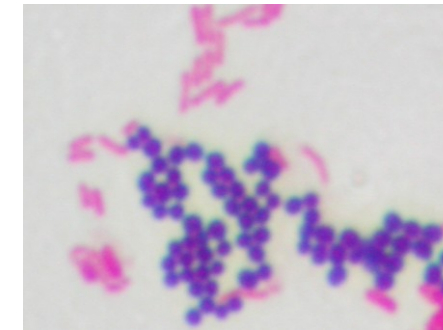
- ▶ Fluorescenční mikroskopie



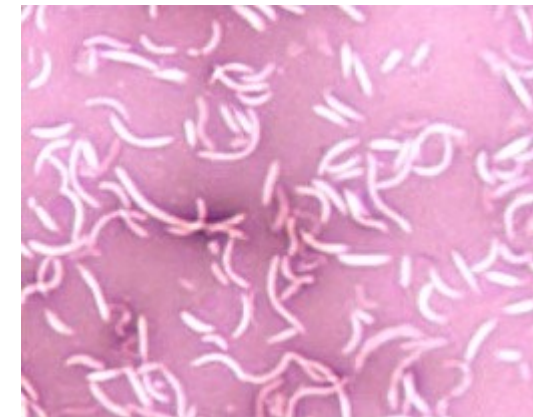
Nativní preparát



Gramovo barvení

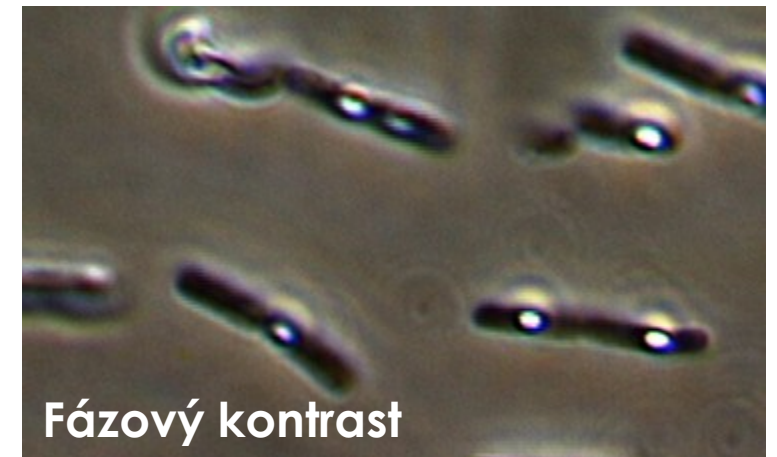
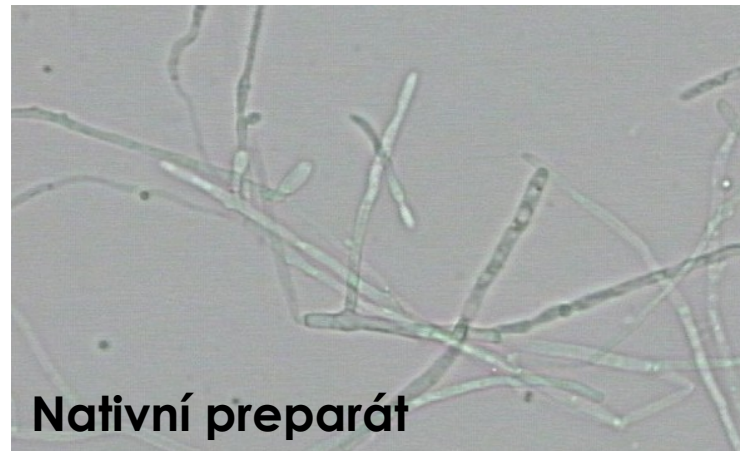


Negativní barvení



Nativní preparát, Fázový kontrast

- ▶ **Nativní preparát** = nedeformované živé buňky v nativním stavu bez barvení, možno pozorovat pohyb, růst a množení bakterií.
- ▶ **Princip: Fázový kontrast** využívá odlišné světlolomnosti částic, různých indexů lomu světla struktur
- ▶ **Transparentní, světlá část buňky** = **nízký** index lomu = **nízká** denzita → **tmavá** část preparátu
- ▶ **Tmavá, hustá část buňky** = **vyšší** index lomu = **vyšší** denzita → **světlá** část preparátu, „**halo**“ efekt
- ▶ Obraz je vytvářen interferencí paprsků fázově posunutých i neposunutých

