

# Pamatykim bakterijas mokykloje: mikrobiologinis dažymas ir imersinė mikroskopija

**j.m.d. Monika Šimoliūnienė**

Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyrius  
Biochemijos Institutas | Gyvybės mokslų centras | Vilniaus Universitetas  
[monika.simoliuniene@gmc.vu.lt](mailto:monika.simoliuniene@gmc.vu.lt)



# MOKYMŲ TEMOS

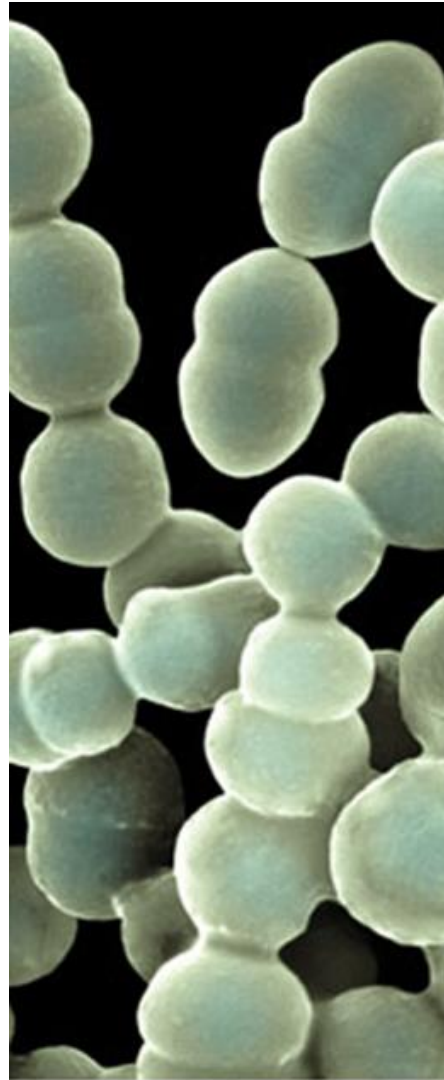
- Ląstelių morfologija
- Šviesinė mikroskopija (imersija)
- Fiksuoti mikroorganizmų preparatai
  - paprastasis ląstelių dažymas
  - dažymas Gramo būdu
- **Praktika:**
  - **Fiksuoto preparato ruošimas ir dažymas Gramo būdu**
  - **Ląstelių morfologijos vertinimas mikroskopuojant**

# Lāstelių morfologija

**KOKAI**

**LAZDELĖS**

**SPIRALĖS**



1  $\mu\text{m}$



2  $\mu\text{m}$

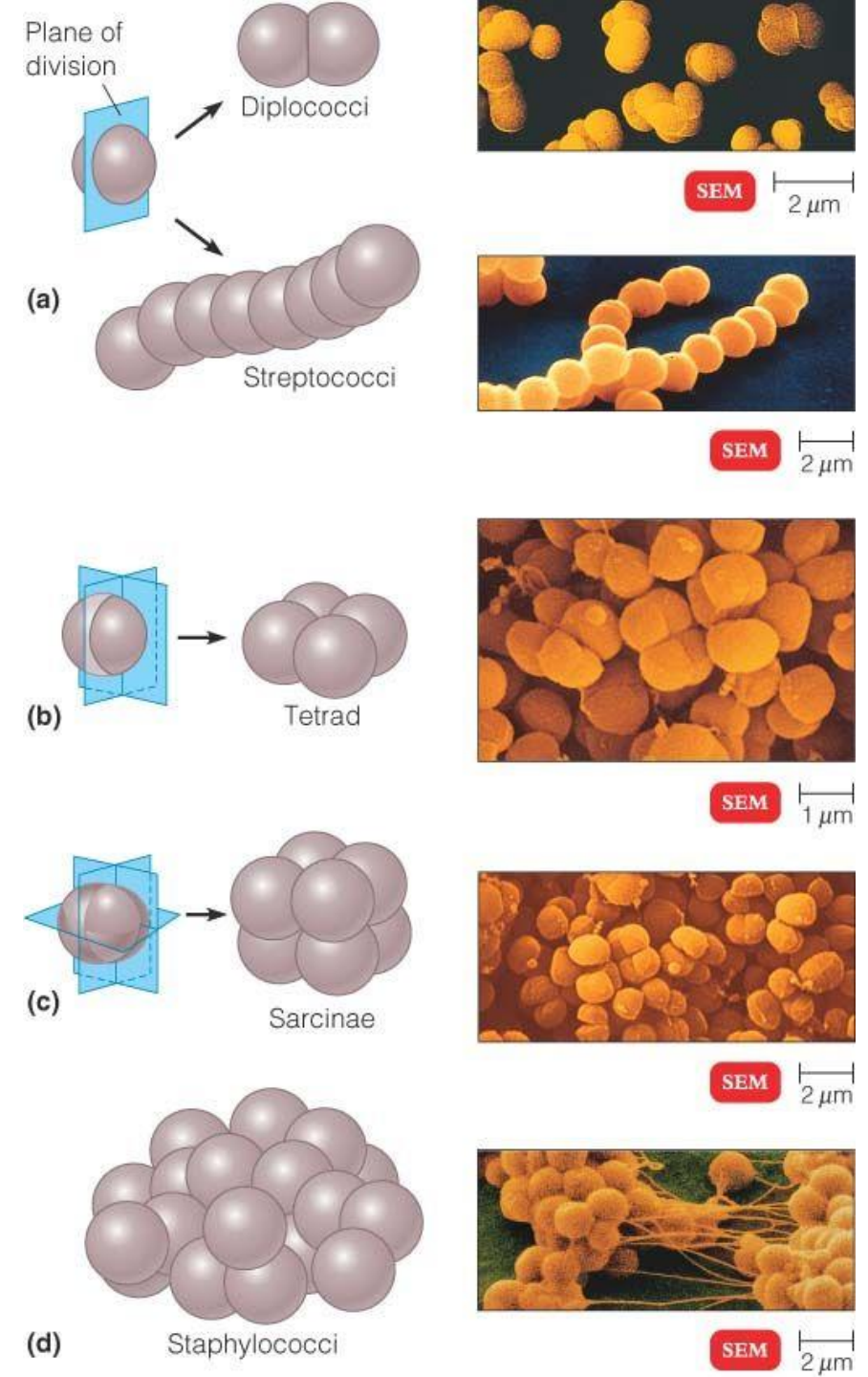
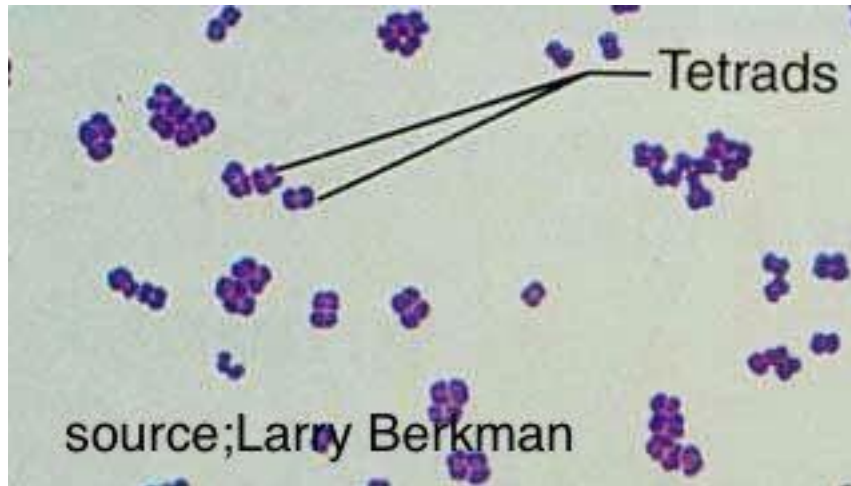


5  $\mu\text{m}$

# Ląstelių morfologija

## KOKAI

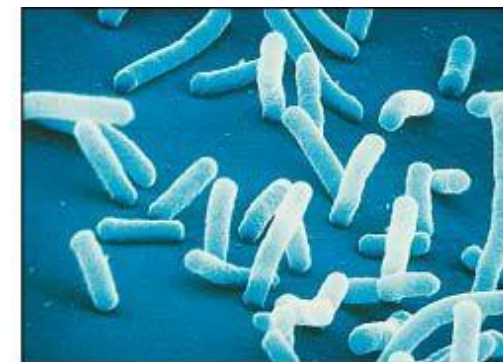
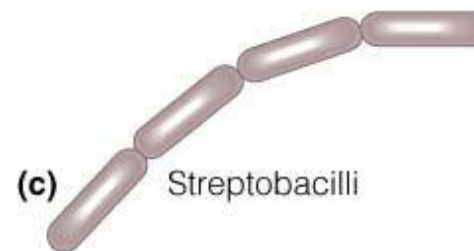
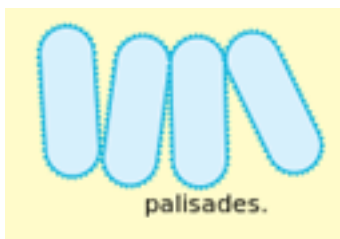
- dalijimasis vienoje plokštumoje (diplokokai *Neisseria*, ląstelių grandinė *Streptococcus*)
- dalijimasis dviejose plokštumose
- dalijimasis trijose plokštumose (*Sarcina*)
- netaisyklingas dalijimasis (*Staphylococcus*)



# Ląstelių morfologija

## LAZDELĖS

- pavienės
- dvigubos lazdelės
- ląstelių grandinė (Streptobacillus)
- panašios į kokus
- išsidėsto "tvorele"



SEM 2  $\mu\text{m}$



SEM 5  $\mu\text{m}$



SEM 1  $\mu\text{m}$

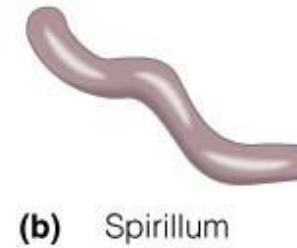
# Ląstelių morfologija

## SPIRALĖS

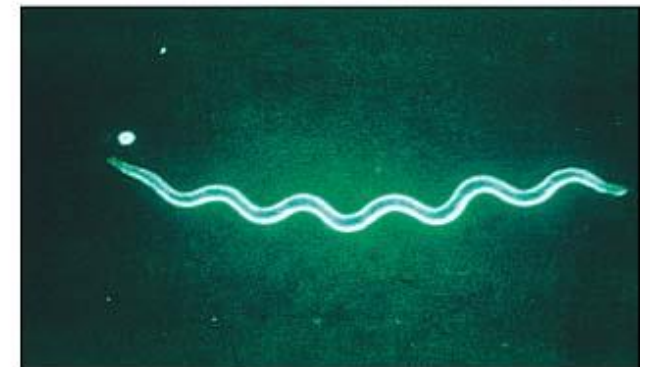
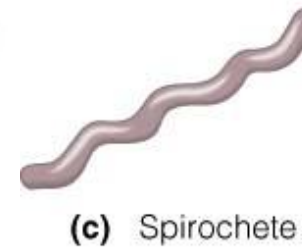
- nepilna spiralė (*Vibrio*)
- trumpa standi spiralė (*Spirillum*)
- plona lanksti spiralė (*Spirochaeta*)



