

# Preparát

- nativní - pozorování skutečného tvaru, pohybu
- fixovaný barvený - barvení buněčné stěny nebo struktur, buňky jsou usmrcené fixací nad plamenem nebo chemicky (etanolem nebo acetonem), usmrcené buňky lépe přijímají barvivo a lépe přilnou k podložnímu sklíčku

## Zdroje:

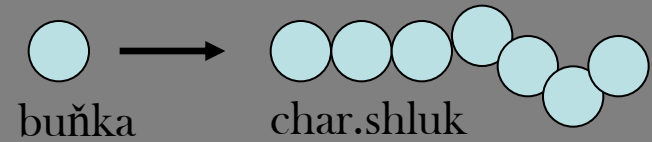
Mikrofoto preparátů předmětu Bi7340 (rok 2007)

<http://www.microbelibrary.org/Gram%20Stain/details.asp?id=2028&Lang=>

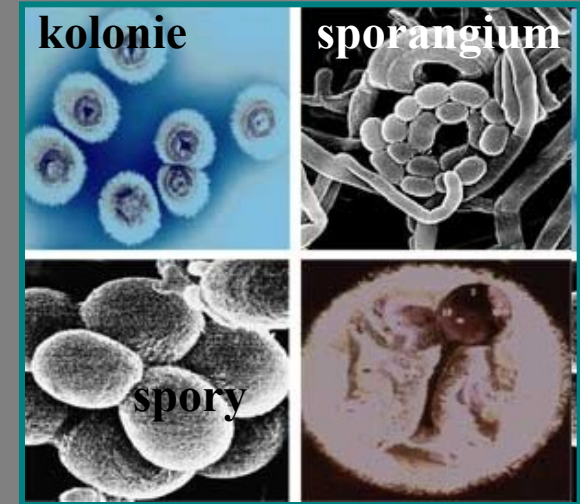
!!Atlas mikroorganismů:

<http://www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/mikr.htm>

# Morfologie



- Buňky
- Charakteristických shluků buněk
- Extracelulárních útvarů (spory, konidie, sporangia, pouzdra..)
- Bakteriální kolonie



Většinou druhově charakteristické  
= identifikační znak

Pozor na: fázi růstového cyklu!

endospory vyklenující buňku

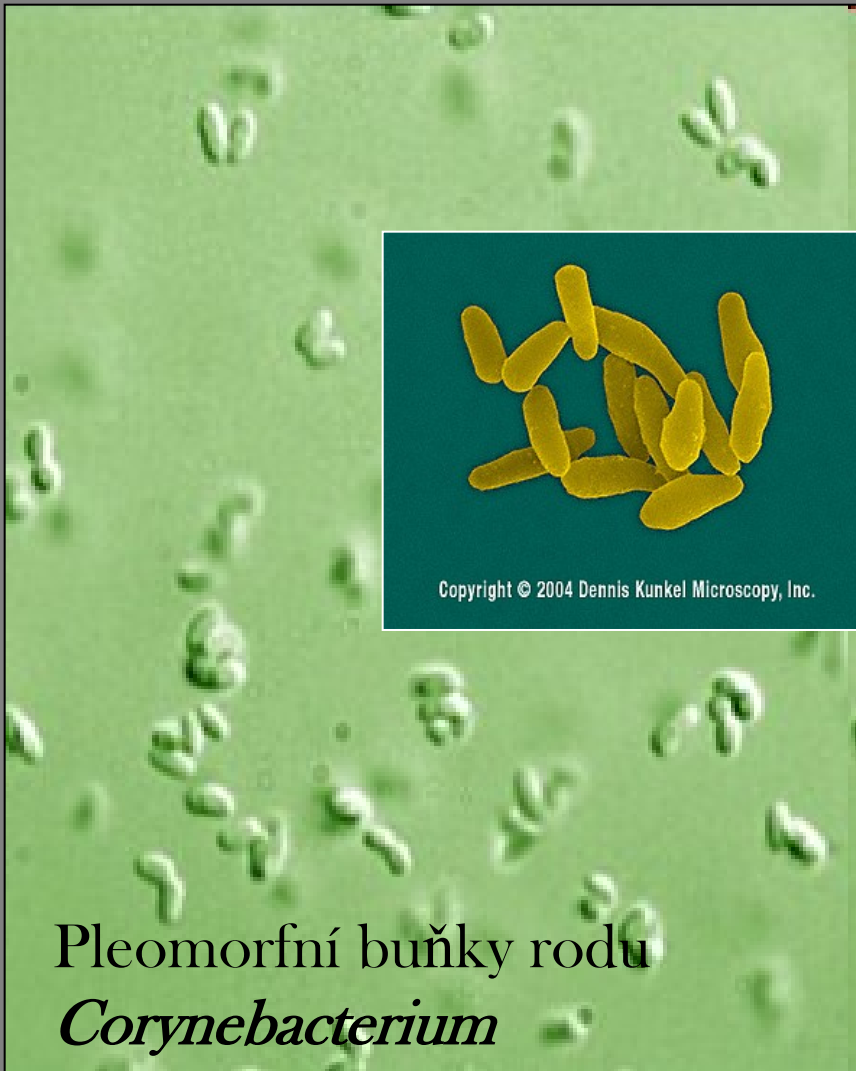
stáří kultury

pleomorfní buňky

*Clostridium  
botulinum*



endospora



Pleomorfní buňky rodu  
*Corynebacterium*



Copyright © 2004 Dennis Kunkel Microscopy, Inc.

Morfologie pleomorfních buněk.

Další potíže:

Jsou barvitelné Gramem?

*Haemophilus* - ano

Bez b.s.

Mykobakteria, mykoplazmata - nikoli

Mykolové kys

Pleomorfní buňky

*M. tuberculosis*



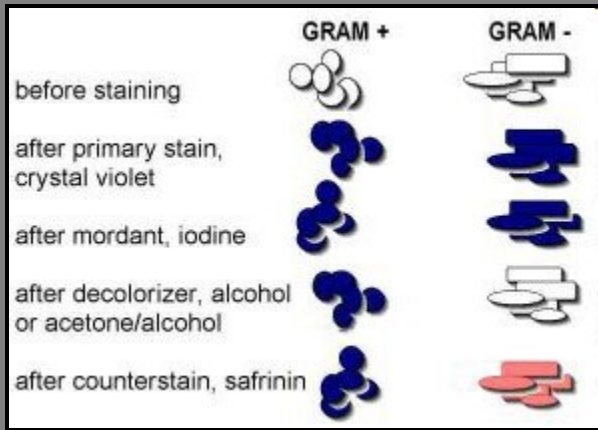
*Mycobacterium avium-intracellulare*

Acidorezistentní buňky:

Odmítají Gramovo barvení

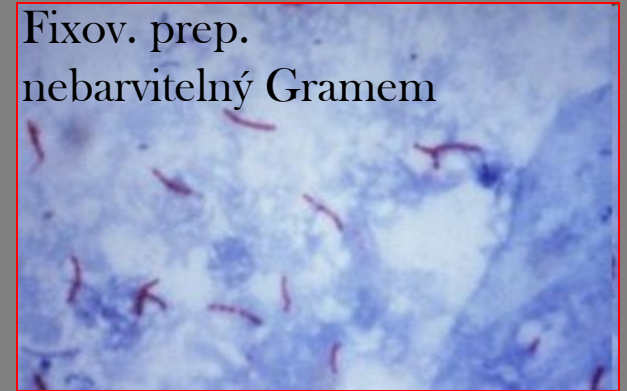
Odmítají se po nabarvení odbarvit ethanolem i kyselinou. Př: *Corynebacterium*, *Nocardia*...

Acidorezistentní barvení buněk histologického řezu lymfatické uzliny

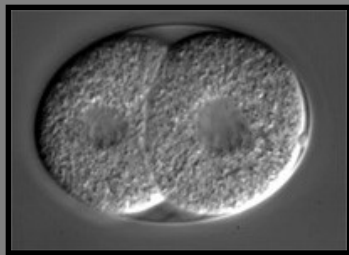


Je neznámý vzorek vůbec barvitelný Gramem?  
Není gramlabilní?

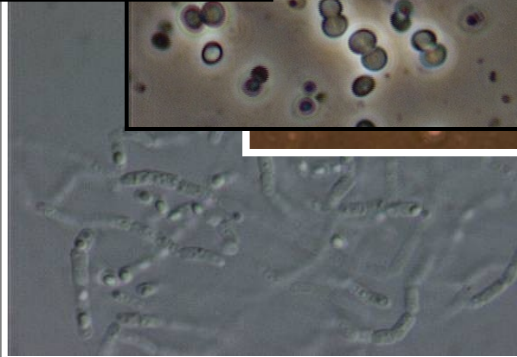
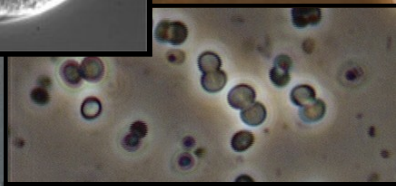
Fixov. prep.  
nebarvitelný Gramem



*Mycobacterium tuberculosis*  
Zeihl-Neelsonovo barvení (červeně)



S barevným filtrem

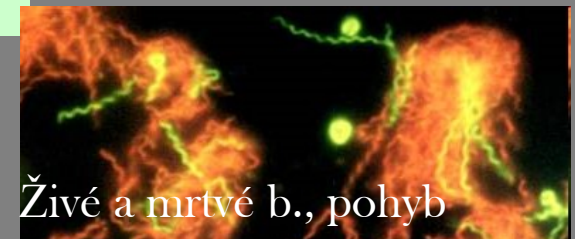


C1  
mikroskopie?  
Typ preparátu  
Typ mikroskopie  
(typ b. stěny, průkaz struktur, růstového cyklu)



Fixov. prep. - tvar a typ b.

Živý (nativní) preparát bez fixace - vidíme nedeformovaný tvar buňky, spory, morfologii seskupení buněk, pohyb buněk



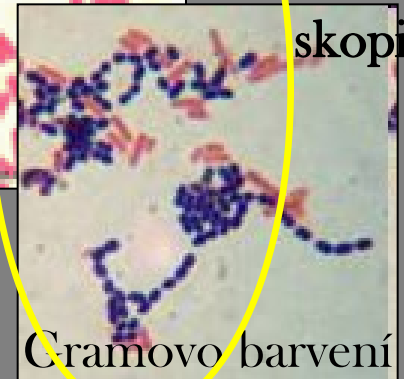
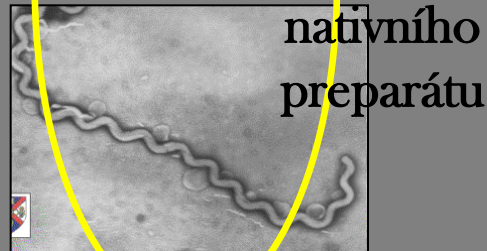
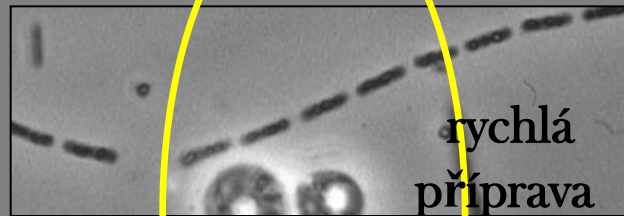
Živé a mrtvé b., pohyb

# Morfologie buňky

## • PREPARÁT

- co chceme vidět? - podle toho preparát a typ mikroskopie

tvár buňky - fázový kontrast, barvený fixovaný prep.  
a struktur



Světelná  
Fázový kontrast  
Fluorescenční  
Elektronová...

světelná  
mikro-  
skopie

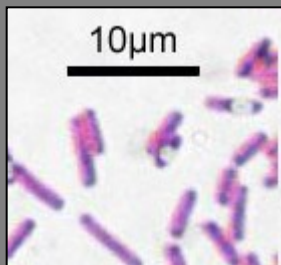
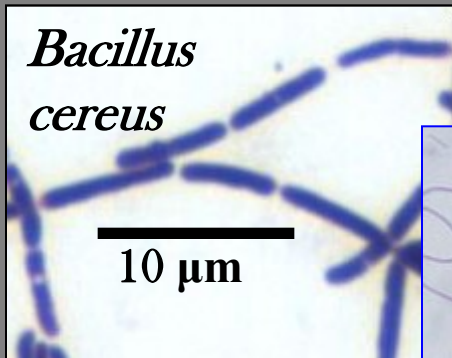
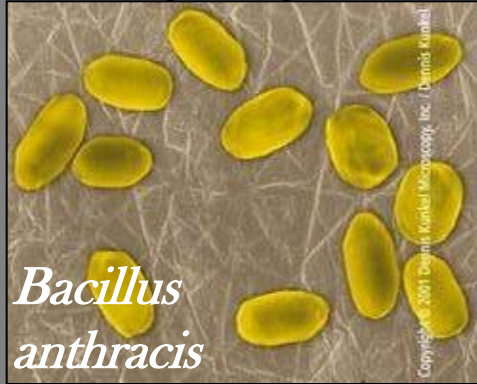
pohyb buňky - fázový kontrast, fluorescence

barvené struktury - pomáhají identifikaci (PHB, síra)

typ buněčné stěny - Gramovo a acidorezistentní b.