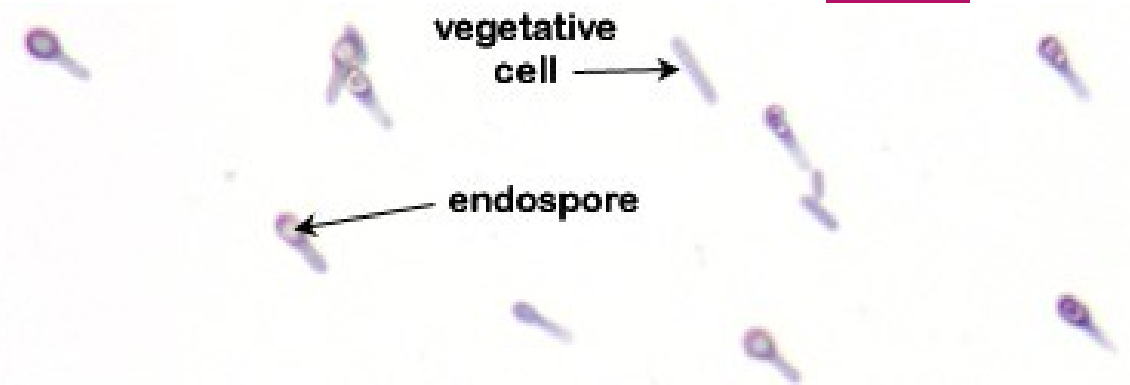


Nativní preparát

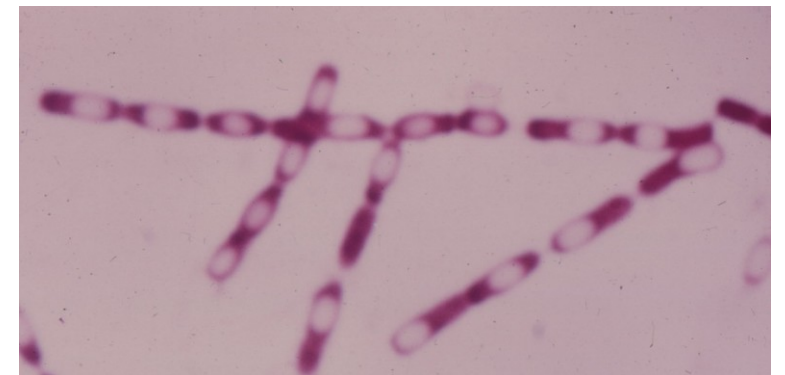
- ▶ Dobře očištěné podložní sklíčko vyjmeme z alkoholu a protáhneme jej plamenem
- ▶ Doprostřed sklíčka nanese kapku sterilní destilované vody
- ▶ Ožehnutou a vychladlou očkovací kličkou vneseme do kapky nepatrné množství kultury a pečlivě rozmícháme
- ▶ Kultury nesmíme nanést do kapky mnoho, aby preparát 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.
- ▶ Ihned mikroskopujeme (rychle vysychá) **FÁZOVÝM KONTRASTEM**
(objektiv 60x / 100x – celkové zvětšení tedy 600x nebo 1000x)



