

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

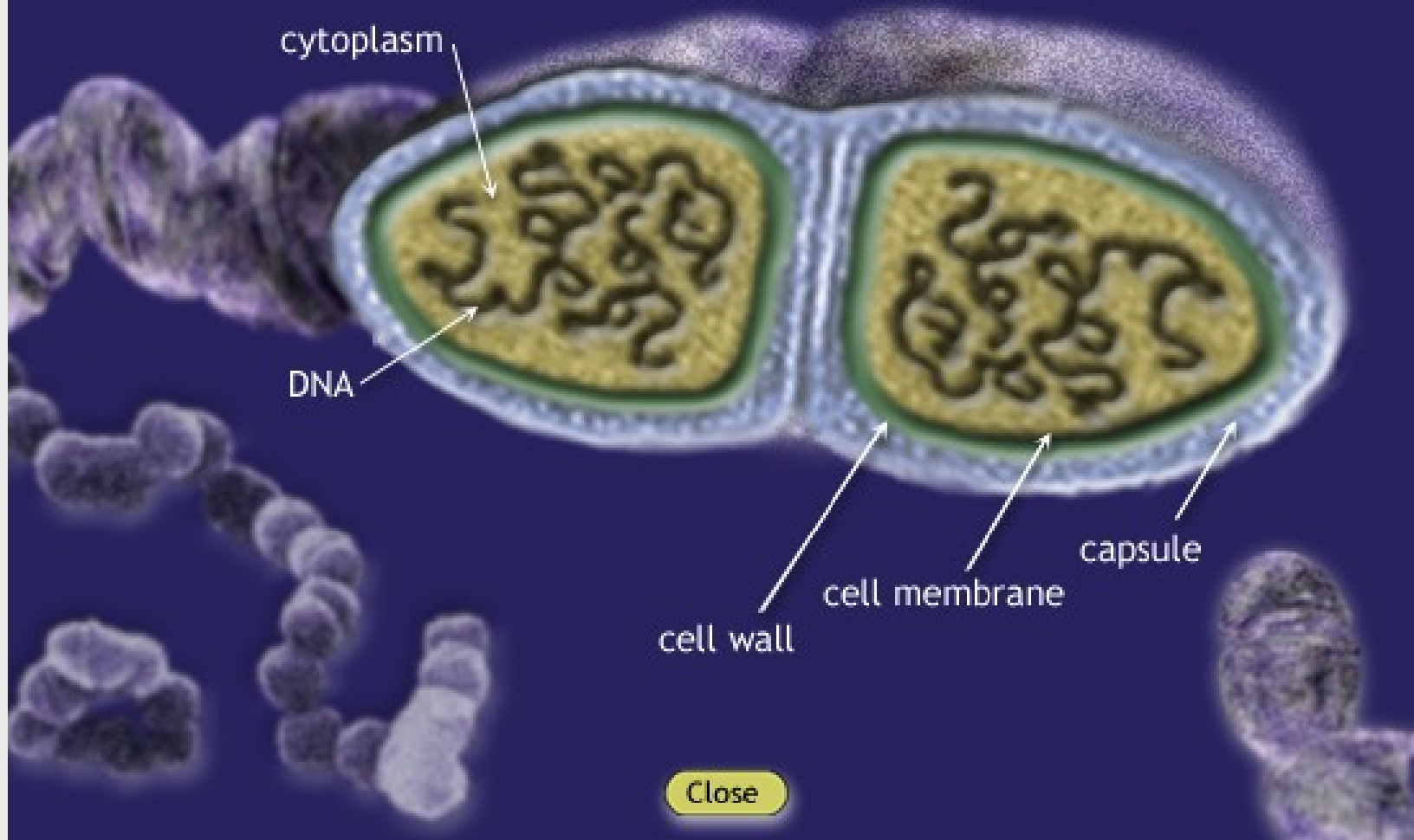
Z čeho se skládá bakteriální buňka

- 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*

www.uni-tuebingen.de

Figure 4. Cross-section of *Streptococcus pneumoniae*

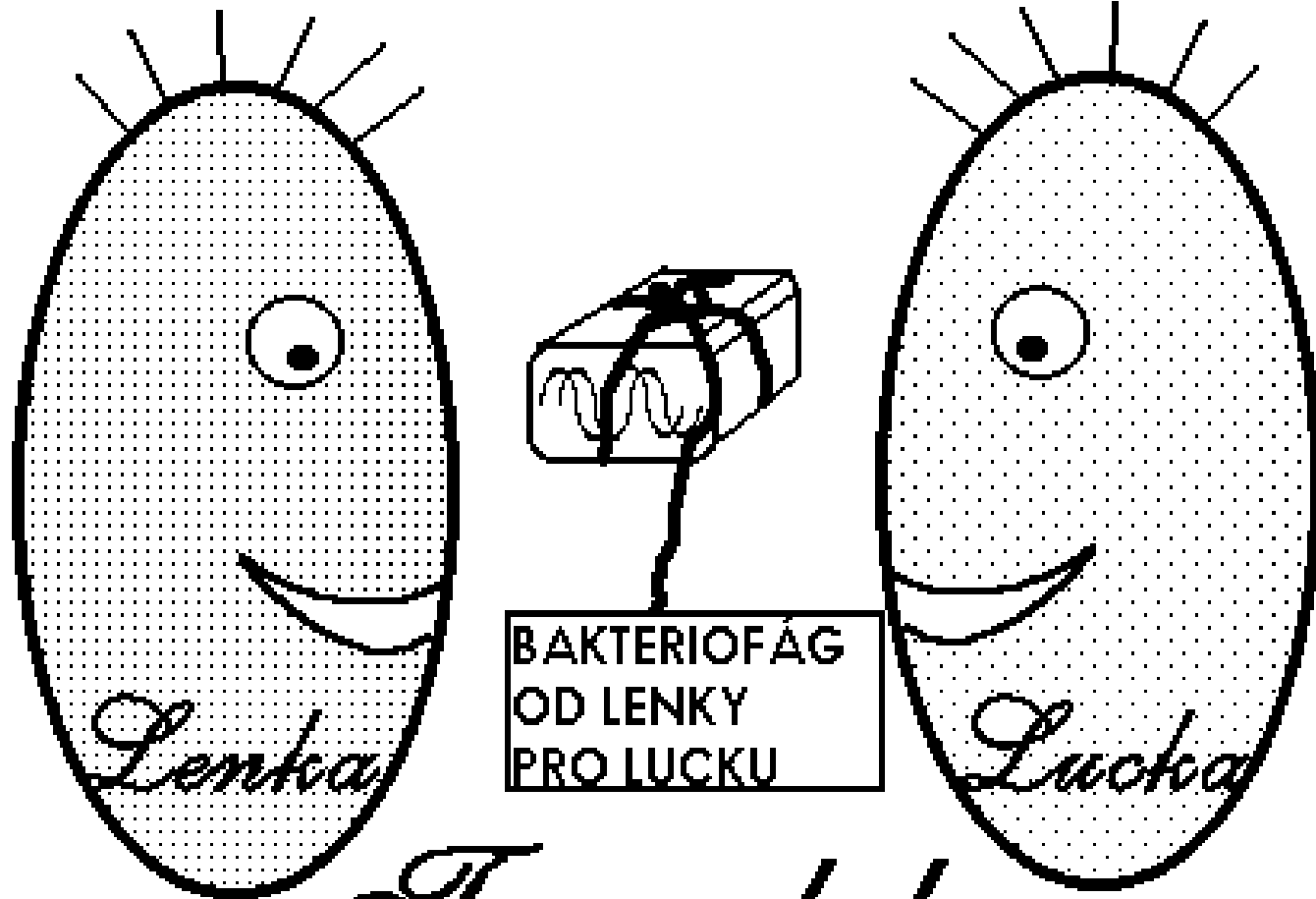


Chromozom a ribozomy

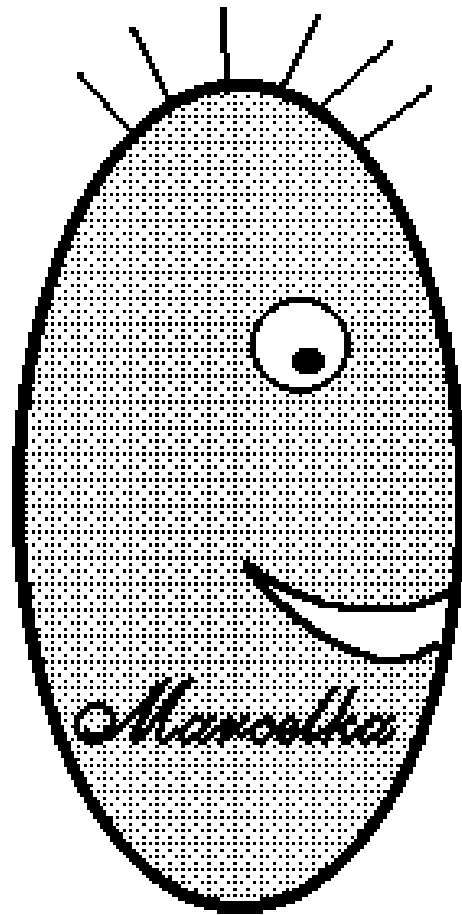
- Chromozom kruhového tvaru
- Ribozomy jiné než v eukaryotních buňkách