SEM 2 μm



SEM 2 μm



SEM 5 μm

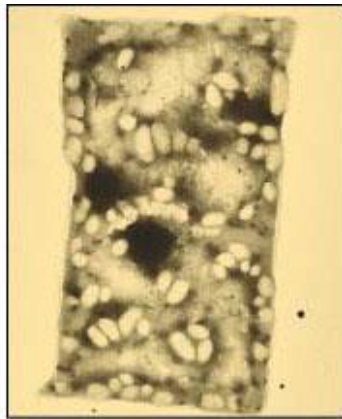


# Ląstelių morfologija

## NETAISYKLINGOS (UNIKALIOS) FORMOS



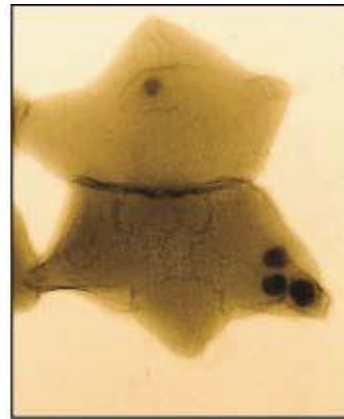
Rectangular bacteria



LM 0.5  $\mu$ m

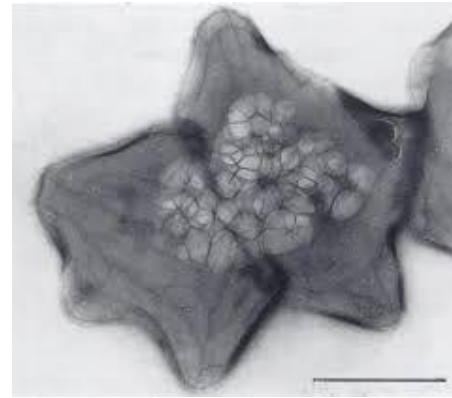


Star-shaped bacteria



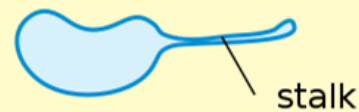
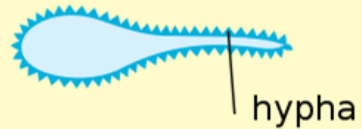
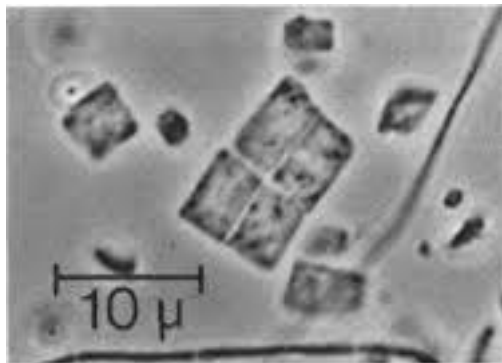
LM 0.5  $\mu$ m

*Stella vacuolata*



*Haloquadratum walsbyi*

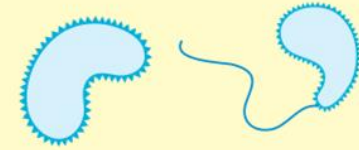
Budding and appendaged bacteria



### Others



enlarged rod  
*Fusobacterium*



*Vibrio*



Comma form  
*Bdellovibrio*



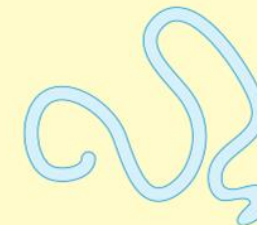
Club Rod  
*Corynebacteriaceae*



Helical form  
*Helicobacter pylori*



Corkscrew form  
*Borrelia burgdorferi*



Filamentous



spirochete

# Šviesinė Mikroskopija

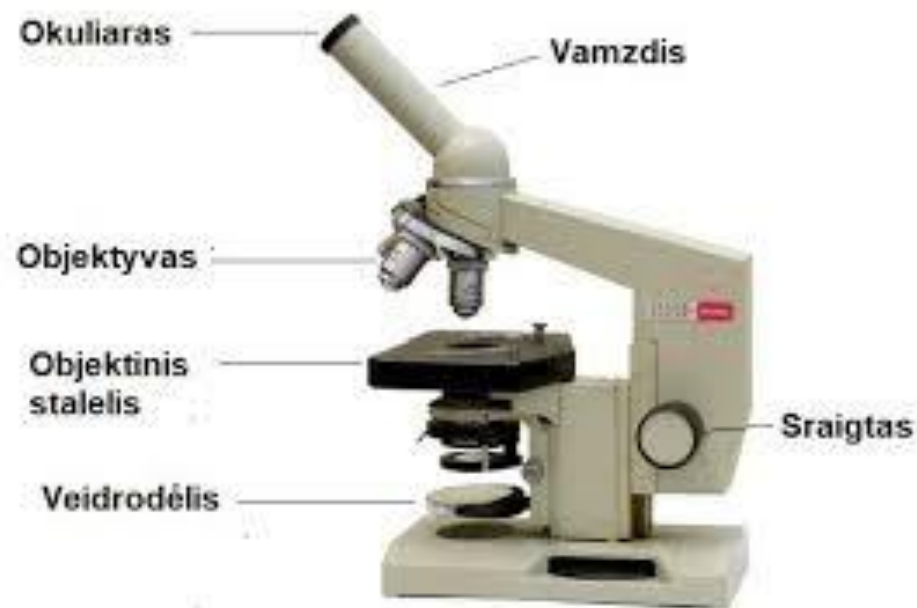
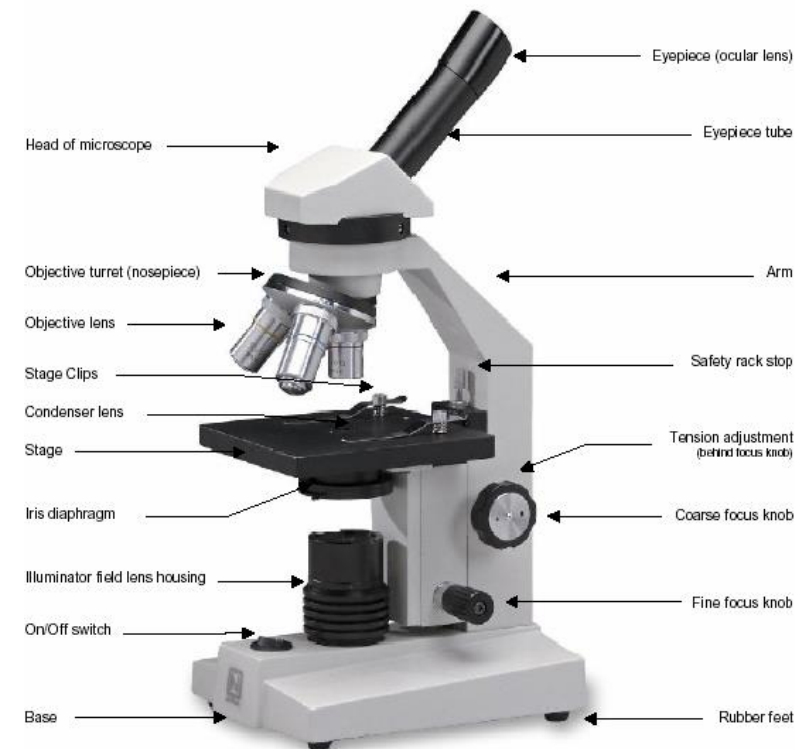
## Šviesinio mikroskopo sandara

Šviesaus lauko šviesinis **mikroskopas** (iš graikų k. „*mikrós*“ - mažas; „*skopein*“ - stebėti) yra optinis prietaisas skirtas stipriai padidintam, plika akimi neįžiūrimų objektų (arba jų struktūros detalių), vaizdui gauti. Mažų objektų tyrimo mokslas vadinamas mikroskopija.

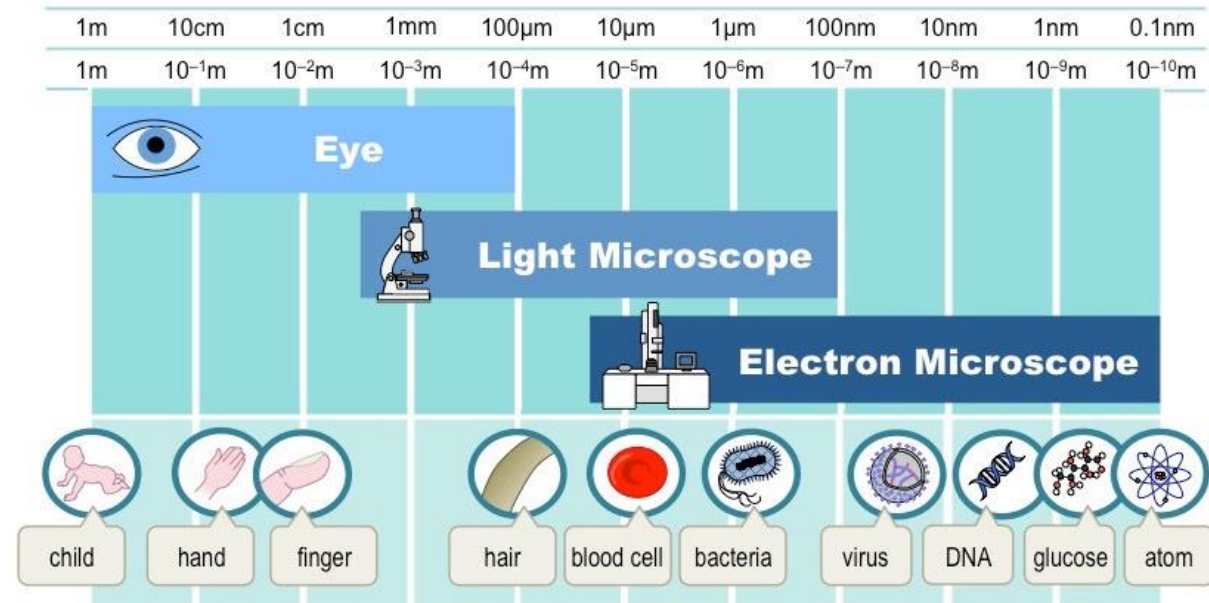
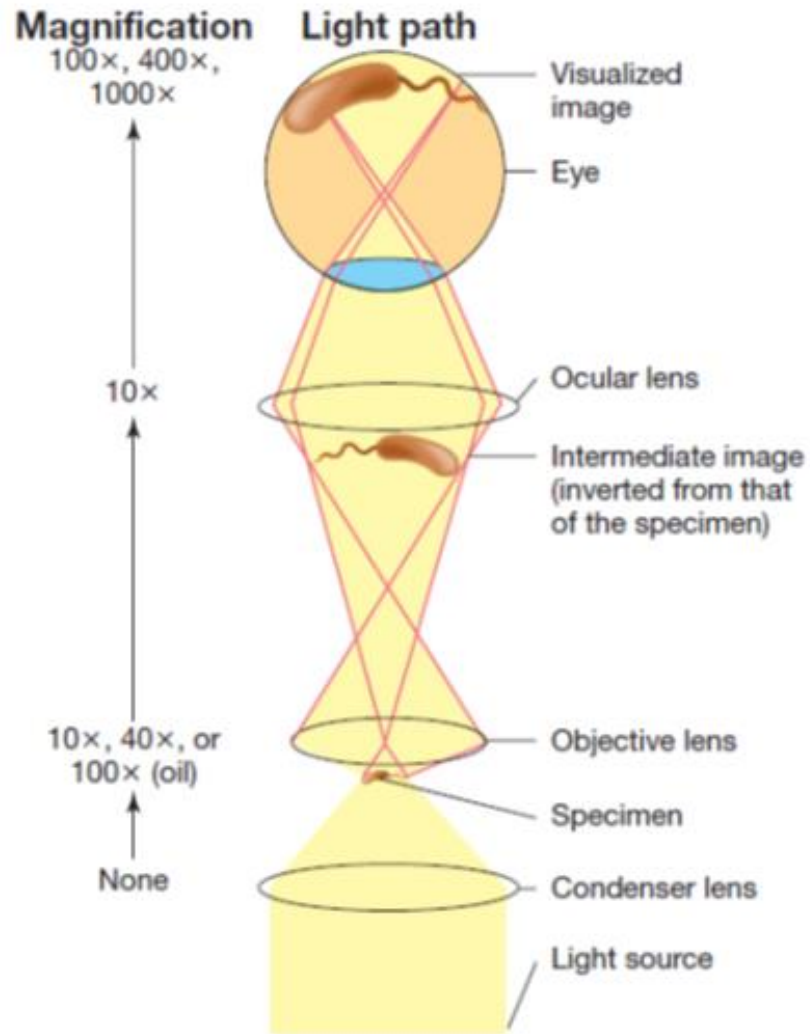
Šviesinį mikroskopą sudaro du vaizdą didinantys lęšiai – **objektyvo lęšis**, esantis netoli tiriamojo pavyzdžio ir **okuliaro lęšis** cilindro viduje, pro kurį žiūrime į objektą.