Barvené preparáty

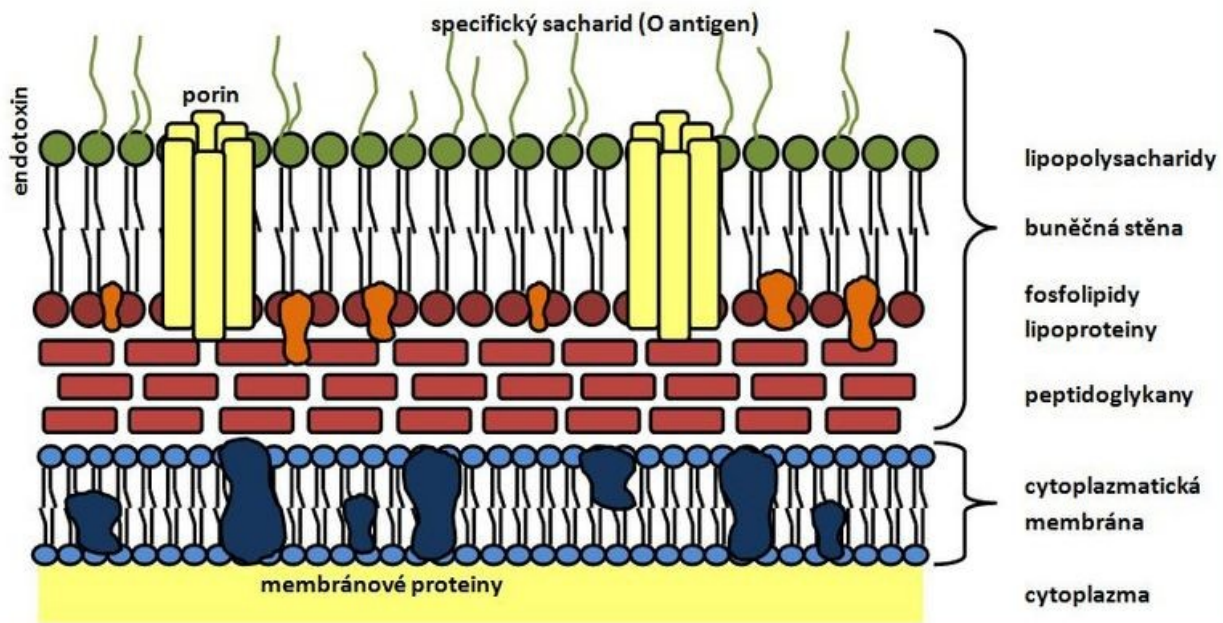


- ▶ Mírně deformují buňku
- ▶ Barvením zjistíme **tvar buňky**, **typ buněčné stěny**, **uspořádání shluků** (barvení buněčné stěny), či je **živá** (vitální test), **její struktury**, přítomnost a uložení **spor**, **inkluzí**, **pouzder** (diferenciační barvení) nebo **identifikujeme buňky** (diagnostické barvení – Gramovo, acidorezistentní)
- ▶ **Fixace** – účelem je usmrcení buněk (ty lépe přijímají barvivo) a přilnutí buněk k podložnímu sklu
- ▶ Bakterie fixujeme plamenem, mikroskopické houby a kvasinky chemicky (etanol, aceton)
- ▶ **Vyvarujeme se** uvaření a spálení buněk, fixujeme až když je nátěr suchý. Sklíčko držíme nátěrem nahoru.
- ▶ **Barviva**: krystalová violet, methylenová modř, safranin, bazický fuchsin, malachitová zeleň

