

JARO 2021

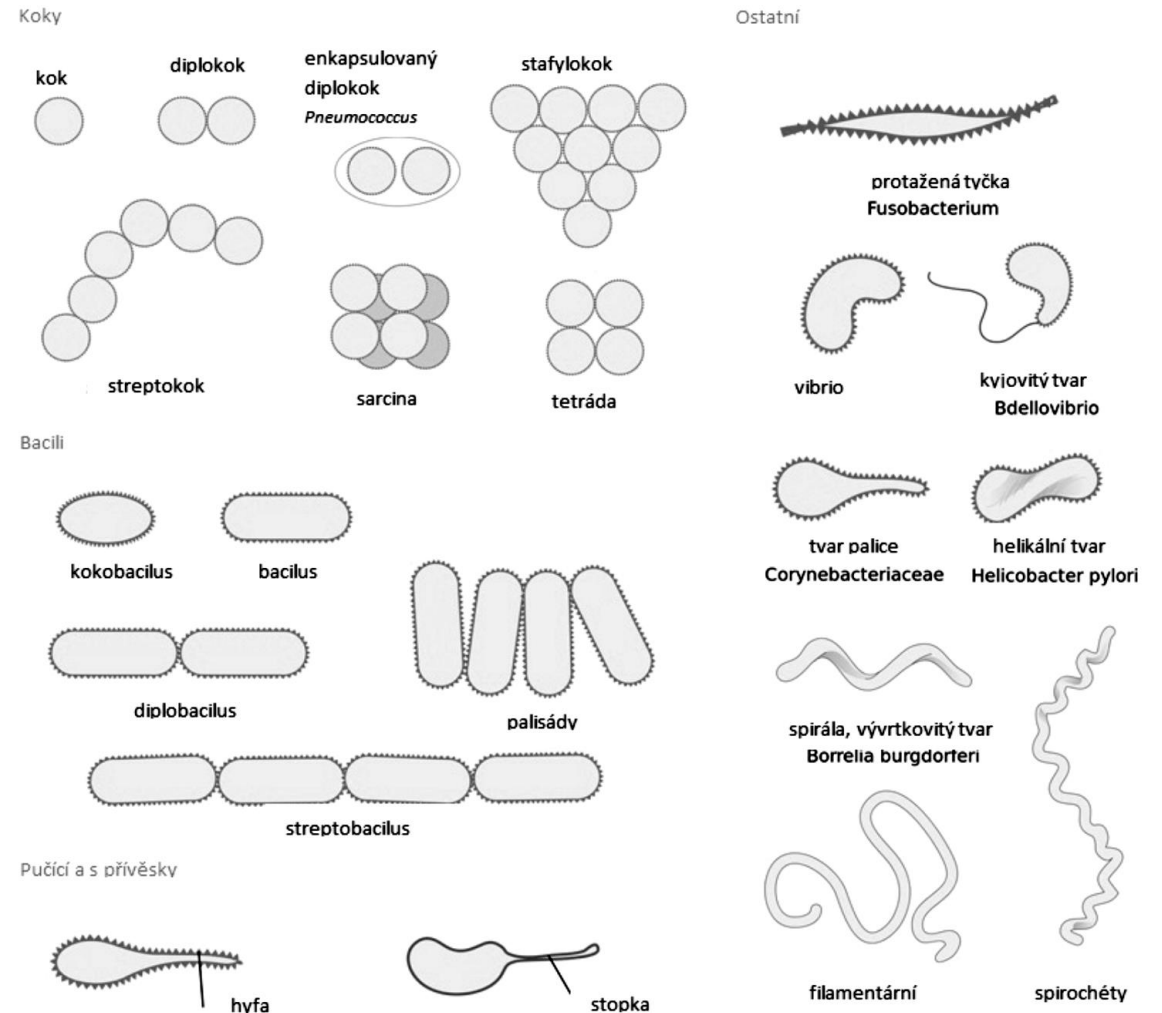
Makroskopické
(hodnoceno v
předchozí prezentaci)
a mikroskopické
pozorování
mikroorganismů

Mikroskopické pozorování

Mikroskopické pozorování MO

○ Hodnotíme:

- tvar buněk (koky, tyčky, kokobacily, spirily ...)
- velikost buněk
- uspořádání
- přítomnost zvláštních útvarů (bičíky, pouzdro, spory apod.)
- způsob rozmnožování (dělení, pučení, přítomnost spor)



Způsoby pozorování, barvení

Preparát je vždy na podložním sklíčku

- **nativní preparát** – nefixuje se ani se nebarví, pozorujeme živé buňky
 - **fixace** – účelem je usmrcení buněk (ty lépe přijímají barvivo) a přilnutí buněk k podložnímu sklíčku)
- **diferenční barvení** buněk nebo jejich složek (většinou se fixuje) – cílené barvení konkrétních struktur (spory, pouzdra, buněčná stěna, 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 zapíchnuté v agaru pod úhlem 45°, je porostlé kulturou