# U jednoho bakteriálního rodu různý vzhled char. tvaru buňky!

- Př: tyčky bacilů

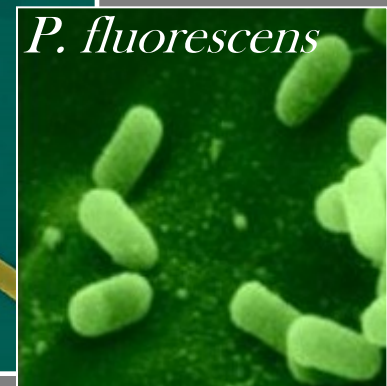


*Bacillus subtilis*

- *Haemophilus*



- *Pseudomonas*



# Posuzujeme-li vzhled buňky určitého bakteriálního druhu, je třeba si uvědomit:

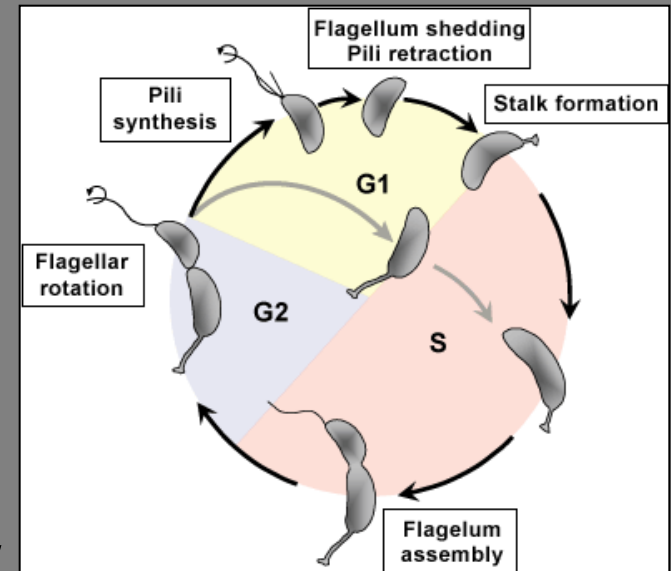
1) Prochází tento druh růstovými cykly?

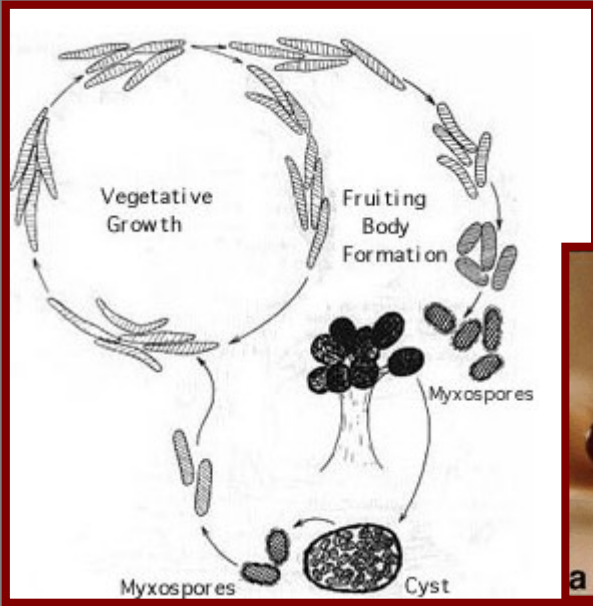
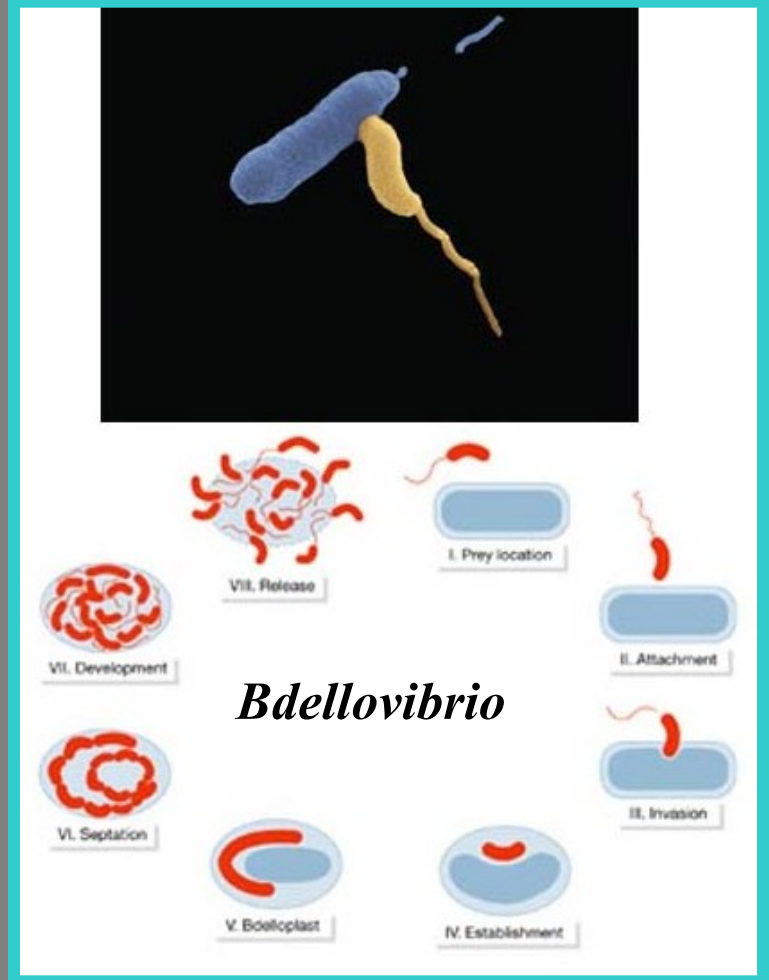
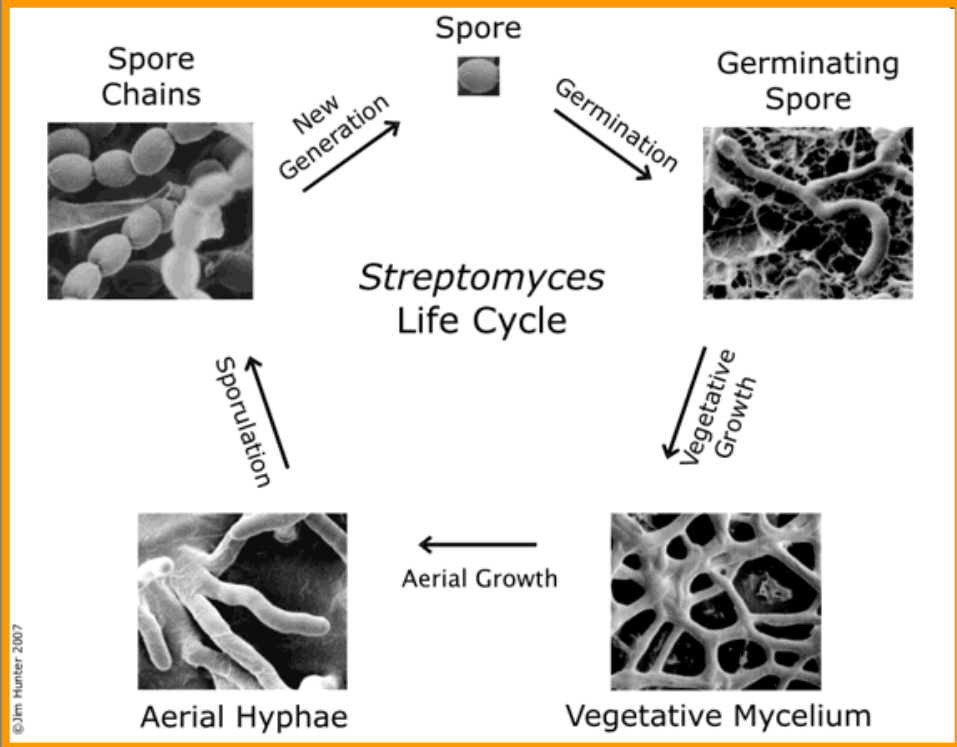
- v každém z nich má pak buňka jinou morfologii!

Př: *Chlamydia* *Bdellovibrio*, *Streptomyces*, *Caulobacter*, myxobakterie....

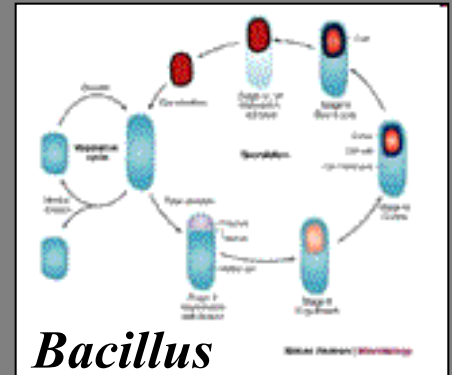
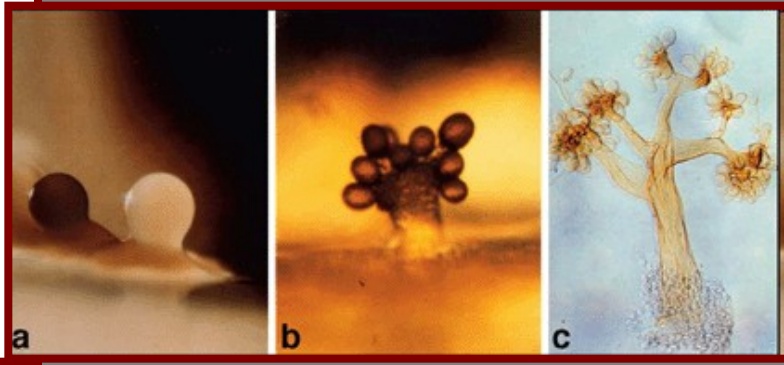
Mění se nejen vzhled buňky, ale buňka v cyklech prochází typickou změnou vnitřních struktur.

Buněčný cyklus  
*Caulobacter crescentus*





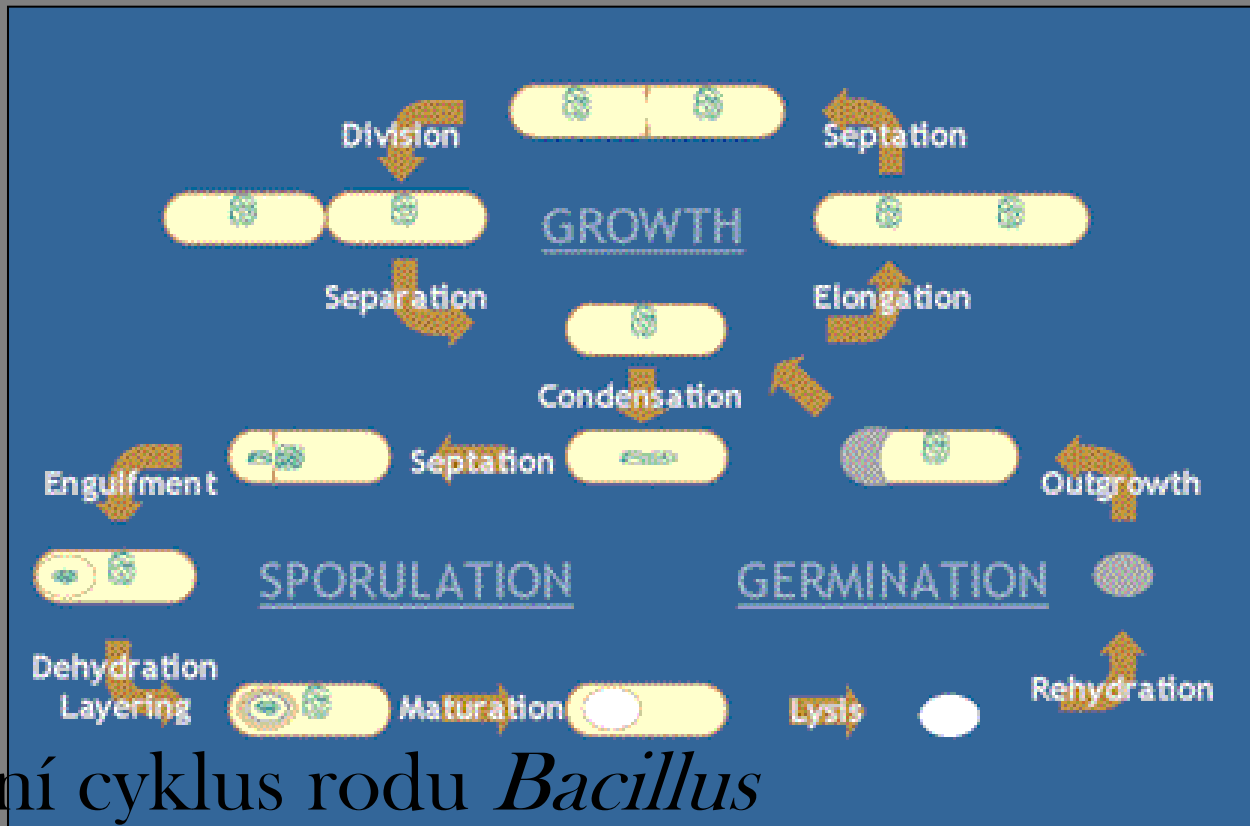
**Myxobakterie**



***Bacillus***



# Morfologie buňky vprostřed buněčného cyklu



## Životní cyklus rodu *Bacillus*

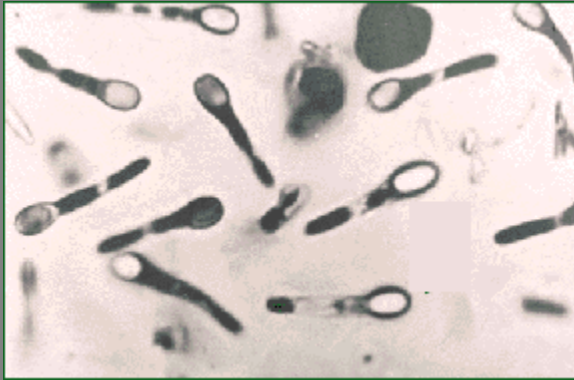
- u některých jeho druhů i u jiných rodů navíc různá barvitelnost

Gramem při různém stáří buněk - až gramlabilní

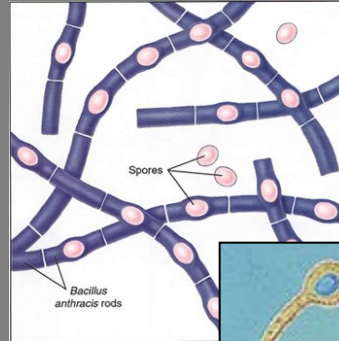
→ při popisu preparátu nutno uvažovat stáří buněk!

## 2) Vytváří posuzovaný druh endospory?

- v preparátu pak mohou měnit tvar buněk!