Šviesos spinduliai, kiaurai peršvietę tiriamąjį pavyzdį, stiklo lęšiais koncentruojami ir susidarantis vaizdas stebimas akimis.

Šviesiniai mikroskopai gali didinti iki kelių tūkstančių kartų.



# Šviesinio mikroskopo optinė sistema



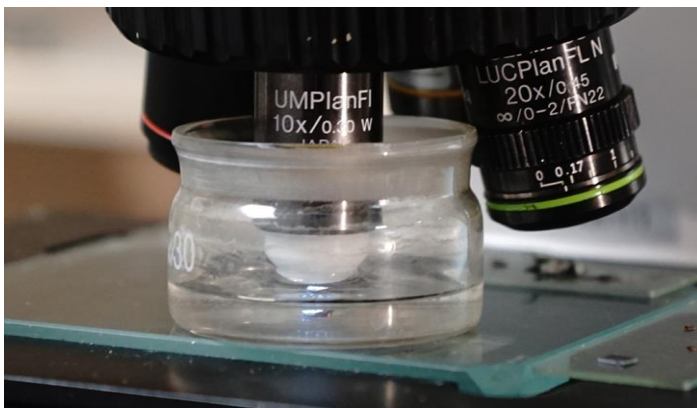
**SKYRA/SKIRIAMOJI GEBA (REZOLIUCIJA)** – sąvoka, žyminti gebėjimą suvokti du taškus (objektus) kaip atskirus.

Šviesinio mikroskopo **SKYRA** siekia ~0,2 μm.

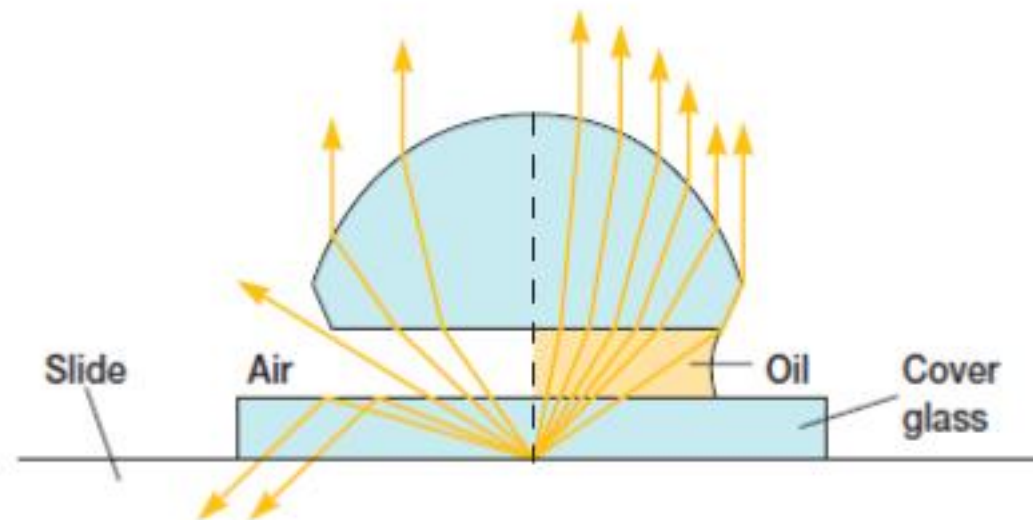
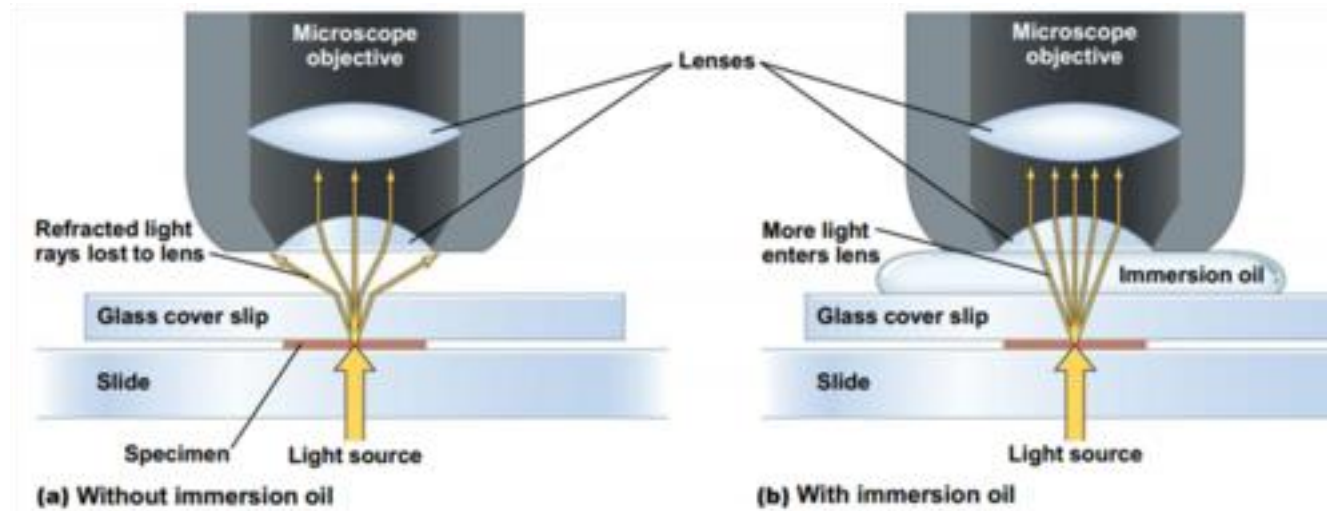
Galimybė stebėti ląstelę šviesiniu mikroskopu pagrįsta kontrastu tarp ląstelės bei aplinkos.

Išnaudojamas natūraliai susidaręs kontrastas, vykdomi ląstelių dažymai.

# Imersija



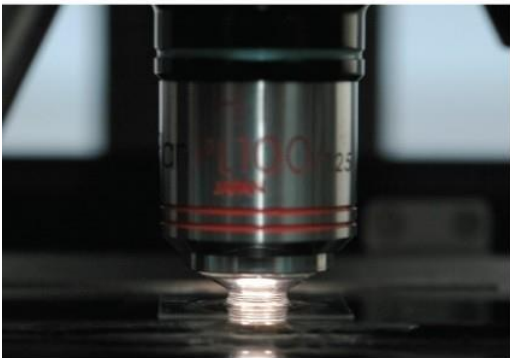
- VANDENS IMERSIJA
- KĖNIO ALIEJAUS IMERSIJA
- IMERSINIO ALIEJAUS IMERSIJA



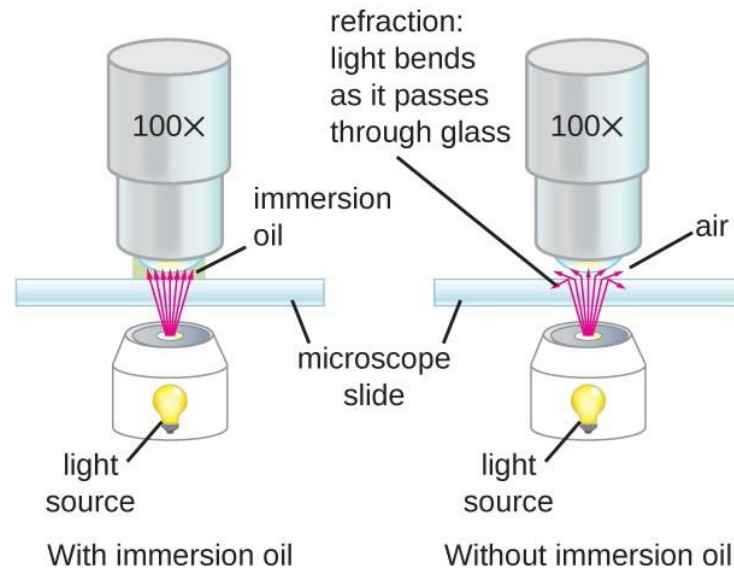
Taikoma skyros gerinimui vykdant ženklų didinimą, pasitelkiant **specialius imersinius objektyvus**.

Imersijai būtinas lęšio ir naudojamo tarpininko (aliejaus) refrakcijos indekso sutapimas ar artimas panašumas.

# Imersija



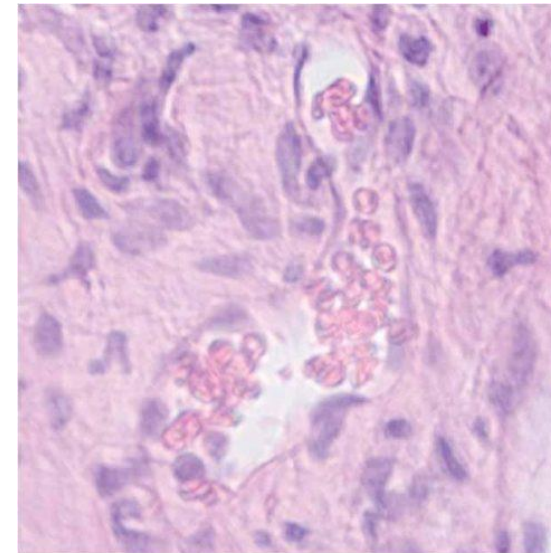
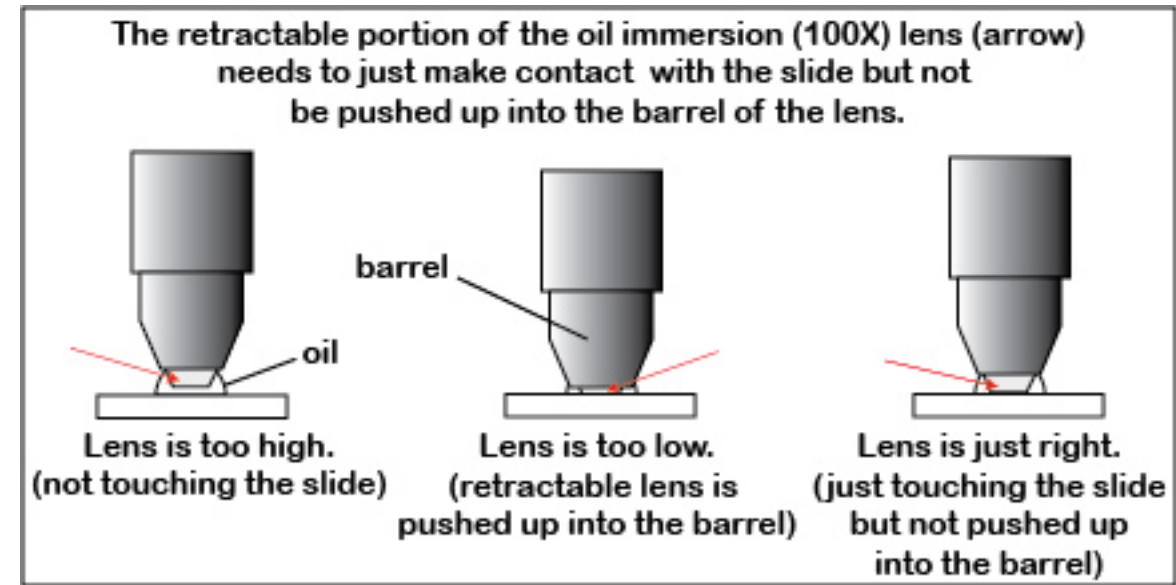
(a)