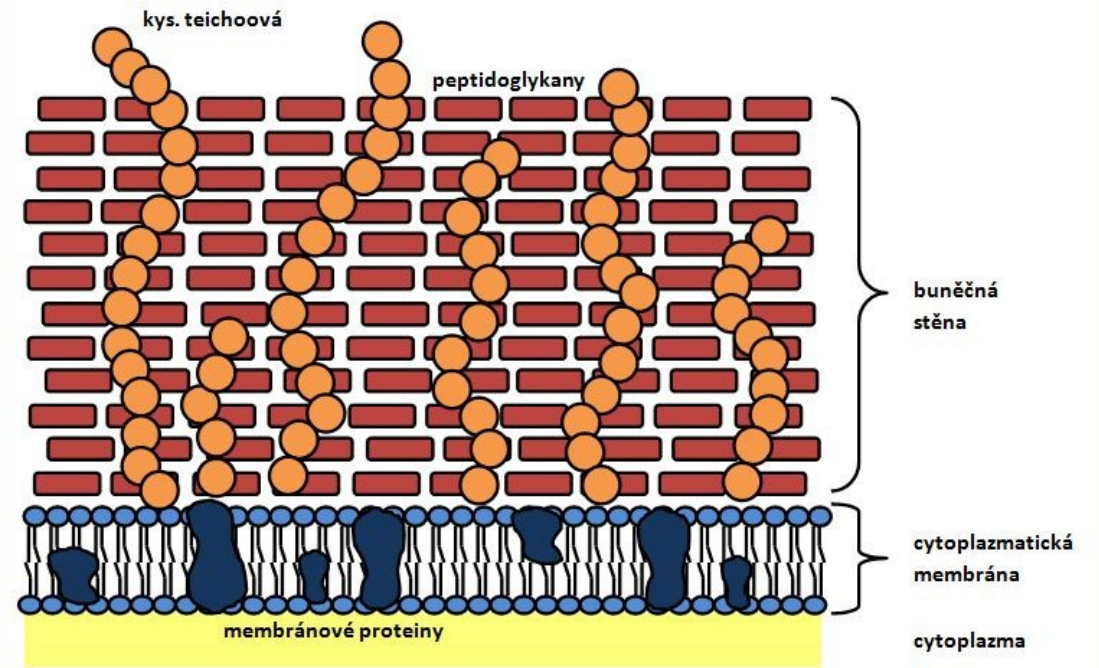


Buněčná stěna

Gram -

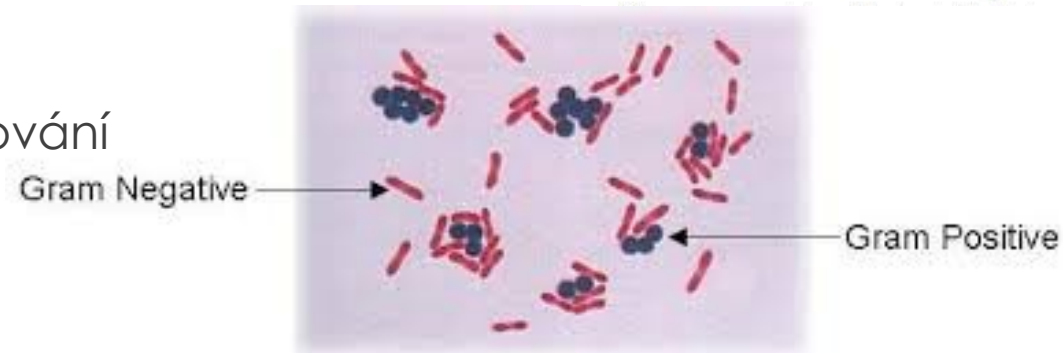
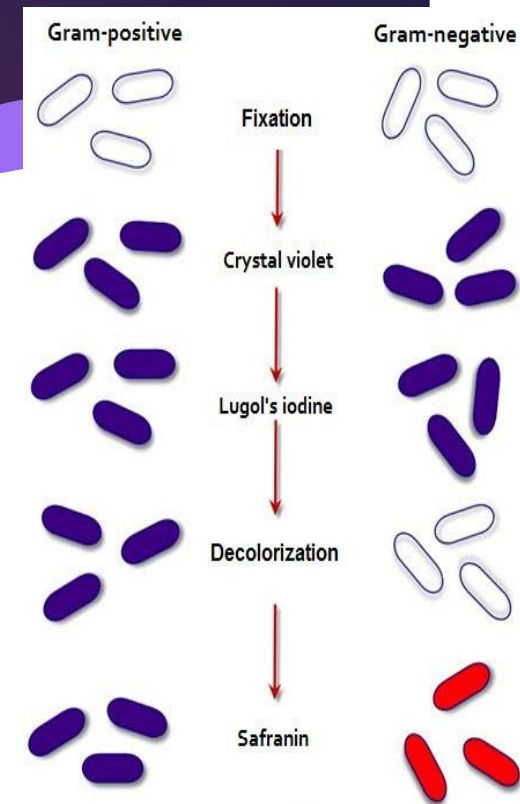


Gram +



Gramovo barvení

- ▶ Jedna z nejdůležitějších diagnostických metod **při identifikaci bakterií**
- ▶ **Barvíme buněčnou stěnu**
- ▶ Rozlišuje **G+** (modrofialové) a **G-** (červenorůžové)
- ▶ **Princip:** je to barvení fixovaného preparátu krystalovou violetí a následné moření buněk jódem v roztoku KI. Vzniká komplex barvivo-jód-buněčná stěna, který je u G+ i u G- bakterií. Rozdíl vzniká při promývání preparátu organickým rozpouštědlem (aceton/etanol). U G- se komplex vymývá a odbarvují se, u G+ ne. Po přidání kontrastního barviva (safranin) se G- dobarví.
- ▶ Závisí na fyziologickém stavu buňky a na složení média
- ▶ **Gram-labilní** bakterie G±, někdy G+, někdy G-
- ▶ **Chyby:** moc silný nátěr, uvaření buněk, dlouhé odbarvování



Bakterie nebarvitelné Gramovým barvením

- ▶ rody **bez buněčné stěny** (mykoplazmata), **spirálovité** bakterie, dále o silně **acidorezistentní** rody (např. mykobakteria)

Borrelia burgdorferi

Borrelia recurrentis

Bartonella henselae

Chlamydia trachomatis

Chlamydophila pneumoniae

Chlamydophila psittaci

Coxiella burnetii

Ehrlichia chaffeensis

Anaplasma phagocytophilum

Legionella sp.