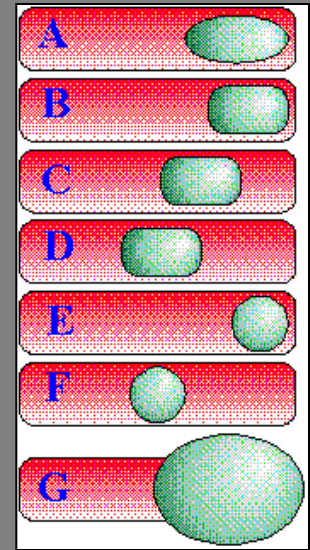
*Clostridium difficile*



*Bacillus anthracis*

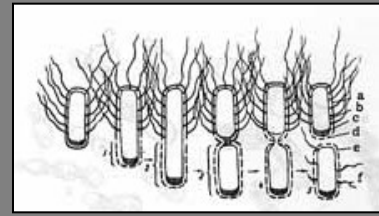


*Clostridium tetani*



„Voják umírající na tetanus“  
Sir Charles Bell  
lukovité prohnutí zad (opisthotonus)  
křečovitý výraz  
Originál je k vidění:  
Royal College of Surgeons  
of Edinburgh, Scotland.

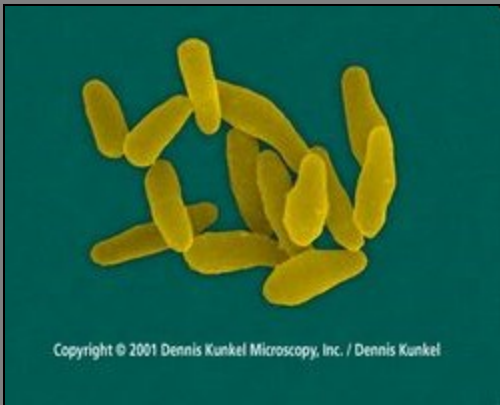
3) Stárnutím mění buňky tvar



4) Závislost tvaru buňky na vnějším prostředí

- živiny, tlak, osmolarita...

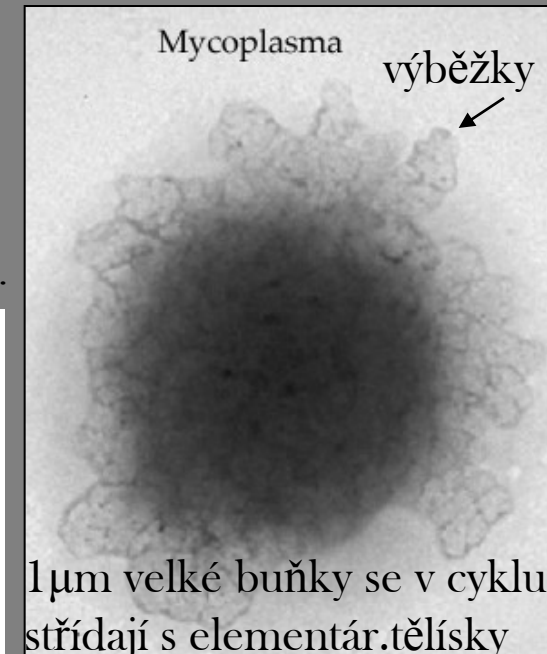
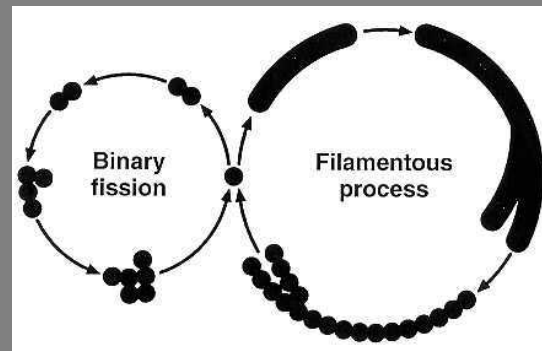
5) pleomorfní buňky - př. rody *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Haemophilus*, *Mycoplasma*



Copyright © 2001 Dennis Kunkel Microscopy, Inc. / Dennis Kunkel

*Corynebacterium*

Pleomorfní mykoplazmata:  
nejmenší bakteriální  
buňky (0,2 - 0,3  $\mu\text{m}$ );  
bez buněčné stěny! Poté:  
Nepůsobí betalaktamy  
Osmoticky stabilní v host.b.



# Morfologie bakt. kolonií

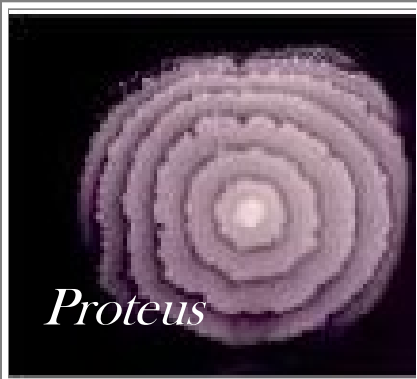
- potřeba zvážit typ media, ne kterém kolonie hodnotíme!  
kultivace - zda vůbec kultivovatelné?? - sledování typu kolonií

Př: sledování morfologie kolonií

- univerzální media, jiný vzhled na selektivním - zda vůbec růst či ne? barevná reakce?)

S-, R- a M-formy

sledování pohybu terasovitě kolonie (Př: *Proteus*)

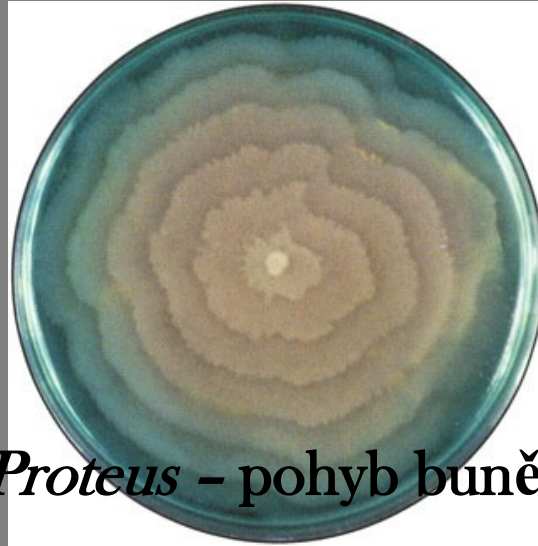


# Morfologie bakteriálních kolonií

## I. na základních půdách



*Nocardia*



*Proteus* – pohyb buněk



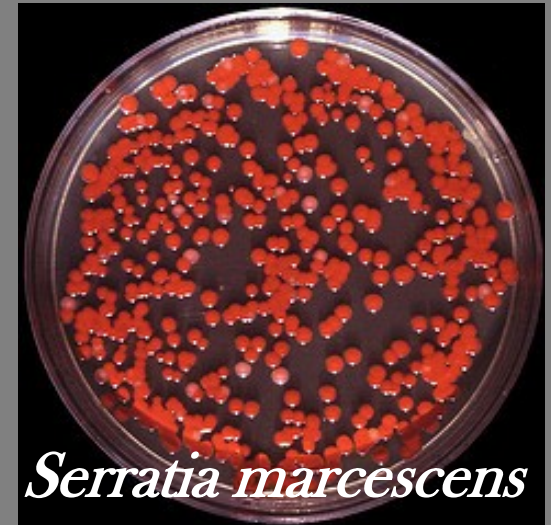
*Bacillus mycooides*



*Streptomyces*



*Streptomyces*



*Serratia marcescens*

*E.coli* na agaru EMB (Eosin Methylene Blue Agar)

Bakteriální kolonie na  
II. diagnost. půdách



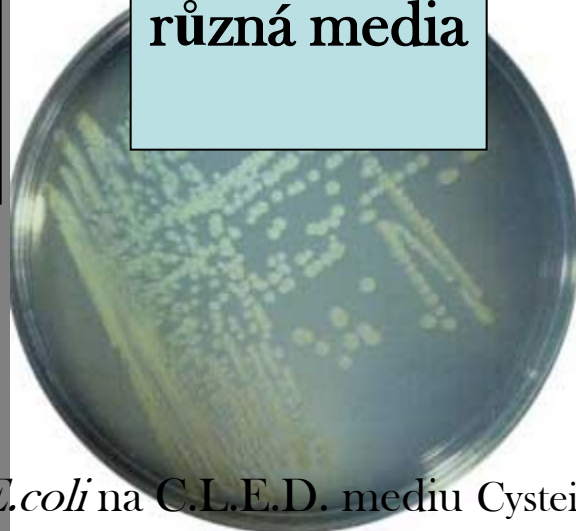
Jeden druh  
bakterie  
různá media



*E.coli* na krevním agaru



*E.coli* na MacConkey agaru



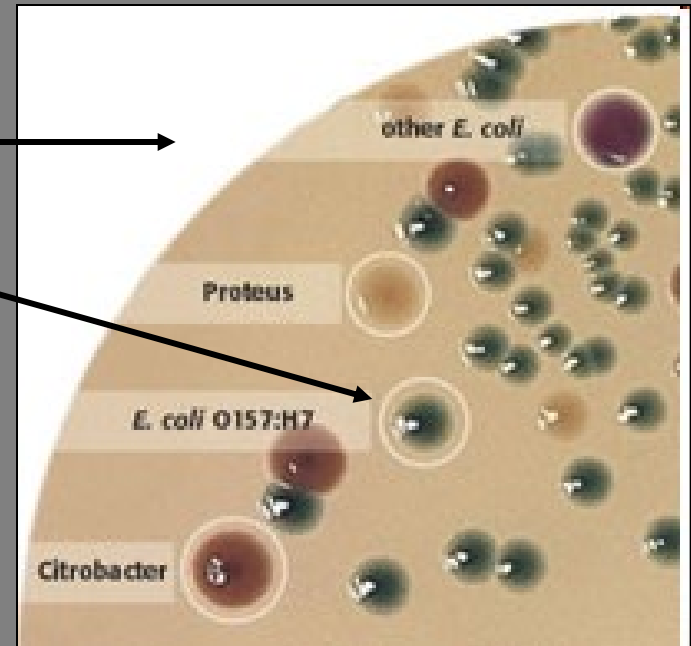
*E.coli* na C.L.E.D. mediu Cysteine Lactose Electrolyte Deficient Agar



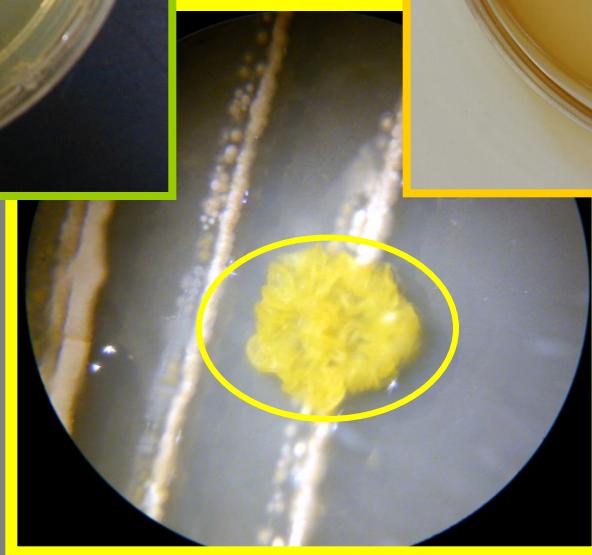
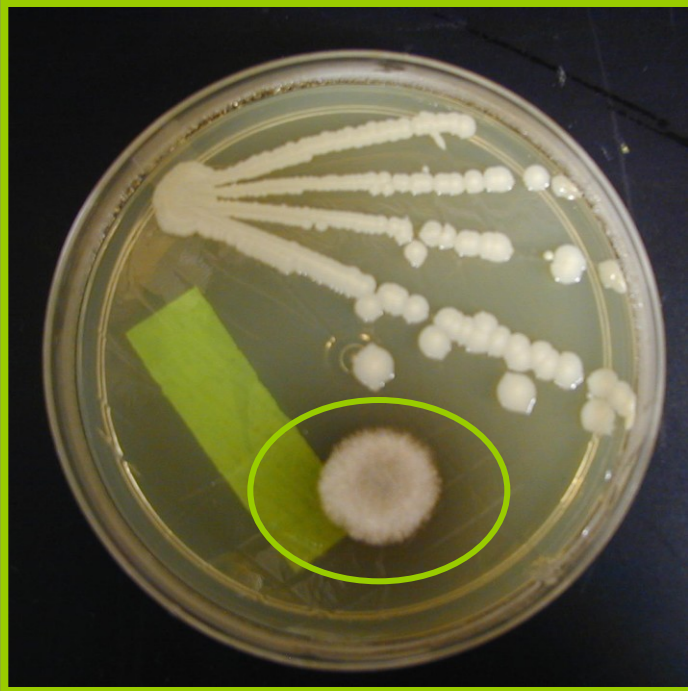
## Bakteriální kolonie na III. selektivních půdách

**O157:H7 ID Agar**

medium selektivní až na kmen!  
Detekce kmene *E. coli* O157:H7  
proti jiným kmenům *E. coli*



# Kontaminace na misce!





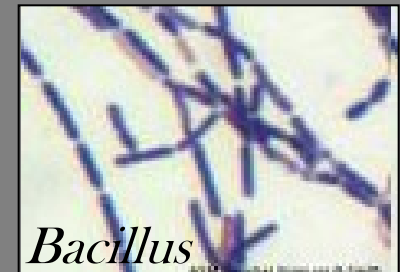
# Morfologie charakteristických shluků buněk

- typické shluky napomáhají identifikaci

řetízky koků: *Streptococcus*



řetízky bacilů: *Bacillus*

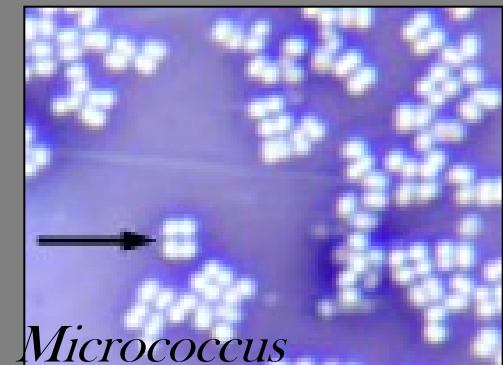
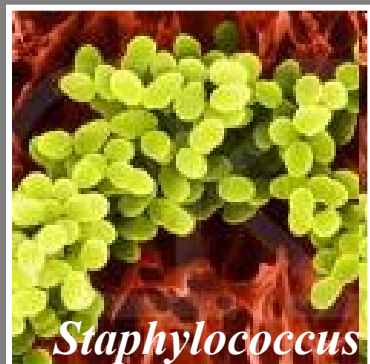


palisády: *Corynebacterium*

tetrády koků: *Micrococcus*

balíčky = sarciny *Sarcina*

hrozníčky: *Staphylococcus*



### Suchý objektiv:

Paprsek vystupující z preparátu pod úhlem  $\alpha$  se na rozhraní mezi krycím sklíčkem a vzduchem láme od kolmice a nemůže se již podílet na tvorbě obrazu.

menší index lomu

menší numerická apertura

vyšší rozlišovací mez

$n = 1$

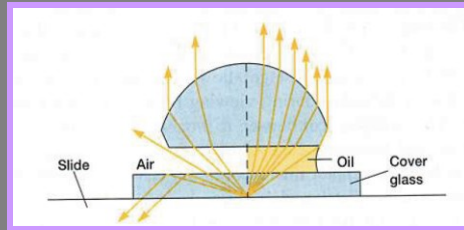
$$NA = \max 1$$

Pro žlutozelené světlo:

$$\lambda = 550 \text{ nm}$$

$$NA = 0,95$$

$$\text{Rozlišovací mez} = 0,6 \mu \text{ m}$$



Rozlišovací mez

$$\delta = \lambda / n \cdot \sin \alpha$$



R. Hook - po 1.olejová lampa  
Kapalina zvyšuje účinek  
světla

### Imerzní objektiv:

Paprsek přecházející ze skla do imerzního prostředí svůj směr nemění a může se podílet na tvorbě obrazu.