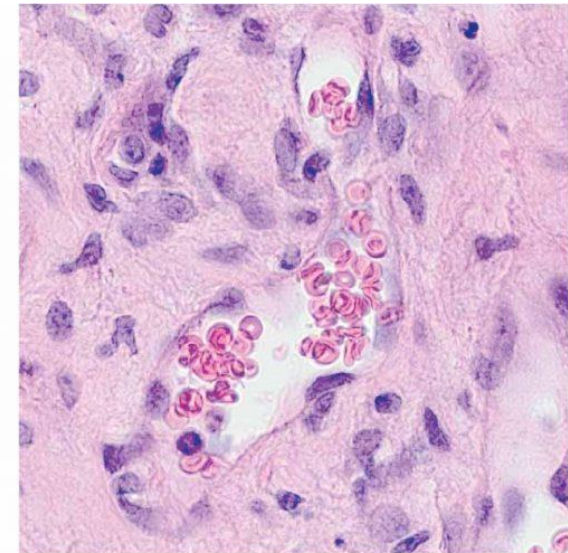
(b)

Taikoma skyros gerinimui vykdant ženklų didinimą, pasitelkiant **specialius imersinius objektyvus**.

Imersijai būtinas lęšio ir naudojamo tarpininko (aliejaus) refrakcijos indekso sutapimas ar artimas panašumas.



Microscopy image of a blood vessel captured using 63x objective lens, dry.

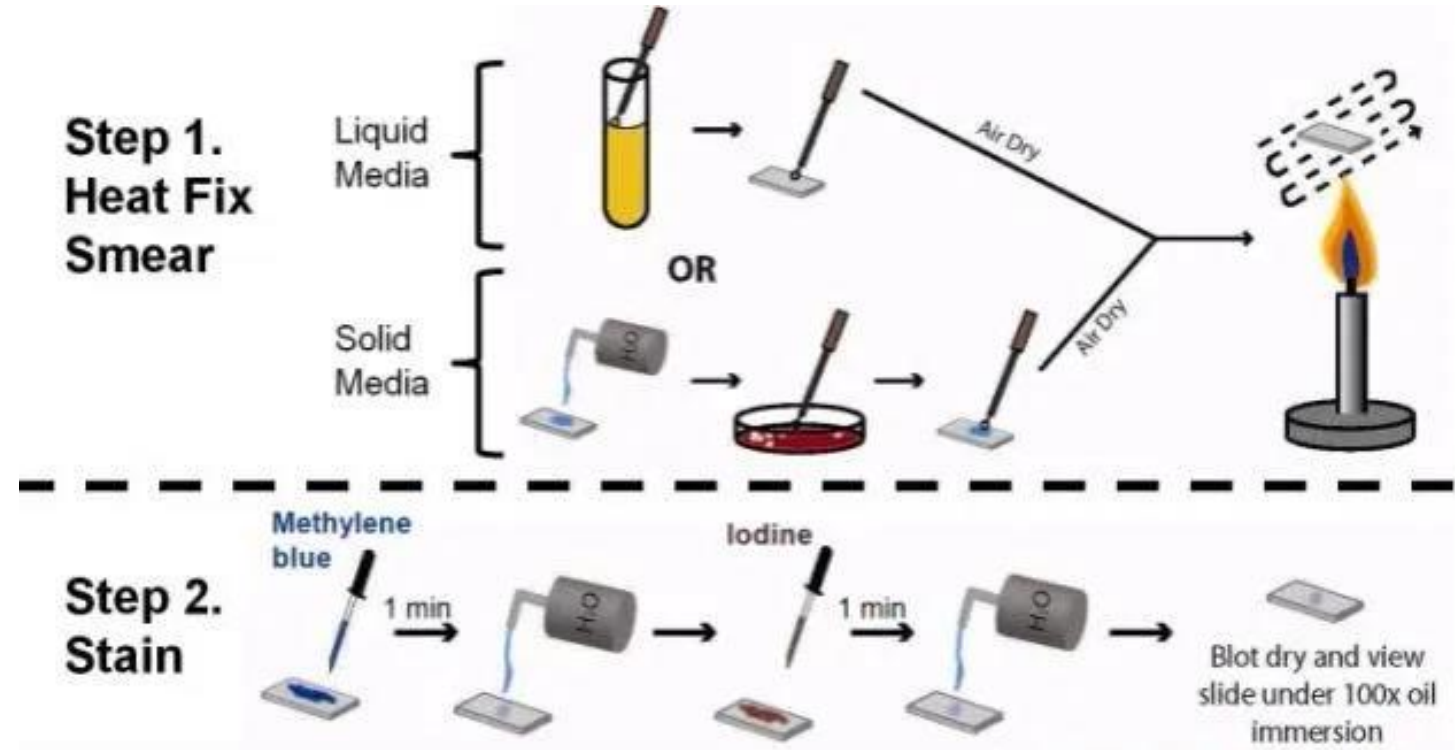


The same view with immersion oil.

# FIKSUOTI MIKROORGANIZMŲ PREPARATAI

## Preparato ruošimo etapai:

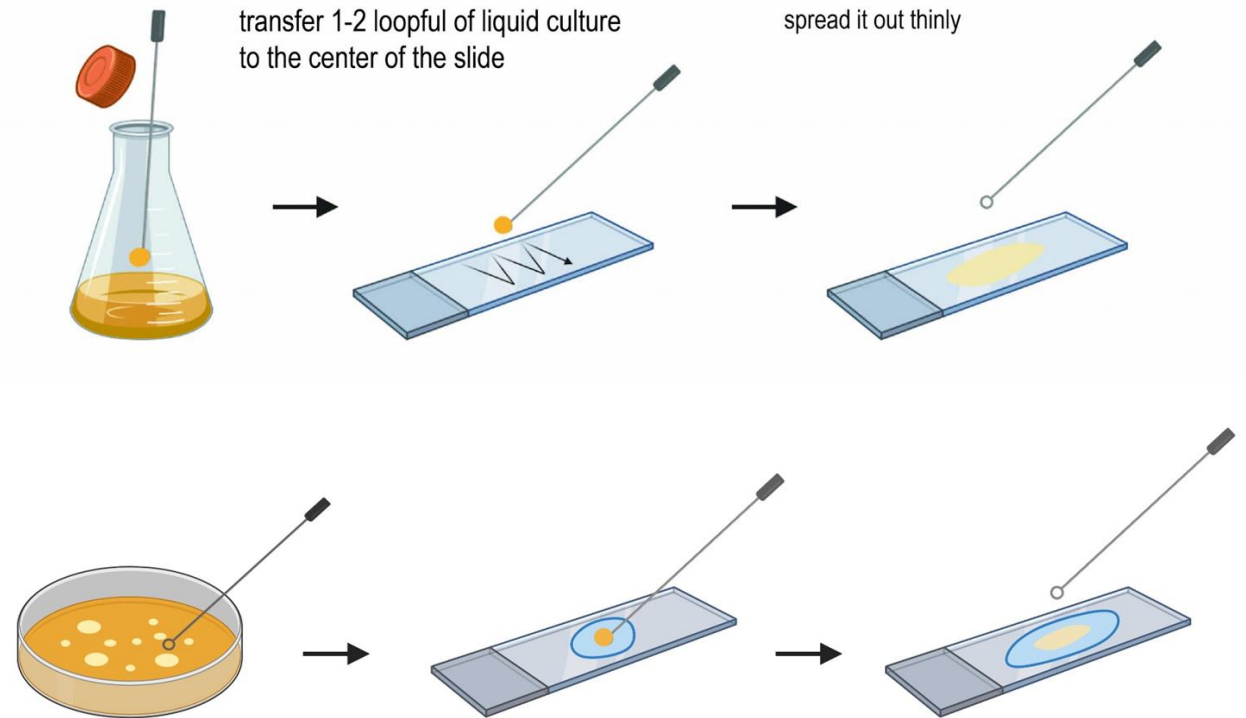
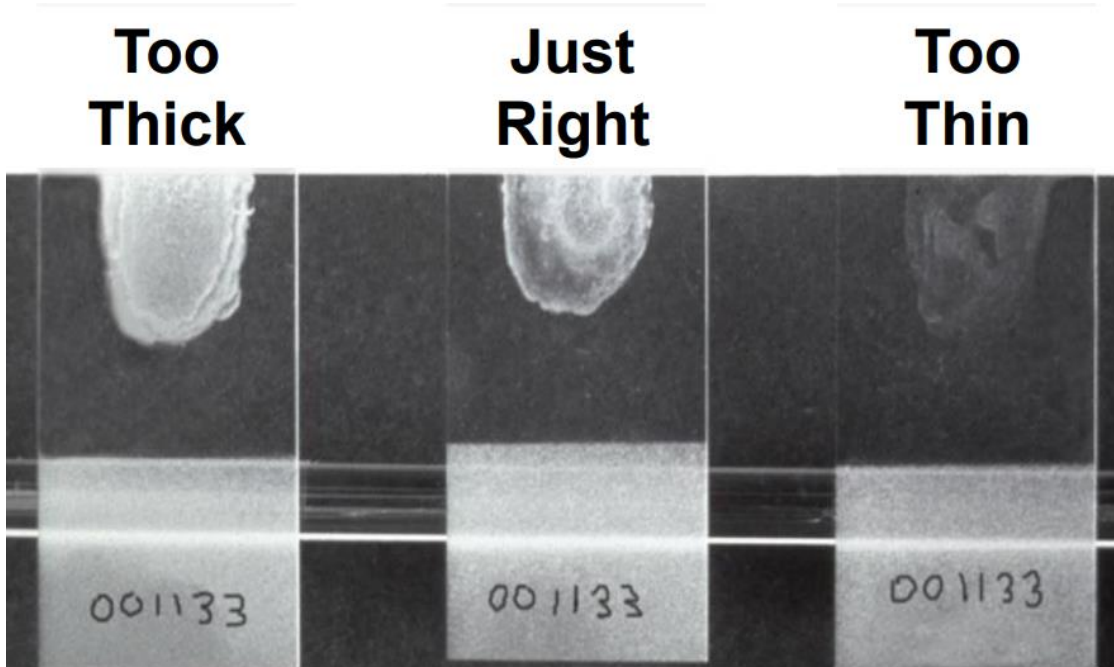
1. Tepinėlio ruošimas
2. Džiovinimas
3. Fiksavimas
4. Dažymas (paprastasis, diferencinis)



# FIKSUOTI MIKROORGANIZMŲ PREPARATAI

Preparato ruošimo etapai:

