

– 3.blok –

Barvení buněčných inkluzí a
fluorescenční alternativa
acidorezistentního barvení

2.seminární skupina

Cytologie a morfologie bakterií

30.11.2011

Použité kultury:

- pro barvení buněčných inkluzí
 - *Saccharomyces cerevisiae*
 - *Bacillus cereus* CCM 2010
 - *Bacillus megaterium* CCM 2007

 - pro acidorezistentní barvení
 - *Mycobacterium phlei* CCM 5639
-

Saccharomyces cerevisiae

- bílé, drsné kolonie



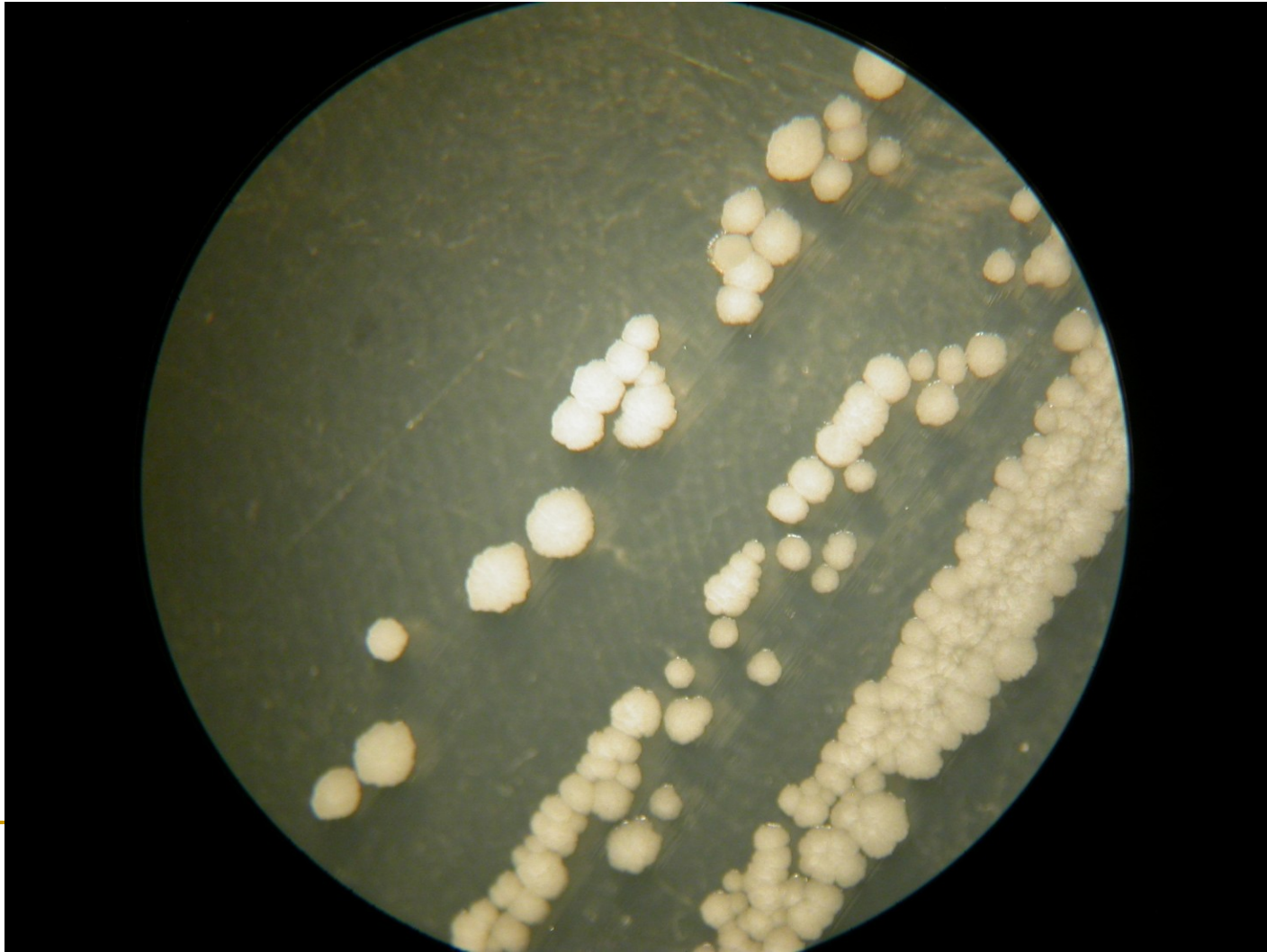
Bacillus cereus CCM 2010

- bezbarvé až lehce
nažloutlé drsné kolonie



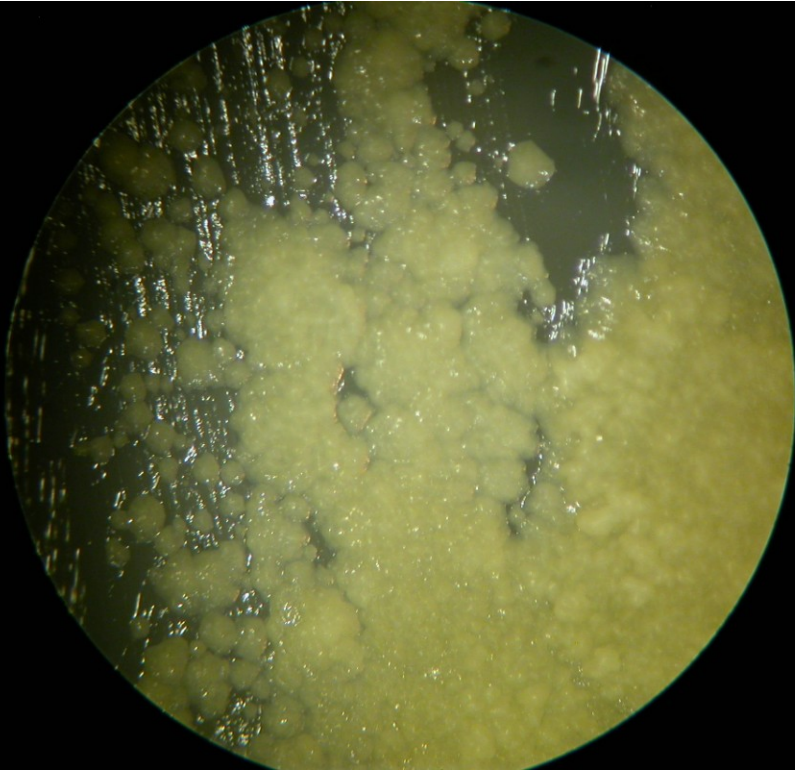
Bacillus megaterium CCM 2007

- bílé, drsné kolonie



Mycobacterium phlei CCM 5639

- žluté drsné až hrbolkaté kolonie



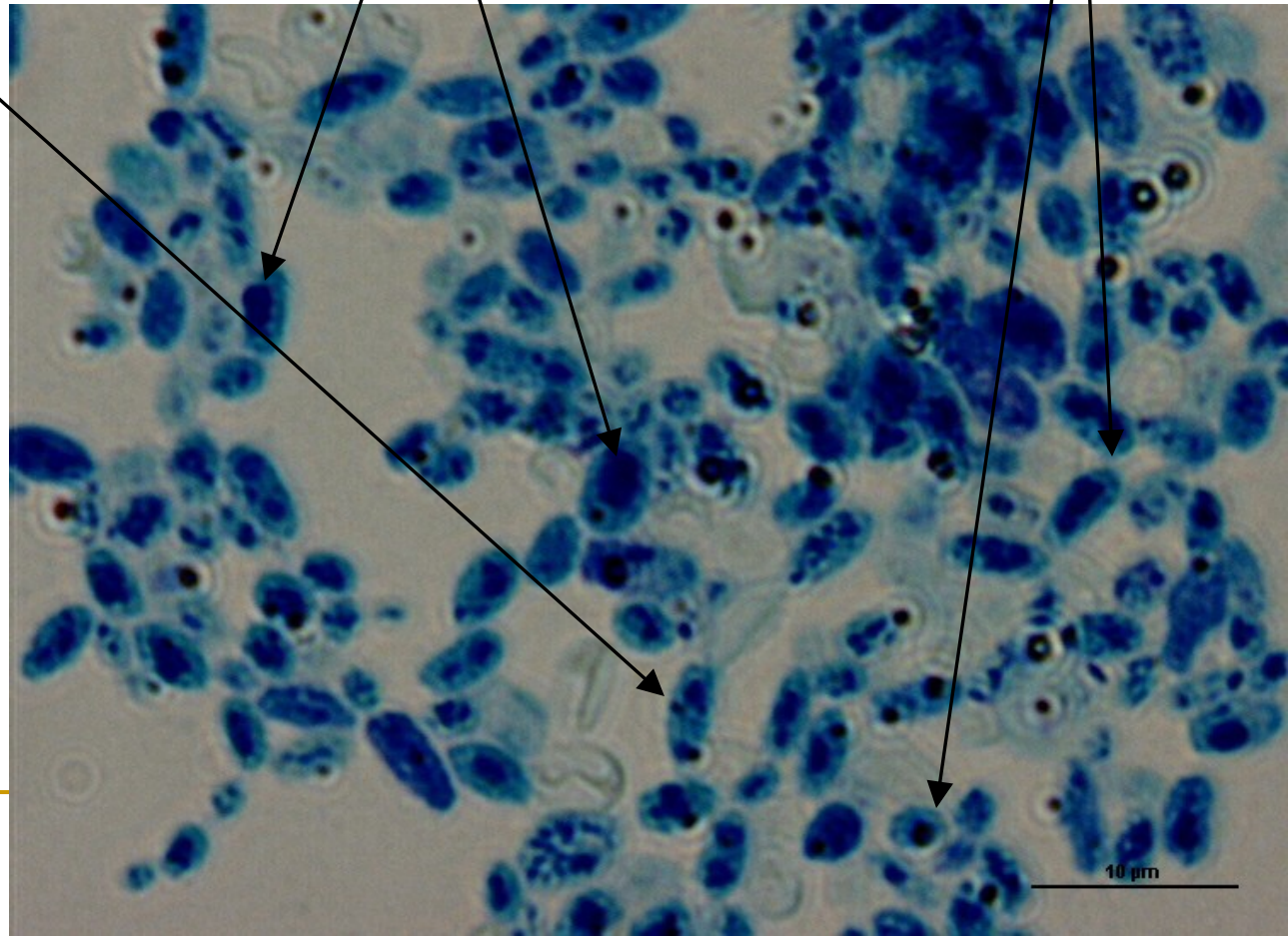
Barvení buněčných inkluzí

■ Volutin

- polyfosfátová granula, při nadbytku ATP
- barvení polychromatickou methylenovou modří
- postup:
 - nátěr buněk se nechá uschnout na vzduchu
 - převrstvení polychromatickou methylenovou modří (Löfferova vyzrálá alespoň 12 měsíců) po dobu 3 minut
 - oplach destilovanou vodou
 - osušení
 - pozorování pod imerzí (volutinová zrna purpurově zbarvena, cytoplazma lehce namodralá)

