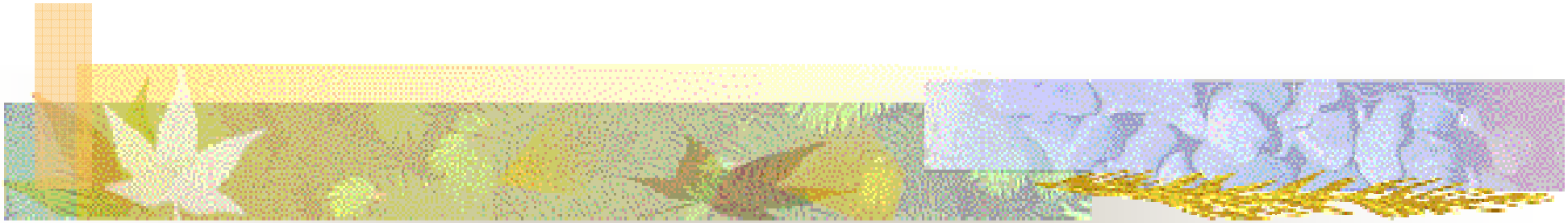
Lékařská mikrobiologie pro ZDRL



Týden 2: Morfologie bakterií, mikroskopie

Ondřej Zahradníček 777 031 969
zahradnicek@fnusa.cz ICQ 242-234-100

Morfologie a fyziologie, mikroskopie a kultivace

Morfologie bakterií (složení, tvary, uspořádání, sporulace)	Fyziologie bakterií (množení, metabolismus, využívání substrátů)
Mikroskopické pozorování (= pozorování mikroba jako morfologické jednotky)	Kultivace (= pozorování růstových, tedy fyziologických vlastností mikroba

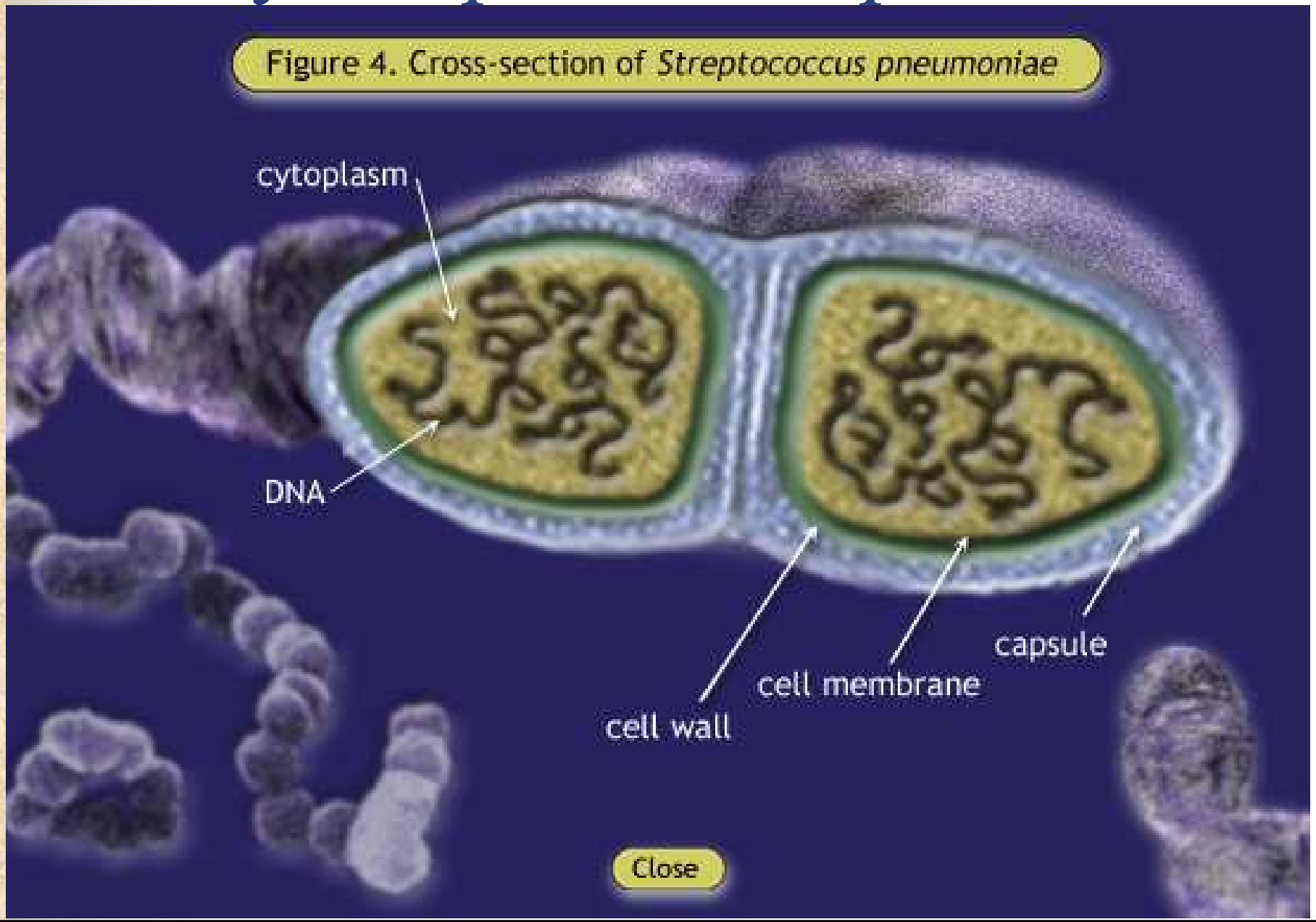
Morfologie bakteriální buňky

- Z čeho se skládá každá bakterie
- Nepovinné složky bakteriální buňky
- Jaké jsou tvarové možnosti bakterie
- Jaké jsou možnosti uspořádání bakterií
- Zvláštní formy života bakterií – spory

Z čeho se skládá bakteriální buňka

- Stočený chromozom coby předchůdce jádra
- Ribozomy, nutné k proteosyntéze
- Cytoplasma, prostředí uvnitř buňky
- Cytoplasmatická membrána
- Buněčná stěna
- Vakuoly, buněčné inkluze – dočasná záležitost
- Plasmidy
- Bičíky a fimbrie
- Pouzdro, biofilm

Buňky *Streptococcus pneumoniae*

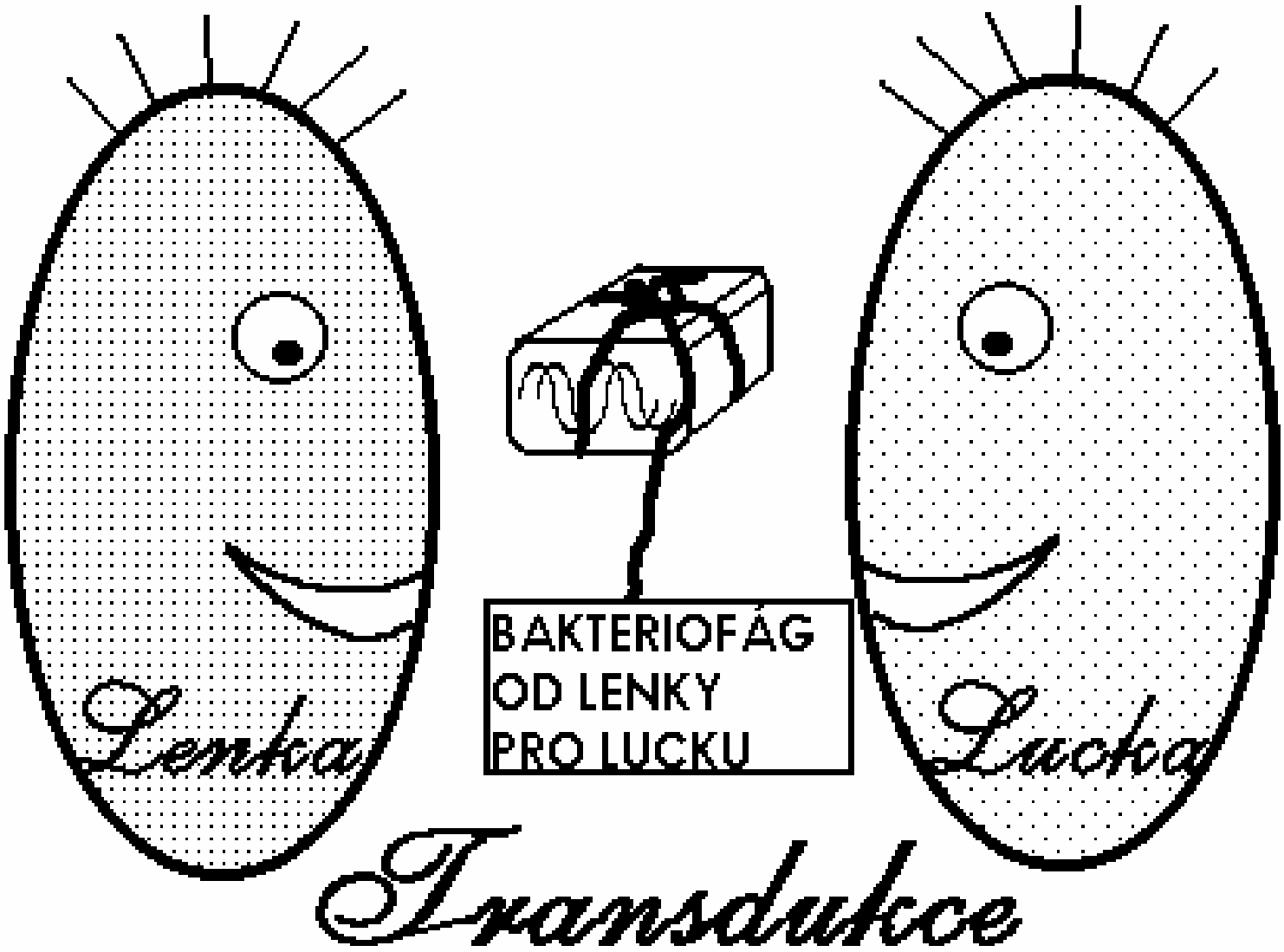


Chromozom a ribozomy

- Chromozom kruhového tvaru
- Ribozomy jiné než v eukaryotních buňkách
- Bakteriální „jádra“ nejsou viditelná v optickém mikroskopu
- Kromě chromozomu je genetická informace i v plasmidech (často virového původu)