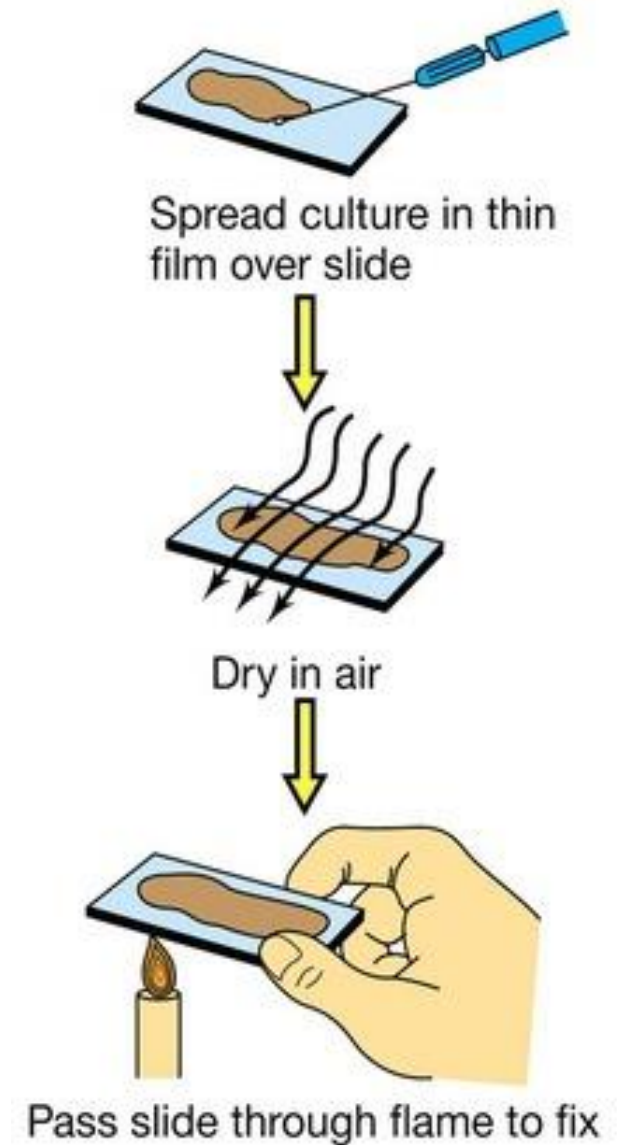
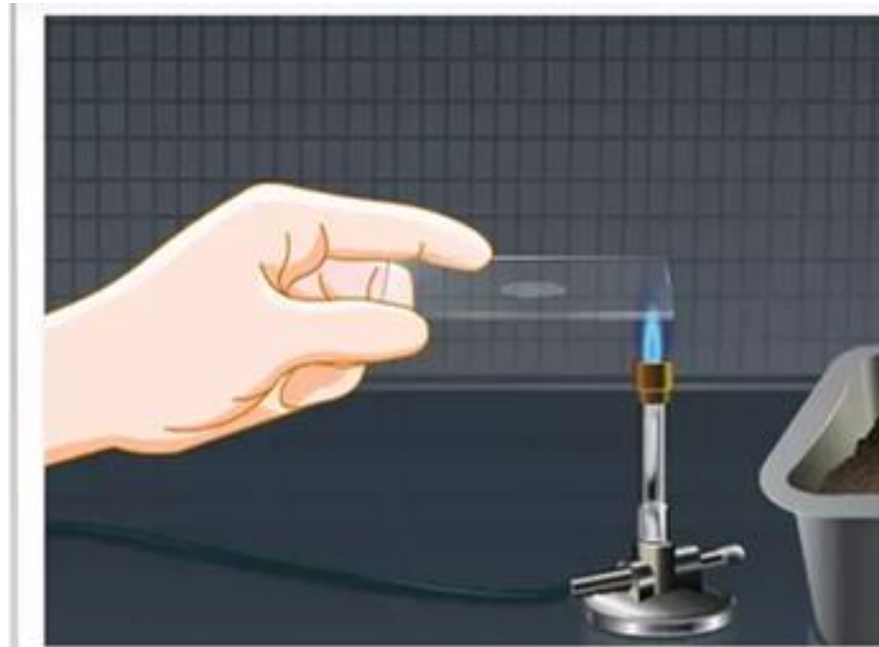
1. **Tepinėlio ruošimas**
2. Džiovinimas
3. Fiksavimas
4. Dažymas (paprastasis, diferencinis)



# FIKSUOTI MIKROORGANIZMŲ PREPARATAI

Preparato ruošimo etapai:

1. Tepinėlio ruošimas
2. **Džiovinimas**
3. **Fiksavimas**
4. Dažymas (paprastasis, diferencinis)



# PAPRASTASIS LĄSTELIŲ DAŽYMAS

Dažoma vienu dažu. Išskiriami:

- *rūgštiniai (anijoniniai)*

Nudažantys ląstelių **protoplazmą**: eozinas, fuksinas, pikrino rūgštis, pikrofuksinas, oranžas.

- *katijoniniai (baziniai)*

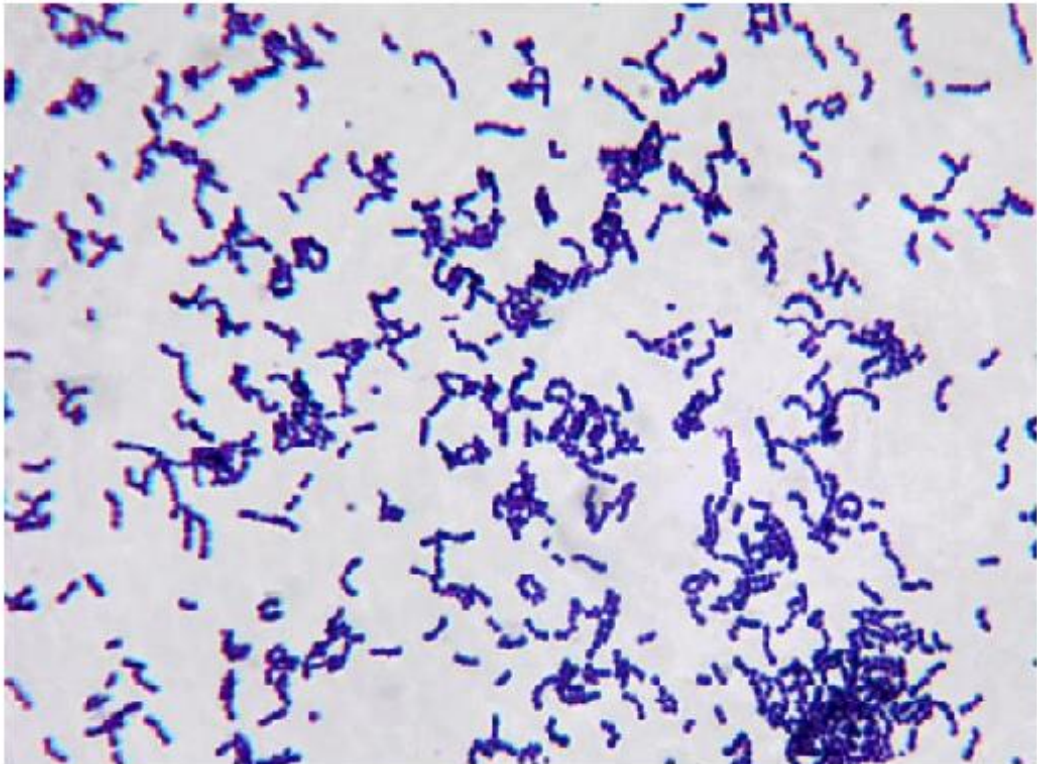
Sąveikauja su neigiamą krūvį turinčiomis medžiagomis – **nukleorūgštimis ir rūgštiniais polisacharidais**. Kadangi ląstelės paviršius paprastai turi neigiamą krūvį, šie dažai tinka **tiesioginiam ląstelių dažymui**: safraninas, metileno melsvė (metileno mėlynojo chloridas), kristalinis violetas.



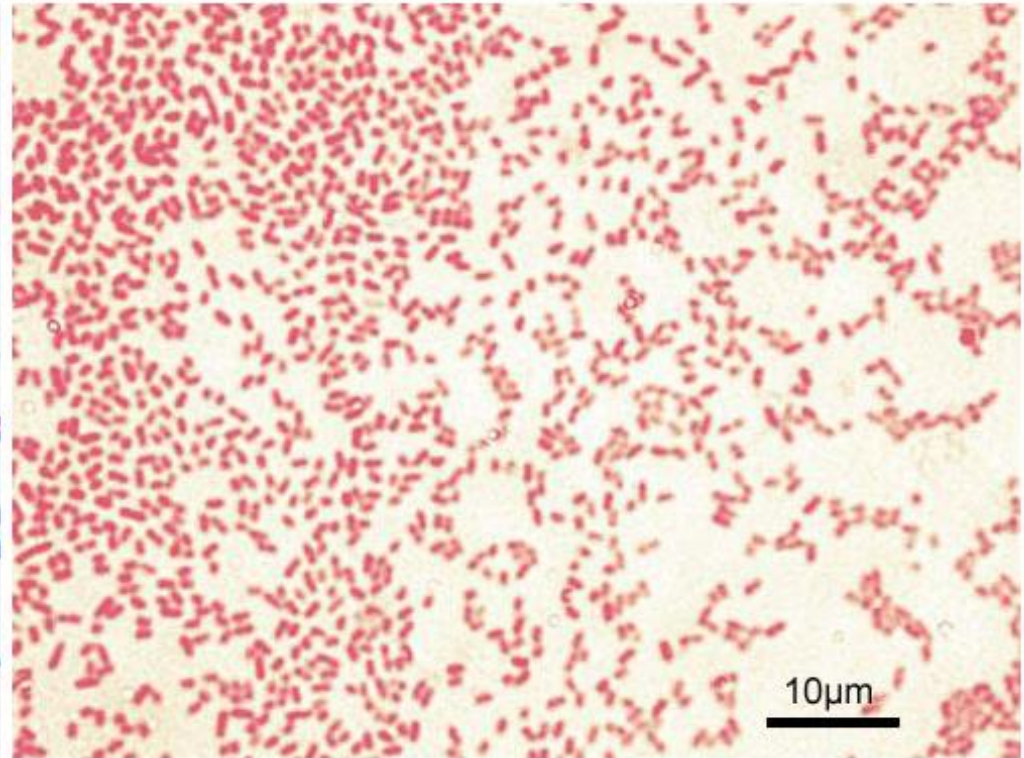
Dažant tepinėlius paprastaisiais dažymo būdais, dažai pilami ant fiksuoto tepinėlio, po ekspozicijos (1–5 min) dažai nuplaunami vandeniu. Tepinėlis džiovinamas ir mikroskopuojamas imersine sistema.

# DIFERENCINIS LĄSTELIŲ DAŽYMAS – GRAMO DAŽYMAS

Dažant **Gramo būdu**, bakterijos nusidažo dvejopai – mėlynai violetine (gramteigiamos, G+) ir raudona (gramneigiamos, G-) spalva.