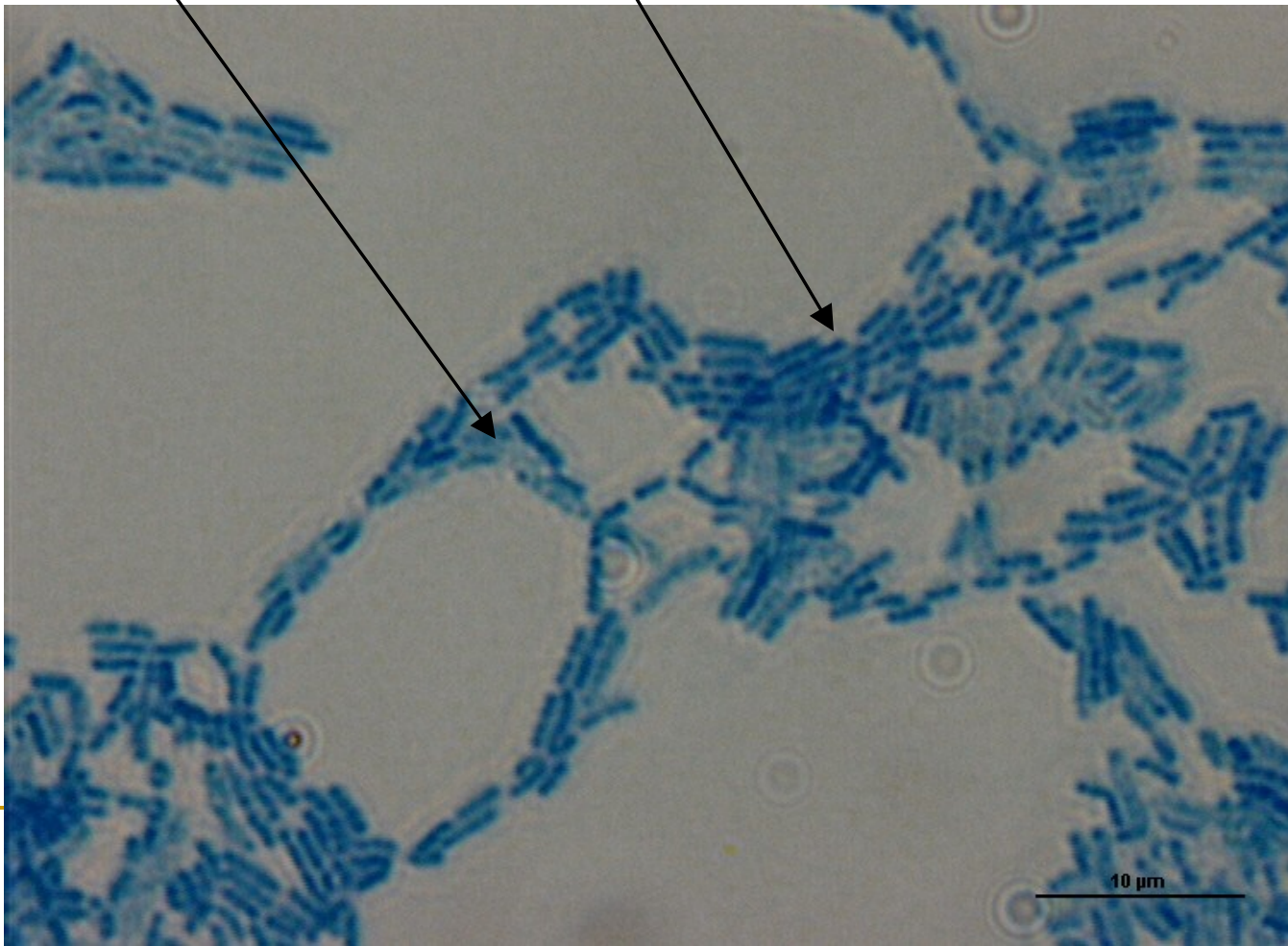
Saccharomyces cerevisiae

- volutinová zrna purpurově zbarvena, cytoplazma lehce namodralá
- i více zrn v buňce
- jasné pole