- Bakteriální „jádra“ nejsou viditelná v optickém mikroskopu
- Kromě chromozomu je genetická informace i v plasmidech (často virového původu)

Jak může buňka přijít k plasmidu

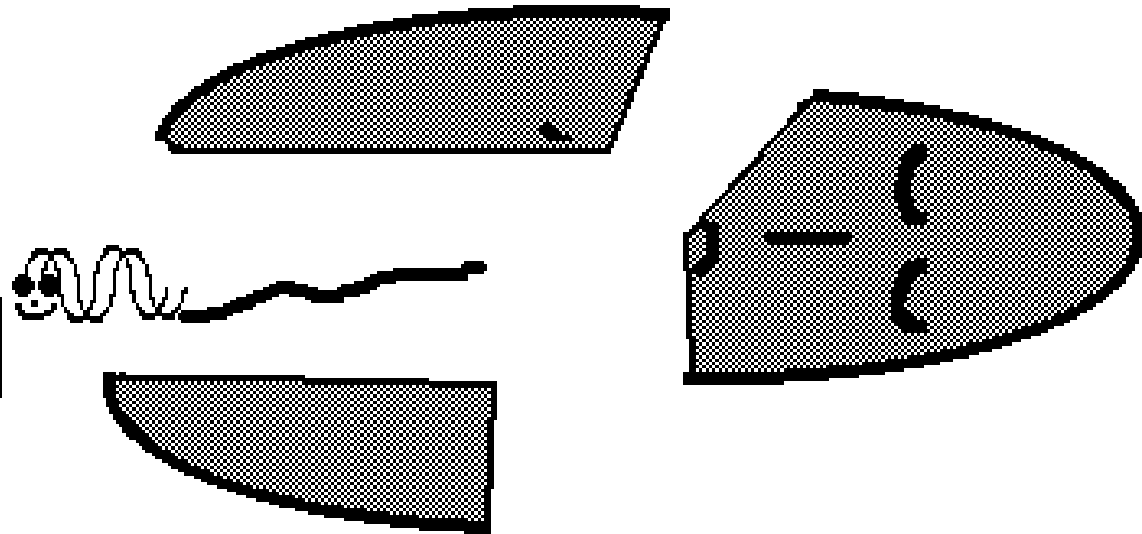
- Existují v zásadě tři způsoby: transdukce, transformace a konjugace
- Pro různé bakterie je typický ten nebo onen, anebo žádný způsob
- Je to i prakticky významné – plasmidy kódují třeba i rezistenci na antibiotika