Nativní preparát



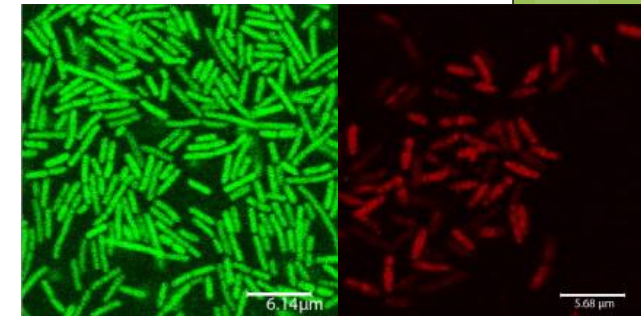
Gramovo barvení



Negativní barvení

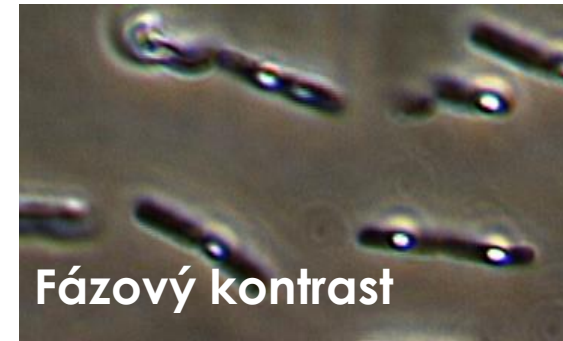


Fluorescenční mikroskopie



Nativní preparát, fázový kontrast

- o **nativní preparát** = nedeformované živé buňky v nativním stavu bez barvení, možno pozorovat pohyb, růst a množení bakterií a měřit skutečnou velikost buněk
- o **princip: fázový kontrast** využívá odlišné světlolomnosti částic, různých indexů lomu světla struktur
- o **transparentní, světlá část buňky** (cytoplasma) = **nízký** index lomu = **nízká** denzita → **tmavá** část preparátu
- o **tmavá, hustá část buňky** (membrány) = **vyšší** index lomu = **vyšší** denzita → **světlá** část preparátu; „**halo**“ efekt (projevuje se jasně zářícím rozhraním mezi objektem a prostředím a tím se ztrácí hranice objektu)
- o obraz je vytvářen interferencí fázově posunutých i neposunutých paprsků světla



Nativní preparát, pohyb

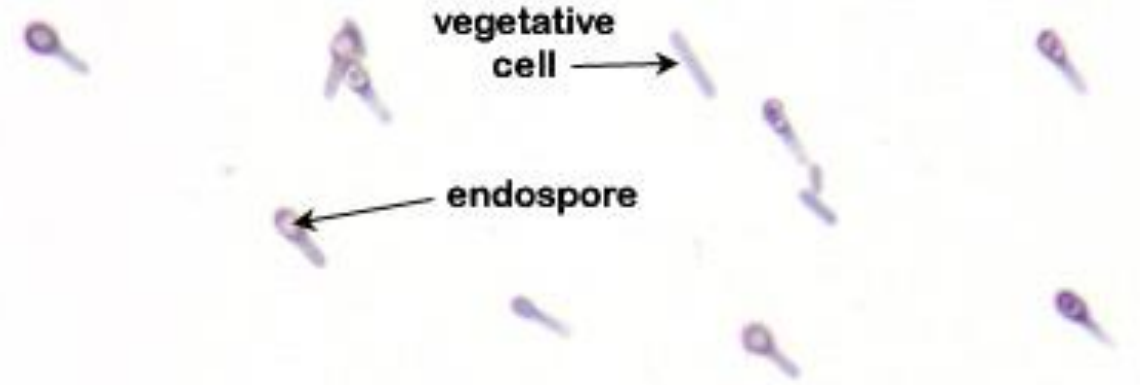
- Při mikroskopickém pozorování nativního preparátu můžeme rozlišovat tři druhy pohybu organismů:
 - a) vlastní pohyb – projevuje se jistou pravidelností, bývá kývavý, krouživý, přímočarý, vířivý
 - b) Brownův pohyb – fyzikální úkaz způsobený pohybovou energií molekul kapaliny. Buňky jeví pohyb pasivní, nepravidelný, směřovaný na jedno místo
 - c) pohyb buněk způsobený pohybem tekutiny, v níž jsou suspendovány. Nastává pokud není preparát, nebo mikroskop v horizontální poloze. Tekutina proudí jedním směrem a unáší i buňky, které pak jeví pasivní jednosměrný pohyb

Nativní preparát – postup přípravy

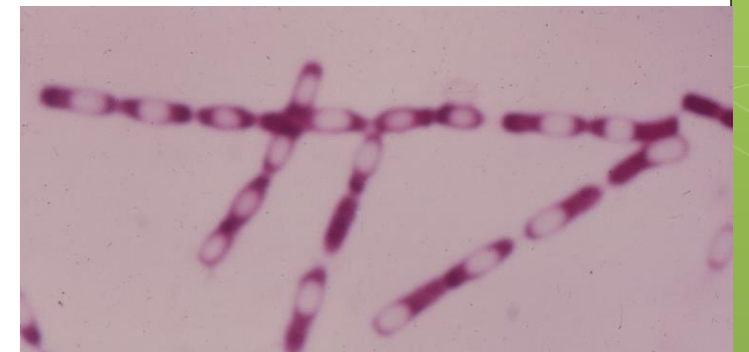
- podložní sklíčko vyjmeme z alkoholu a protáhneme jej plamenem
- doprostřed sklíčka nanese kapku sterilní **destilované vody**
- ožehnutou a vychladlou očkovací kličkou vneseme do kapky nepatrné množství **kultury** a pečlivě rozmícháme
 - kultury nesmíme nanést do kapky příliš mnoho, aby preparát nebyl 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, pomalu pokládáme pod úhlem asi 45 °, nepřitlačujeme)
 - přebytečnou kapalinu odsajeme filtračním papírem
- ihned mikroskopujeme (rychle vysychá) **fázovým kontrastem** (objektiv 40x /100x – celkové zvětšení tedy 400x nebo 1000x)
- <https://www.youtube.com/watch?v=N1780tJTk90>