Leptospira sp.

Mycobacterium tuberculosis

(*Mycobacterium avium*

Mycobacterium intracellulare

Mycobacterium kansasii

Mycobacterium leprae

Mycobacterium marinum

Rickettsia rickettsii

Orientia tsutsugamushi

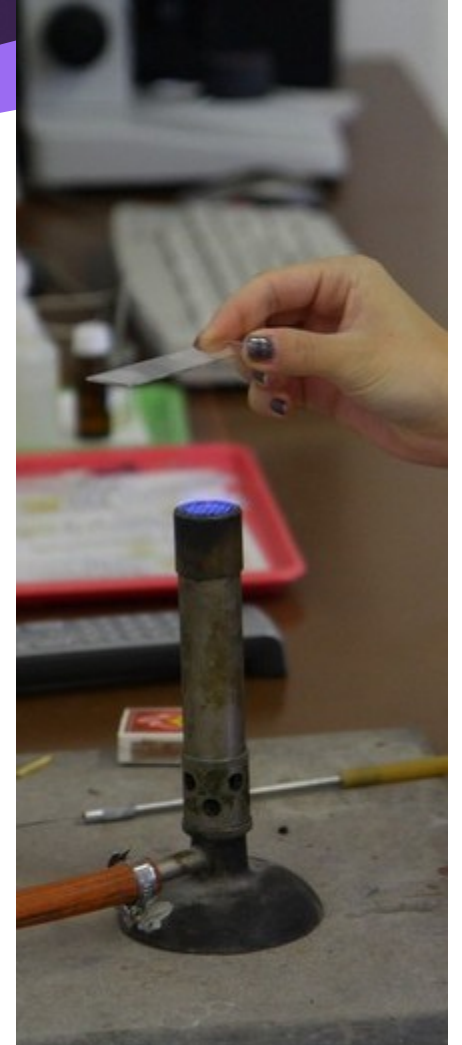
Treponema pallidum

Mycobacterium bovis



Fixace plamenem

- ▶ Provádí se před barvením (kromě negativního barvení a vitálního testu)
- ▶ Sklíčko **vytáhneme z etanolu a ožehneme nad plamenem**
- ▶ Sklíčko **popíšeme** a kápneme na něj **kapku sterilní vody**
- ▶ Buňky z Petriho misky – vyžíhanou kličku ochladíme o médium a **nabereme z jednotlivé kolonie** (1/4 kličky, stačí fuknout)
- ▶ Buňky z šikmého agaru – ožeháme hrdlo zkumavky, vyžíhanou a ochlazenou kličkou **nabereme kulturu**, ožehneme zkumavku a zavřeme
- ▶ Buňky přeneseme **do kapky vody, smícháme a rozetřeme po celém sklíčku**
- ▶ Necháme vodu **uschnout** a fixujeme: 3x přejdeme plamenem, **nátěrem nahoru**



Gramovo barvení

- ▶ (Suspenzi z kultury **mikrobů rozeřeme na čisté podložní sklíčko**, necháme dobře zaschnout a **fixujeme 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 **etanolem** maximálně **15-20 sekund (18 s)**
- ▶ Opláchneme **slabým proudem vody**
- ▶ Buňky dobarvíme **safraninem 1 minutu**
- ▶ Osušíme mezi dvěma filtračními papíry a mikroskopujeme **pod imerzním objektivem** (zvětšení 1000x)