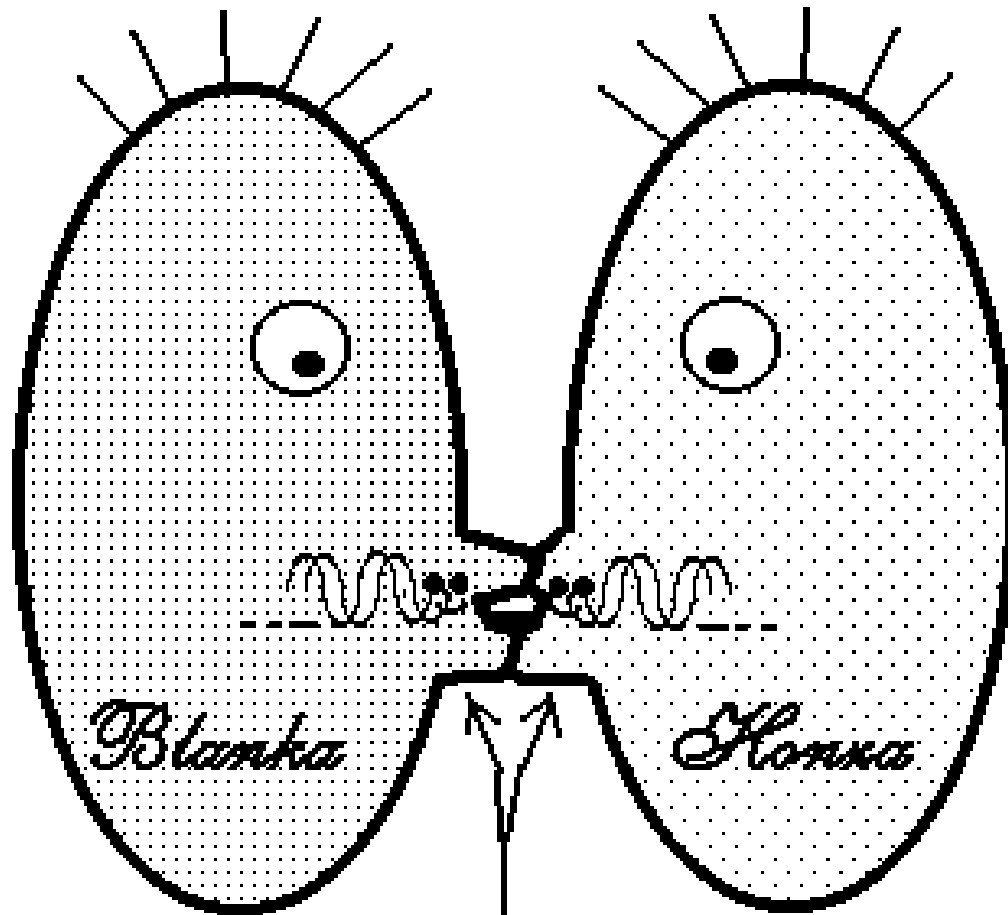
Transdukce



rozpadající se bakterie, ze které se uvolňuje DNA



Transformace



*Kon-
jugace*

"SEX" PILLI (FIMBRIE)