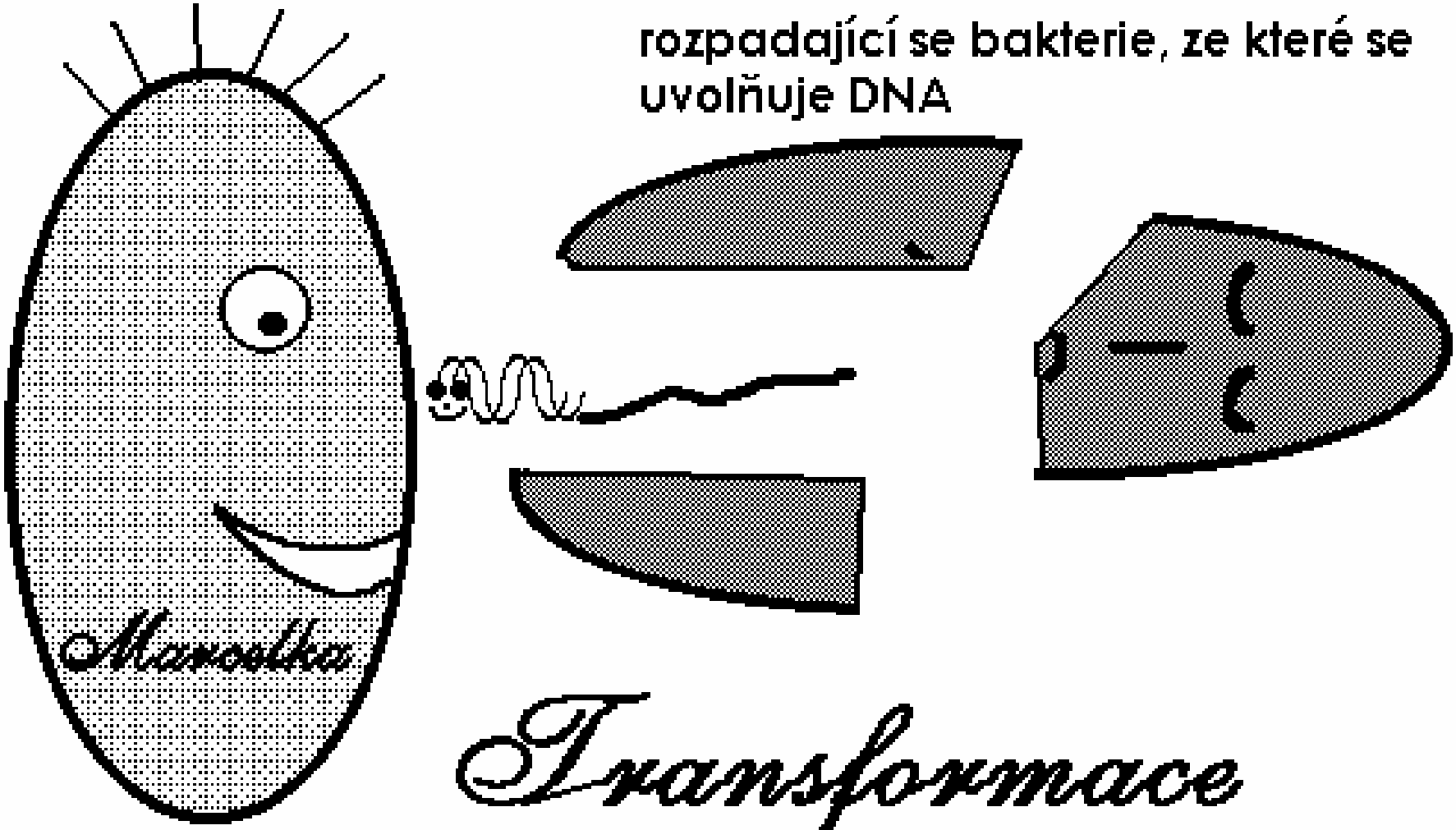
Jak může buňka přijít k plasmidu

- Existují v zásadě tři způsoby: transdukce, transformace a konjugace
- Pro různé bakterie je typický ten nebo onen, anebo žádný způsob
- Je to i prakticky významné – plasmidy kódují třeba i rezistenci na antibiotika