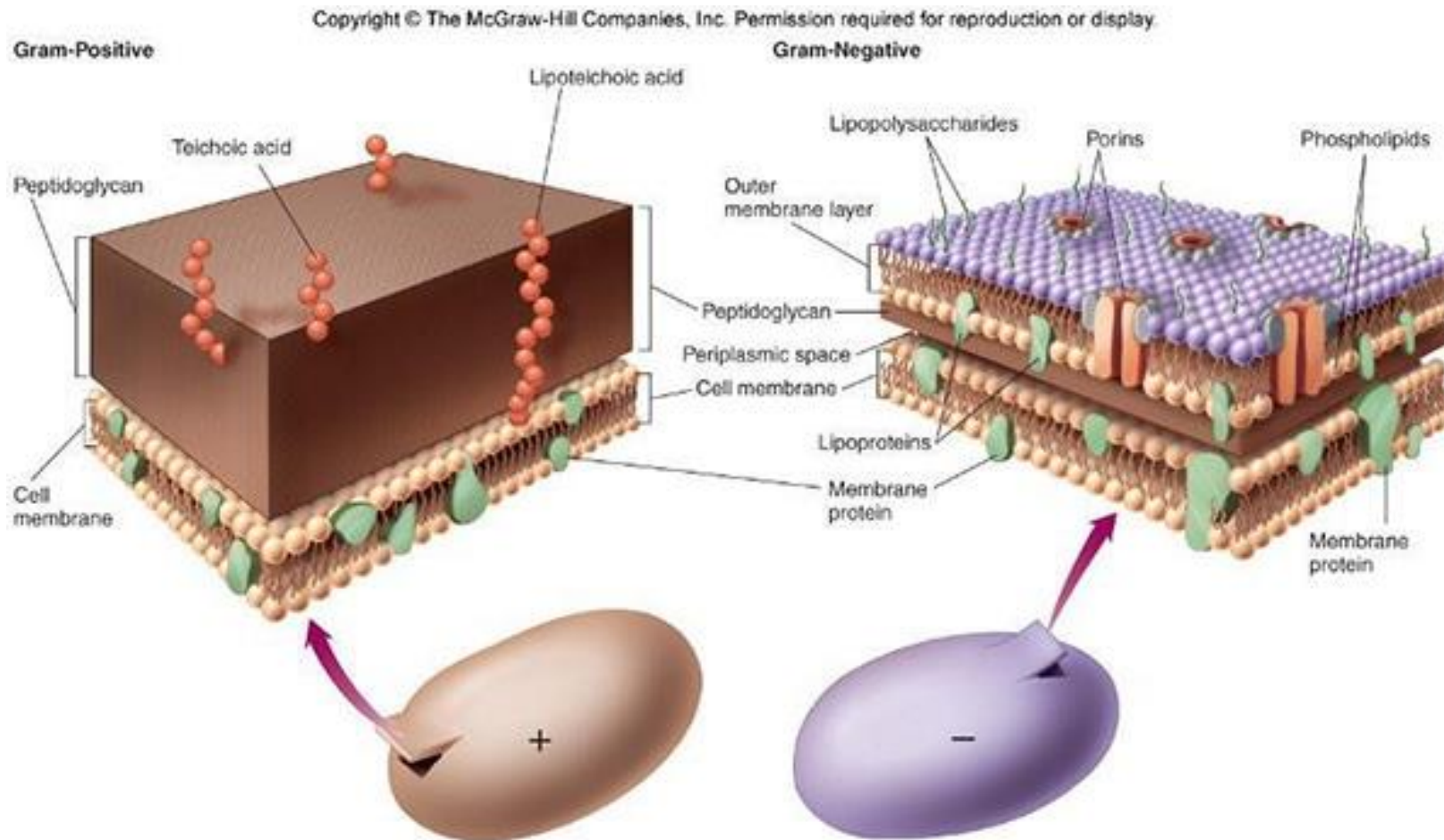


Gram Positive Bacteria



Gram Negative Bacteria

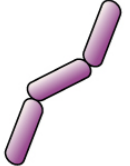
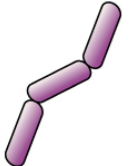
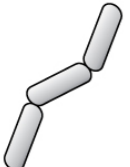
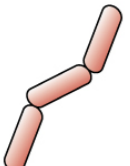
# Gramteigiami ir gramneigiami mikroorganizmai



# Gramo dažymas – eiga

Dažymo procedūra susideda iš **4 pagrindinių** žingsnių:

1. Dažymas **kristalvioletu**. Visos ląstelės nusidažo mėlynai violetine spalva.
2. Veikimas **jodo tirpalu**. Susidaro patvarus kristalvioleto ir jodo kompleksas. Ir G+, ir G- lieka violetinės.
3. **Blukinimas** – etilo alkoholio ir acetono mišiniu. Po jo G- išblunka.
4. Dažymas **safraninu**. G+ lieka violetinės, G- nusidažo raudonai.

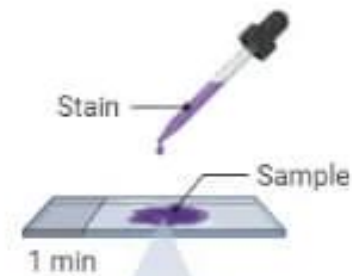
| Gram stain process                                                                                     |                                                                                    |                                                                                       |                                                                                       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Gram staining steps                                                                                    | Cell effects                                                                       | Gram-positive                                                                         | Gram-negative                                                                         |
| <b>Step 1</b><br><b>Crystal violet</b><br><i>primary stain added to specimen smear.</i>                | Stains cells purple or blue.                                                       |    |    |
| <b>Step 2</b><br><b>Iodine</b><br><i>mordant makes dye less soluble so it adheres to cell walls.</i>   | Cells remain purple or blue.                                                       |    |    |
| <b>Step 3</b><br><b>Alcohol</b><br><i>decolorizer washes away stain from gram-negative cell walls.</i> | Gram-positive cells remain purple or blue. Gram-negative cells are colorless.      |    |    |
| <b>Step 4</b><br><b>Safranin</b><br><i>counterstain allows dye adherence to gram-negative cells.</i>   | Gram-positive cells remain purple or blue. Gram-negative cells appear pink or red. |  |  |

# Gramo dažymas – eiga

## Step 1

### Crystal violet

Primary stain added to specimen smear.

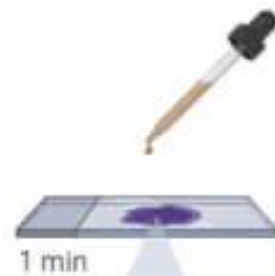


- Gram (+): purple
- Gram (-): purple

## Step 2

### Iodine

Mordant makes dye less soluble so it adheres to cell walls.

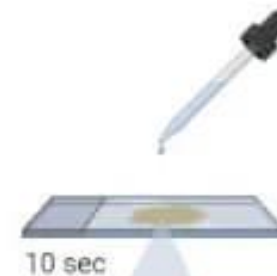


- Gram (+): purple
- Gram (-): purple

## Step 3

### Alcohol

Decolorizer washes away stain from gram (-) cell walls.

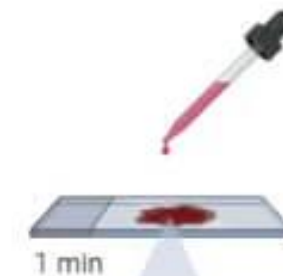


- Gram (+): purple
- Gram (-): colorless

## Step 4

### Safranin

Counterstain allows dye adherence to gram (-) cell walls.



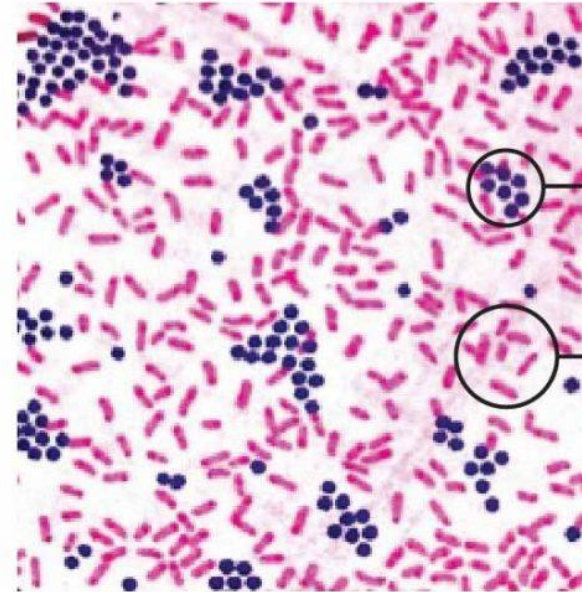
- Gram (+): purple
- Gram (-): red

# Kas lemia skirtingą bakterijų nusidažymą?

**G+** didžiulis **kristalvioleto** ir **jodo** kompleksas nusėda ląstelėje.

Alkoholio-acetono mišinys dehidratuoja daugiasluoksnį peptidoglikaną - dėl to sumažėja tarpai tarp molekulių ir spalvinis kompleksas lieka uždarytas ląstelėje.

**G-** alkoholio-acetono mišinys (lipidų tirpiklis) ištirpina išorinę membraną, o plonas peptidoglikano sluoksnis nesugeba išlaikyti spalvinio **kristalvioleto** ir **jodo** komplekso, todėl vyksta išblukimas, o tuomet dažoma kontrastiniu dažu (pvz., **safraninu**).



Gram-positive  
*Cocci* (spherical)

Gram-negative  
*Bacilli* (rod-shaped)

# GRAMO DAŽYMAS: blogas dažymasis

**G+ bakterijos dažosi kaip G-:**

**ATLIKIMO KLAIDOS** – neteisinga preparato fiksavimo, blukinimo technika, per dažnas plovimas vandeniu.

**KULTŪROS AMŽIUS** – senesnė nei 24 val. bakterijų kultūra praranda gebėjimą išlaikyti spalvinį kompleksą.

**BAKTERIJOS SAVYBĖS** – kai kurios bakterijos linkusios labiau dažytis nei kitos.

## 2 PREPARATAI

- Fiksuoto preparato paruošimas, dažymas Gramo būdu ir mikroskopavimas (stebint imersiniu objektyvu)

**du** preparatai:

1. Maišytas preparatas:

- *Escherichia coli* **IR** *Sarcina* spp.,
- *Escherichia coli* **IR** *Bacillus subtilis*,