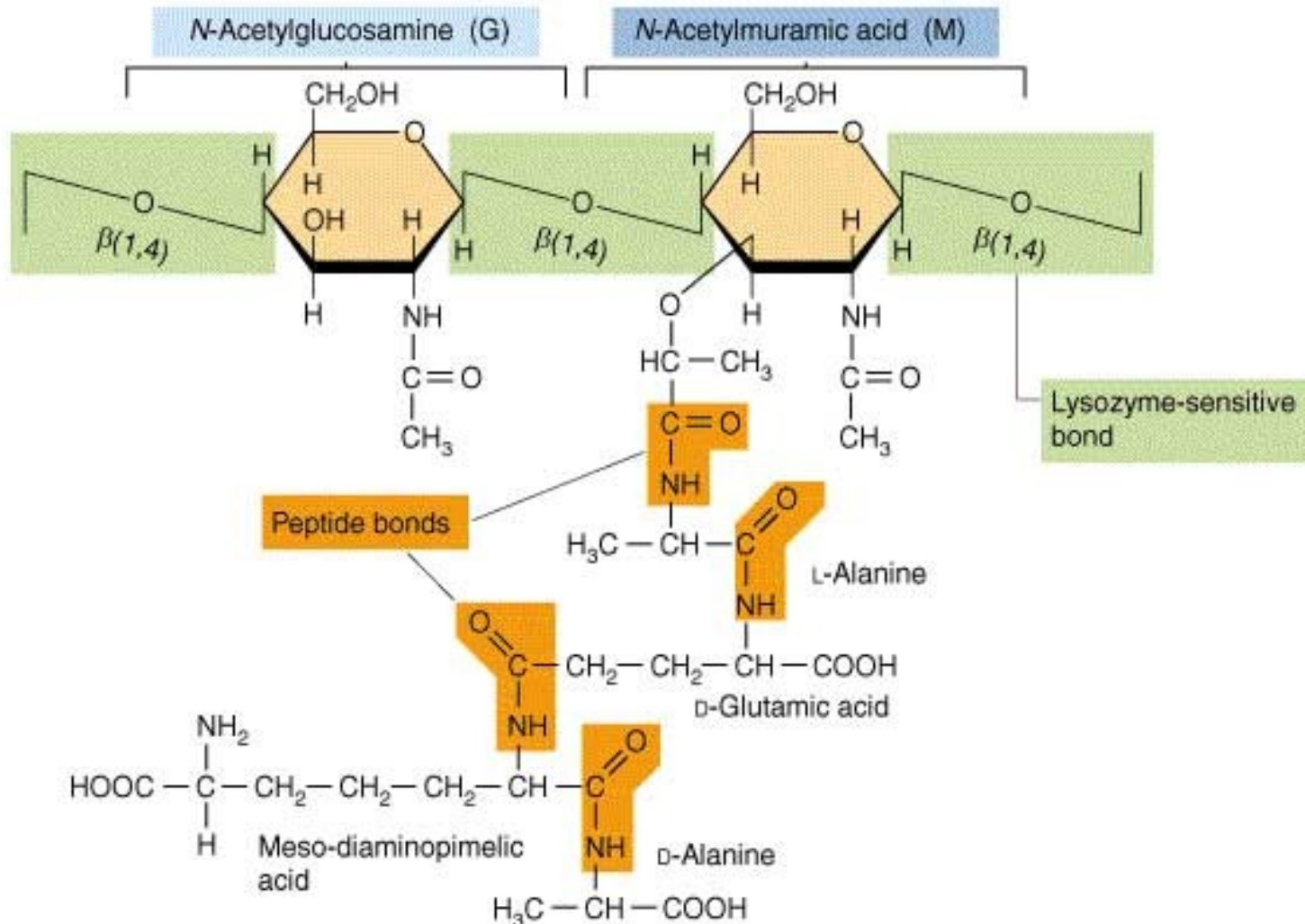
Cytoplasma a cytoplasmatická membrána

- 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

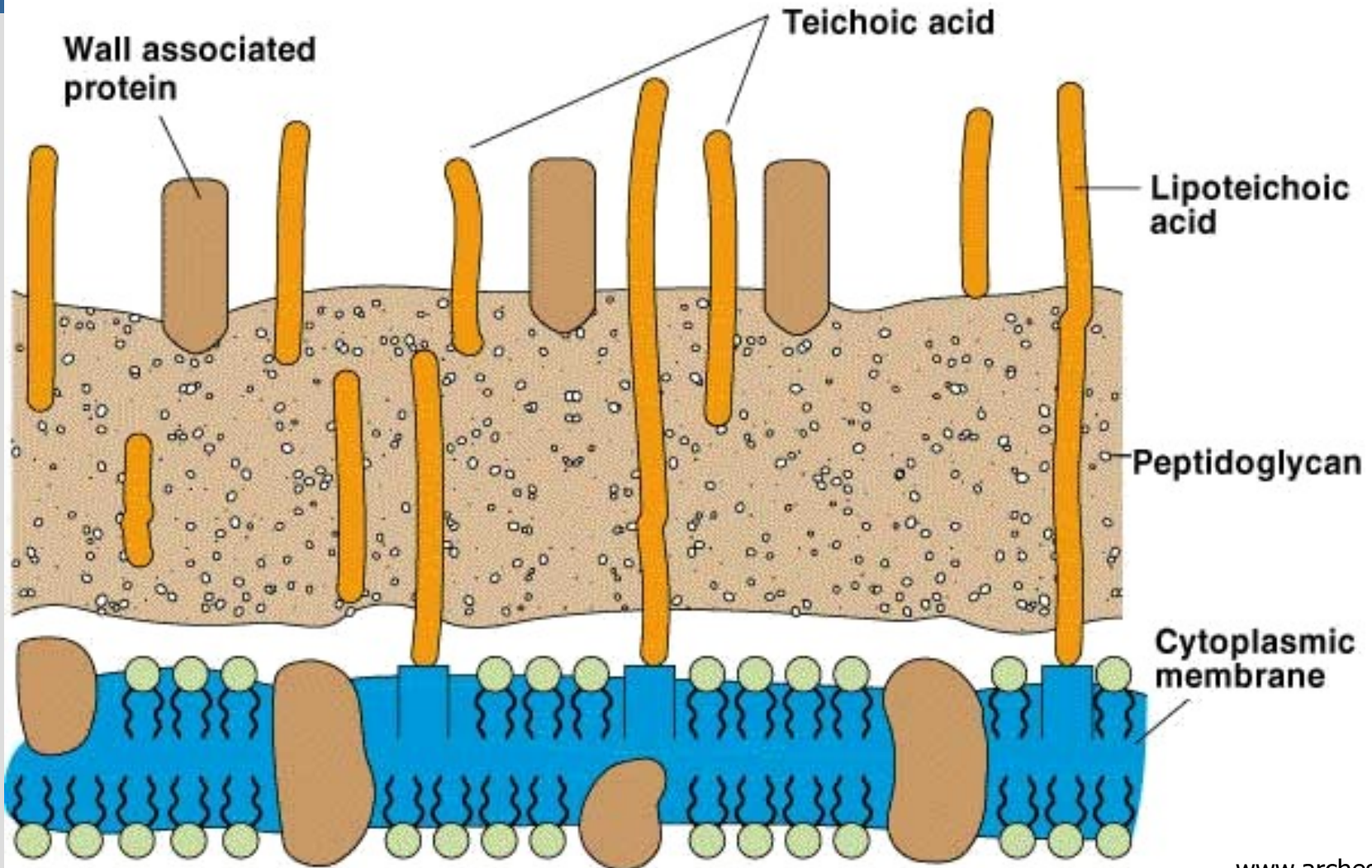
Buněčná stěna

- 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)