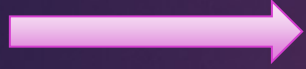
Krystalová
violeť 30 s



Opláchnout
vodou



Lugolov
roztok 30 s



Opláchnout
vodou



Etanol 18 s



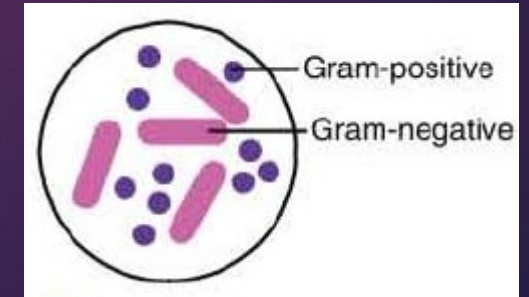
Opláchnout
vodou



Safranin
1 min

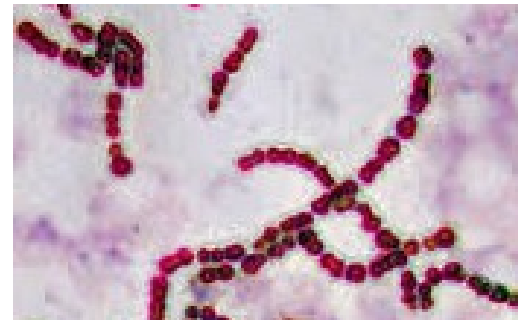
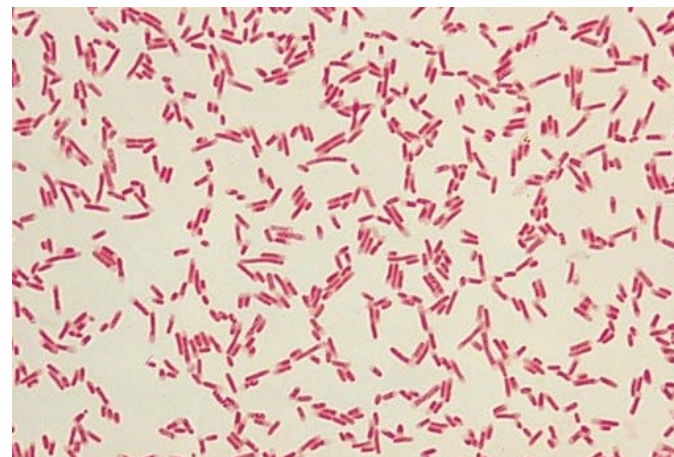
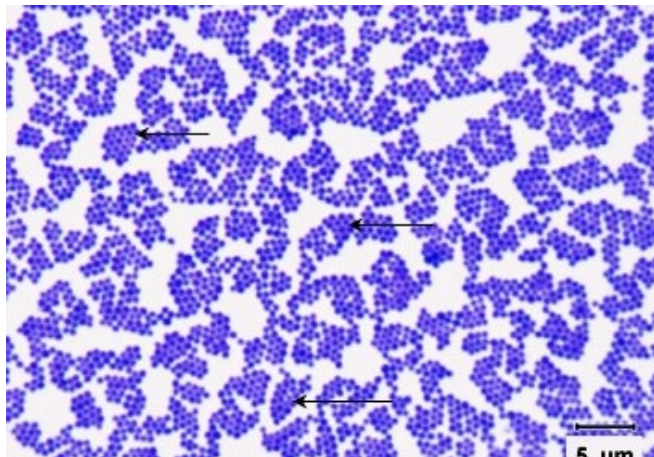
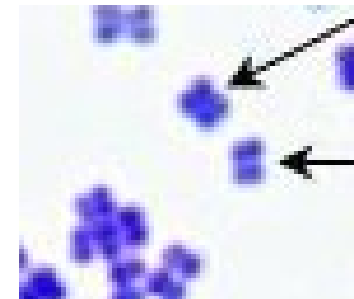
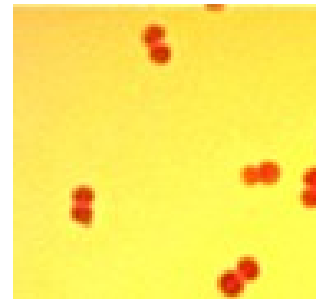
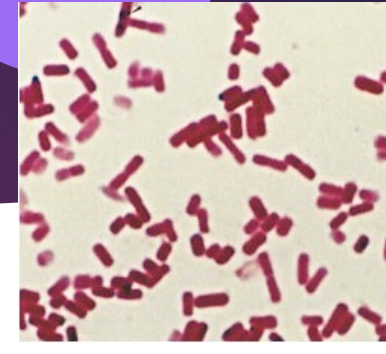


Opláchnout
vodou



Hodnocení

- ▶ Jsou bakterie G+ nebo G – ?
- ▶ Tvar buňky (kok, tyčka, spirálky...)
- ▶ Uspořádání, shluky buněk
(dvojičky, tetrády, hrozničky, řetízky ...)
- ▶ G+ jsou modrofialové, G – jsou růžovo-červené



Nativní preparát – pohyb buněk

- ▶ <https://www.youtube.com/watch?v=4grQSLmWXQk>
- ▶ <https://www.youtube.com/watch?v=kwQ-yXXL3Pw> od 0:30