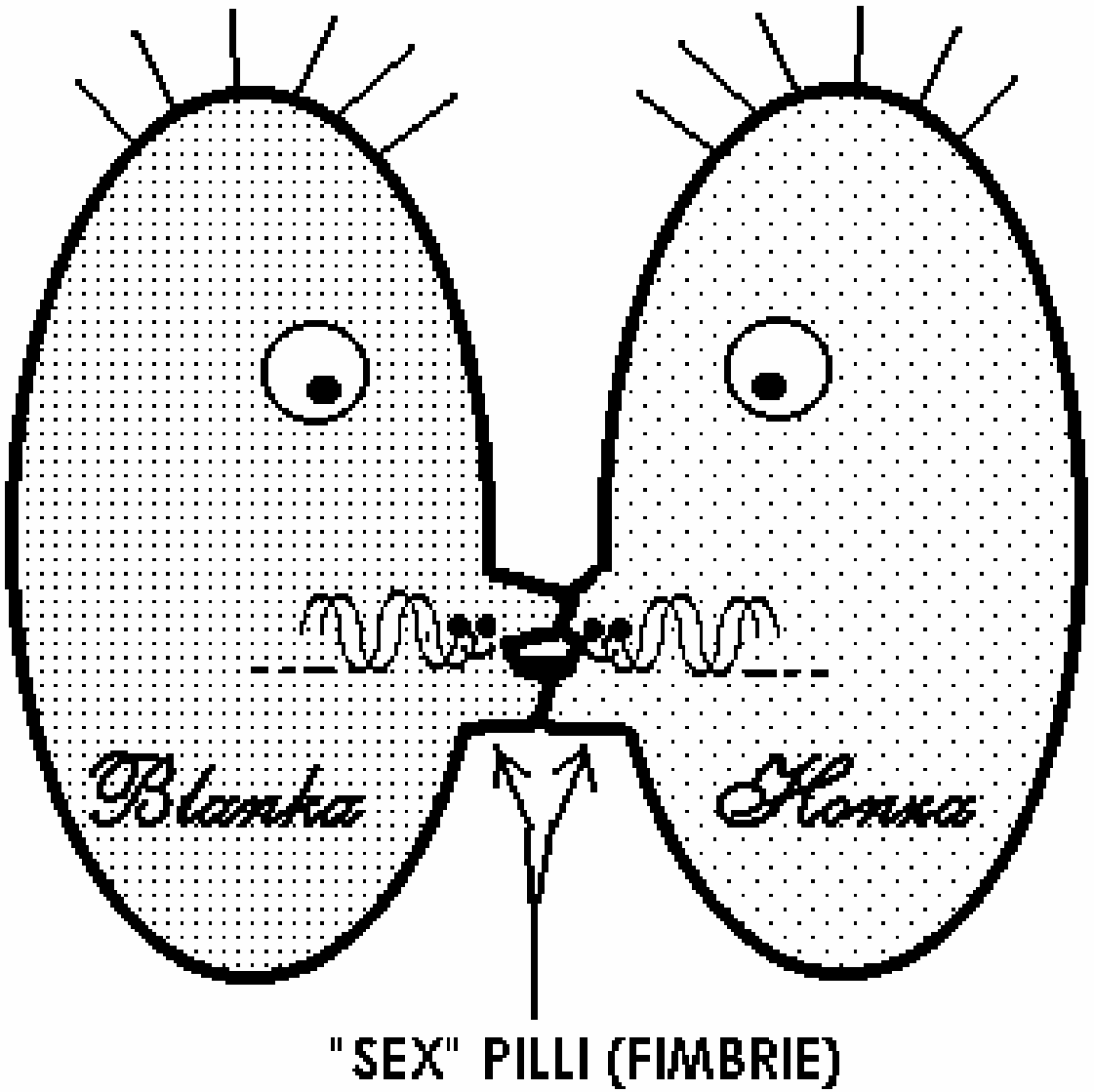


Transdukce

rozpadající se bakterie, ze které se uvolňuje DNA



Transformace



Kon-jugace

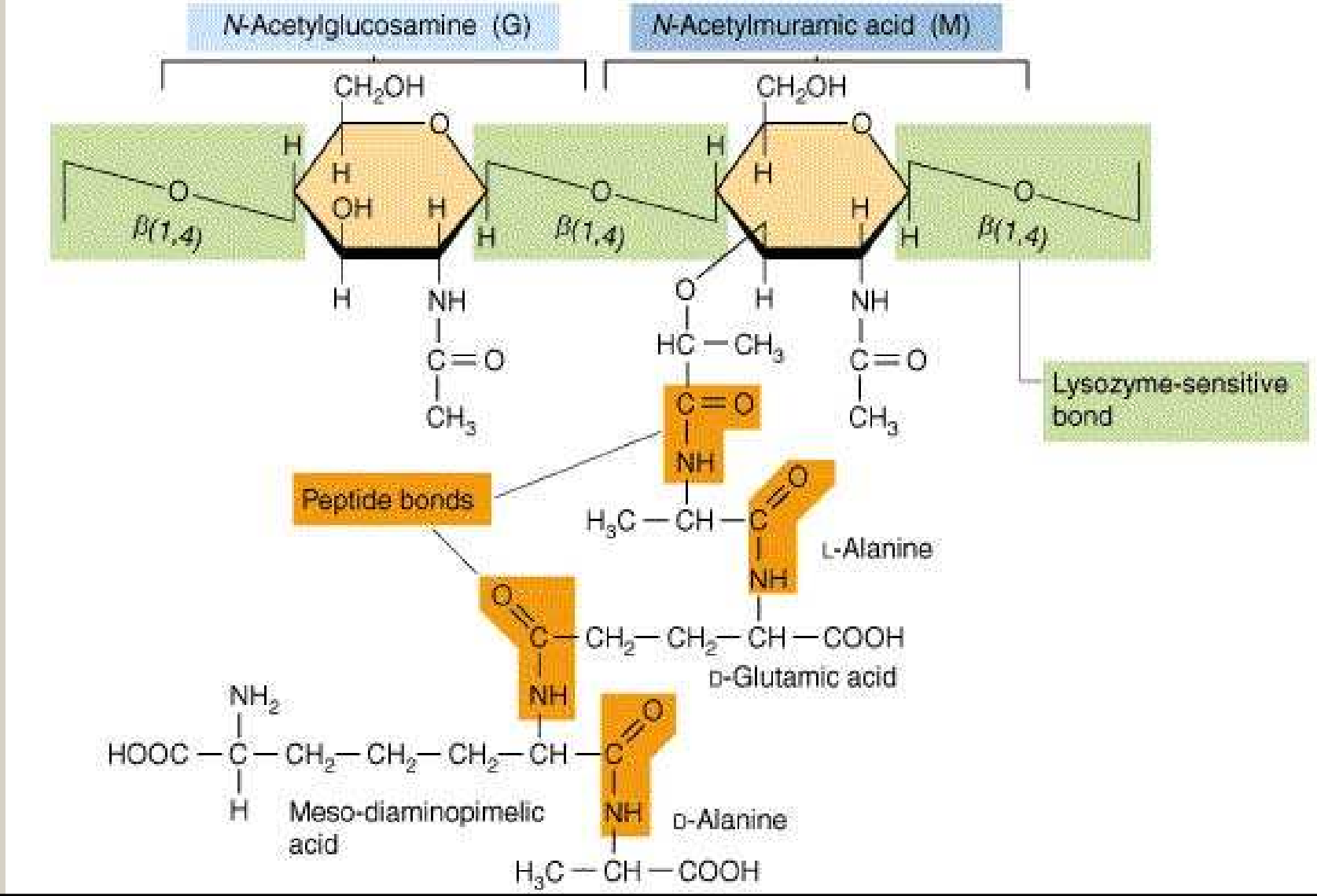
Cytoplasma a cytoplasmatická membrána

- Jak v cytoplasmě, tak i na cytoplasmatické membráně probíhá řada chemických procesů
- Na membráně především ty, které využívají rozdílu např. v koncentraci určitých iontů vně a uvnitř buňky
- Membrána zároveň chrání buňku před chemickými a jinými vlivy

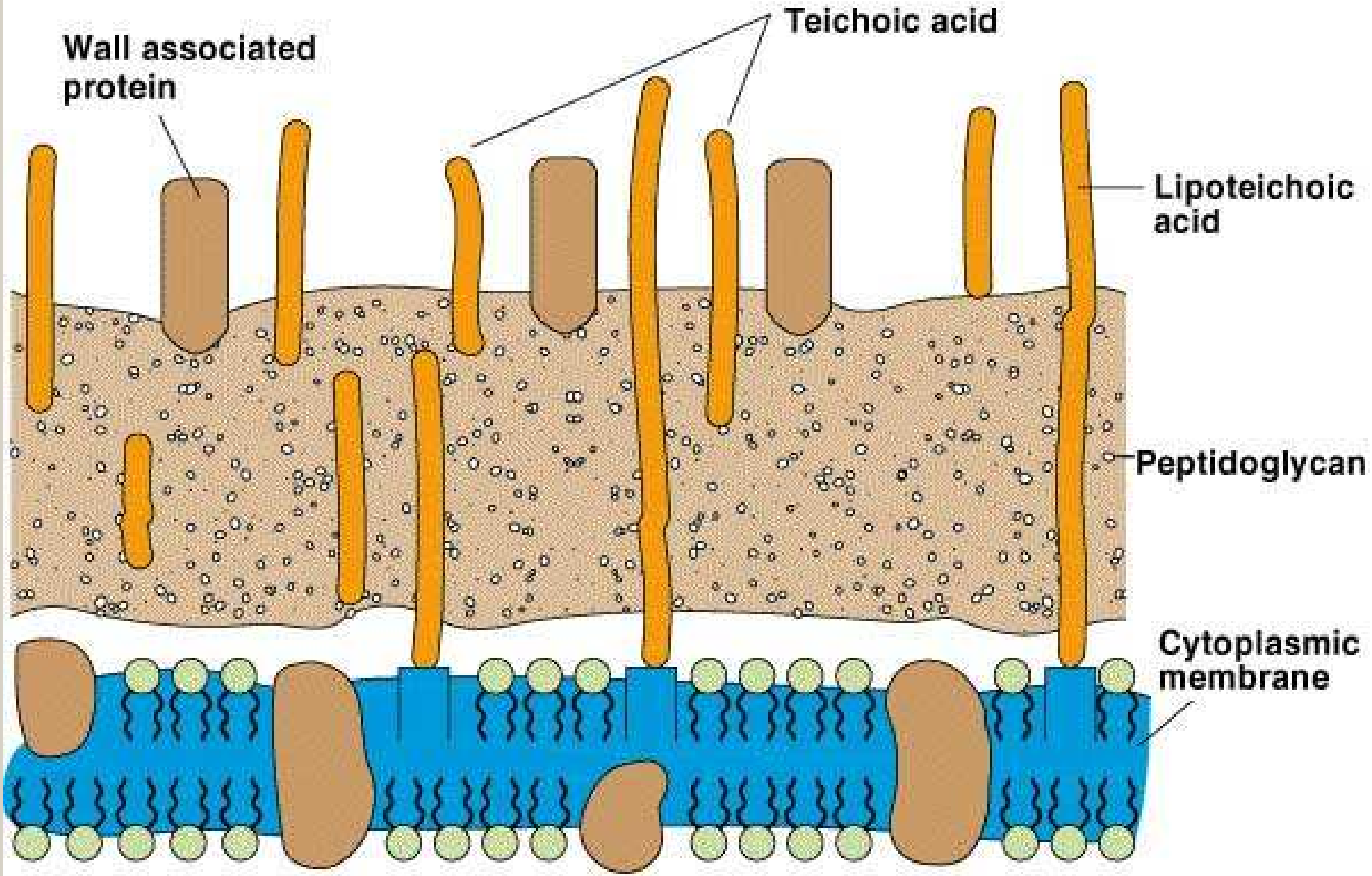
Buněčná stěna

- Grampozitivní bakterie mají buněčnou stěnu tlustou a jednoduchou
- Gramnegativní bakterie mají buněčnou stěnu tenkou a složitější
- Některé bakterie mají jinou buněčnou stěnu (mykobakteria – acidoresistentní, v buňce jsou mykolové kyseliny)
- Některé bakterie (mykoplasmata) buněčnou stěnu vůbec nemají

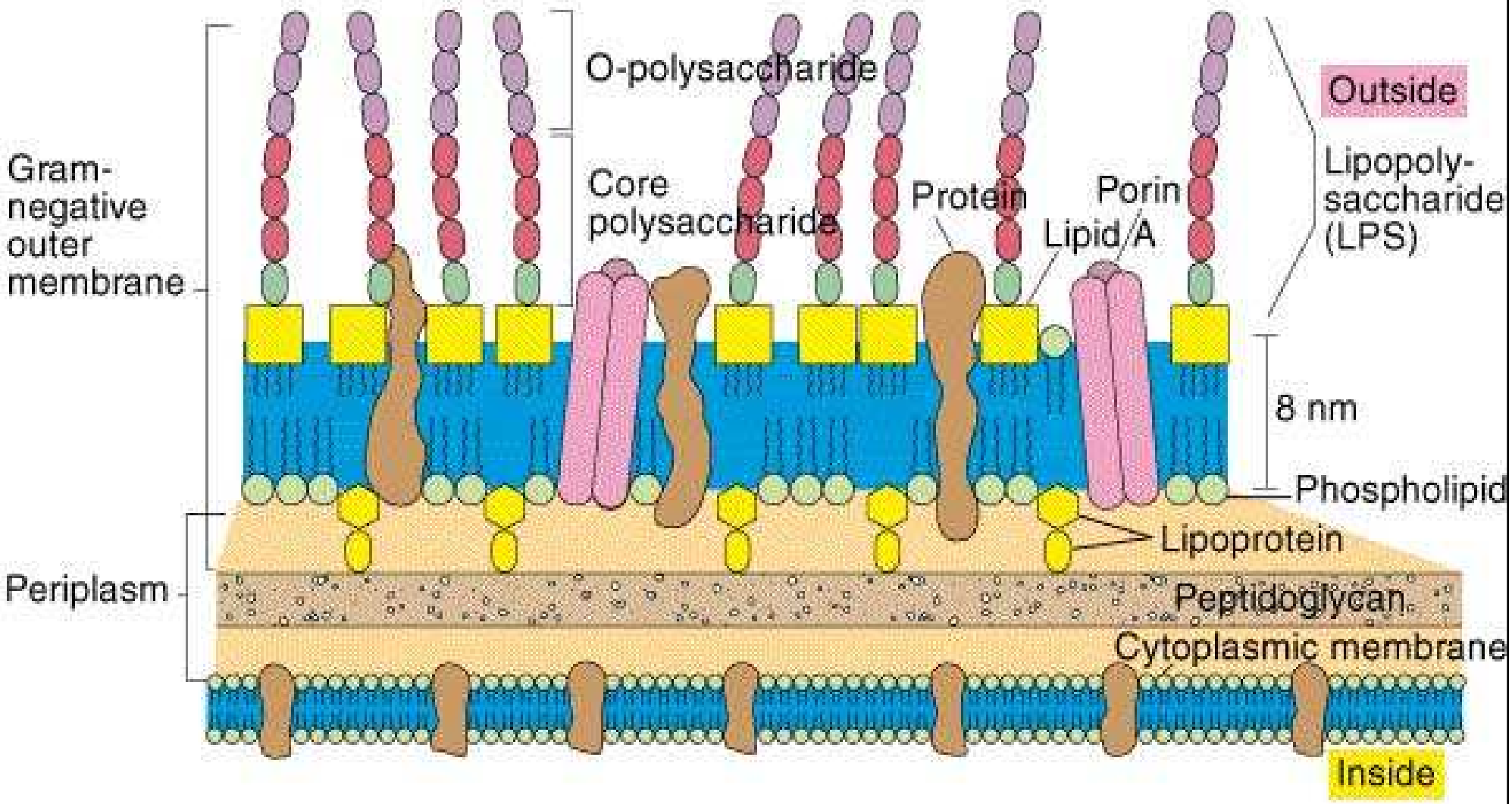
Základem každé buněčné stěny je peptidoglykan (murein)