2. Probiotikų kapsulių turinys (Salutil **ARBA** Linex)



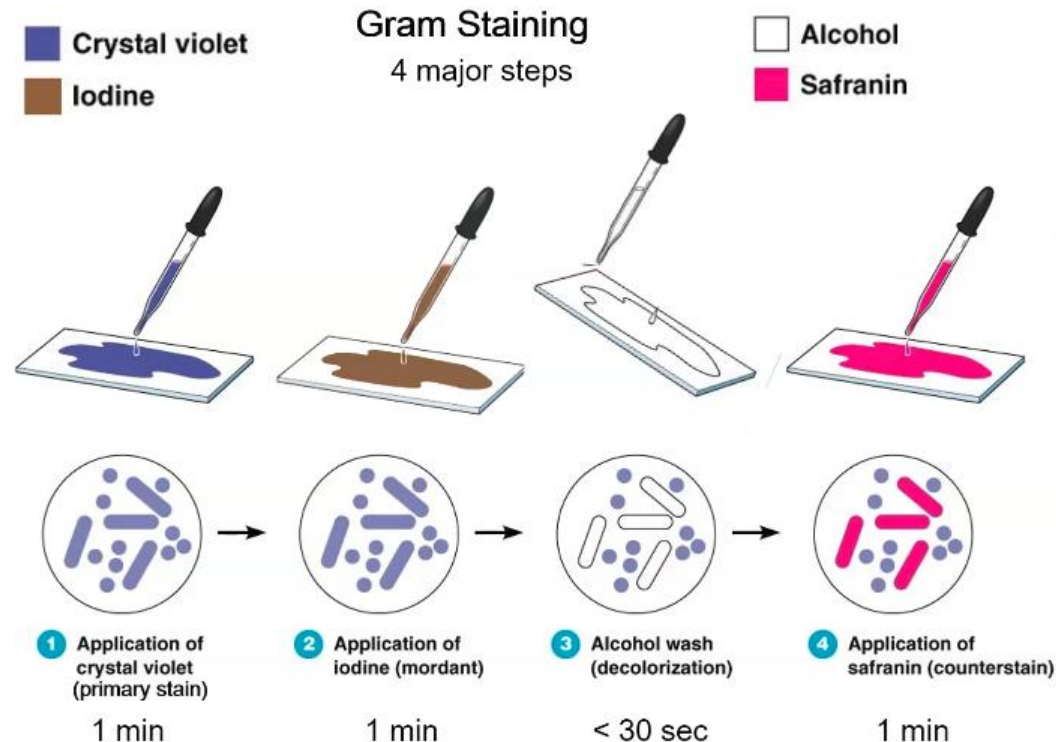
# Fiksuotų preparatų ruošimas

- Stiklelis, ant kurio bus ruošiamas tepinėlis gerai nuvalomas etanoliu.
- Ant objektinio stikliuko dedamas lašas vandens ir jame paskirstoma su inokuliavimo kilpele užkabinta ląstelių masė arba miltukai iš probiotikų kapsulių.
  - Svarbu paimti ne per daug ląstelių, kadangi po dažymo matysis vientisa masė.
- Palaukiama, kol vanduo išgaruoja. Kaitinti stikliuko negalima, kad nesilizuotų ląstelės.
- Tepinėliui išdžiūvus, objektinio stiklelio apatinė pusė pakaitinama 3 kartus po 2–3 sekundes virš liepsnos – tepinėlio fiksavimas (liečiame prie riešo ir tikriname, kad nebūtų karšta).
  - Fiksavimas reikalingas, kad dažymo metu mikroorganizmai nenusiplautų. Tuo pačiu mikroorganizmai nužudomi.
- Toliau atliekamas paprastas arba diferencinis (pvz., Gramo) dažymas.
- Kadangi ląstelės yra labai mažos, todėl įprasta jas stebėti išdžiovintas, nudažytas ir naudojant imersinius objektyvus.

Po naudojimosi imersiniu objektyvu būtina nuvalyti objektyvą su 96% spiritu!

# Dažymas Gramo būdu

1. Ant užfiksuoto tepinėlio pilame kristalvioleto dažų, laikome apie 1–2 min.
2. Dažų perteklių nupilame ir ant tepinėlio pilame jodo (ar liugolio) tirpalo, kurį laikome apie 1–2 min.
3. Nupylus jodo (ar liugolio) tirpalą, preparatas blukinamas 96 % etanoliu arba blukinimo reagentu (10–30 s).
4. Tepinėlis plaunamas steriliu fiziologiniu tirpalu ar distiliuotu vandeniu.
5. Nuplautas tepinėlis dažomas safraninu (ar vandeniniu fuksino tirpalu) 1–2 min.
6. Po to vėl plaunama vandeniu ir dažytas mikropreparatas džiovinamas kambario temperatūroje.
7. Paruoštas tepinėlis tiriamas mikroskopu imersine sistema.



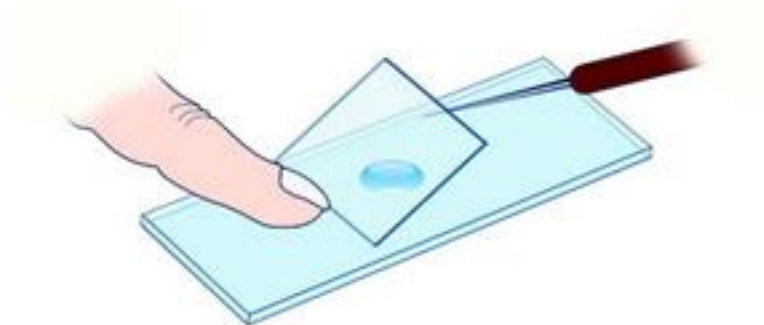
# PABAIGA



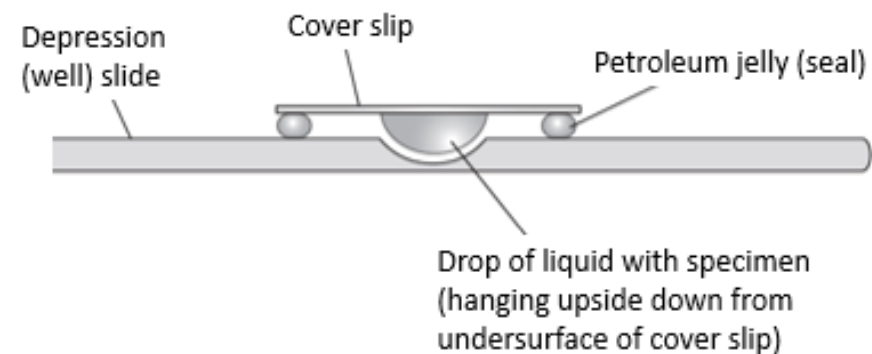
Priedu gyvo mielių prerapato dažymo  
protokolą tiems kam buvo įdomu :)

# GYVŲ MIKROORGANIZMŲ PREPARATAI

## ***“Suspausto lašo” preparatas*** (ne-/dažytas)



## ***“Kabančio lašo” preparatas***

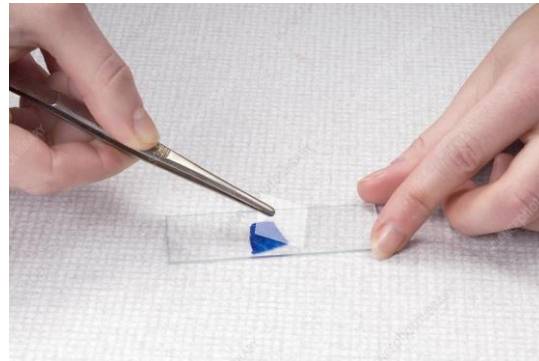


***Negatyvusis preparatas*** (*Būrio būdas*) – sumaišomas lašas bakterijų suspensijos ir lašas juodo tušo.

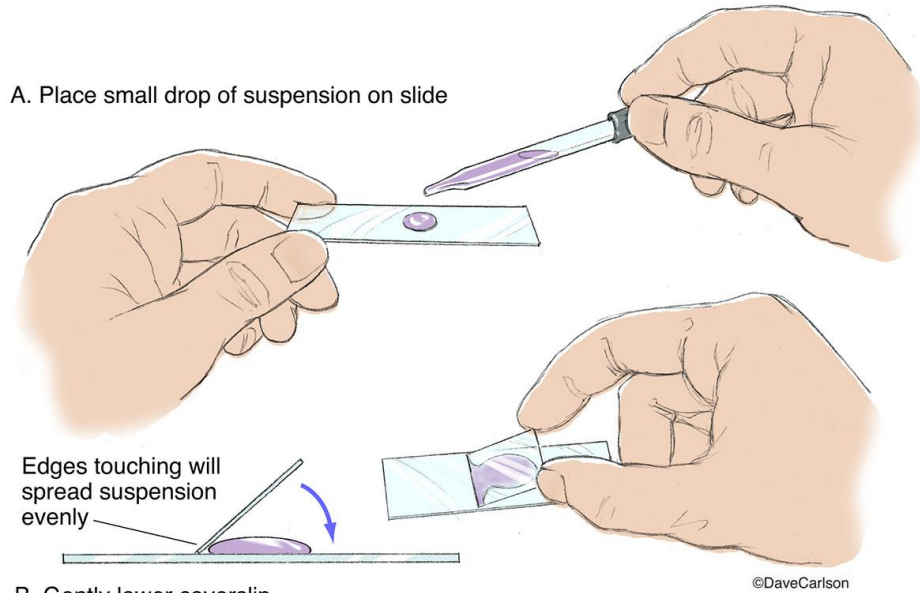
***Gazono preparatas*** – bakterijų, aktinomicetų ar mikroskopinių grybų kultūros, išaugintos standžiosios terpės paviršiuje. Jos tiriamos tiesiogiai mažiausiai didinančiais objektyvais per mėgintuvėlio ar Petri lėkštelės stiklą.

# GYVŲ MIKROORGANIZMŲ PREPARATAI

## ***“Suspausto lašo” preparatas*** (ne-/dažytas)



A. Place small drop of suspension on slide



B. Gently lower coverslip

C. Slide ready for viewing

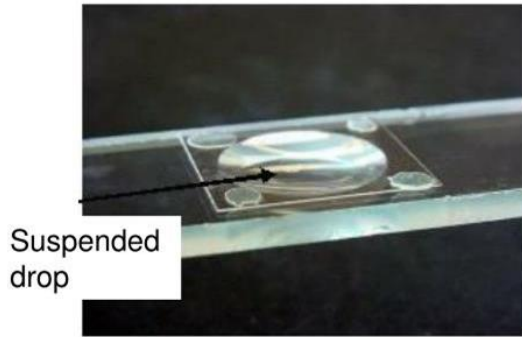
Ant švaraus nuriebalinto stiklelio užlašinama skysta bakterijų kultūra ar ant standžios terpės užaugintų bakterijų kultūros suspensija, kuri uždengiama dengiamuoju stikleliu.

Ruošiant preparatą turi nesusidaryti oro burbulų, todėl dengiamasis stiklelis dedamas ne iš viršaus, bet statomas prie lašo krašto ir pamažu nuleidžiamas. Tokiu būdu išstumiamas oras, esantis tarp dengiamojo ir objektinio stiklelio.

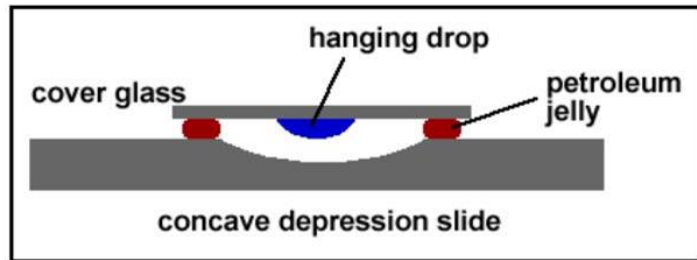
Taisyklingai paruoštame preparate skystis užpildo visą ertmę tarp stiklelių, bet neišeina už dengiamojo stiklelio ribų. Jei preparatą reikia stebėti ilgesnį laiką, dengiamojo stiklelio kraštai sutepami vazelinu.