Imerzní prostředí - kapalina o stejném  $n$  jako krycí sklíčko.

Často cedrový olej ( $n = 1,52$ ).

Imerze umožňuje korigovat některé opt. vady mikroskopu.

větší index lomu

vyšší úhel  $\alpha$

vyšší numerická apertura

nižší rozlišovací mez

$$NA = 1,2 - 1,4$$

žlutozelené světlo:

$$\text{Rozlišovací mez} = 0,4 \mu \text{ m}$$

# Jasně pole – barvené preparáty

- pozorování světelným mikroskopem
- max zvětšení 1500krát, max rozlišení 200 nm
- pozorování pod imerzí – mokré pracovní prostředí umožňuje větší zvětšení, zvyšuje numerickou aparaturu, soustřeďuje světelné paprsky

# Gramovo barvení

Slouží pro rozlišení G+, G- a pro určení tvaru buněk samotných (koky, kokotyčky, tyčky, spirily, pleomorfní buňky, vlákna) a také jejich uspořádání do charakteristických útvarů (balíčky, řetízky bacilů i koků, tetrády, sarciny)

**Grampozitivní** – tmavě fialové až modročerné zbarvení - komplex barviva a jódu není vyplaven

**Gramnegativní** – červené nebo růžové zbarvení - komplex barviva a jódu je odbarven etanolem nebo acetonem a buňky jsou **dobarveny safraninem**

# *Micrococcus luteus* CCM 169

**-Grampozitivní kok**

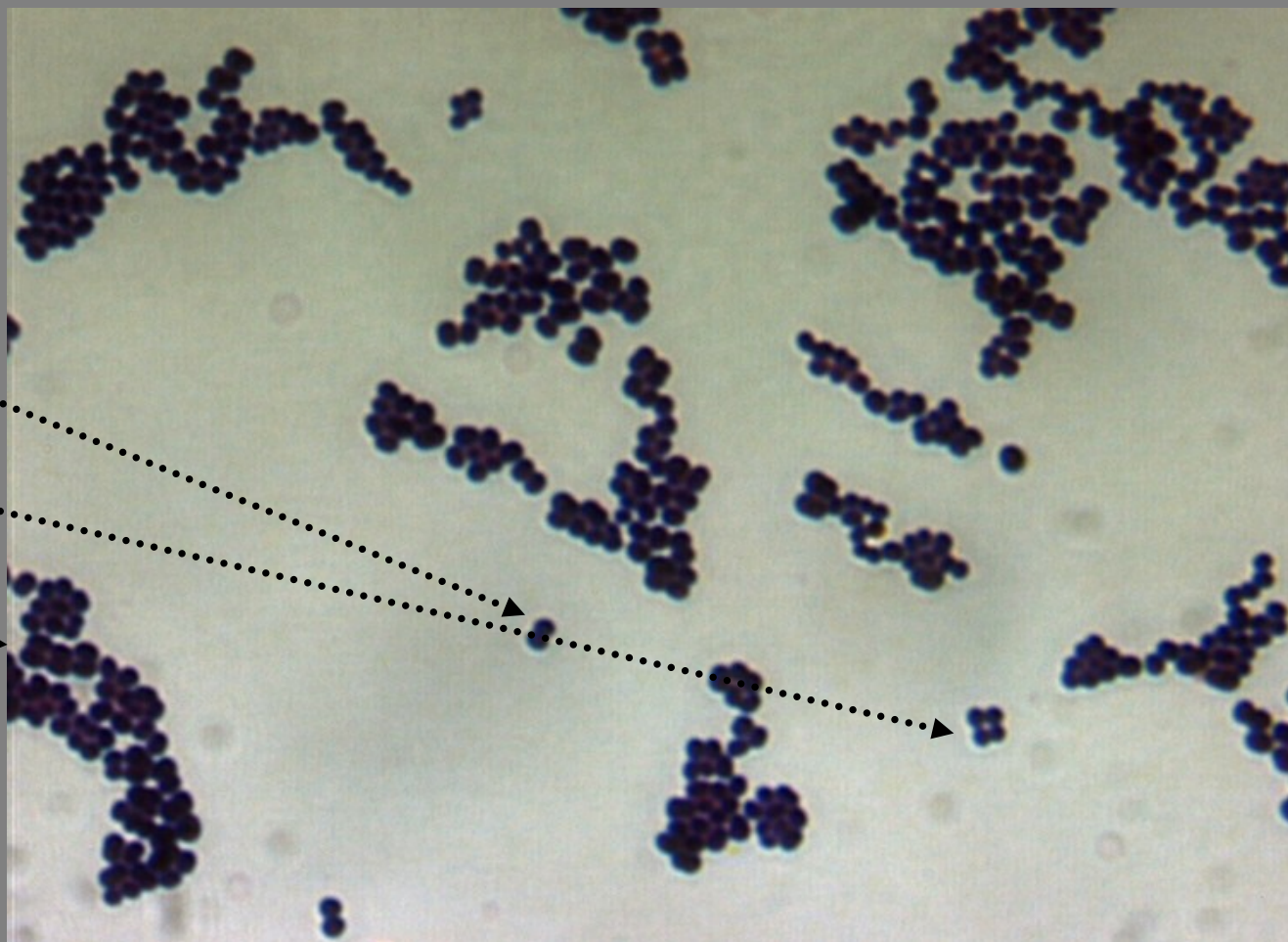
zv. 1000

Preparát:

DVOJICE

ČTVEŘICE

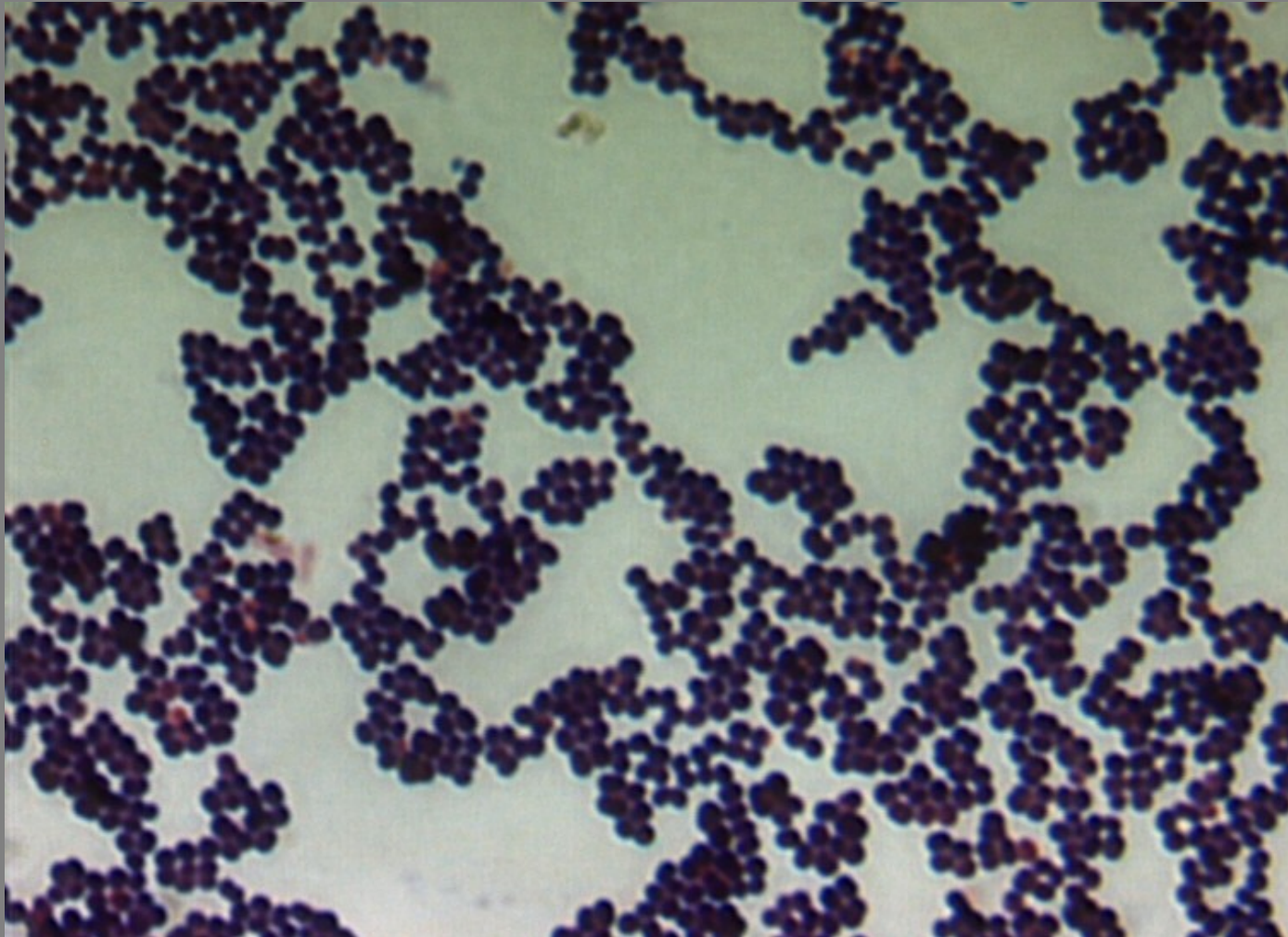
SHLUKY



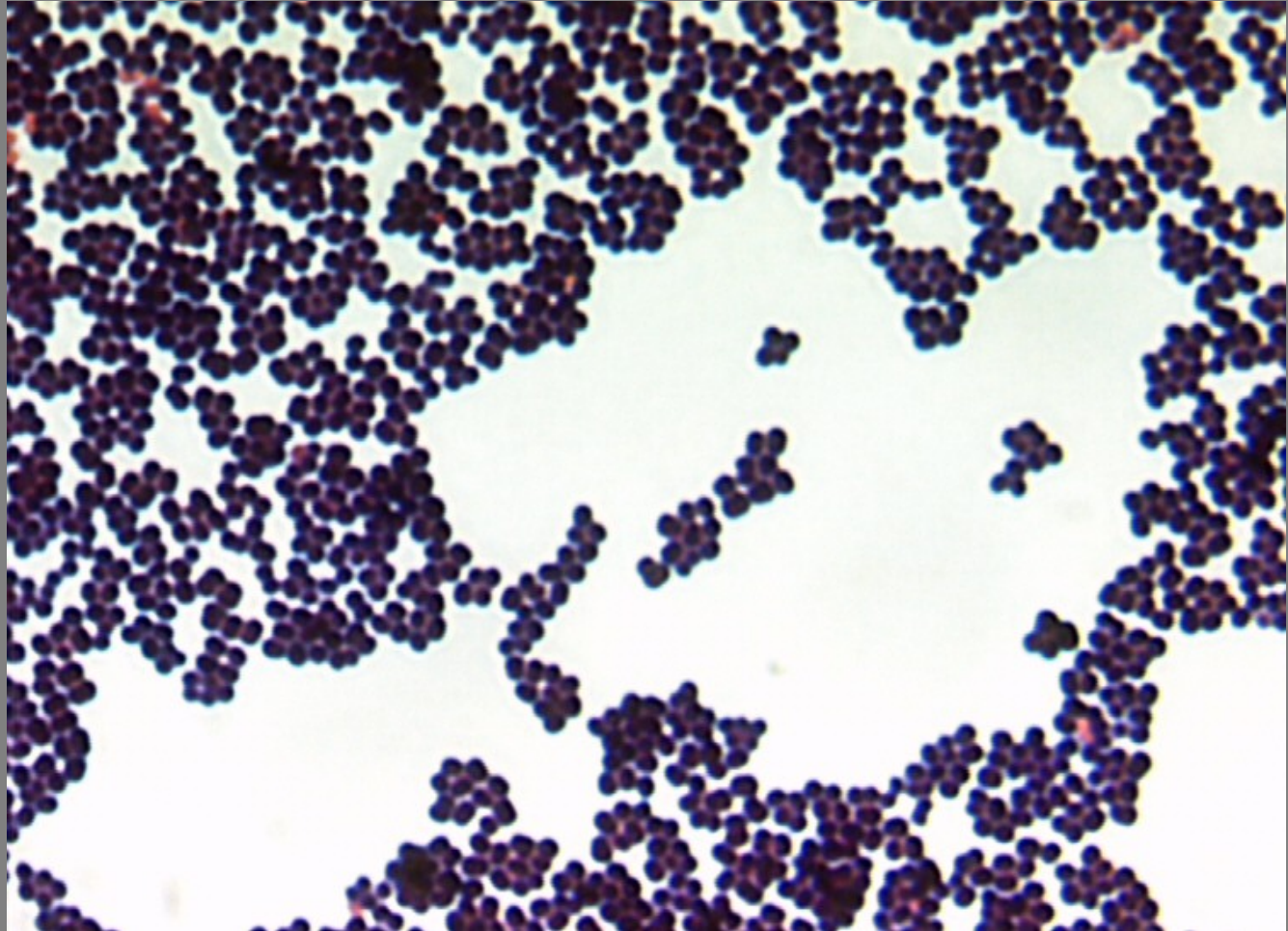
Jaké bakteriální rody Gramovým barvením neobarvíme? Jedná se o rody bez buněčné stěny (mykoplazmata), spirálovité bakterie, dále o silně acidorezistentní rody (např. mykobakteria):