Grampozitivní buněčná stěna



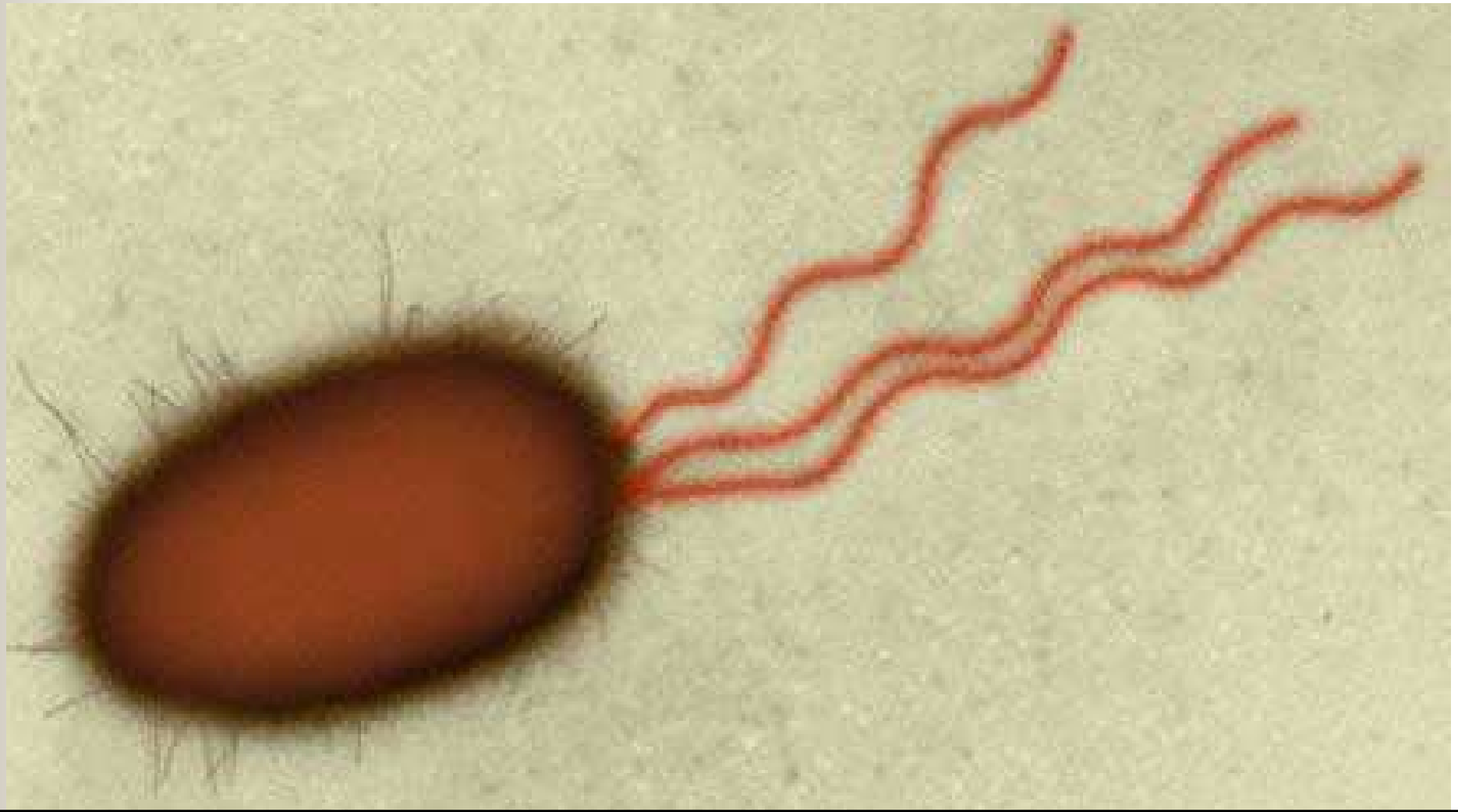
Gramnegativní buněčná stěna



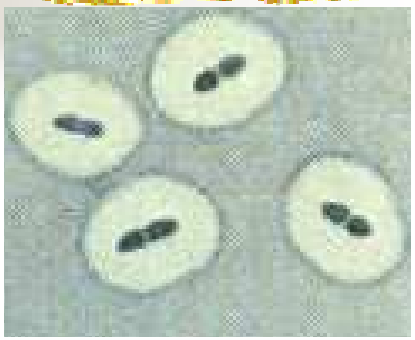
Fimbrie a bičíky

- Mnohé bakterie jsou schopny pohybu
- K pohybu slouží hlavně bičíky
- Fimbrie mohou vedle pohybu sloužit např. i k adhezi bakterie na povrch, ke konjugaci a podobně
- Bičíky bakterií jsou úplně jiné než bičíky eukaryotních organismů

Bakterie s bičíky *(Escherichia coli)*



Pouzdro a biofilm



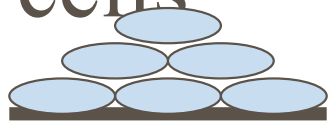
- Pouzdro obklopuje jednotlivou bakterii, popř. dvojici. Není to už integrální součást bakteriální buňky, spíš nánosy molekul (většinou polysacharidů), které buňku chrání
- Biofilm je souvislá vrstva, vzniklá z bakterií, jejich pouzder a dalšího materiálu. Biofilm je mnohem odolnější než jednotlivá bakterie, žijící v tzv. planktonické formě

Stages of biofilm development

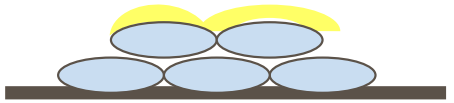
- Direct contact of a planktonic bacteria with a surface

- Attachment to this surface

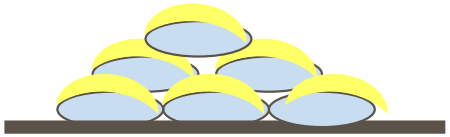
- Adhesion, growth, and aggregation of cells into microcolonies



- Production of polymeric matrix



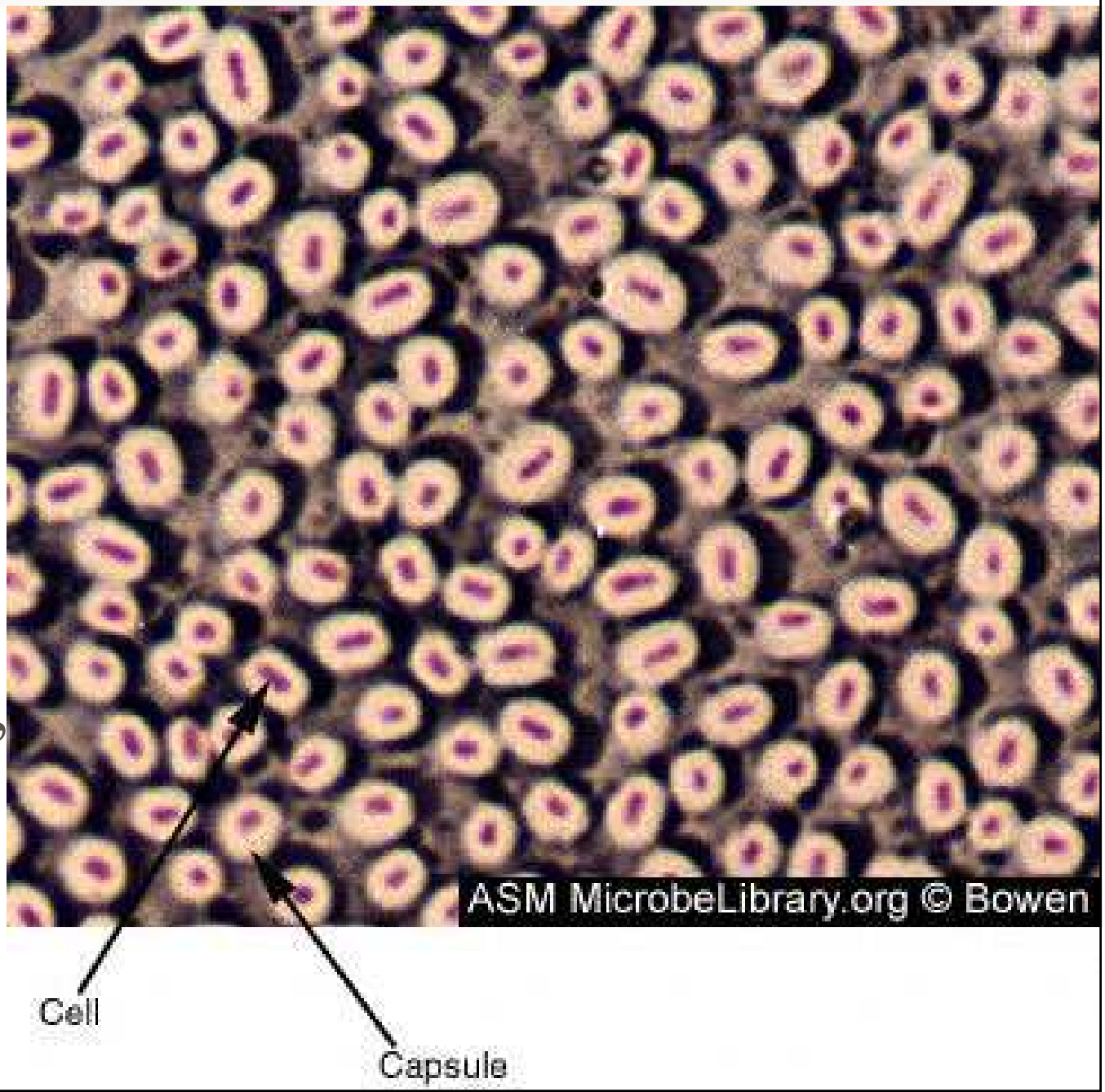
- Formation of three-dimensional structure known as biofilm



(Z prezentace dr. Černohorské)