Barvené preparáty

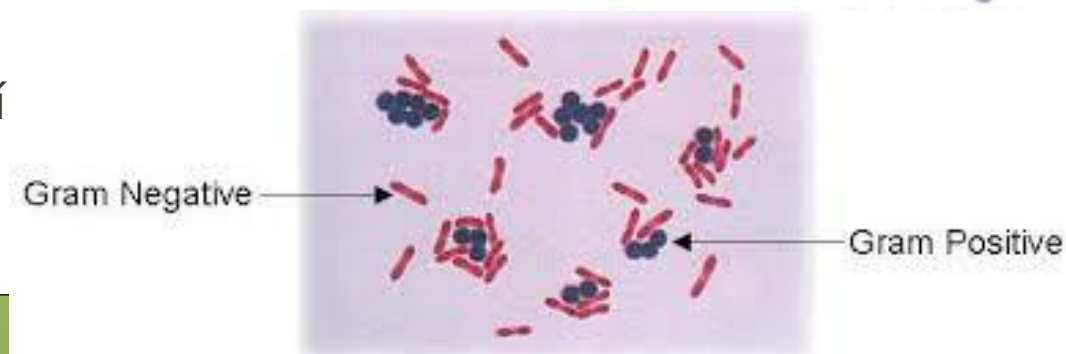
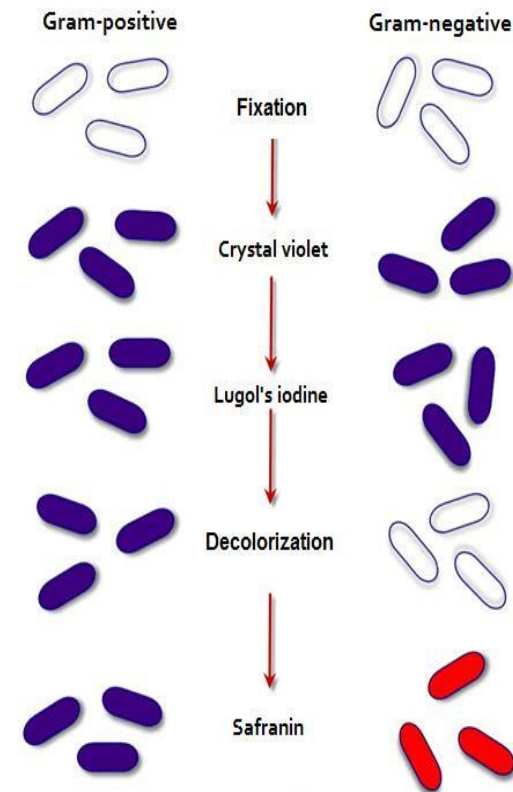


- barvením zjistíme **tvár buňky** (i když může mírně buňku deformovat), **typ buněčné stěny**, **uspořádání shluků** (barvení buněčné stěny), je-li buňka **živá** (vitální test), **její struktury**, přítomnost a uložení **spor, inkluzí, pouzder** (diferenciační barvení) nebo **identifikujeme buňky** (diagnostické barvení – Gramovo, acidorezistentní)
- **fixace** – účelem je usmrcení buněk (ty lépe přijímají barvivo) a přilnutí buněk k podložnímu sklíčku díky vysrážení vylitých bílkovin
 - **bakterie fixujeme plamenem, mikroskopické houby a kvasinky chemicky (etanol, aceton)**
 - **vyvarujeme se** uvaření a spálení buněk, fixujeme až když je nátěr kompletně suchý. Sklíčko držíme nátěrem nahoru
- **barviva:** krystalová violet, methylenová modř, safranin, bazický fuchsin, malachitová zeleň
- příprava preparátu
 - <https://www.youtube.com/watch?v=c2BPE7wIK20>