- *Borrelia burgdorferi* (fig [1](#), [2](#))
- *Borrelia recurrentis* (fig [1](#))
- *Bartonella henselae* (fig [1](#), [2](#))
- *Chlamydia trachomatis* (fig [1](#), [images of elementary bodies](#), [images of reticulate bodies](#))
- *Chlamydophila pneumoniae* ([images of elementary bodies](#), [images of reticulate bodies](#))
- *Chlamydophila psittaci* ([images of elementary bodies](#), [images of reticulate bodies](#))
- *Coxiella burnetii* (fig [1](#), [2](#))
- *Ehrlichia chaffeensis* (fig [1](#), [2](#))
- *Anaplasma phagocytophilum* (formerly; *Ehrlichia phagocytophilum* or *E. equi*; Fig. [1](#))
- *Legionella* sp. (fig [2](#))
- *Leptospira* sp. (fig [1](#), [2](#))
- *Mycobacterium bovis* (fig [1](#))
- *Mycobacterium tuberculosis* (fig [1](#), [2](#) thanks to Anders Olav Lande, [3](#))
- *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* (fig [1](#) thanks to Anders Olav Lande)
- *Mycobacterium kansasii* (fig [1](#))
- *Mycobacterium leprae* (fig [1](#), [for a close up](#) thanks to Anders Olav Lande)
- *Mycobacterium marinum* (fig [1](#))
- *Rickettsia rickettsii* (Fig. [1](#): scroll down to bottom of the page. [2](#))
- *Orientia tsutsugamushi* (formerly; *Rickettsia tsutsugamushi*; Fig. [1](#))
- *Treponema pallidum* (fig [1](#), [2](#), [3](#))

# ***Micrococcus luteus* CCM 169**



# ***Micrococcus luteus* CCM 169**

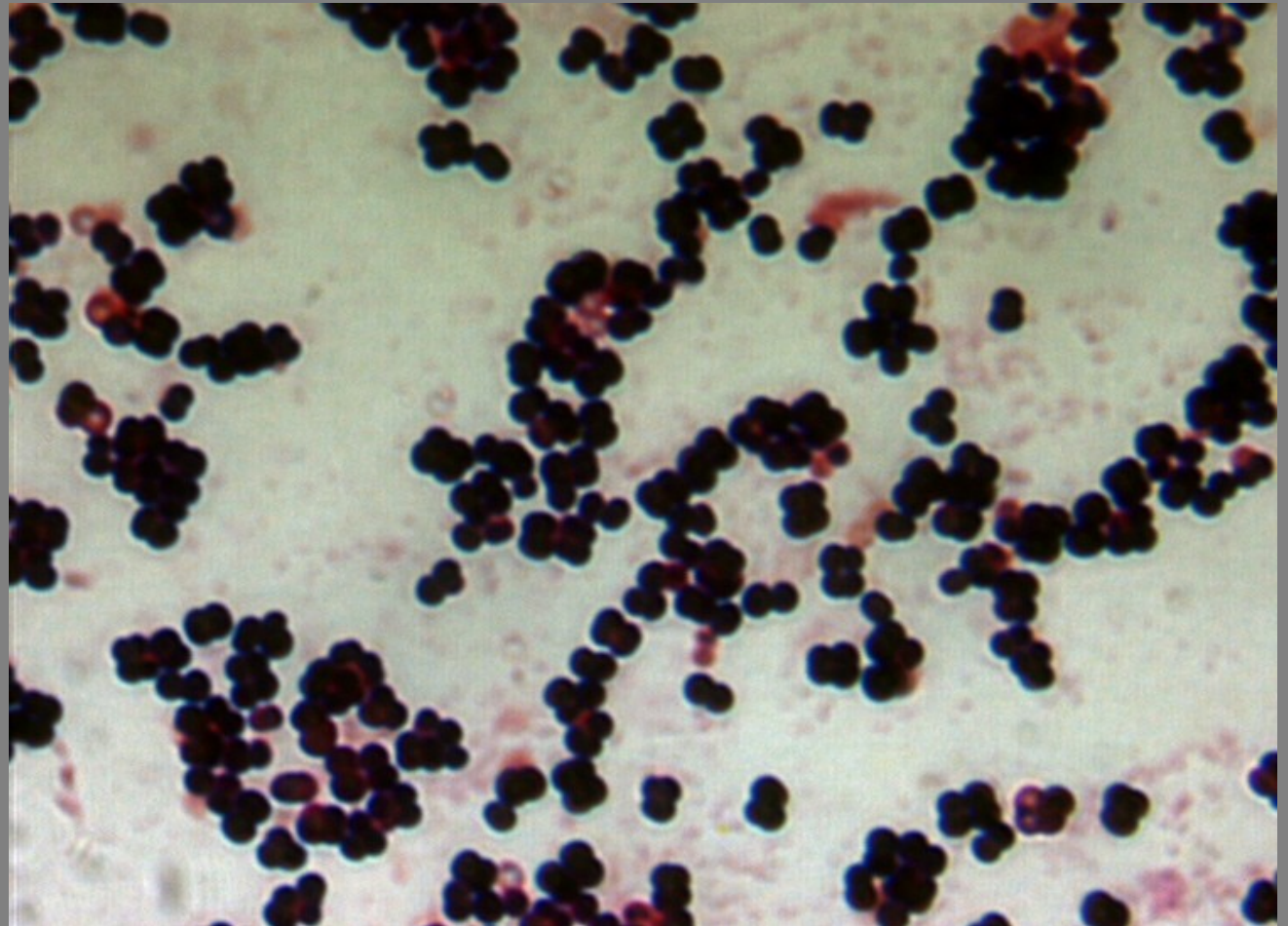




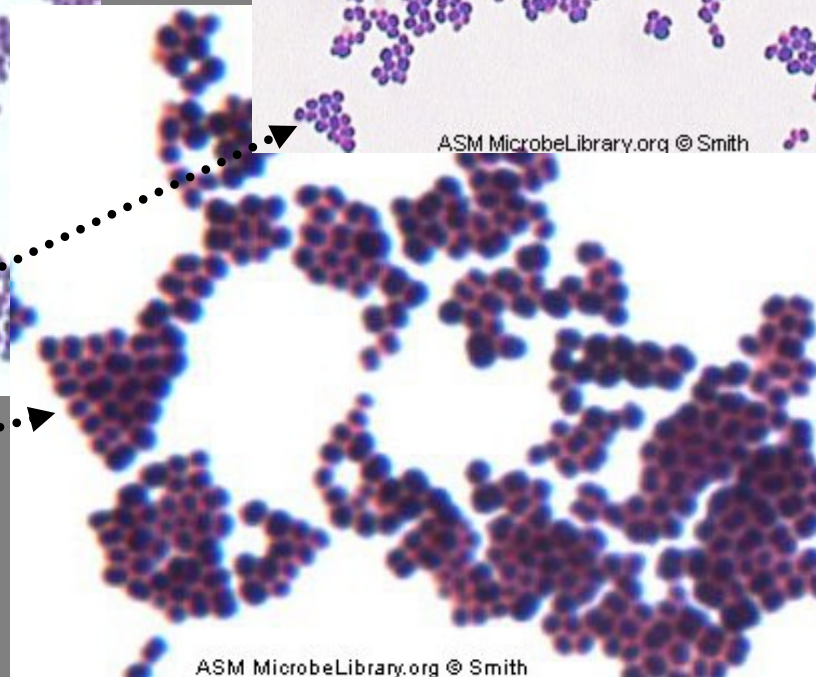
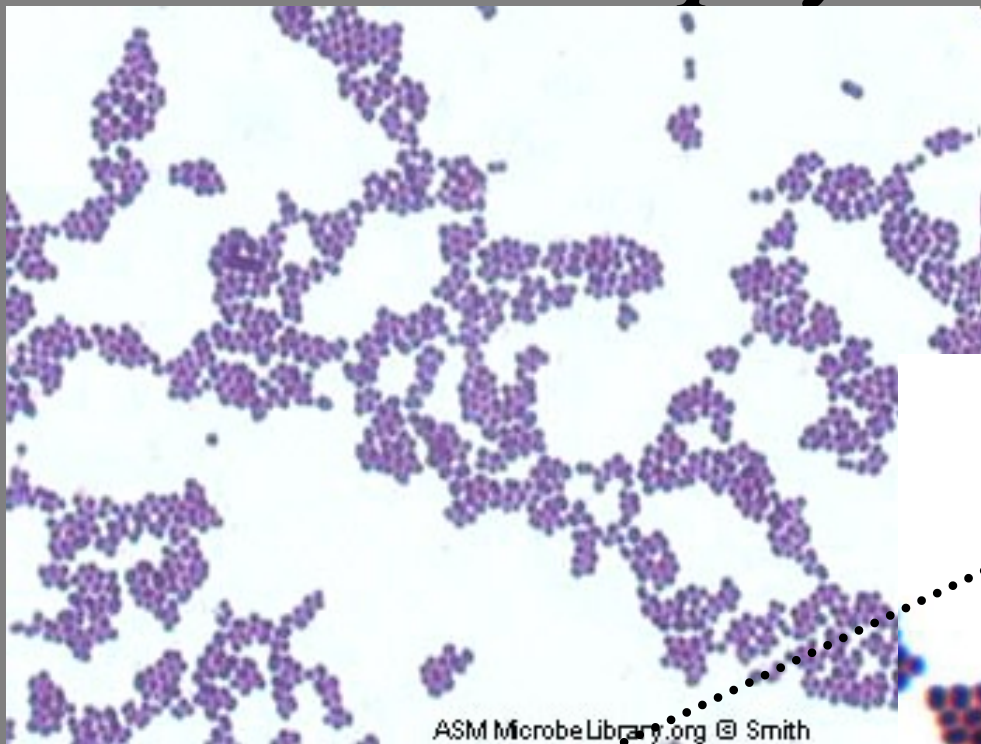
# *Sporosarcina ureae* CCM 860