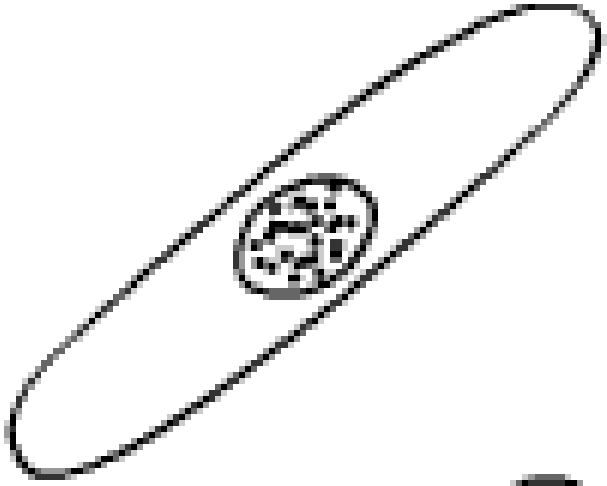
Neobarvené pouzdro

- V barvení dle Burriho byly nabarveny bakterie na červeno a pozadí pak dobarveno tuší, tuší se pak pouzdro tam, kde se nic neobarvilo



Sporulace

- Sporulace je něco jako zimní spánek, ale dovedený oproti zimnímu spánku zvířat k mnohem větší dokonalosti
- Spory přežijí velmi vysoké teploty, vyschnutí, desinfekci a podobně
- Spora vzniká jako endospora: buňka se rozdělí, ale neoddělí úplně: jedna část se mění ve sporu, která je zavzata do té druhé buňky
- *Nepleťme si spory bakterií a spory hub!*

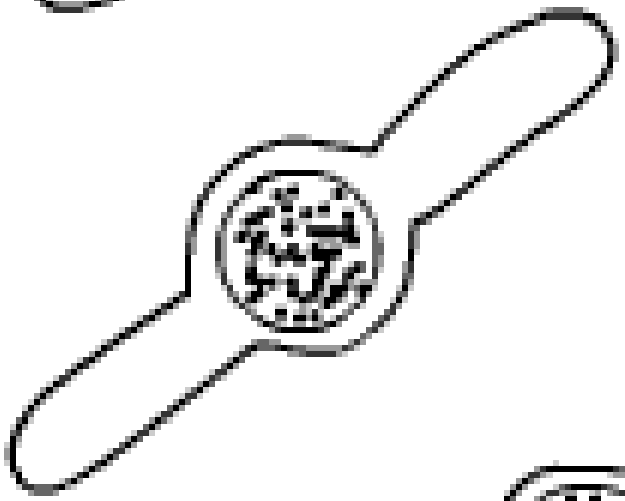


ex : B. Subtilis

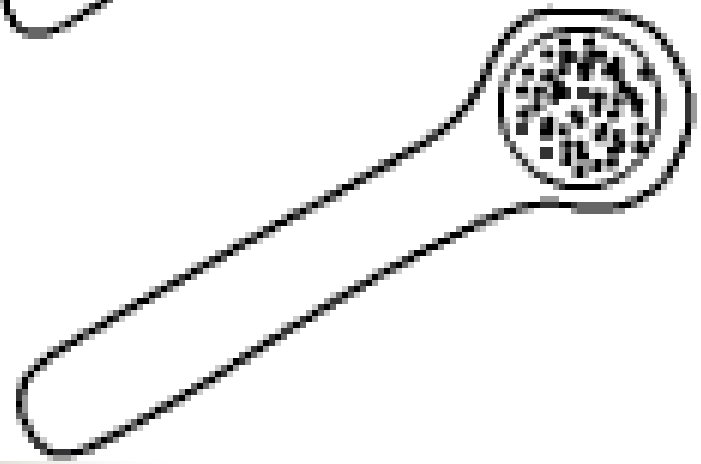
B. Cereus

B. Thuringiensis

B. Anthracis

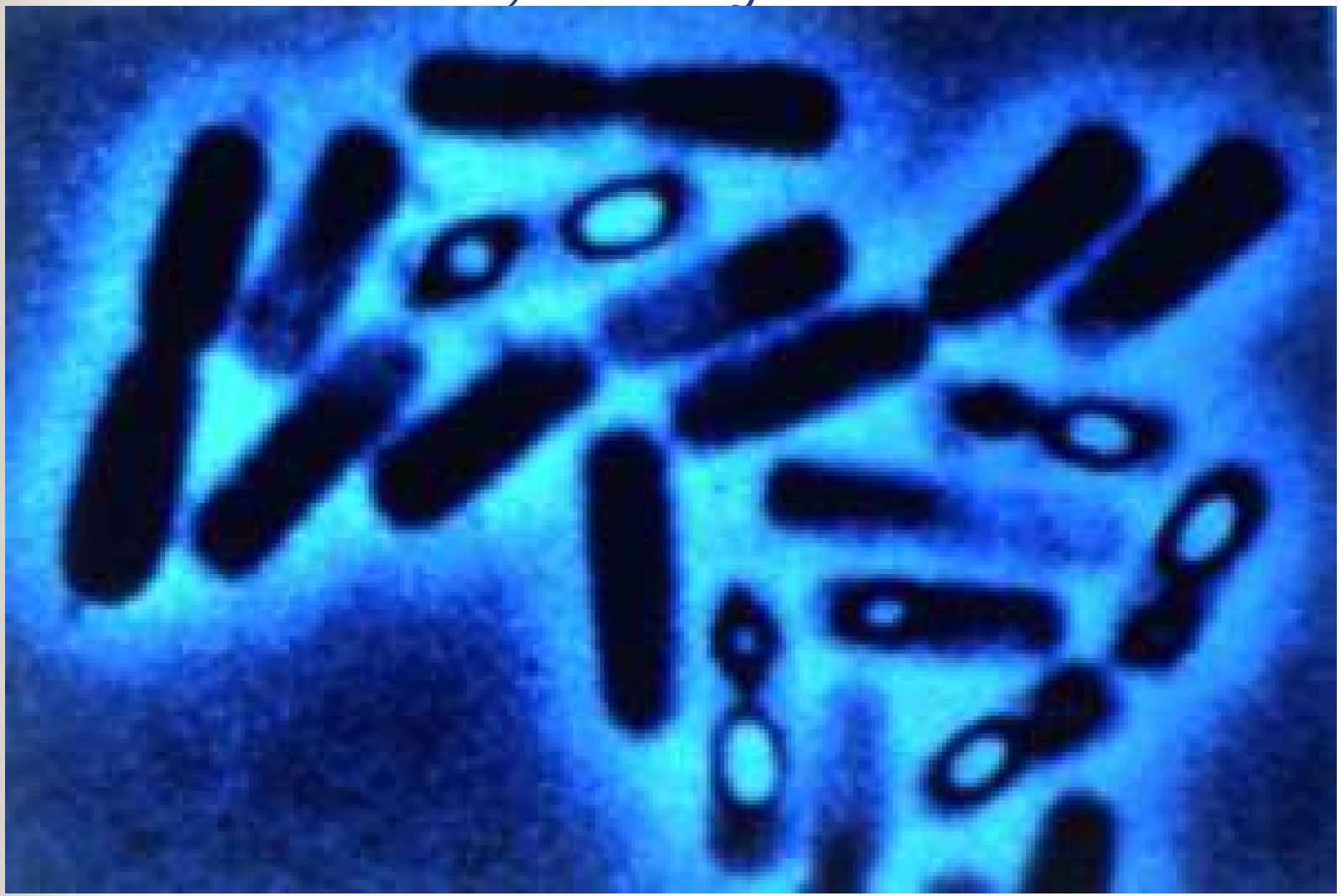


ex : B. Polyxyma (fixe le N2)



ex : B. Pasteurii (dégrade l'Urée)

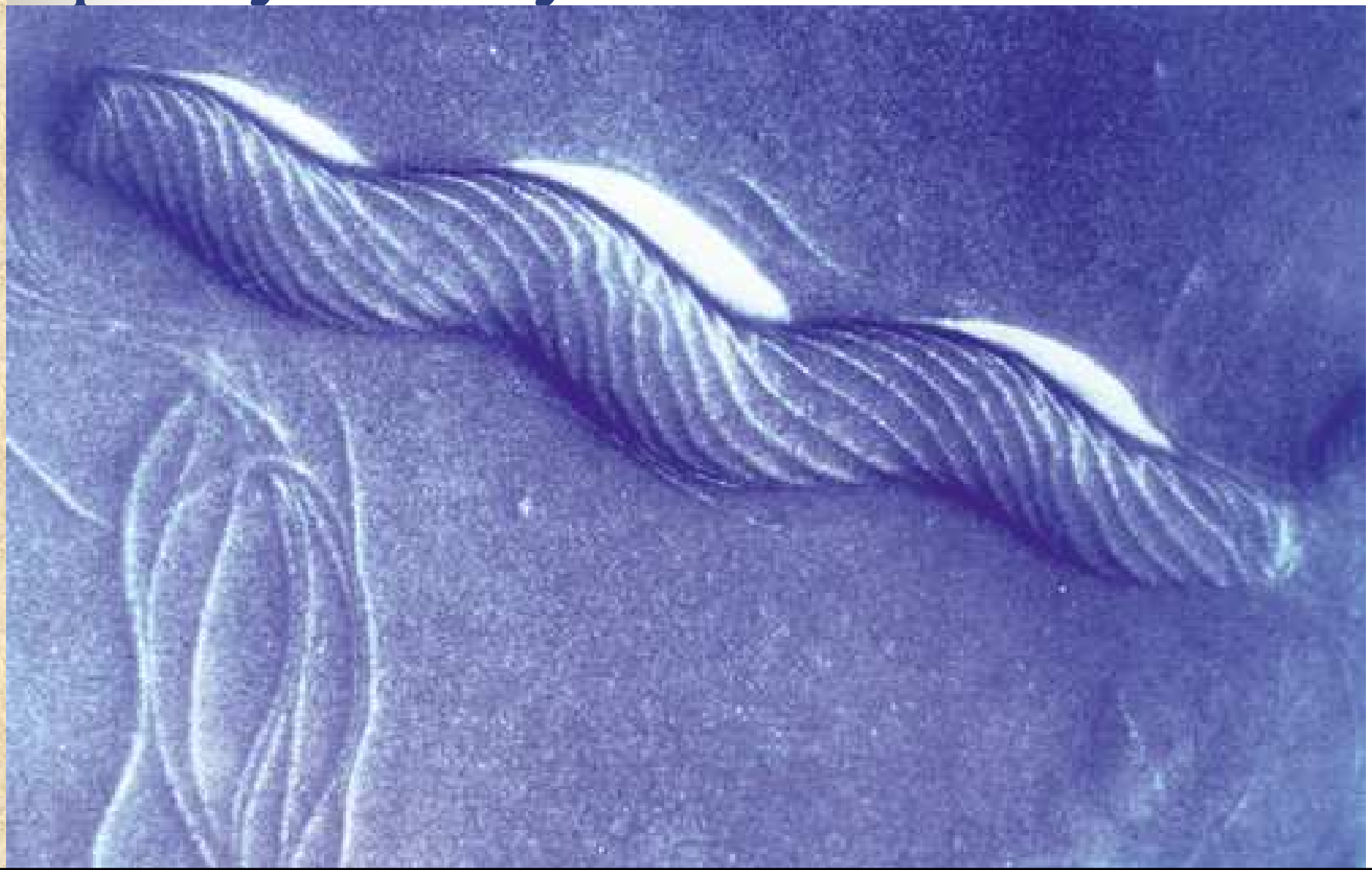
Spory jsou biochemicky inaktivní, samy o sobě se nebarví