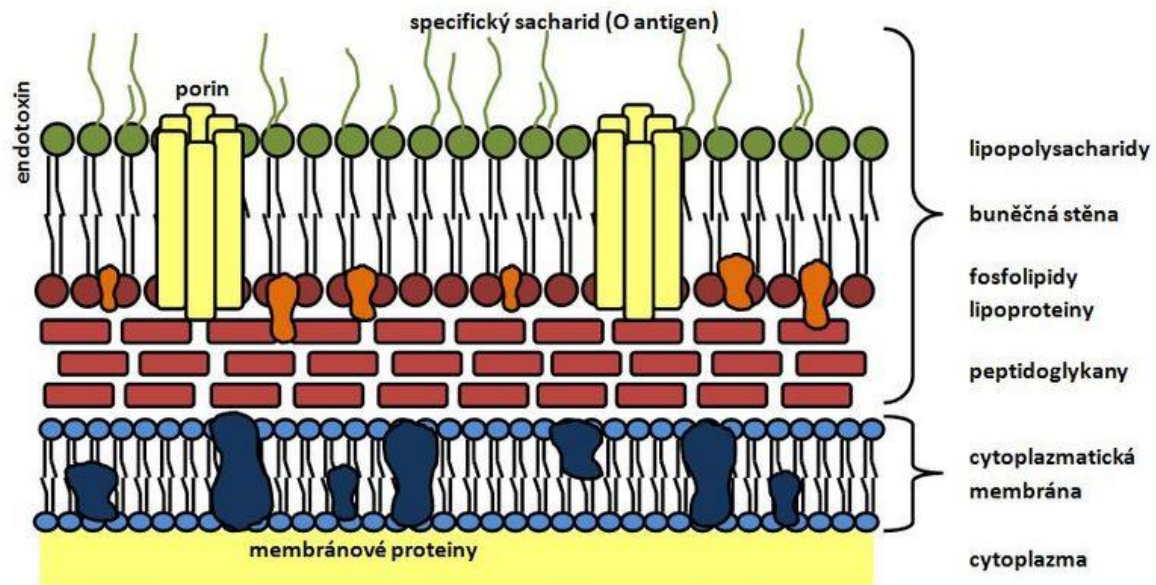
Gramovo barvení

- o jedna z nejdůležitějších diagnostických metod **při identifikaci bakterií**
- o **barvíme buněčnou stěnu**
- o rozlišuje **G+** (modrofialové) a **G-** (červenorůžové)
 - o **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.
- o závisí na fyziologickém stavu buňky a na složení média
- o **Gram-labilní** bakterie (G \pm) – někdy se barví jako G+, jindy jako G-
- o **chyby**
 - o moc silný nátěr, uvaření buněk, dlouhé odbarvování

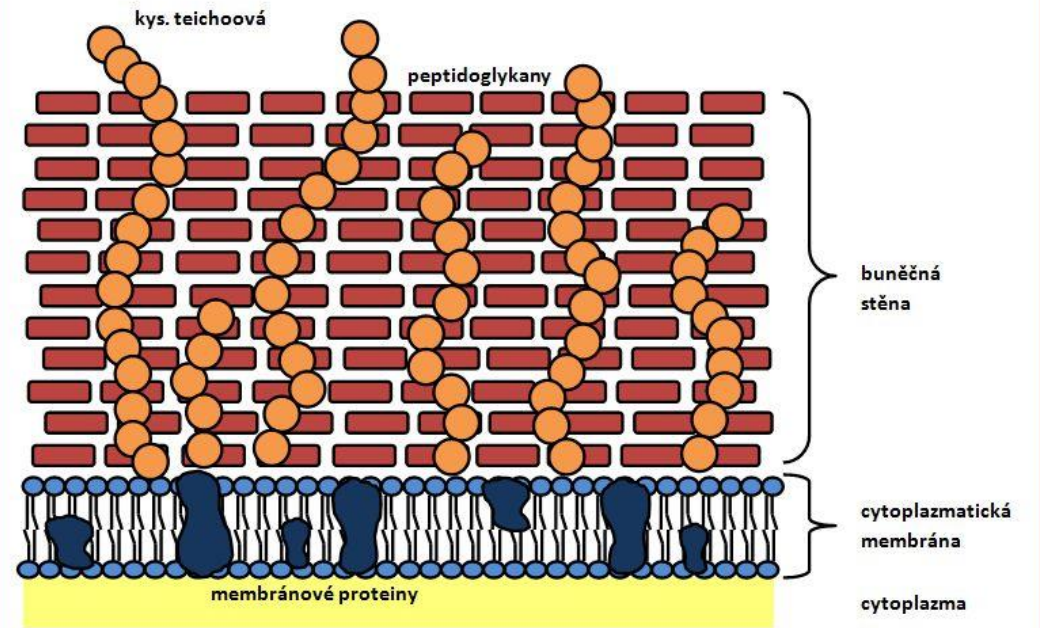


Buněčná stěna

Gram -



Gram +



Buněčná stěna

Gram negativní

- dvě membrány, mezi kterými se nachází tenká vrstva peptidoglykanu
- peptidoglykanová vrstva obsahuje k. muramovou (murein) a s vnější membránou je spojena lipoproteiny
- O-antigen lipopolysacharidů – hlavní antigenní struktura, na něž se váží specifické protilátky tvořené imunitním systémem
- tloušťka stěny je asi 15 nm

Gram pozitivní

- membrána s tlustou vrstvou peptidoglykanu
- peptidoglykanová vrstva obsahuje k. teichoovou, lipoteichoovou a/nebo polysacharidy
- hlavním antigenem jsou proteiny asociované s buněčnou stěnou
- tloušťka stěny je asi 20 nm

Bakterie nebarvitelné Gramovým barvením

- rody **bez buněčné stěny** (mykoplazmata), **spirálovité** bakterie, dále i 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