G+ koky

Preparát:  
Sarciny  
(= balíčky  
po 8)  
Dvojice  
Shluky



# *Staphylococcus*

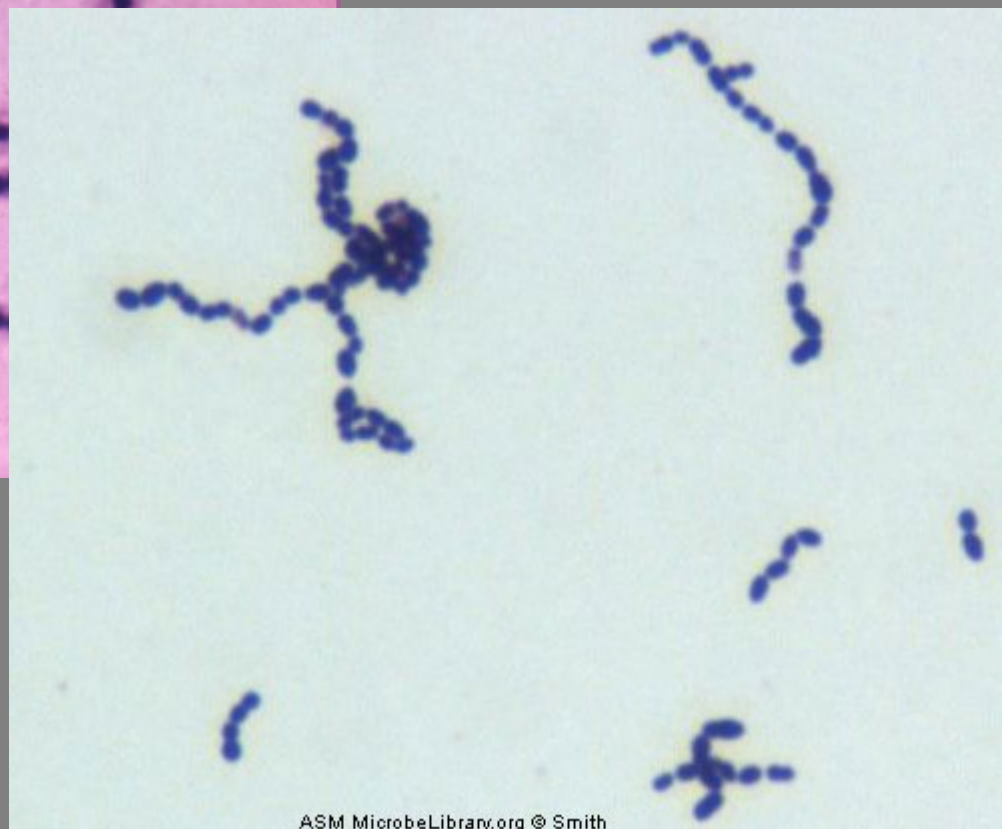
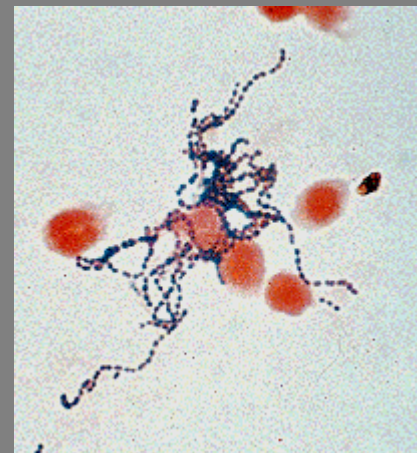
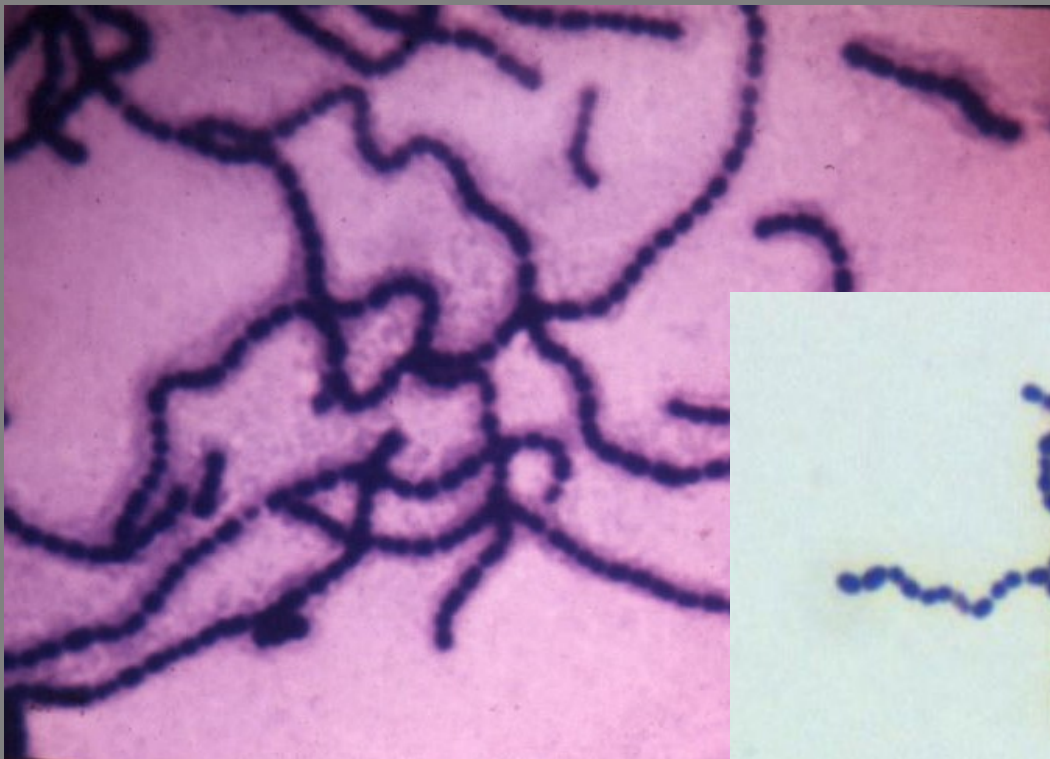


Jednotlivé buňky  
Dvojice  
Hrozníčky

Zdroj:

<http://www.microbelibrary.org/Gram%20Stain/details.asp?id=2028&Lang=>

# *Streptococcus*



Jednotlivé buňky  
Různě dlouhé řetízky

# *Bacillus cereus* CCM 2010

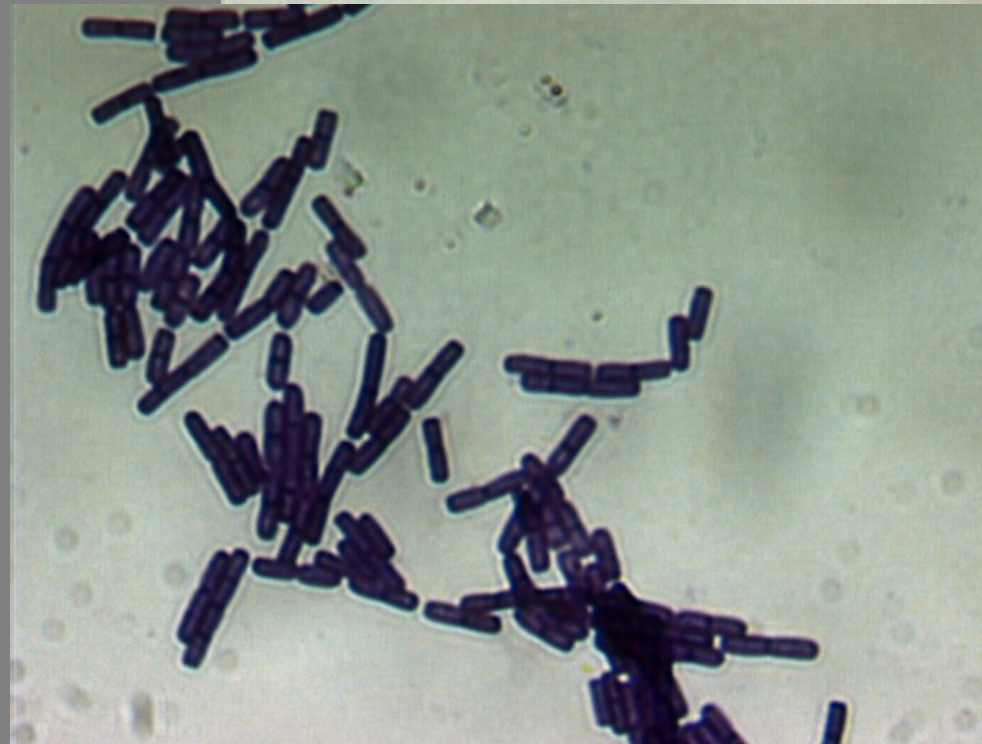
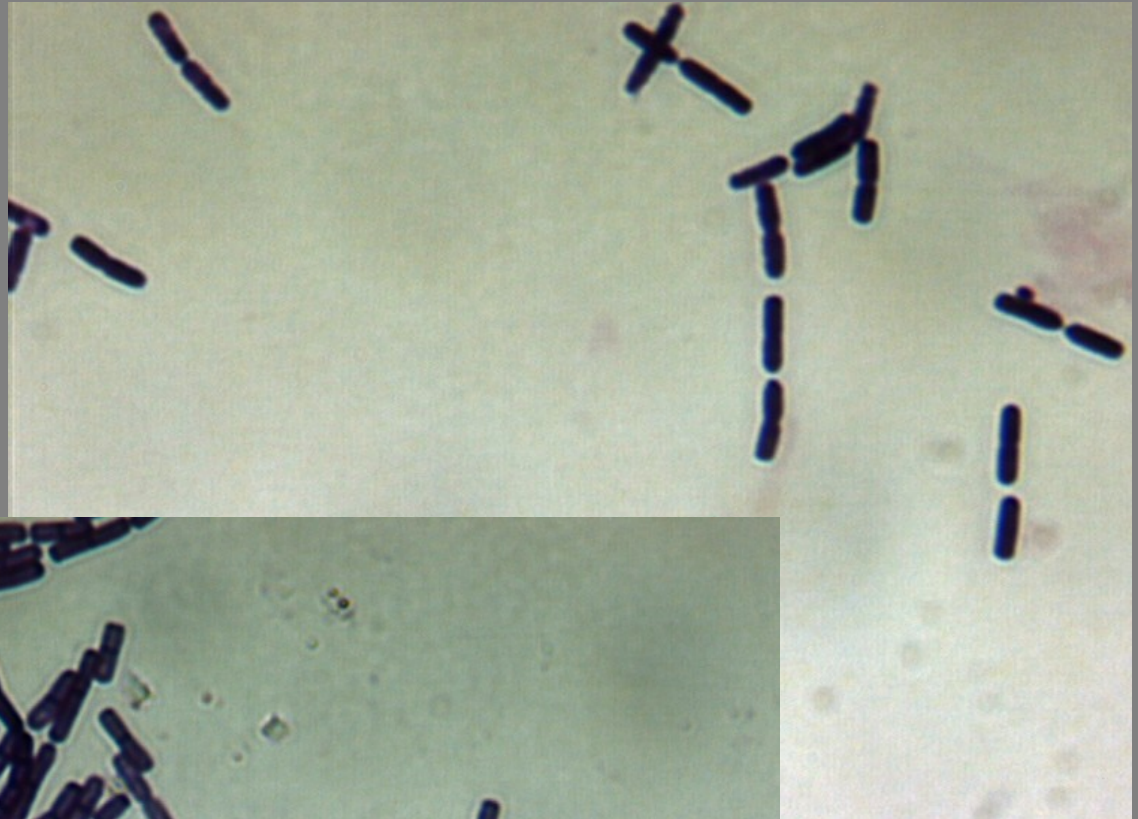
-Grampozitivní tyčka

zv. 1000

Preparát:  
DVOJICE

JEDNOTLIVÉ  
BUŇKY

ŘETÍZKY



# *Bacillus cereus* CCM 2010

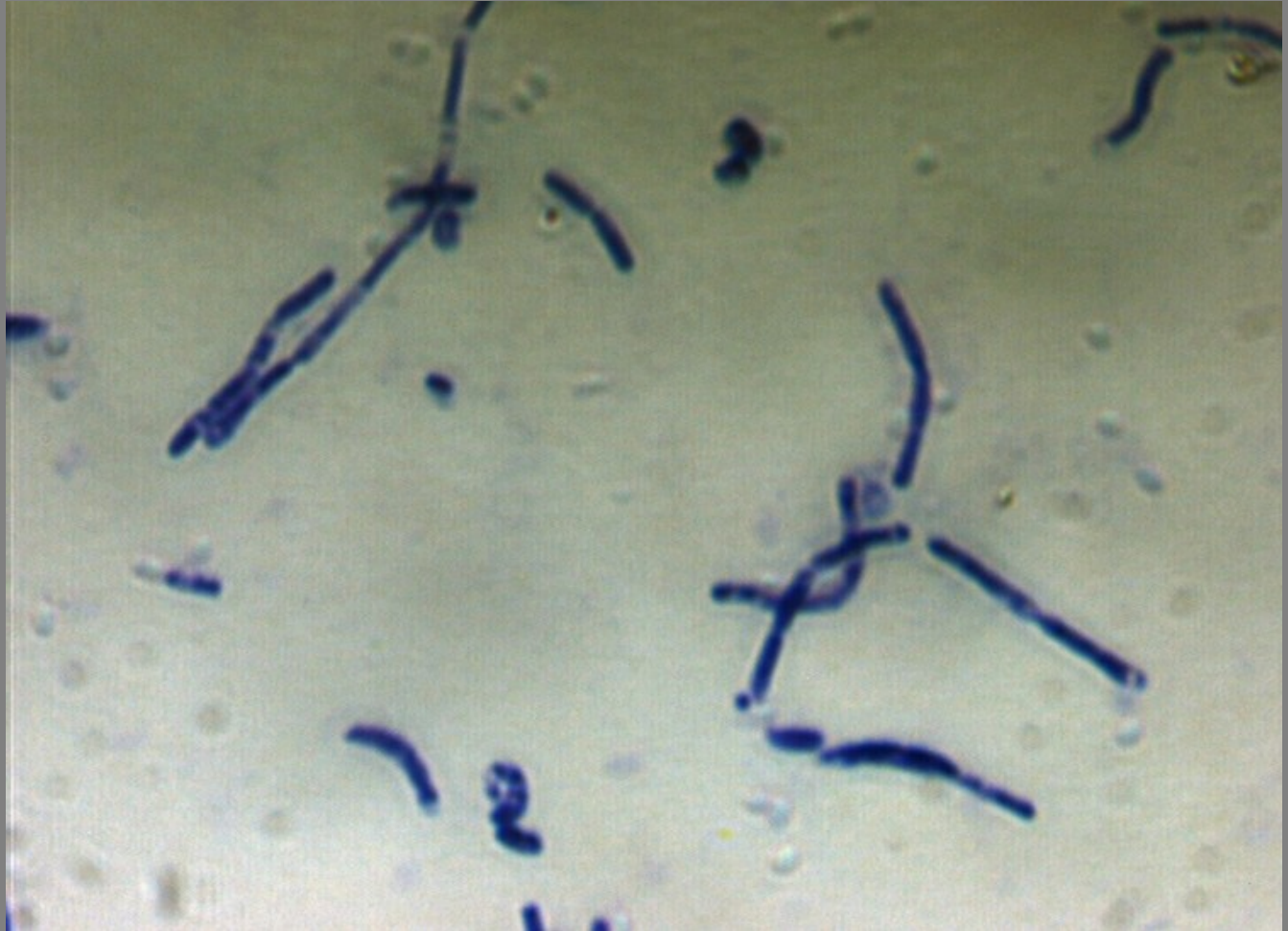


# *Bacillus megaterium* CCM 2007

Preparát:  
Jednotlivé  
buňky  
(velké)