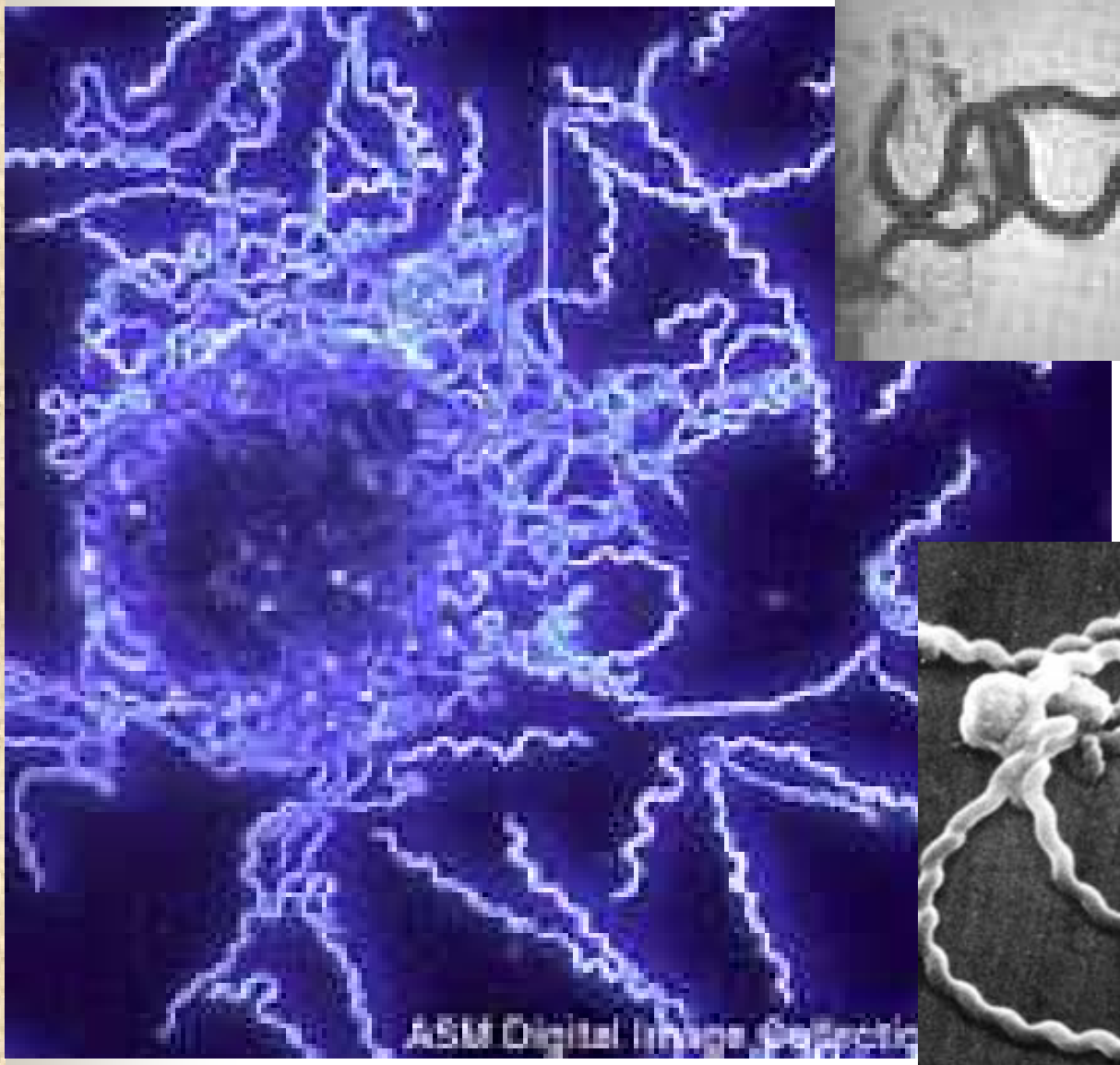
Tvarové možnosti bakterií

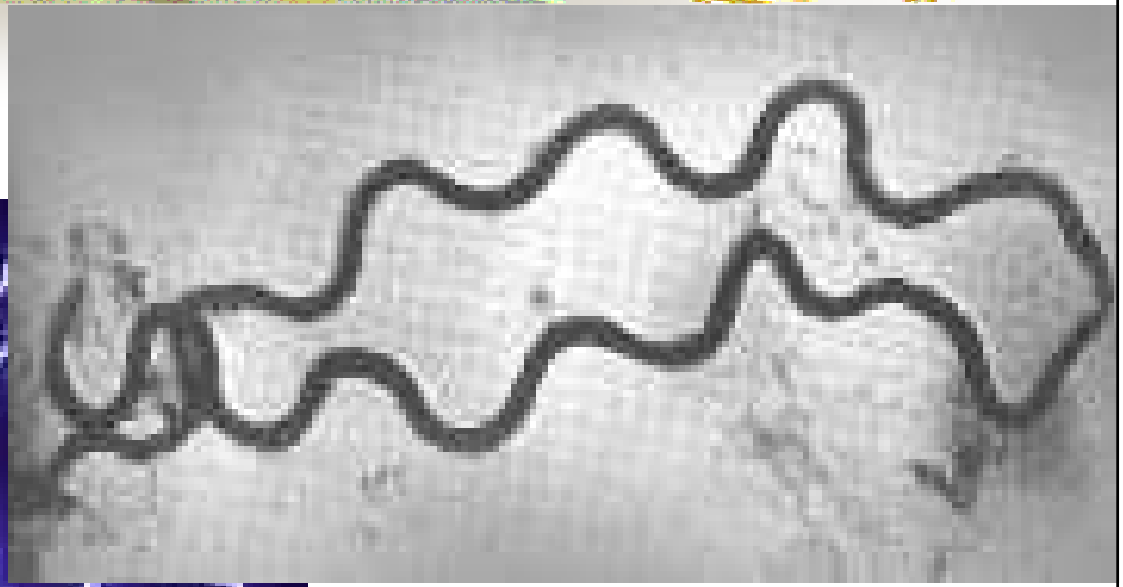
- Koky (kulaté, protáhlé, ploché)
- Kokotyčinky
- Tyčinky (rovné, zahnuté, s oblými či špičatými konci, tlusté, tenké)
- Vláknité bakterie (zvláštní případ tyčinek)
- Spirální bakterie – spirochety
- Beztvaré bakterie, např. mykoplasmata