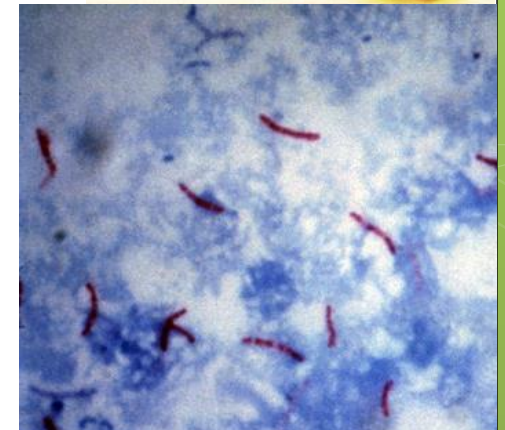
Mycobacterium marinum

Rickettsia rickettsii

Orientia tsutsugamushi

Treponema pallidum

Mycobacterium bovis



Příprava preparátu – GRAMOVO BARVENÍ

- sklíčko **vytáhneme z etanolu a ožehneme nad plamenem**
- sklíčko **popíšeme** a kápneme na něj **kapku sterilní vody**
- **vyžíhanou kličkou odebereme kulturu** jedním z níže uvedených způsobů:
 - buňky z Petriho misky – vyžíhanou kličku ochladíme o médium a **nabereme z jednotlivé kolonie** (1/4 kličky, stačí fuknout), nebo
 - buňky ze šikmého agaru – ožháme hrdlo zkumavky, vyžíhanou a ochlazenou kličkou **nabereme kulturu**, ožehneme zkumavku a zavřeme
- buňky přeneseme **do kapky vody, smícháme a rozetřeme po sklíčku**
- necháme **uschnout** (několik minut při pokojové teplotě) a fixujeme: sklíčko držíme za okraje a 3x přejdeme plamenem, **nátěrem nahoru**
 - fixace plamenem se provádí před barvením (kromě negativního barvení a vitálního testu)
- <https://www.youtube.com/watch?v=MIGp8buyzXg>



Gramovo barvení

Po fixaci se přistoupí k samotnému barvení

- sklíčko ponoříme do roztoku **krystalové violeti** a necháme působit **60 sekund**
- barvivo opláchneme **slabým proudem vody (2 s)**
- preparát ponoříme do **Lugolova roztoku** na **30 sekund.**
- opláchneme **slabým proudem vody (2 s)**
- překryjeme **etanolem** maximálně **5 -10 sekund**
- opláchneme **slabým proudem vody**
- buňky dobarvíme **safraninem** vložení sklíčka do barviva **na 60 s**
- osušíme mezi dvěma filtračními papíry a mikroskopujeme **pod imerzním objektivem** (objektiv 100x – celkové zvětšení 1000x)

Pomůcka:

K = kryst. violet

L = Lugolův roztok

A = alkohol

S = safranin



Krystalová violet
45-60 s



Opláchnout
vodou



Lugolův roztok
30 s



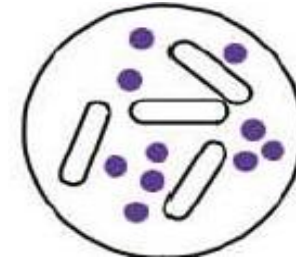
Opláchnout
vodou



Ethanol 5-10 s



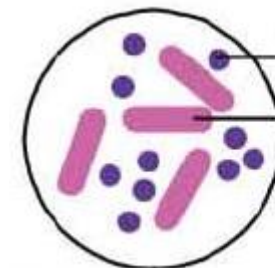
Opláchnout
vodou



Safranin
60 s



Opláchnout
vodou



Gram-positive
Gram-negative

Gramovo barvení

- <https://www.youtube.com/watch?v=28jAsVpAp3I>
- Poznámky:
 - nejkritičtějším krokem je odbarvování preparátu alkoholem/acetone (do deseti sekund nebo nechat pomalu stékat)
 - inkubace s barviv (krytalová violeť, Lugolův roztok, safranin) 30-60 s, přesná délka inkubace není pro úspěšný výsledek klíčová
 - je nezbytné zachovat správné pořadí jednotlivých roztoků
 - roztoky mohou být nanášeny přímo na vzorek (viz video) nebo je sklíčko ponořeno postupně do jednotlivých lázní (umožňuje recyklaci barviv; postup ve cvičení)

Nativní preparát

Nativní preparát – pohyb buněk

- Růst MO

<https://www.youtube.com/watch?v=4grQSLmWXQk>

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

Podklady pro vyhotovení protokolu

- Na následujících snímcích najdete obrázky všech 8 druhů, které barvíme podle Grama a také z nich vytváříme ve cvičení nativní preparát
 - obrázky kultur na PM jsou použité z fotek křížových roztěrů
- Do tabulky v protokolu si podle zobrazených preparátů označte u jednotlivých druhů zda jsou **G+ nebo G-**
- Popište dle obrázků **tvar** buňky (kok, tyčinka,...)
- Určete charakteristické **uspořádání, shluky** buněk (dvojičky, tetrády, hrozny, řetízky,...), které jsou pro daný druh specifické (zapátrejte i v dalších dostupných zdrojích)
- V závěru mimo zhodnocení Gramova barvení nezapomeňte zmínit také poznatky o **nativním preparátu**, o kterých jste se v prezentaci dozvěděli – co na nativním preparátu můžeme pozorovat?