Dvojice

Řetízky

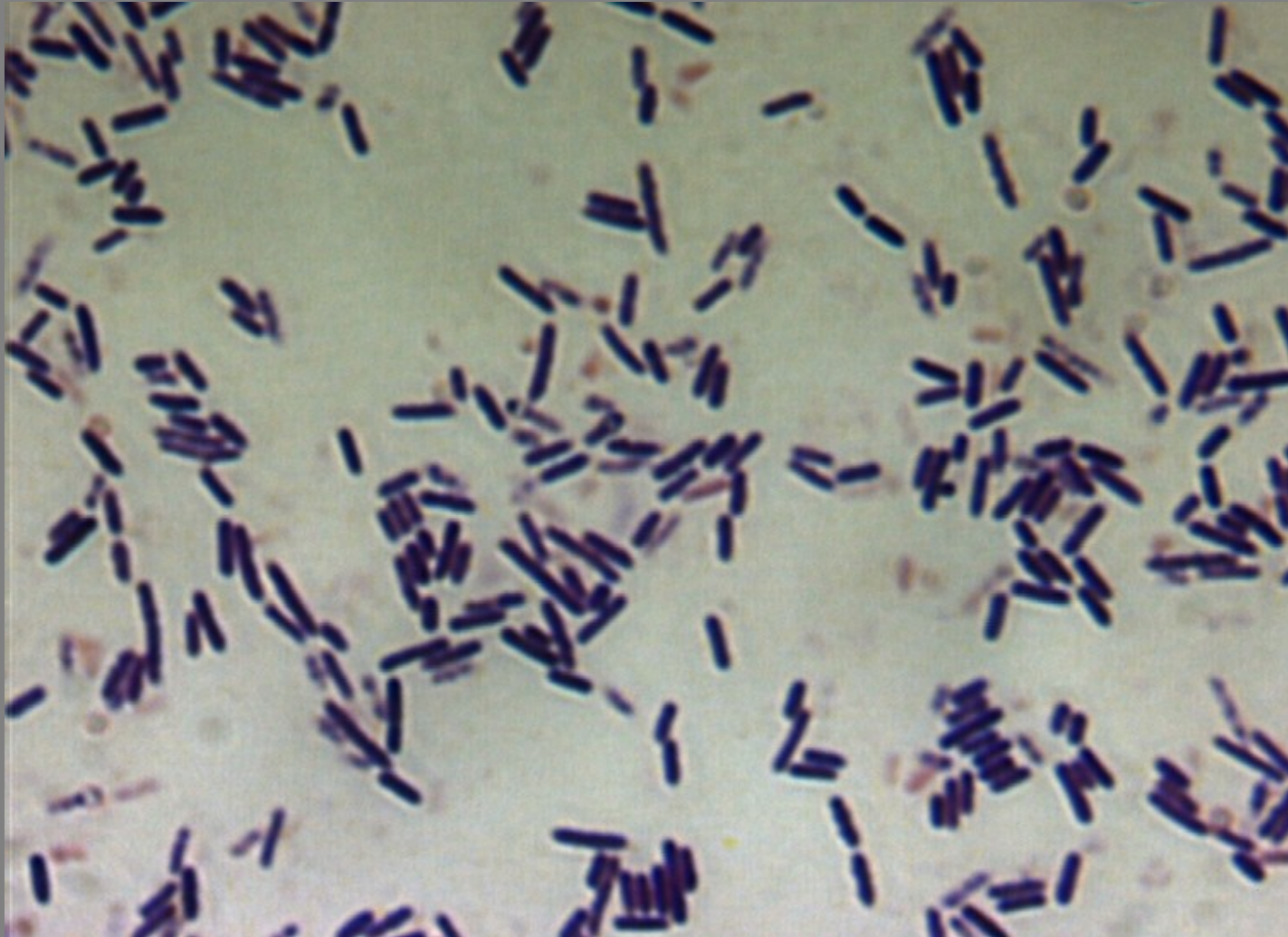


# *Bacillus thuringiensis* CCM 19



*Bacillus sphaericus* CCM 1615

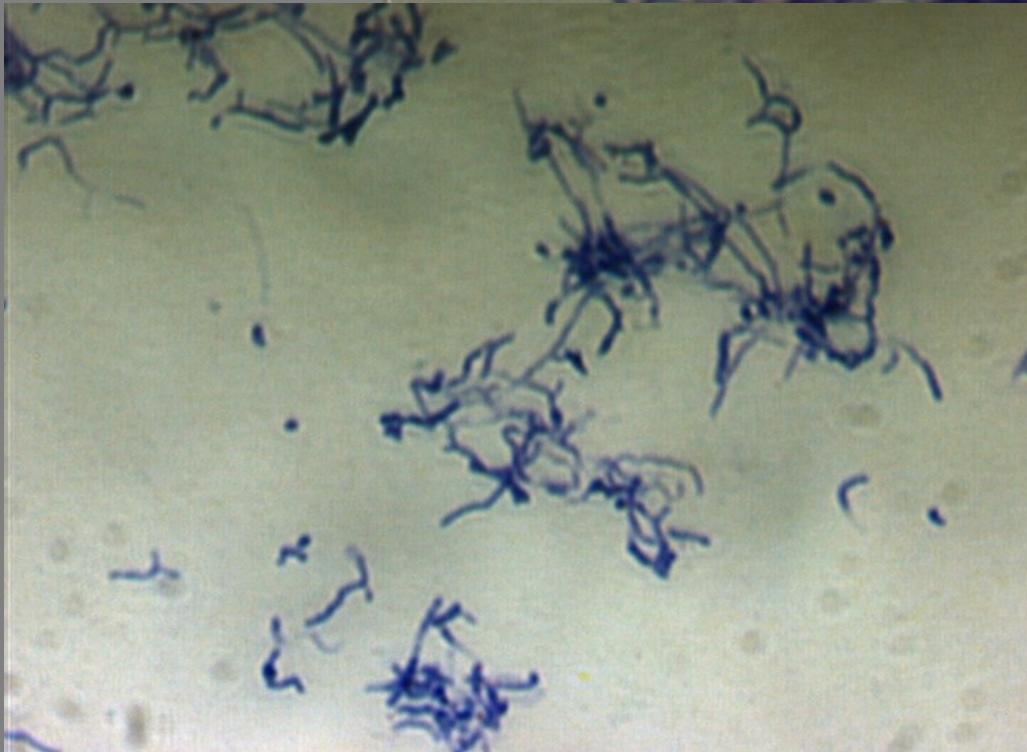
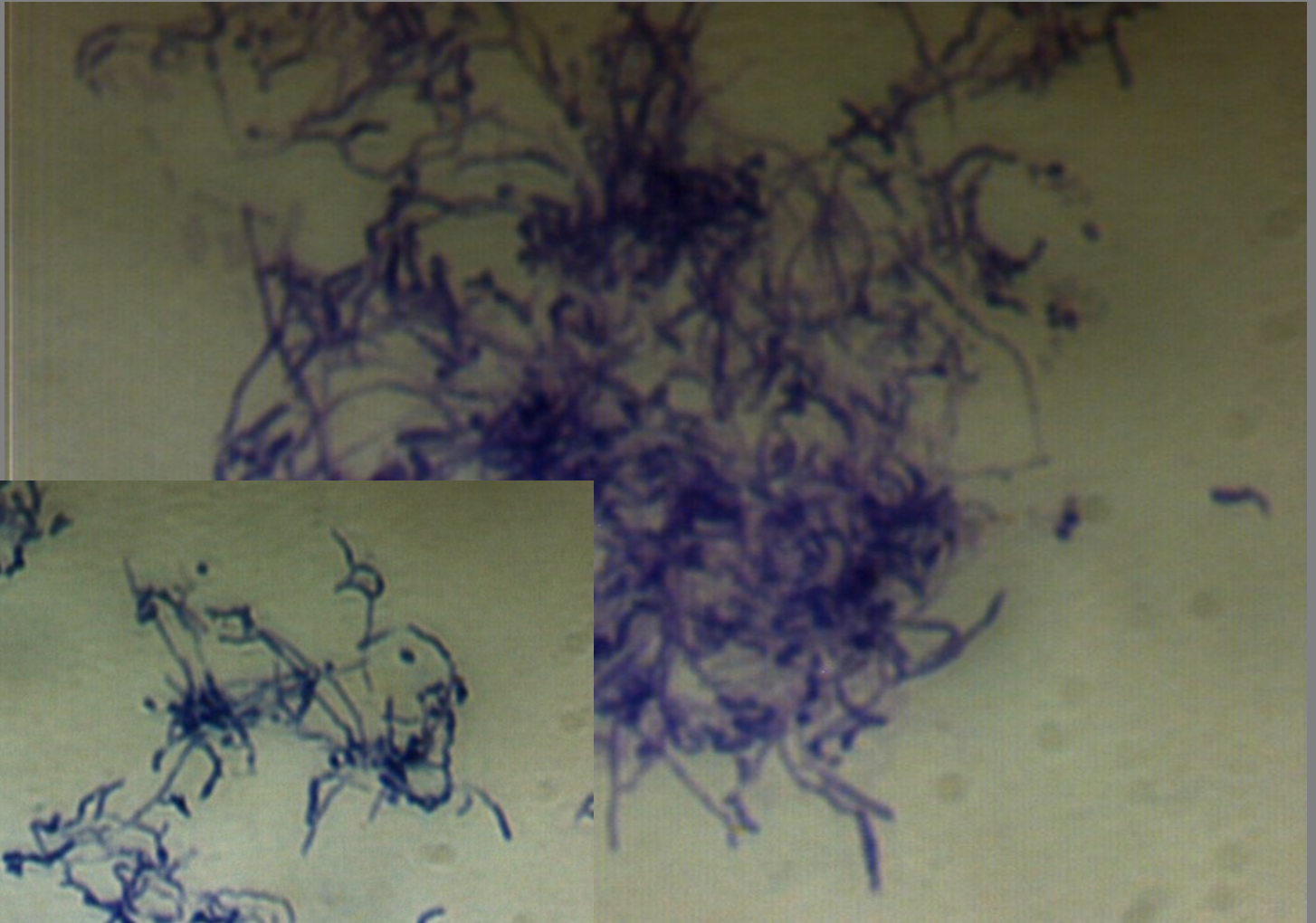
G+ tyčky





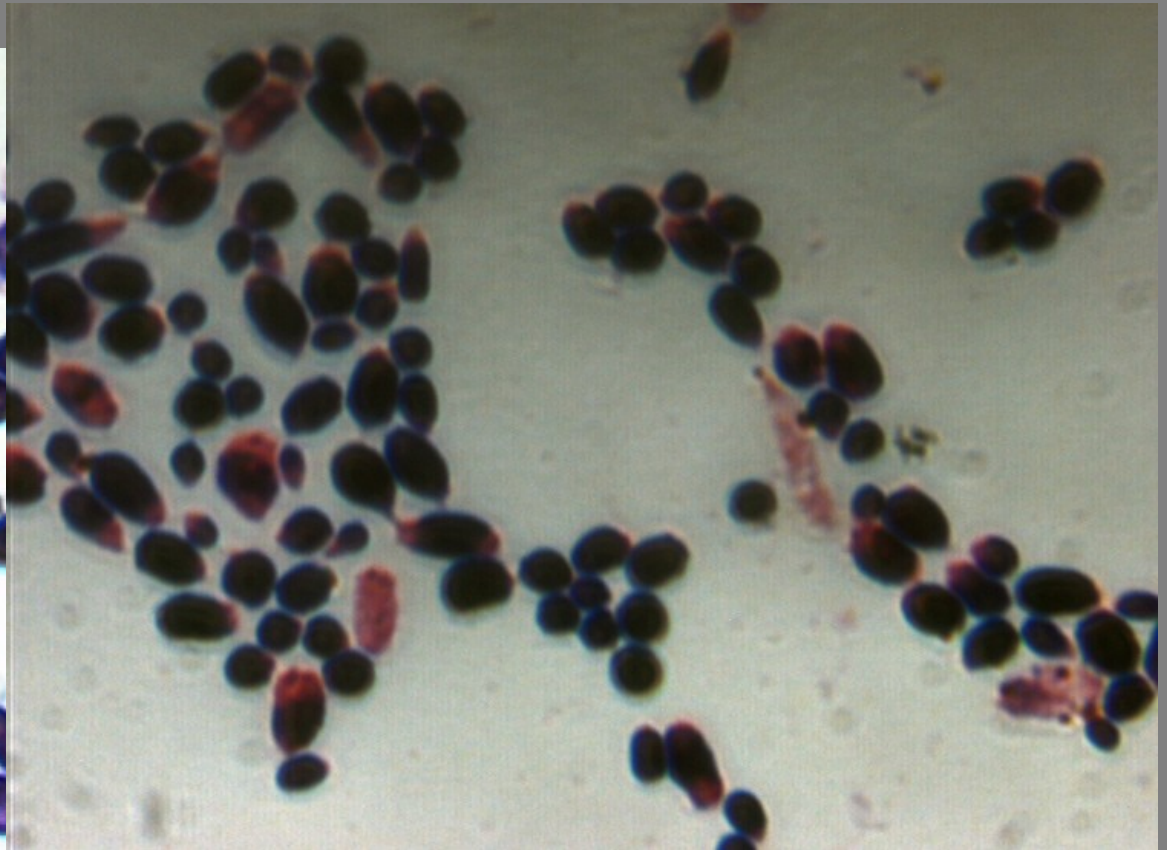
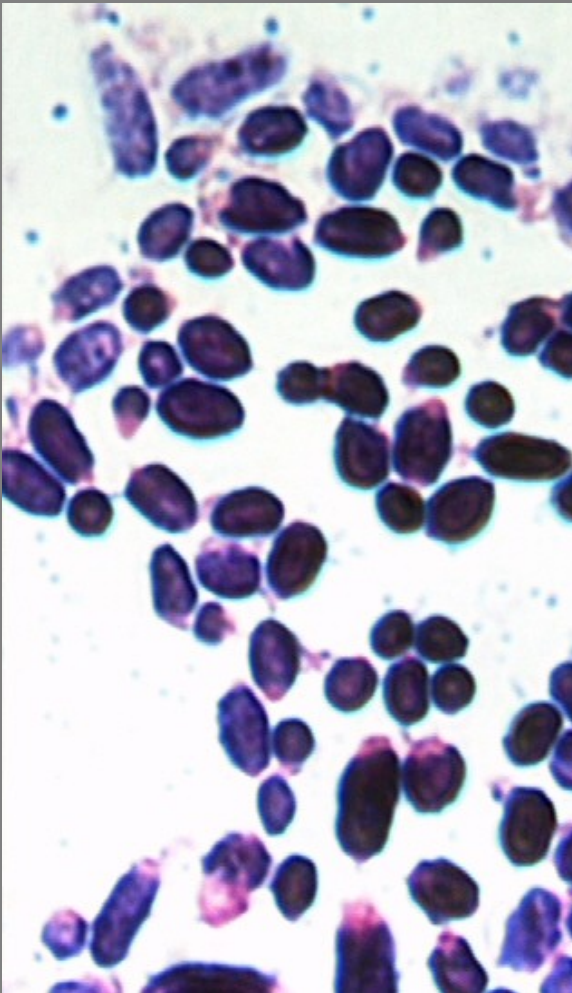
*Streptomyces griseus* ssp. *griseus* CCM 2386

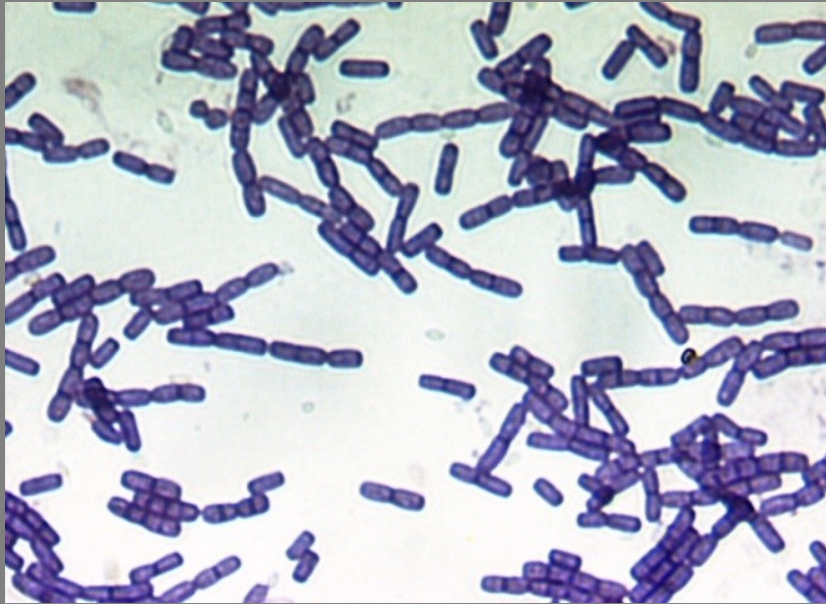
G+ vlákna  
zv. 1000×



*Saccharomyces cerevisiae* -

eukaryotický typ b., barví se grampozitivně!!