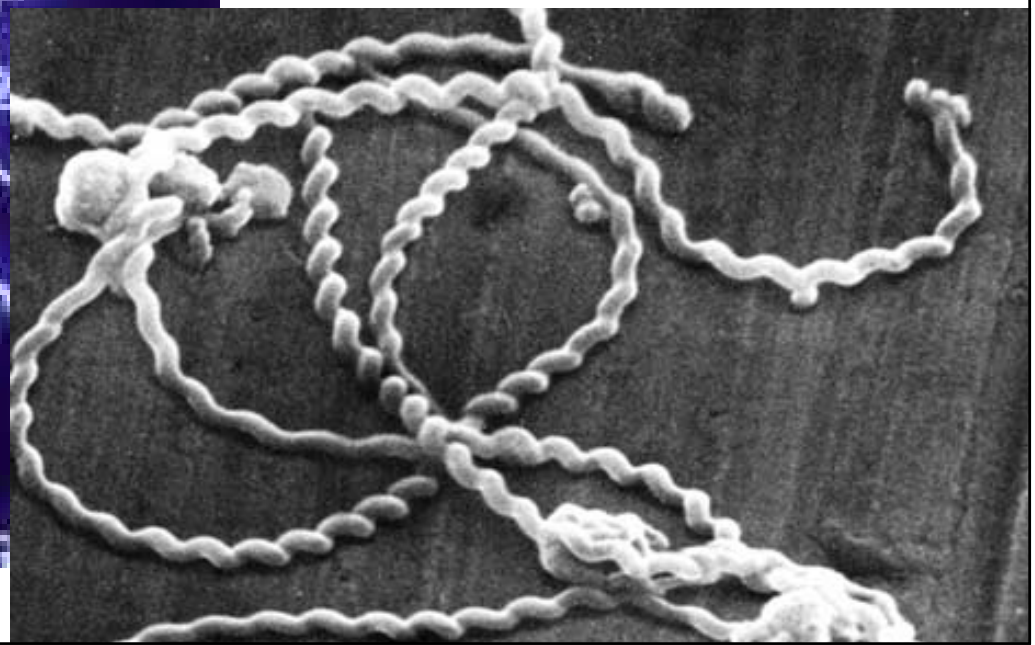
Zprohýbaná tyčinka – helikobakter

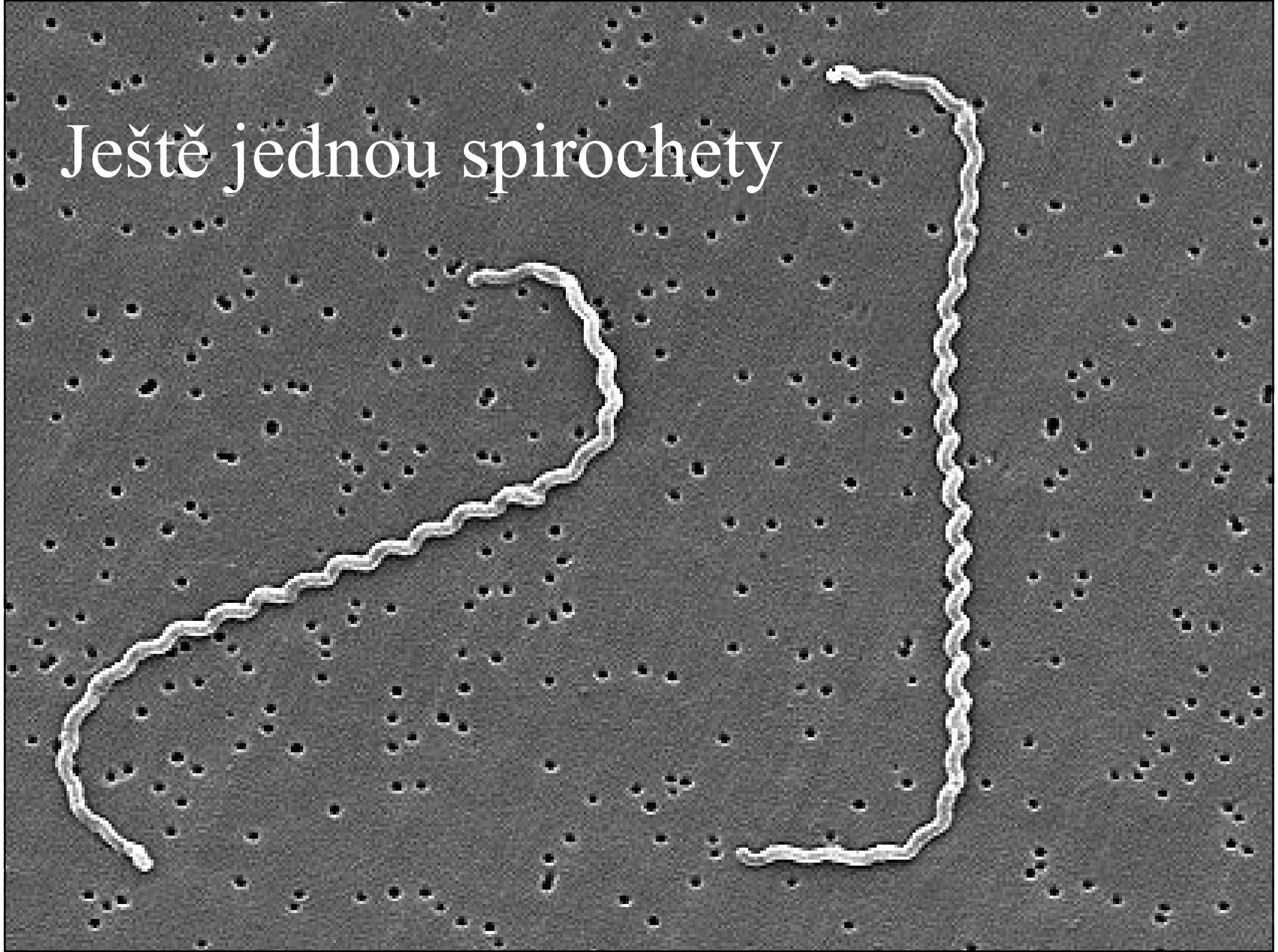


Spirochety



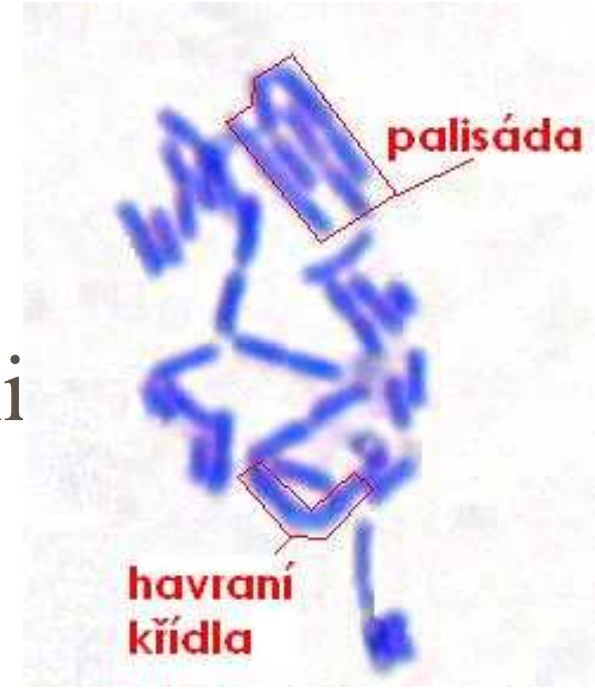




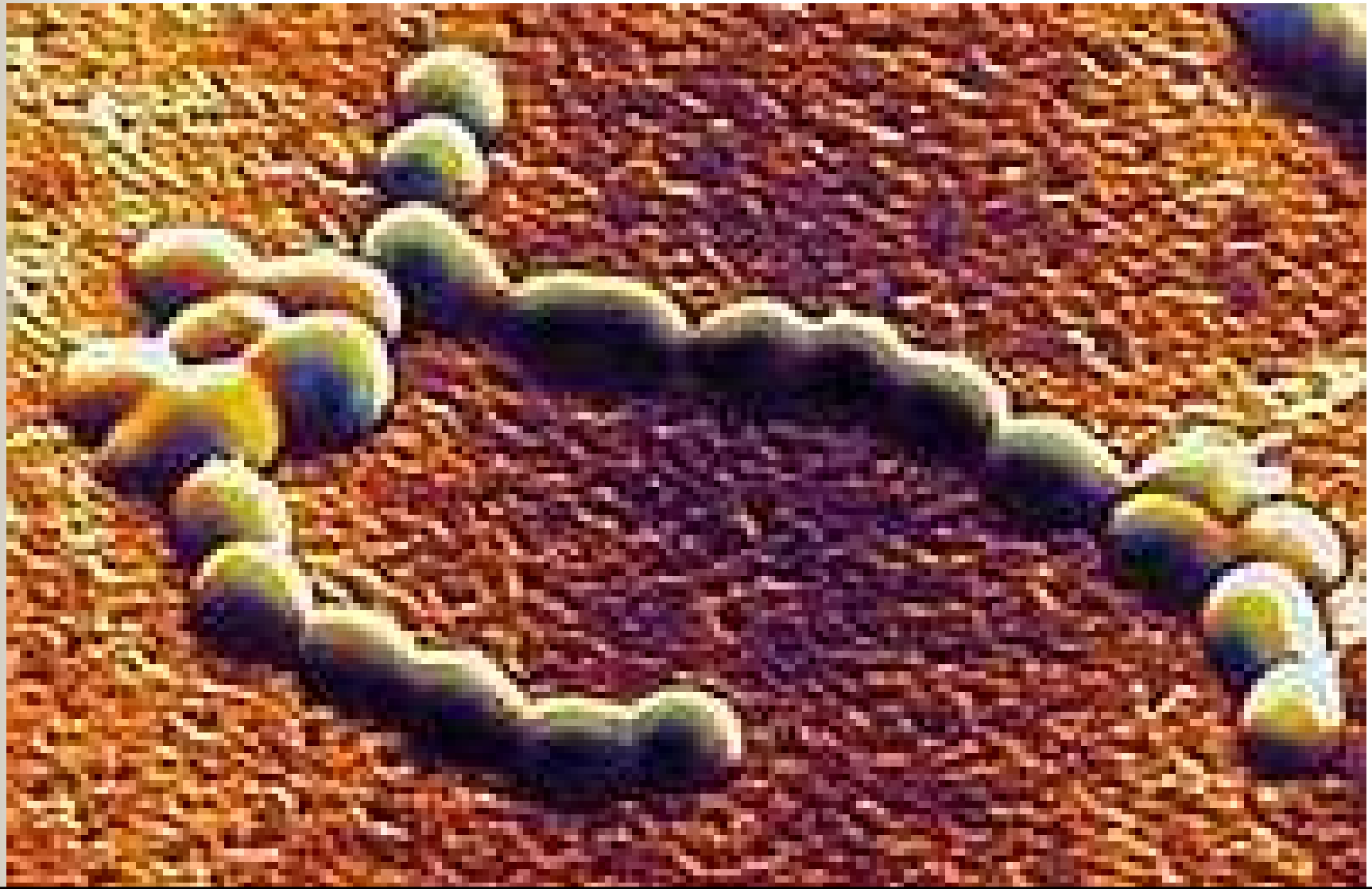

Ještě jednou spirochety

Možnosti uspořádání bakterií

- Jednotlivě
- Dvojice
- Čtveřice, skupiny po osmi
- Shluky
- Řetízky
- U tyčinek: palisády (||||||), řetízky (-----)