Náhledy

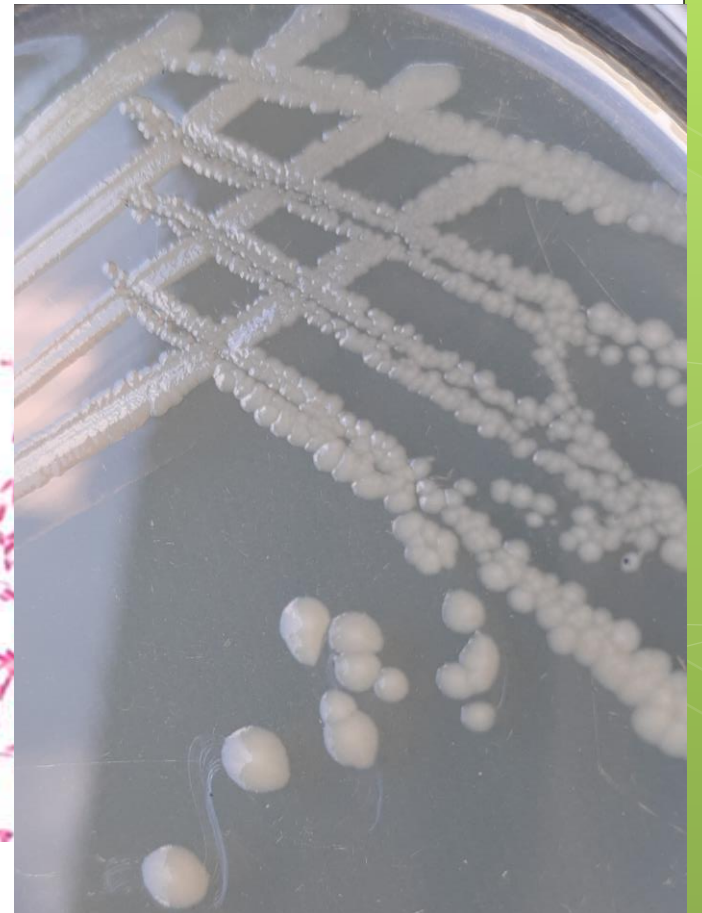


Bacillus cereus

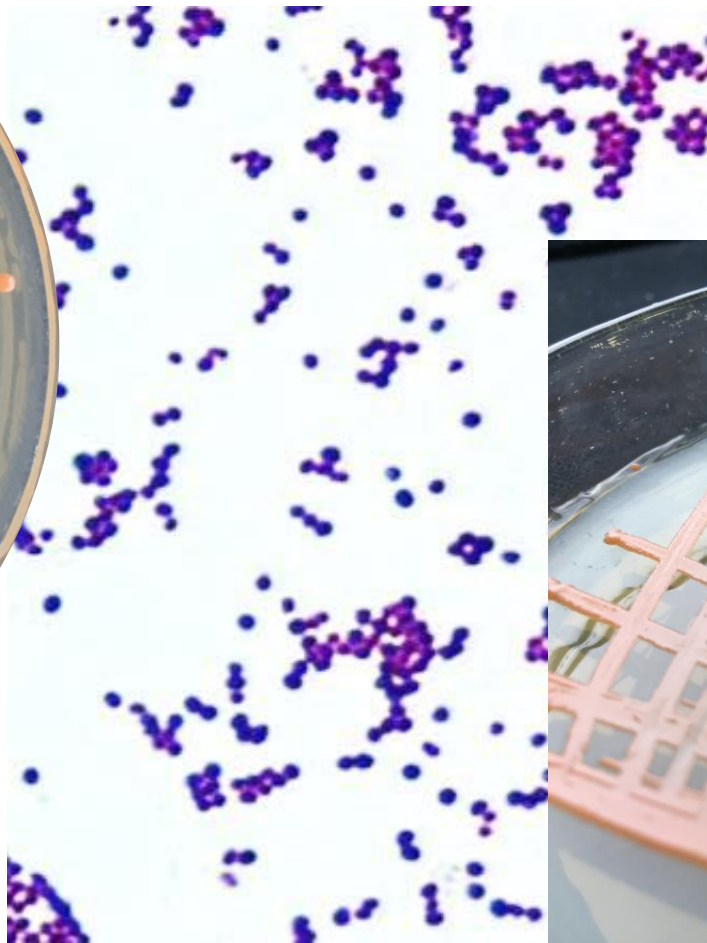


Náhledy

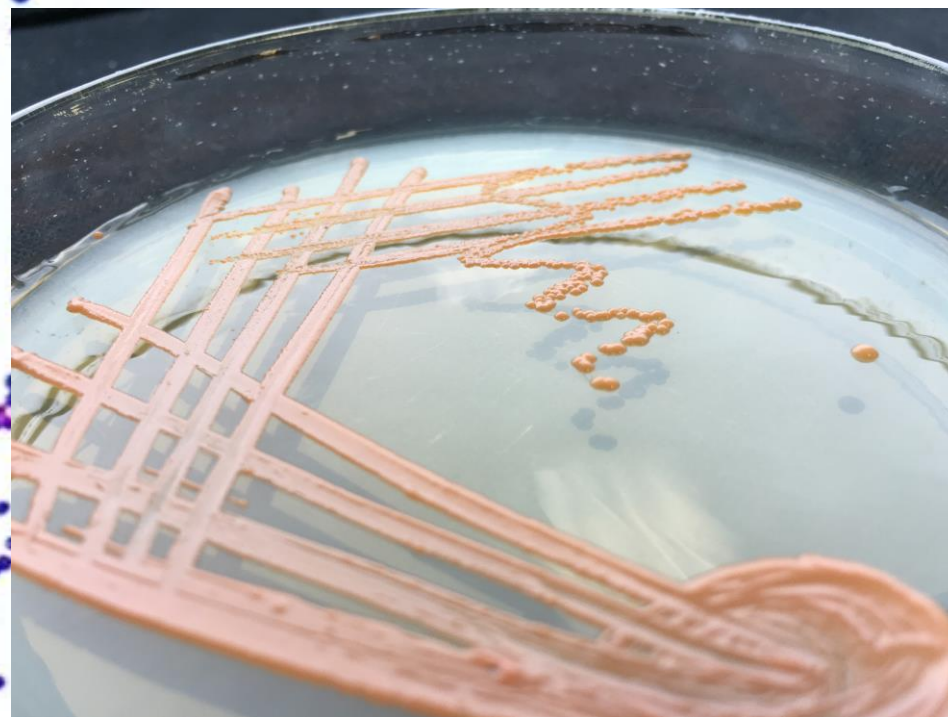
Escherichia coli



Náhledy



Kocuria rosea



Náhledy



Saccharomyces cerevisiae