# GYVŲ MIKROORGANIZMŲ PREPARATAI

## *“Kabančiojo lašo” preparatas*



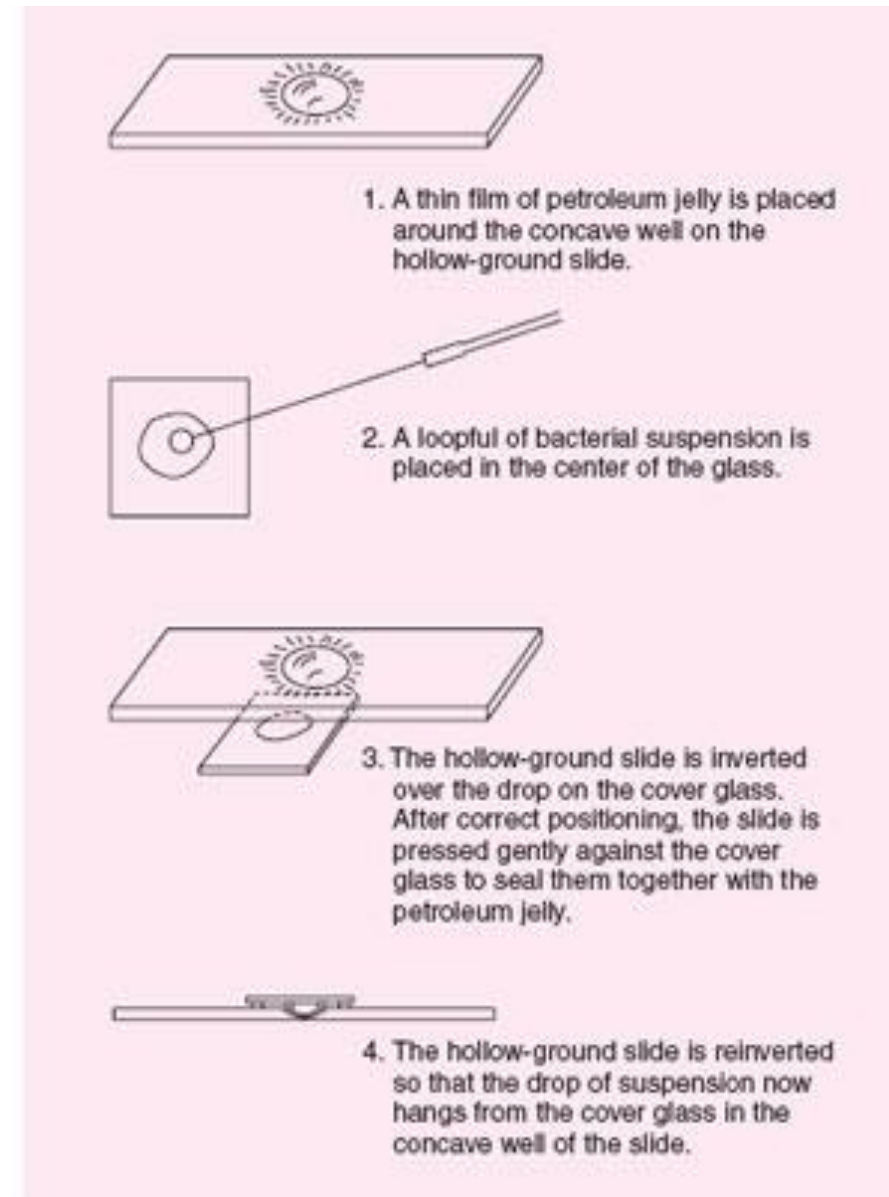
Quickly invert depression slide. Drop will now be suspended from the cover glass inside the concave hollow.



Naudojamas specialus objektyvinis stiklėlis su duobute.

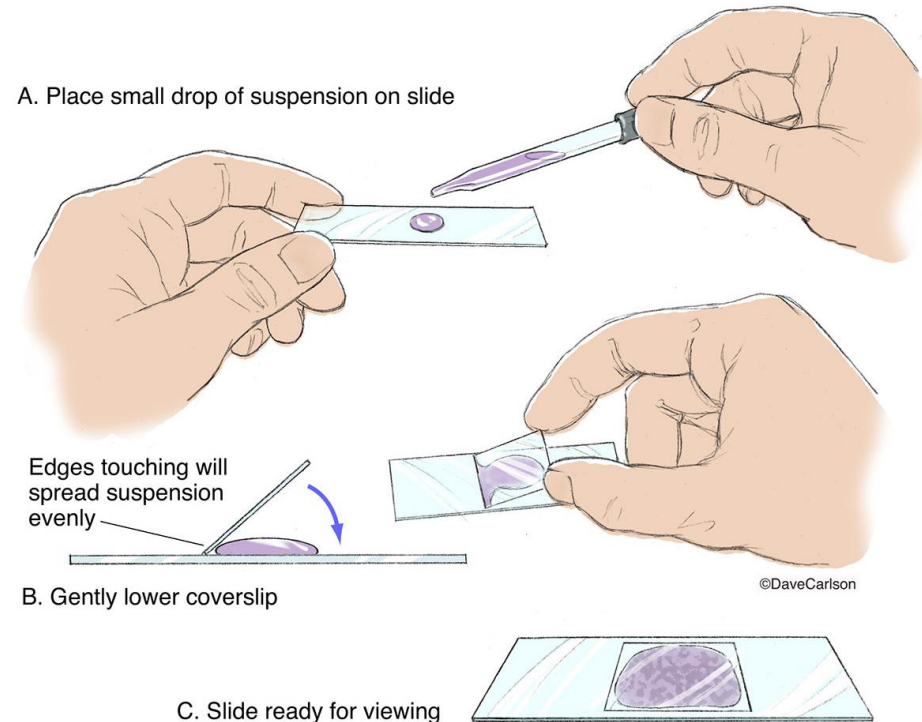
Tiriamo tiriamo pavyzdžio suspensijos lašas uždedamas ant dengiamojo stiklelio, jis staigiu judesiu apverčiamas ir lašas talpinamas į duobutę.

Kad vanduo neišsiliėtų, objektyvinio stiklelio duobutės kraštai patepami vazelinu.



# Gyvo mielių preparato dažymas ir analizė

- Ant švaraus objektinio stikliuko užlašinamas lašas vandens.
- Į lašą vandens perkeliamas nedidelis kiekis mielių biomasės.
  - Jei naudojamos sausos mielės reikėtų jas aktyvuoti ir tuomet naudoti lašą paruoštos suspensijos.
- Užlašinamas metileno melsvės lašas (panašaus dydžio kaip pradinis lašas).
- Uždengiama dengiamuoju stikliuku ir mikroskopuojama 40x padidiniu.

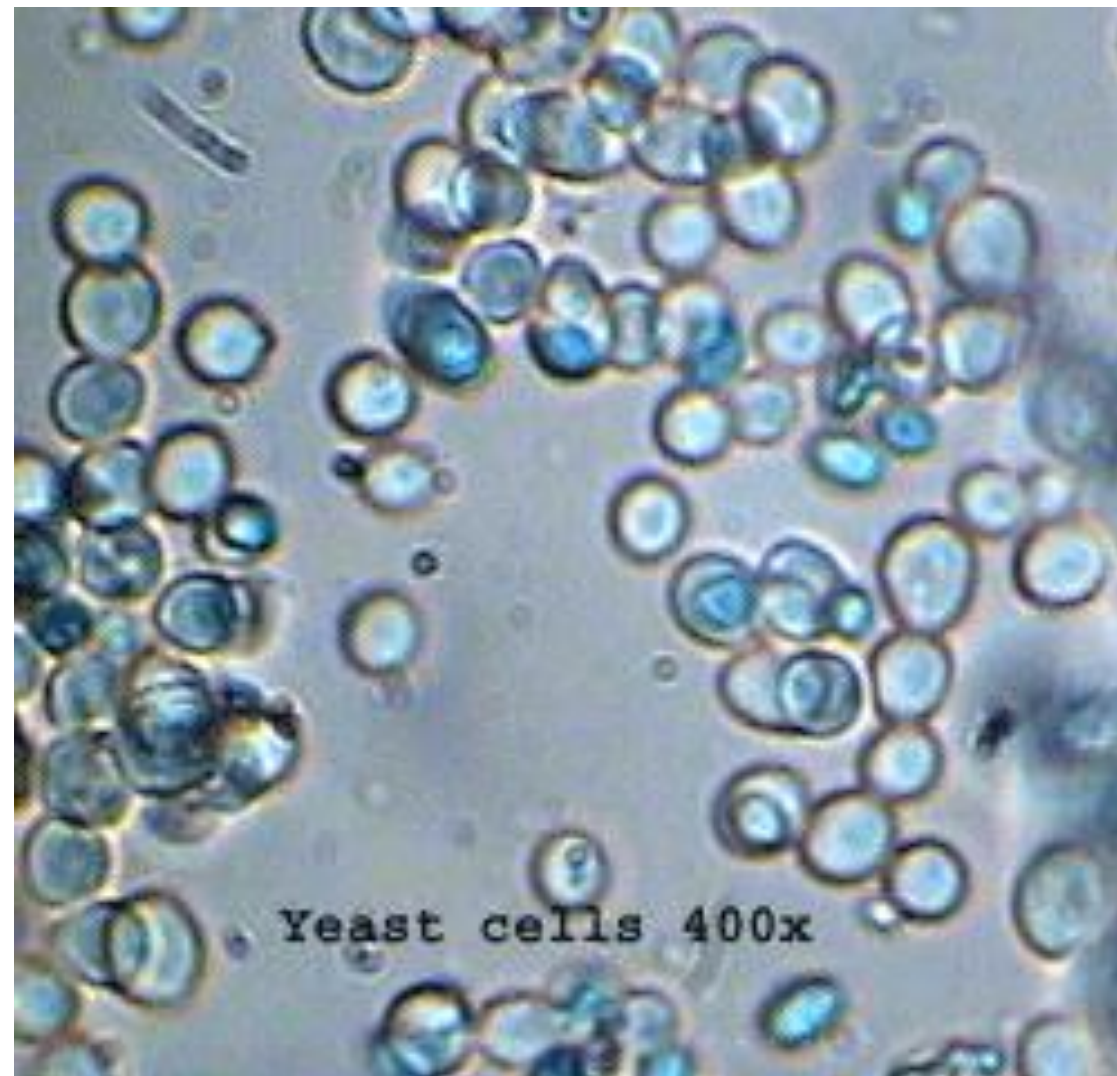


**SVARBU.** Jei naudojamos sausos mieles prieš tai jas reikėtų aktyvuoti palaikant bent 10 min 20-30 laipsnių temperatūros vandenyje su šiek tiek cukraus (geriausia kol atsiranda paviršiuje burbuliukai).

# Gyvo mielių preparato analizė

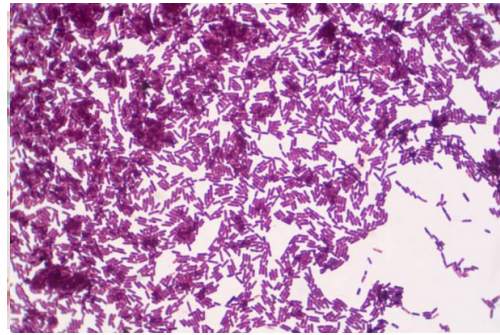
Gyvybingos ląstelės sugeria metileno melsvę ir ją suardo – ląstelės tampa bespalvės ar švelniai melsvos.

Žuvusios ląstelės negali suskaidyti metileno melsvės ir nusidažo ryškiai mėlynai.

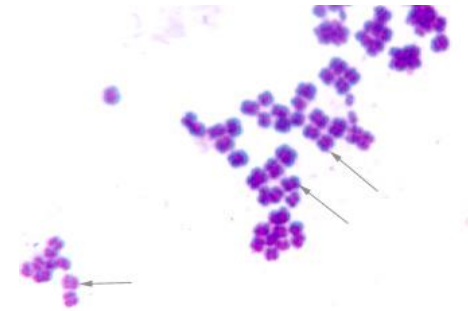


# Ląstelių ir kolonijų morfologija

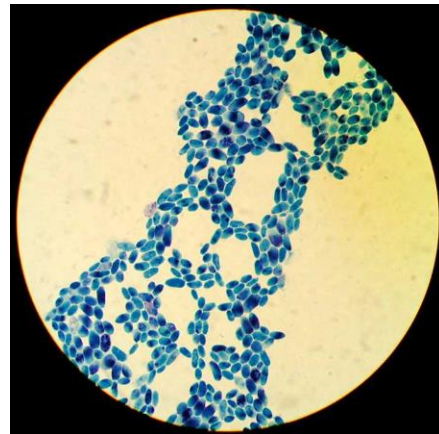
- *Bacillus subtilis*



- *Sarcina sp.*



- *Saccharomyces cerevisiae*



- *Escherichia coli*