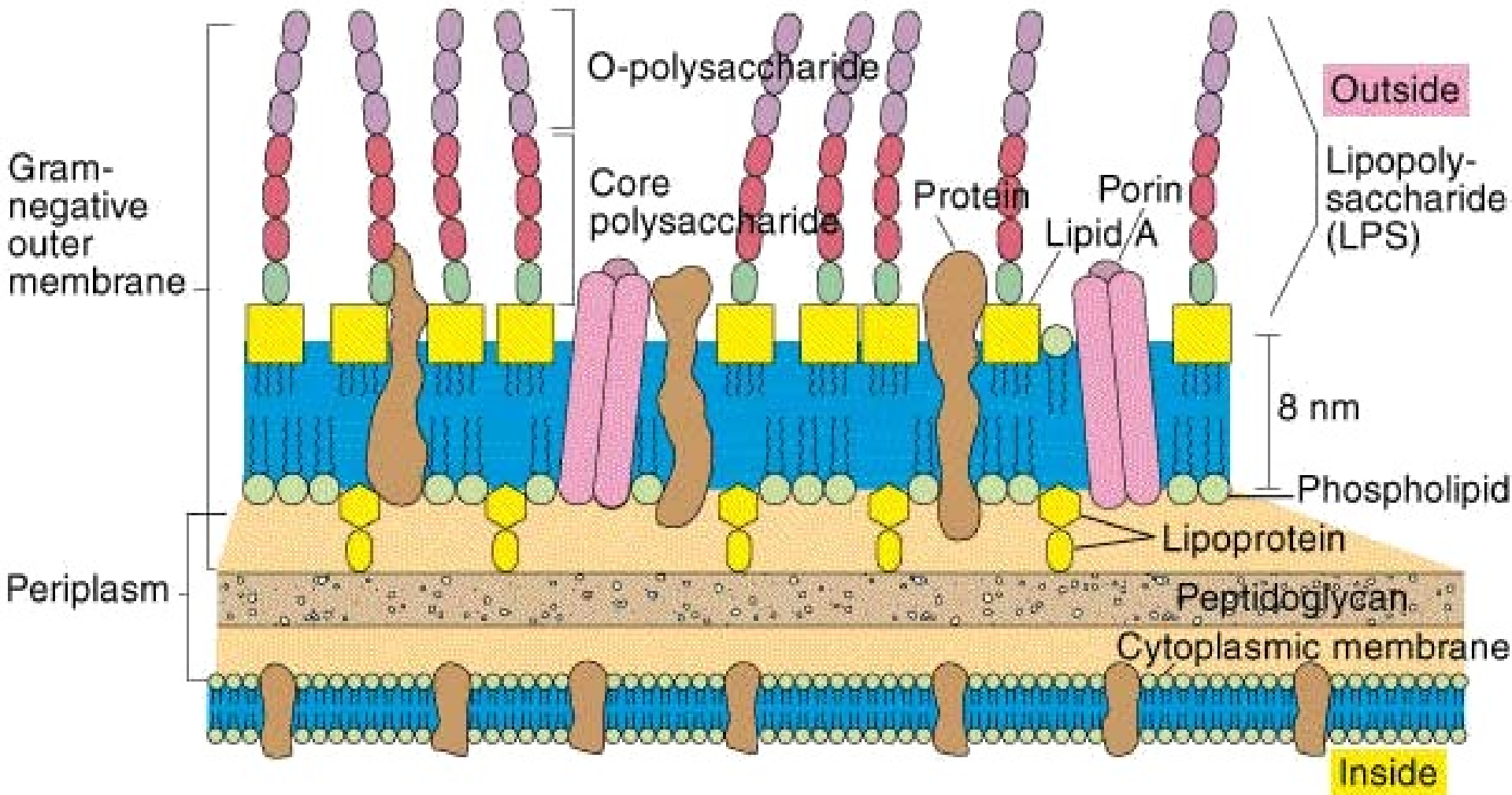


Grampozitivní buněčná stěna



Gramnegativní buněčná stěna

www.arches.uga.edu

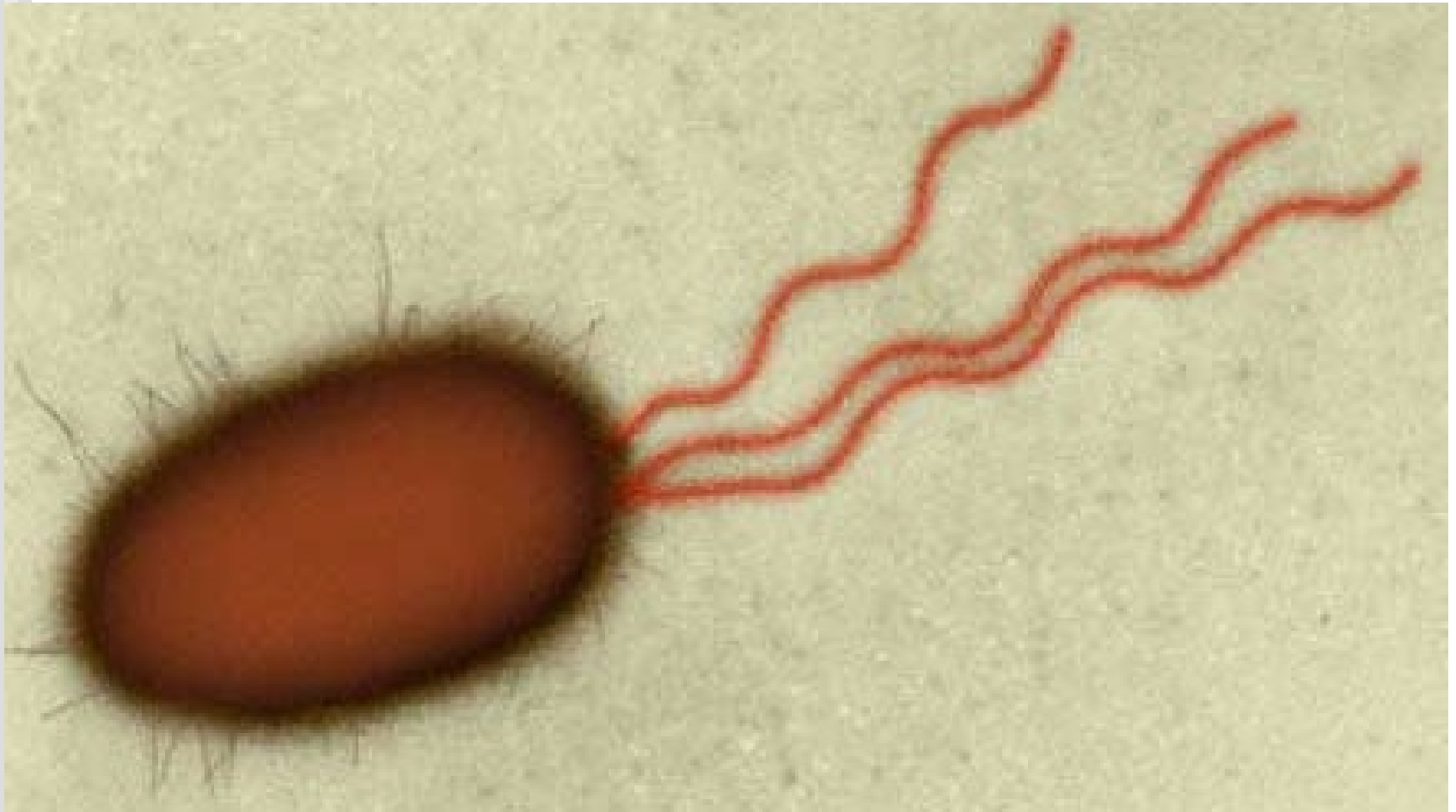


Fimbrie (pili), curli a bičíky

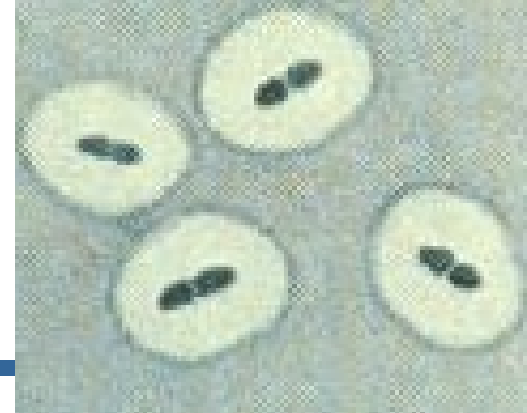
- Mnohé bakterie jsou schopny pohybu
- K pohybu slouží hlavně bičíky
- Fimbrie mohou vedle pohybu sloužit např. i k adhezi bakterie na povrch, ke konjugaci a podobně
- Curli jsou podobné jako pili, ale zakroucené
- Bičíky bakterií jsou úplně jiné než bičíky eukaryotních organismů

Bakterie s bičíky (*Escherichia coli*)

www.biotox.cz