Náhledy



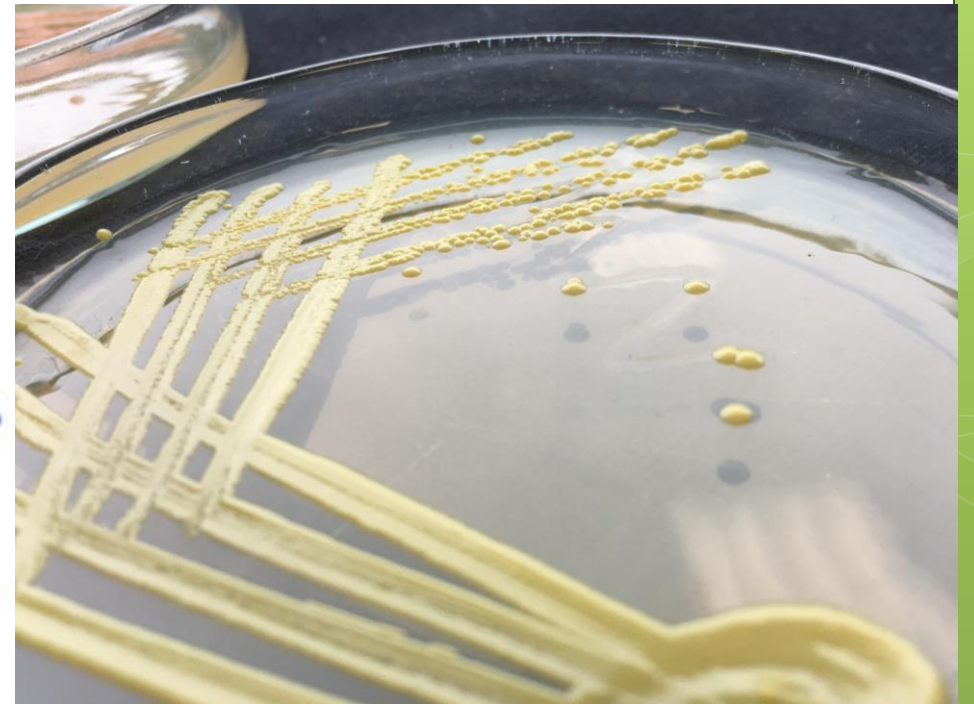
Pseudomonas fluorescens



Náhledy

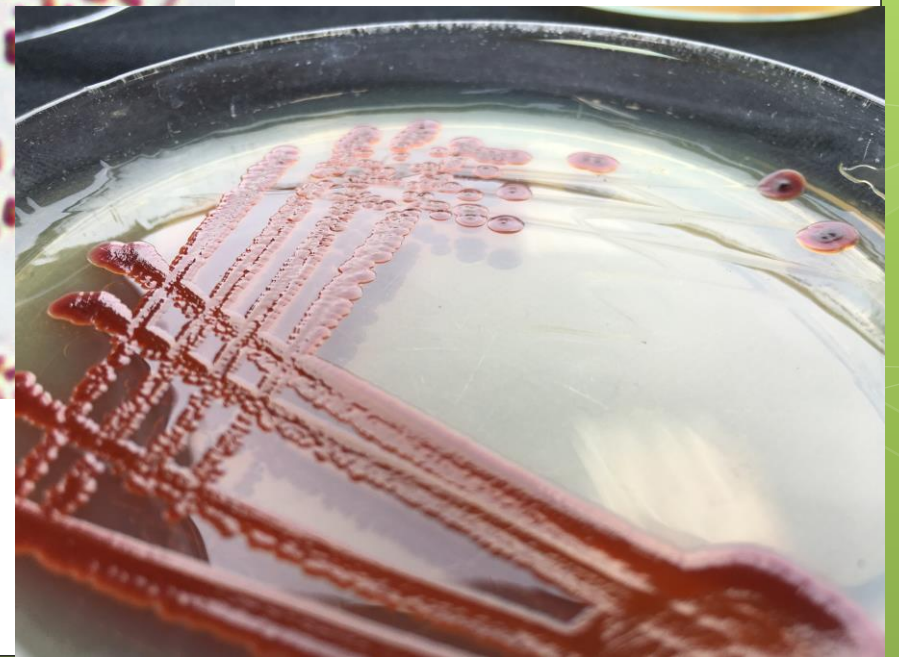
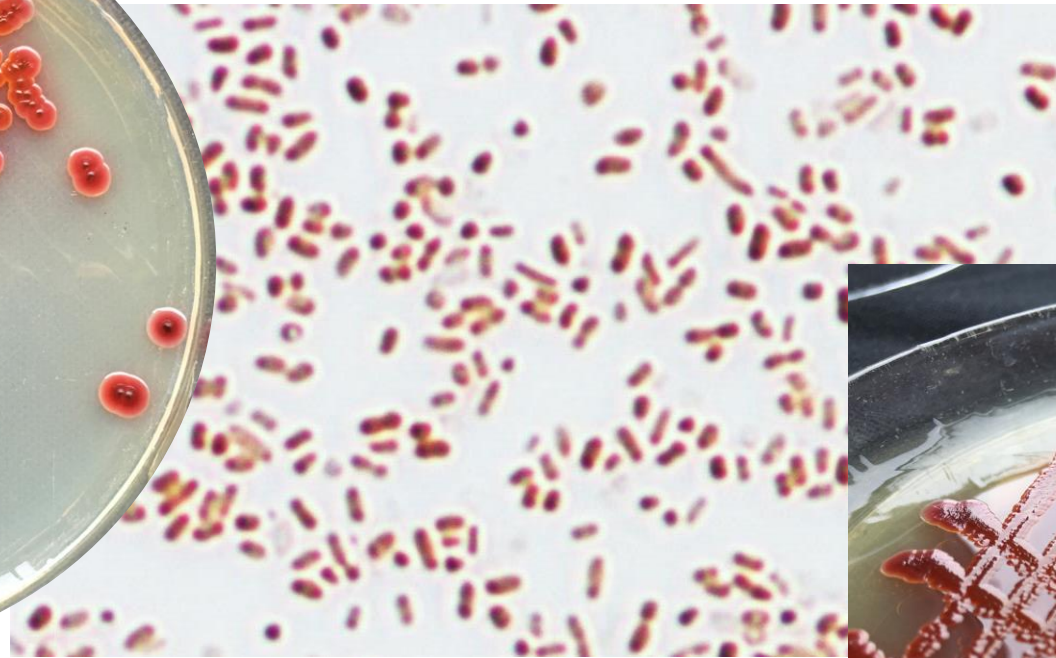
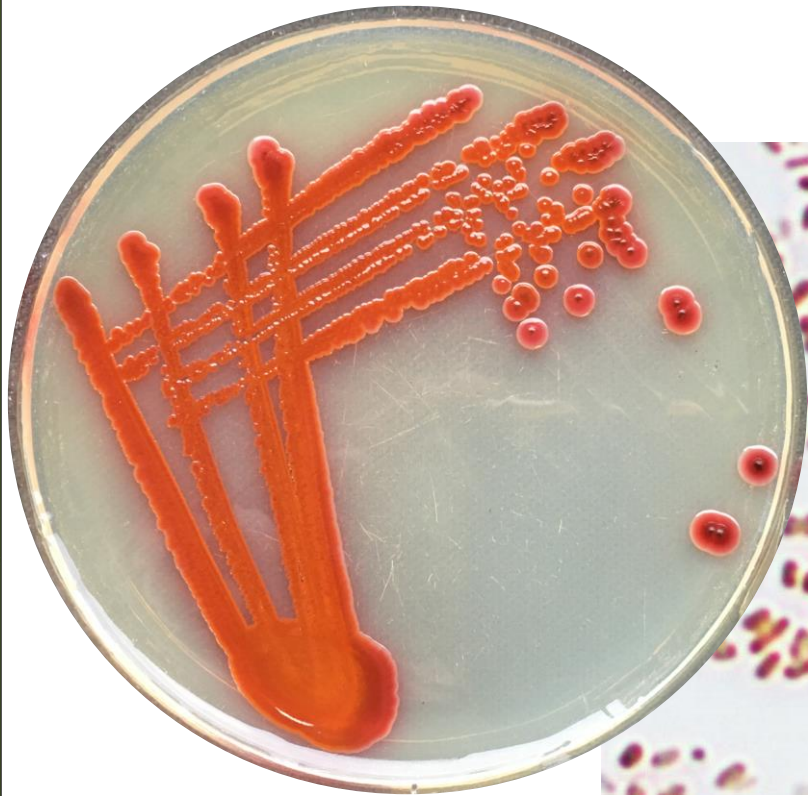


Micrococcus luteus



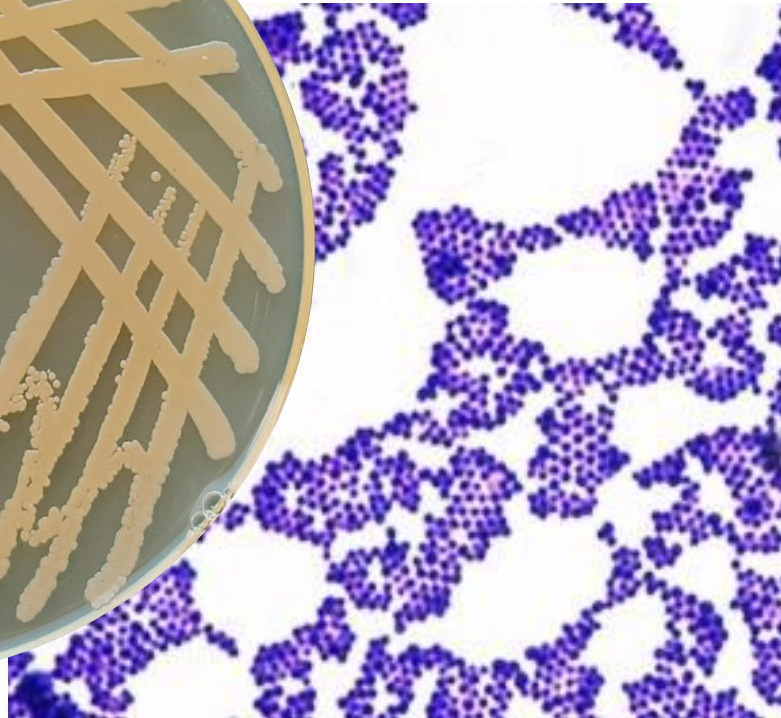
Náhledy

Serratia marcescens



Náhledy

Staphylococcus aureus



Náhledy – nativní preparát

Saccharomyces cerevisiae

Fázový kontrast u sporulujících bakterií;
Bacillus megaterium (A), ***B. mycoides*** (B), ***B. pumilus*** (C)