Bacillus cereus CCM 2010

- jasné pole
- volutinová zrna purpurově zbarvena, cytoplazma lehce namodralá



Bacillus megaterium CCM 2007

- jasné pole
 - volutinová zrna purpurově zbarvena, cytoplazma lehce namodralá

 - *fotografie chybí, byla zřejmě uložena do jiné složky a již nebyla nalezena*
-

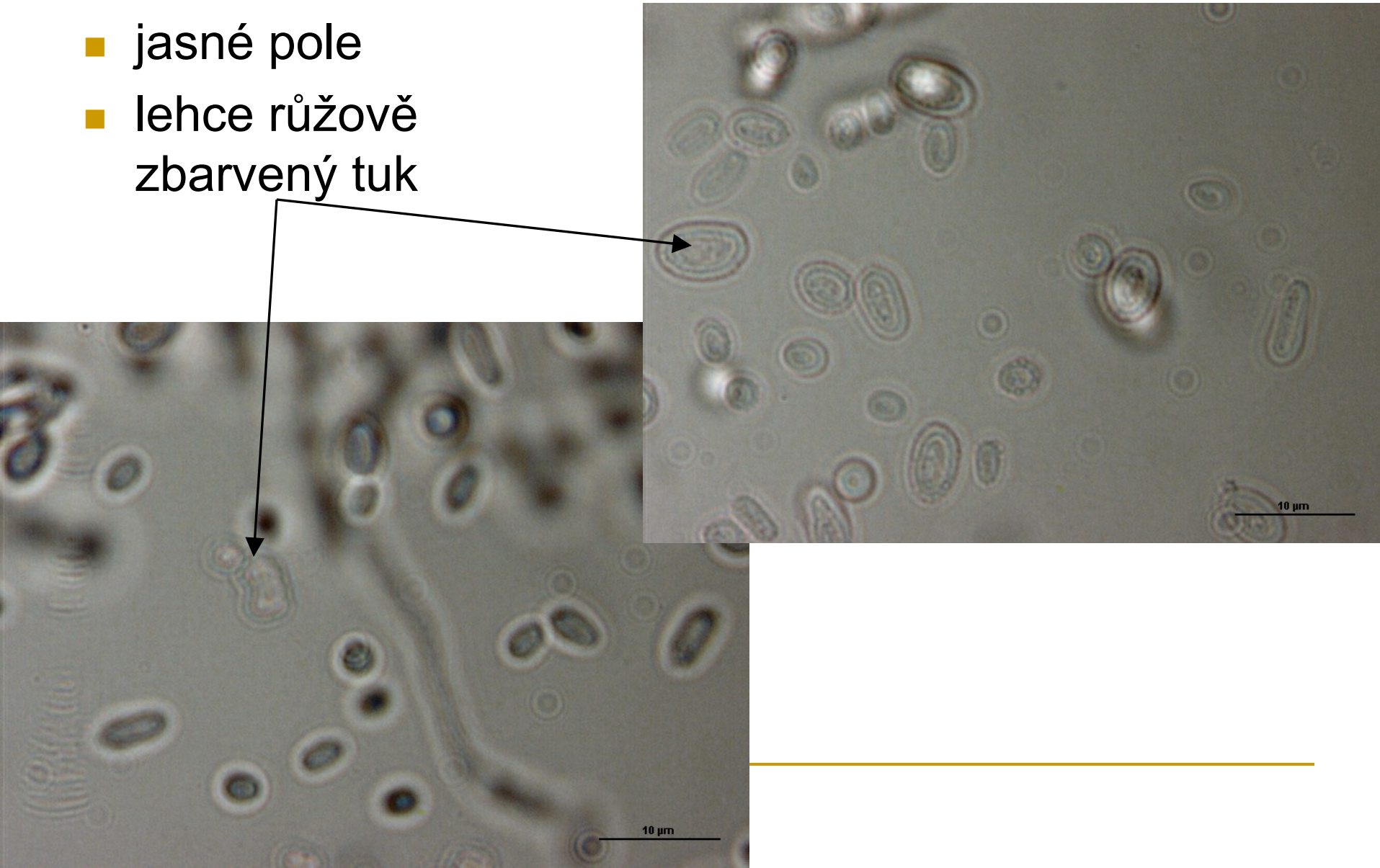
Barvení buněčných inkluzí

■ Tuk

- v buňce ve formě kapének nebo jako součást membrán
- barvení Sudanem III. (0,1% roztok Sudanu III v ethanolu a glycerolu)
- postup:
 - smíchání buněk s barvivem
 - překrytí krycím sklíčkem
 - působení barviva 20-30 minut
 - pozorování cihlově červených kapiček tuku v buňce