Pouzdro a biofilm

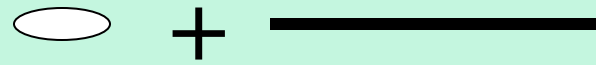


www.cbc.ca

- 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

Stádia vývoje biofilmu

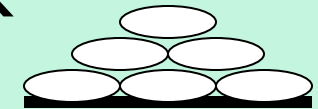
Kontakt planktonické bakterie
s povrchem



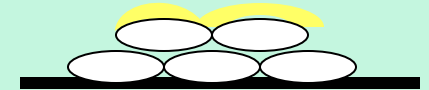
navázání na tento povrch



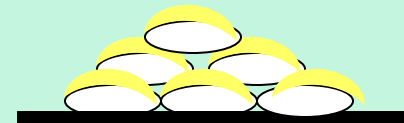
adhese, růst a shlukování buněk
do mikrokolonií



produkce polymerické hmoty
(matrix, nebuněčná složka)



Vytvoření trojrozměrné struktury
známé jako biofilm

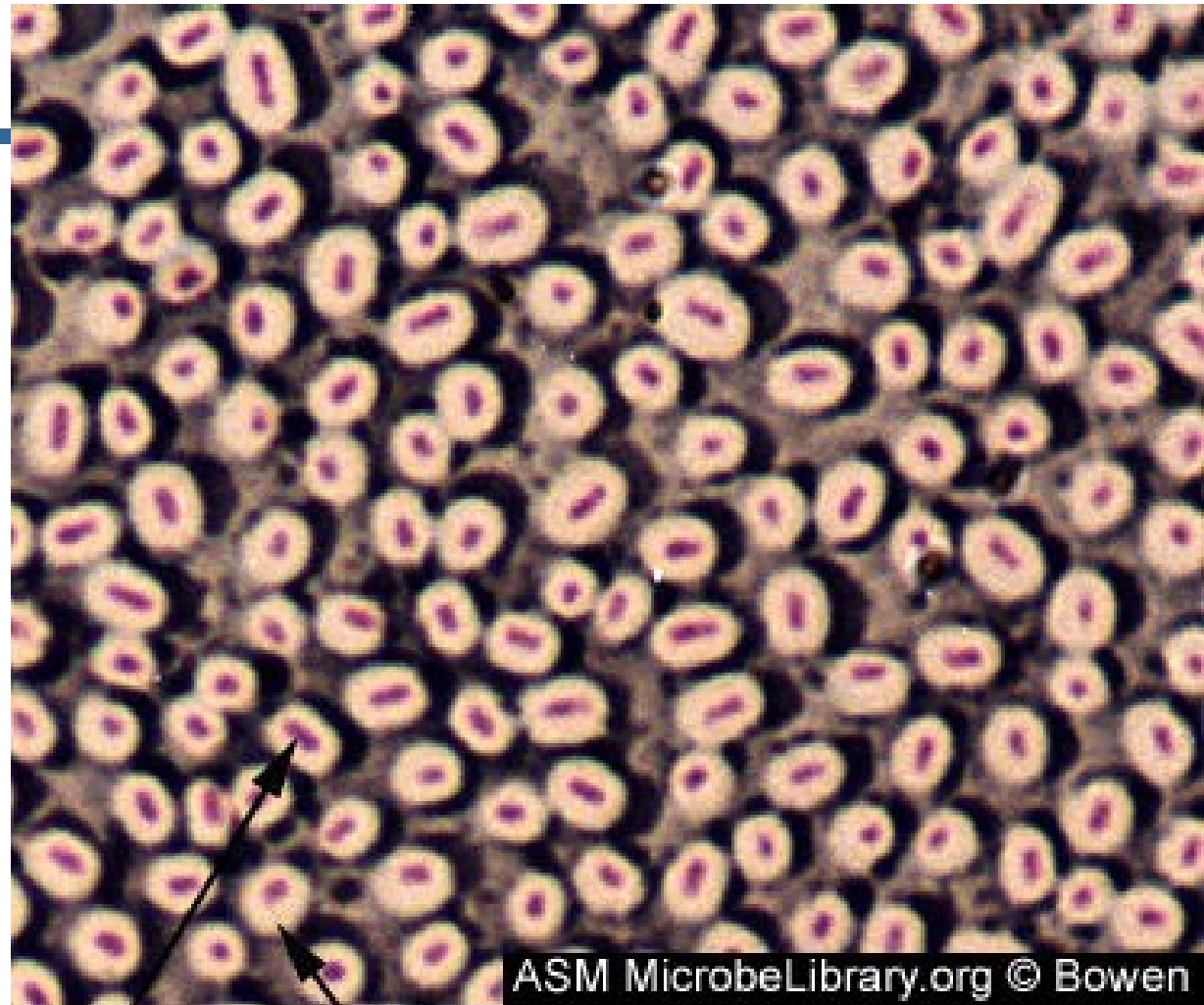


(Z prezentace dr. Černožorské)