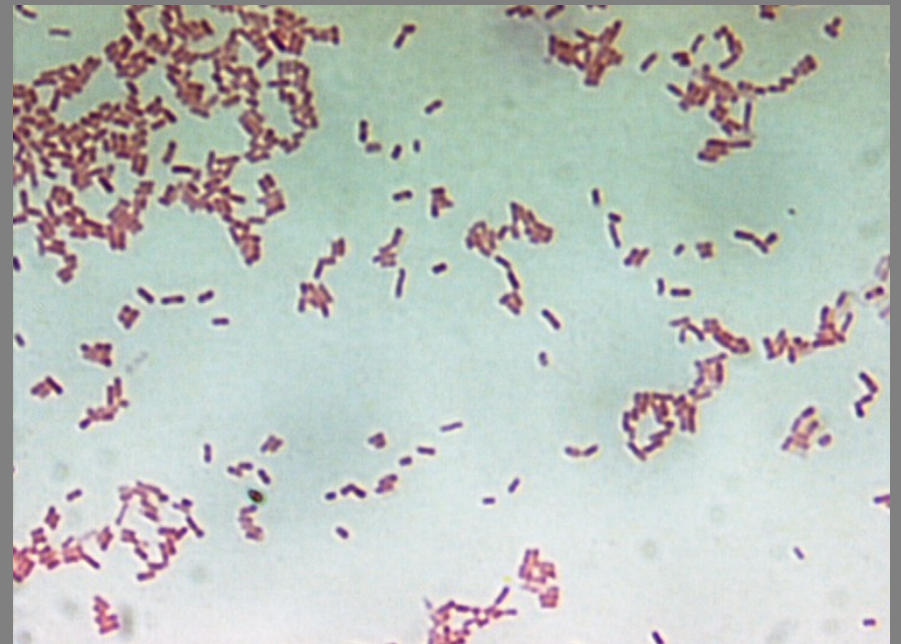




*Bacillus cereus* CCM 2010  
( G+ tyčky)

*Escherichia coli* ( G- krátké tyčky)

2-3 x 0,4-0,6  $\mu\text{m}$



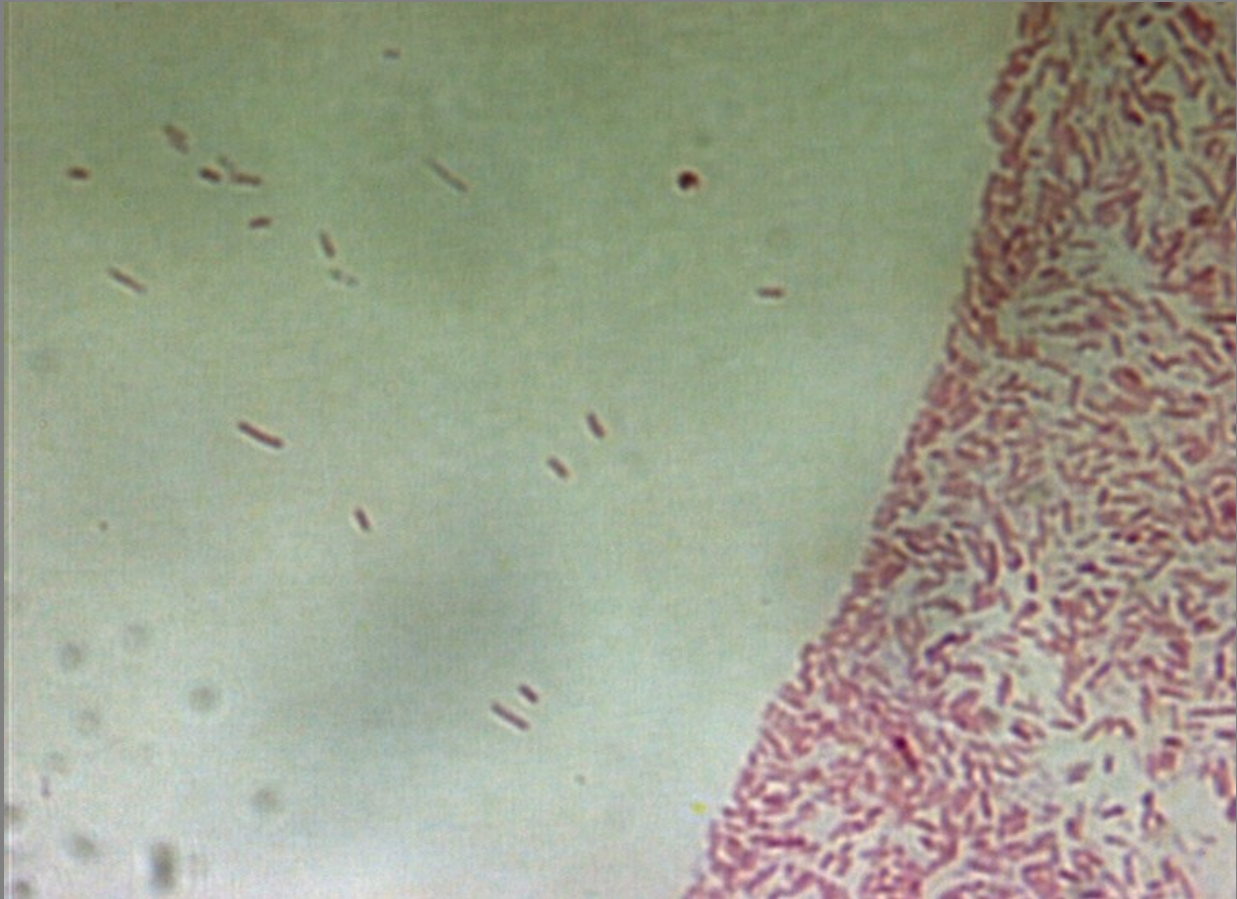
# *Serratia marcescens* CCM 303

-Gramnegativní tyčka

zv. 1000

Preparát:

Jednotlivé  
drobné  
tyčinky



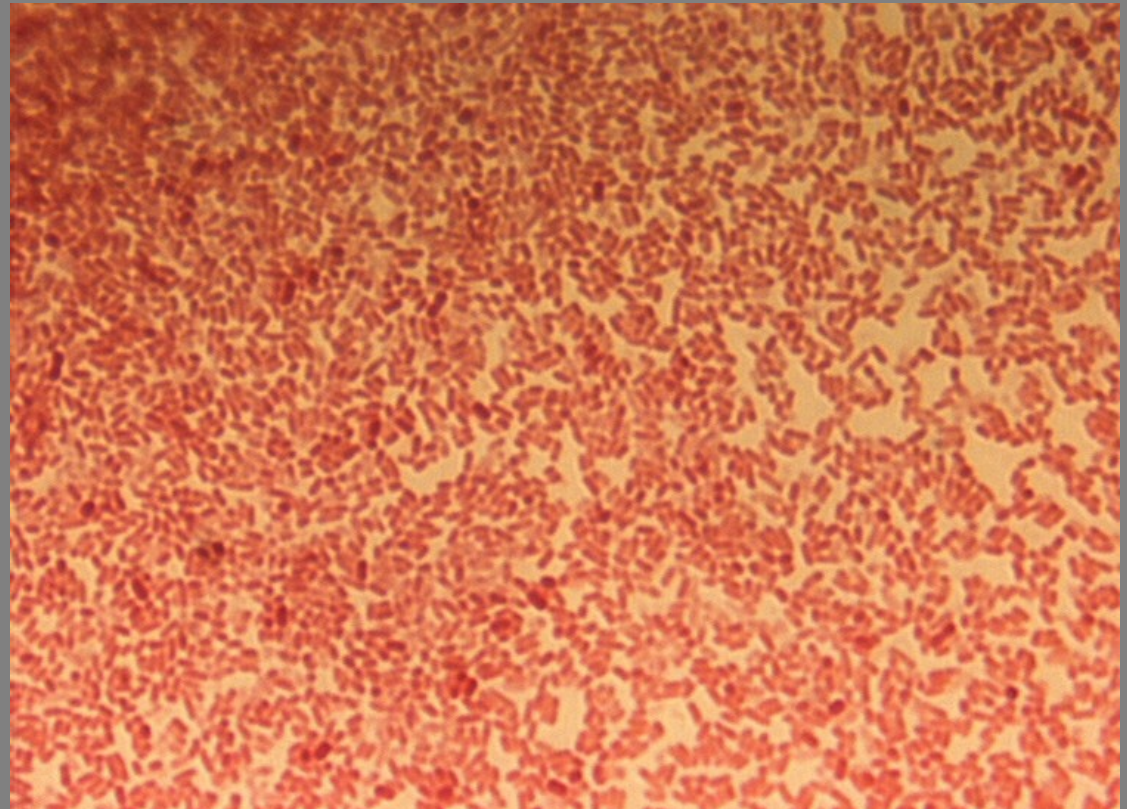
# *Serratia marcescens* CCM 303

Gramnegativní tyčka

zv. 1000×

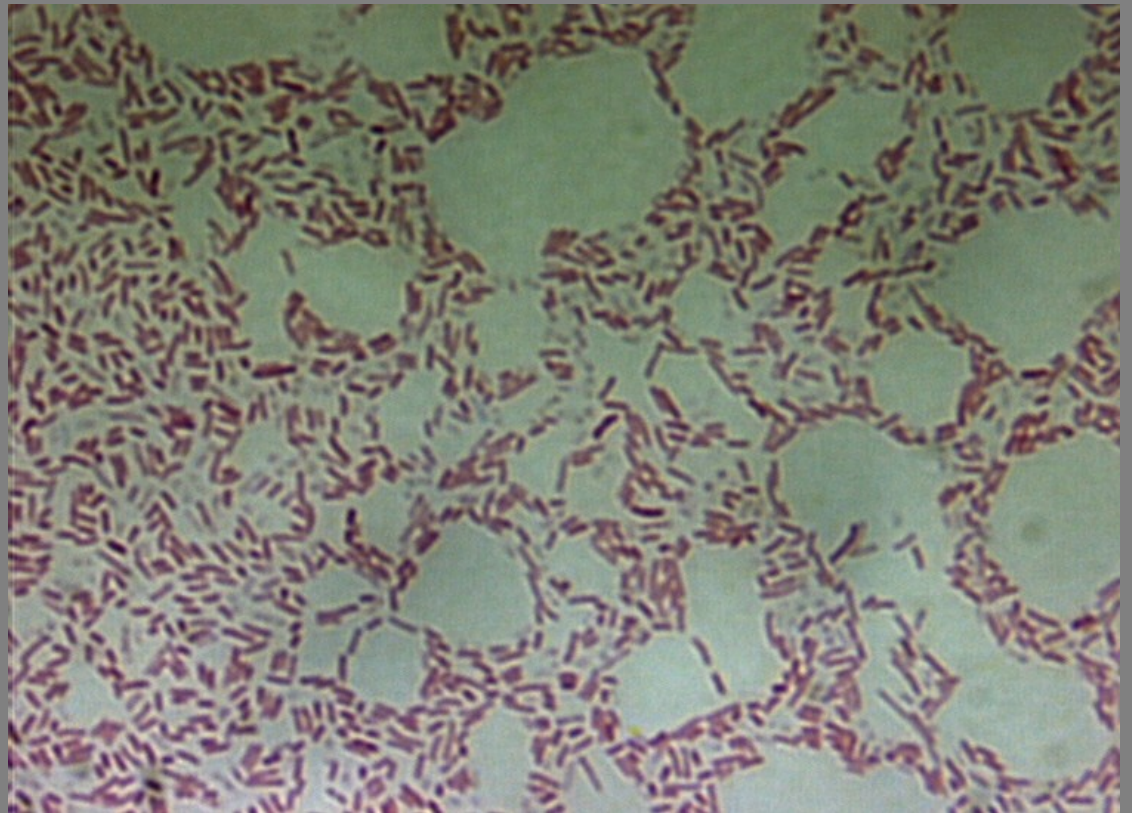
Preparát:

Jednotlivé  
drobné  
tyčinky



*Serratia marcescens* CCM 303

G- tyčka  
zv. 1000×



# *Pseudomonas fluorescens* CCM 2115

G- tyčky