Saccharomyces cerevisiae

- jasné pole
- lehce růžově zbarvený tuk



Bacillus cereus CCM 2010

- jasné pole
- růžově zbarvená kapénka tuku v buňce a kapky barviva



Bacillus megaterium CCM 2007

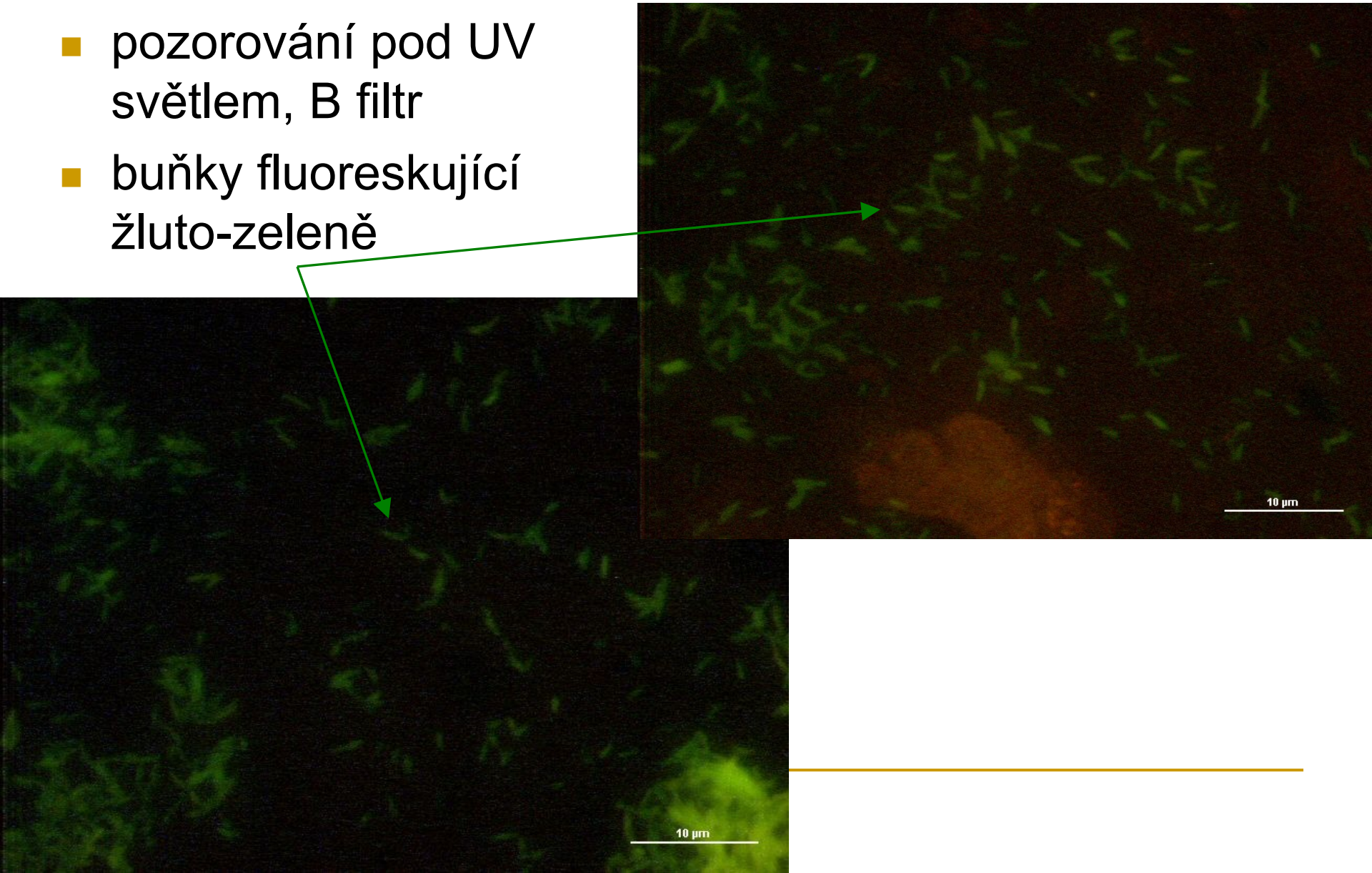
- jasné pole
- *měly být vidět růžově zbarvené kapky tuku v buňce či tuk v jejich membránách, ale protože nebyly upozorovány na žádném z preparátu této kultury, nebyla pořízena ani fotografie*

Fluorescenční alternativa acidorezistentního barvení

- barvení nespecifickými fluorochromy auraminem a rhodaminem, které se váží na mykolové kyseliny, rezistentní k odbarvení kyselým alkoholem
- postup:
 - roztěrový preparát, usušení
 - fixace při 65°C nejméně 2h v sušárně
 - barvení roztokem auraminu-rhodaminu 15min
 - promytí vodou
 - odbarvení 2-3min 0,5% HCl v 70% etanolu
 - po promytí kontrastní barvení 0,5% manganistanem draselným po dobu 2-4 minut
 - promytí, usušení
- pozorování ve fluorescenčním mikroskopu s filtrem B

Mycobacterium phlei CCM 5639

- pozorování pod UV světlem, B filtr
- buňky fluoreskující žluto-zeleně



Použitá přístrojová technika

- badatelský mikroskop
 - Olympus BX 50 RGB
 - videokamera Hitaschi
 - systém analýzy obrazu
 - LUCIA G 4.61
 - LUCIA F

 - binokulární lupy
 - digitální fotoaparát
-