Neobarvené pouzdro

pathmicro.med.sc.edu

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



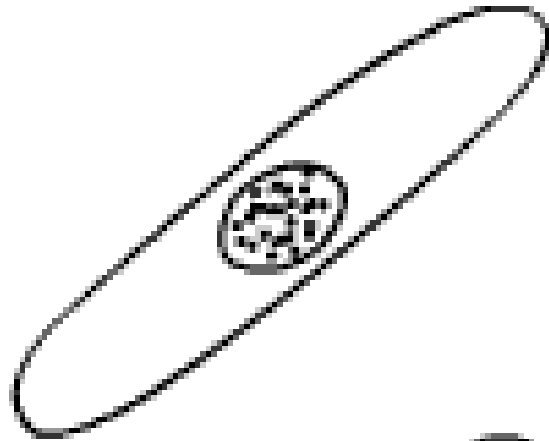
ASM MicrobeLibrary.org © Bowen

Cell

Capsule

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 **endospóra**: 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*

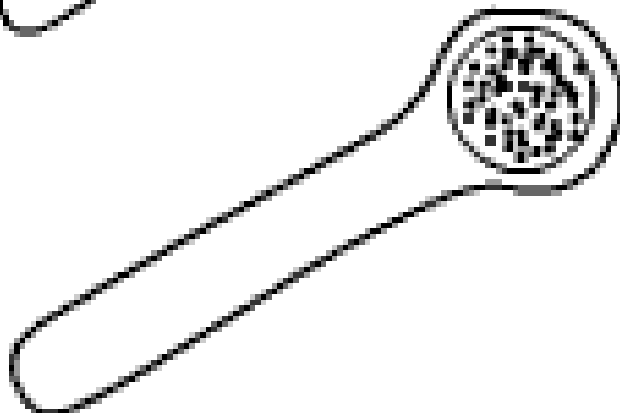
B. Cereus

B. Thuringiensis

B. Anthracis

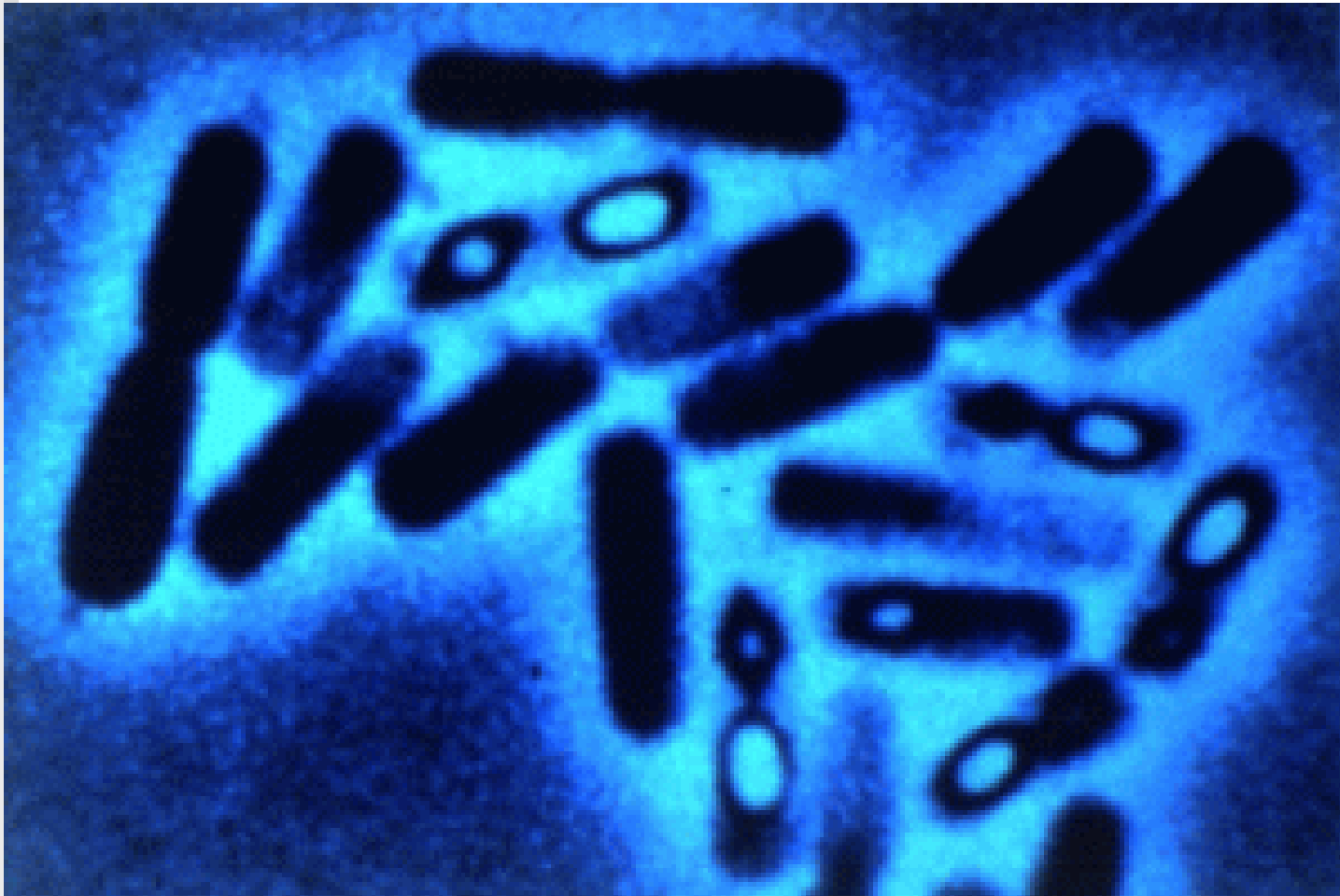


ex : *B. Polyxyma* (fixe le N₂)



ex : *B. Pasteurii* (dégrade l'Urée)