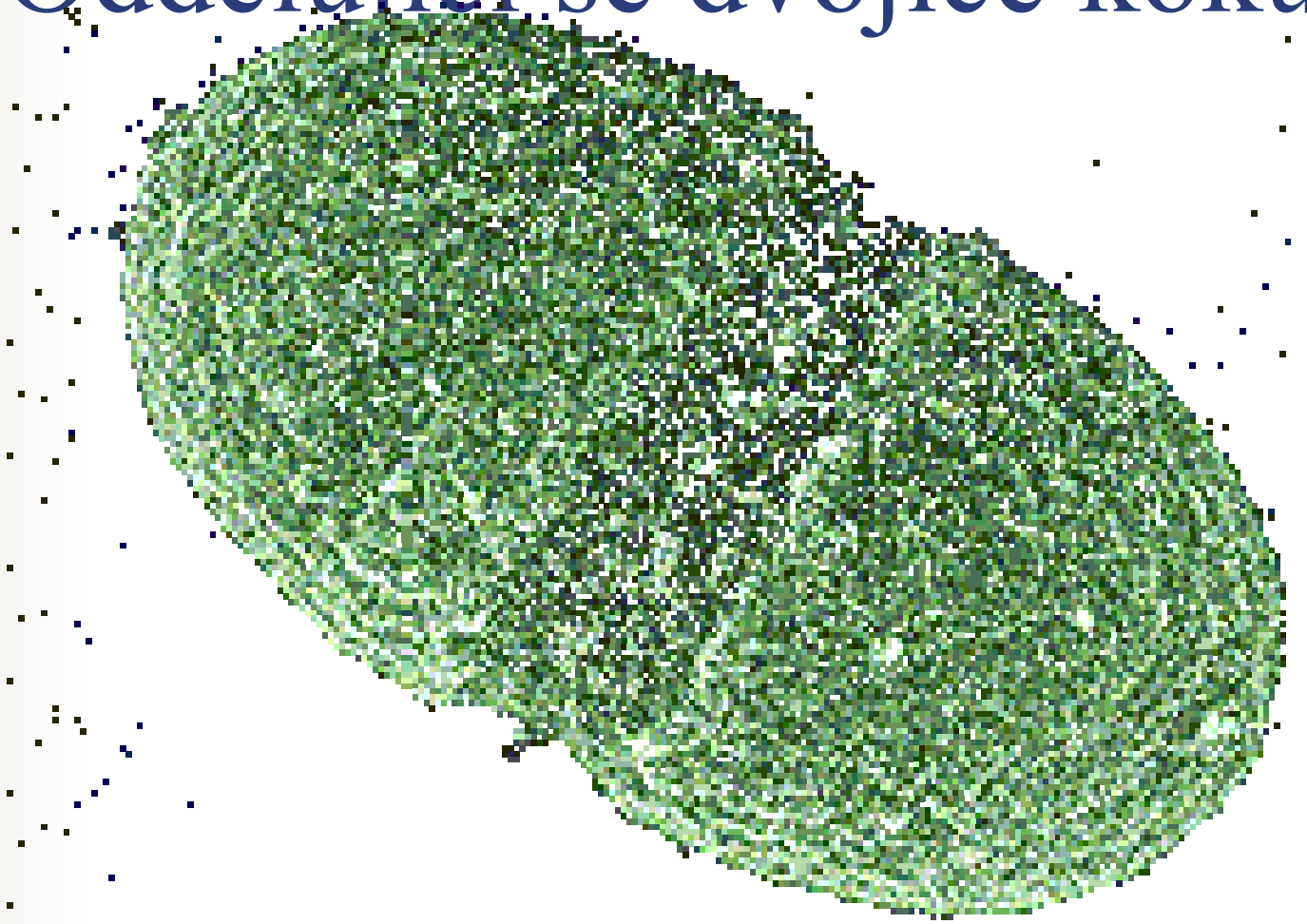


Koky v řetízcích (elektronová mikrofotografie *Enterococcus* sp.)



Řetízky v Gramově barvení

Oddělující se dvojice koků



Mikroskopie bakterií

- Bakterie jsou **dobře viditelné v elektronovém mikroskopu**, v praxi se nevyužívá
- **V optickém mikroskopu jsou viditelné mizerně**. Lépe je vidíme, pokud se pohybují
- Nemůžeme však spoléhat na pohyblivost bakterií. Zviditelníme je proto jinak: **fixujeme je a obarvíme některou z barvících metod**

Práce s mikroskopem

- S mikroskopem zpravidla pracuje mikrobiolog (MUDr., RNDr., Mgr.), avšak i laborant by měl znát základy mikroskopické techniky, včetně údržby mikroskopu
- Laborant často připravuje mikroskopické preparáty, musí je umět připravit tak, aby byly dobře viditelné. Nejde jen o samotné barvicí metody, ale i přípravu nátěru (nesmí být příliš řídký, příliš hustý, při fixaci se nesmí spálit aj.)

Části mikroskopu – dopadající světlo

- **Světlo** prochází ze zdroje světla přes kolektor a kondenzor. Kvalitu a množství paprsků ovlivňuje
  - intenzita napětí zdroje světla
  - irisová clona kolektoru (v dolní části mikroskopu)
  - nastavení výšky kondenzoru
  - nastavení clony kondenzoru (apertura)
- **Výška kondenzoru** se obvykle nastaví při zaclonění. V jednom okamžiku okraj clony přestane být modrý a začne být červený – to je ten správný moment. Pak se clona zase rozevře.

Zvětšovací optika

- V mikrobiologii používáme zpravidla binokulární mikroskop s vyjímatelnými **okuláry** zvětšujícími 10×
- **Objektivy** se používají 4×, 10×, 20×, 40×, 60× a imerzní objektiv zvětšující 100×. „Imerzní“ znamená, že mezi preparát a objektiv se kápne imerzní olej, jehož index lomu je bližší indexu lomu skla, než v případě vzduchu

Zaostřování a vlastní mikroskopie

- Aniž bychom se dívali do okuláru, **přiblížíme** makrošroubem preparát k objektivu na co nejtěsnější vzdálenost
- Nyní, již pod kontrolou zraku preparát **opatrně oddalujeme**, nejdříve makrošroubem, pak i mikrošroubem, až se dostaneme na příslušnou hladinu ostrosti
- V některých případech (hlavně u nativních preparátů) není jedna hladina ostrosti, ale je nutno stále **přeostřovat** na „dno“ a „hladinu“ prostoru vyplněného tekutinou

Čištění mikroskopu

- Po každém použití imerzního oleje je nutno očistit **objektiv gázou s alkoholéterem** (méně vhodný, leč použitelný, je benzín)
- Občas je nutno očistit **i neimerzní objektivy**, zejména pokud jsou potřísněny např. olejem
- Při potřísnění je také nutno otřít **mikroskopický stolek**, zde stačí čtvereček buničité vaty s benzínem. Nečistota často ulpívá pod zařízením pro uchycení sklíčka

Jednoduché barvení

- K **jednoduchému barvení** můžeme použít kde co, například methylenovou modř
- V laboratorní praxi se zpravidla nepoužívá, můžeme ho však doporučit např. při telefonické konzultaci vzdálenému klinickému pracovišti
- Fixovaný preparát se přelije jedním barvivem, a po zaschnutí se pozoruje

Gramovo barvení

	Gram +	**Gram -**
Krystalová violeť 30 s	Obarví se na fialovo	Pevně se obarví na fialovo
Lugol 30 s	Barva se zesílí	Prakticky se nic nestane
Alkohol 15 s	Nestačí se obarvit	Odbarví se
Safranin 60 s	Vše dosud neobarvené se obarví na červeno	

Směs G+ a G- bakterií

Další barvicí metody

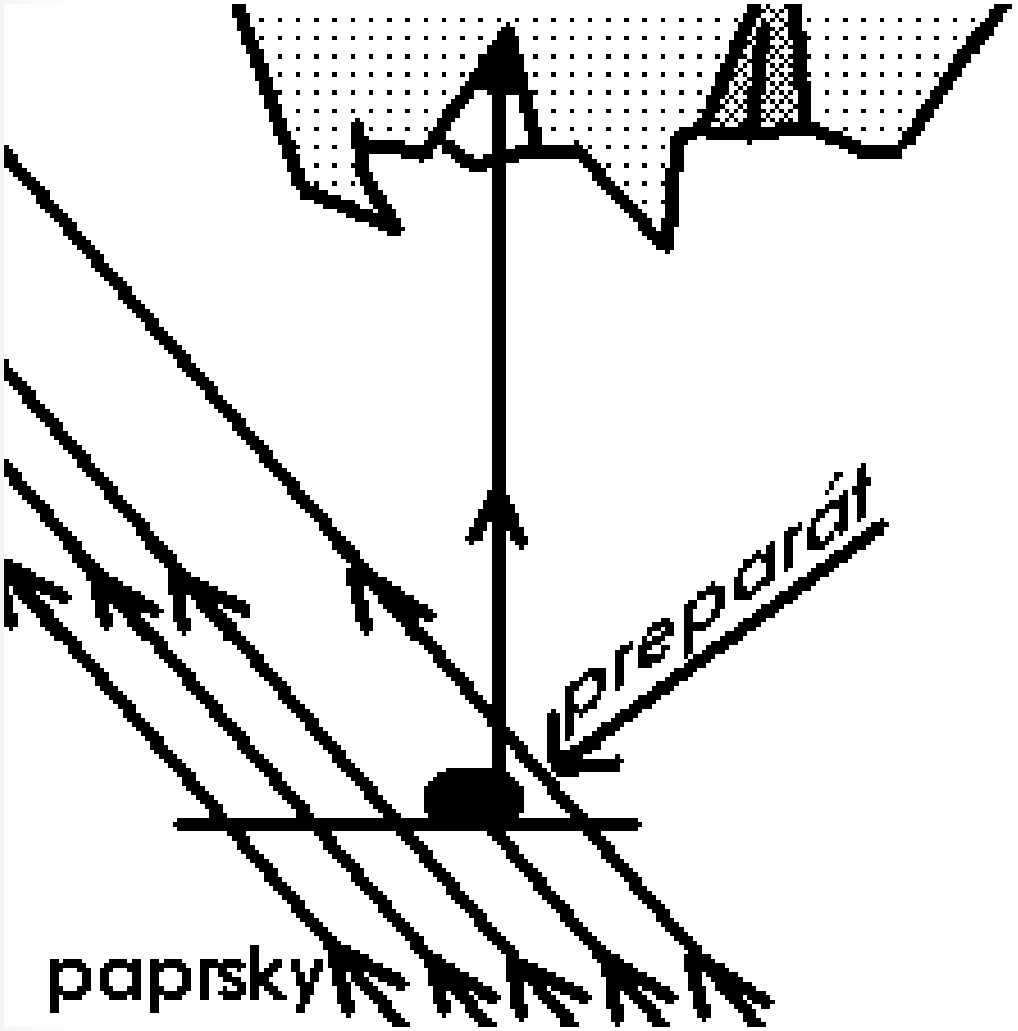
- Barvení podle Giemsy – spíše na parazity, na bakterie je příliš „brutální“
- Barvení dle Ziehl-Neelsena na acidorezistentní bakteria
- Barvení pouzder dle Burriho
- Barvení fluorescenčními barvivy

Fluorescenční barvení

Speciální mikroskopické techniky

- Mikroskopie v zástinu – používá se u světlolomných objektů (např. spirochet). Na objekt dopadají paprsky zešikma a do oka dopadnou POUZE ty, které se na něm zlomí
  - Anglicky se jí říká „darkfield microscopy“ – mikroskopie v temném poli. Pozadí je tmavé, bakterie světlá
- Mikroskopie ve fázovém kontrastu využívá fázový posun paprsku

Zástinová mikroskopie



Nashledanou

Příště budeme pokračovat povídáním o fyziologii bakterií a kultivačních půdách