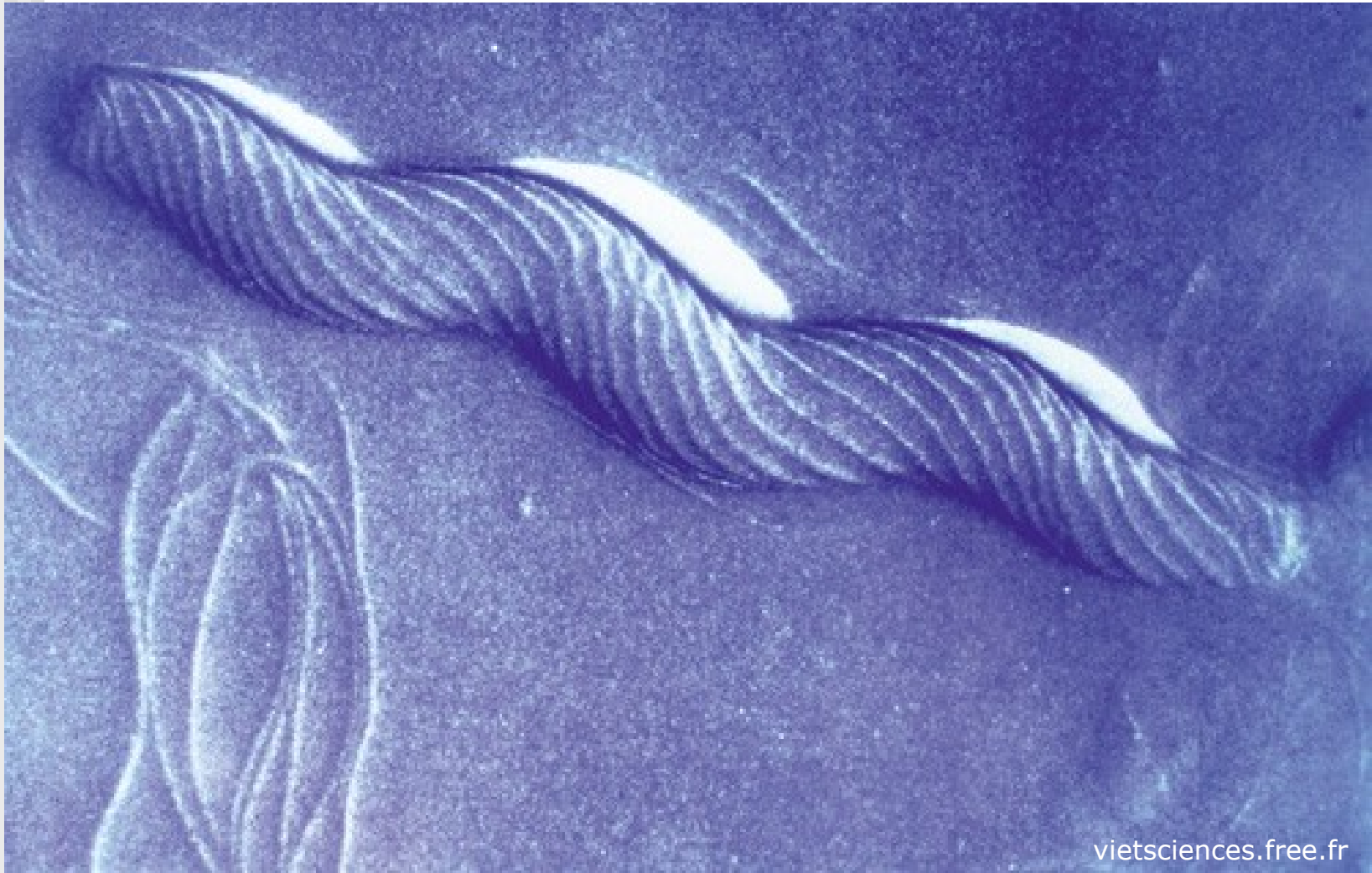
Spory jsou biochemicky neaktivní,
samy o sobě se nebarví



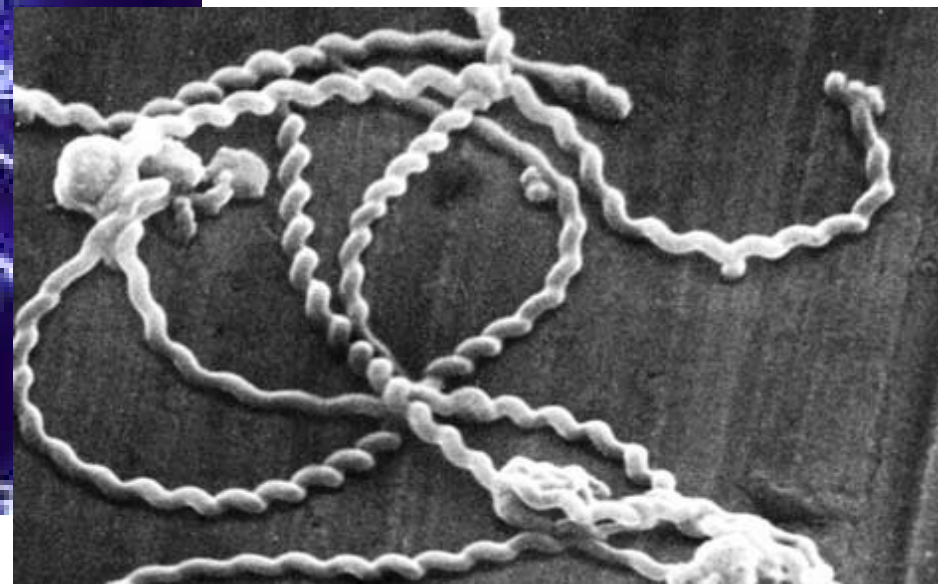
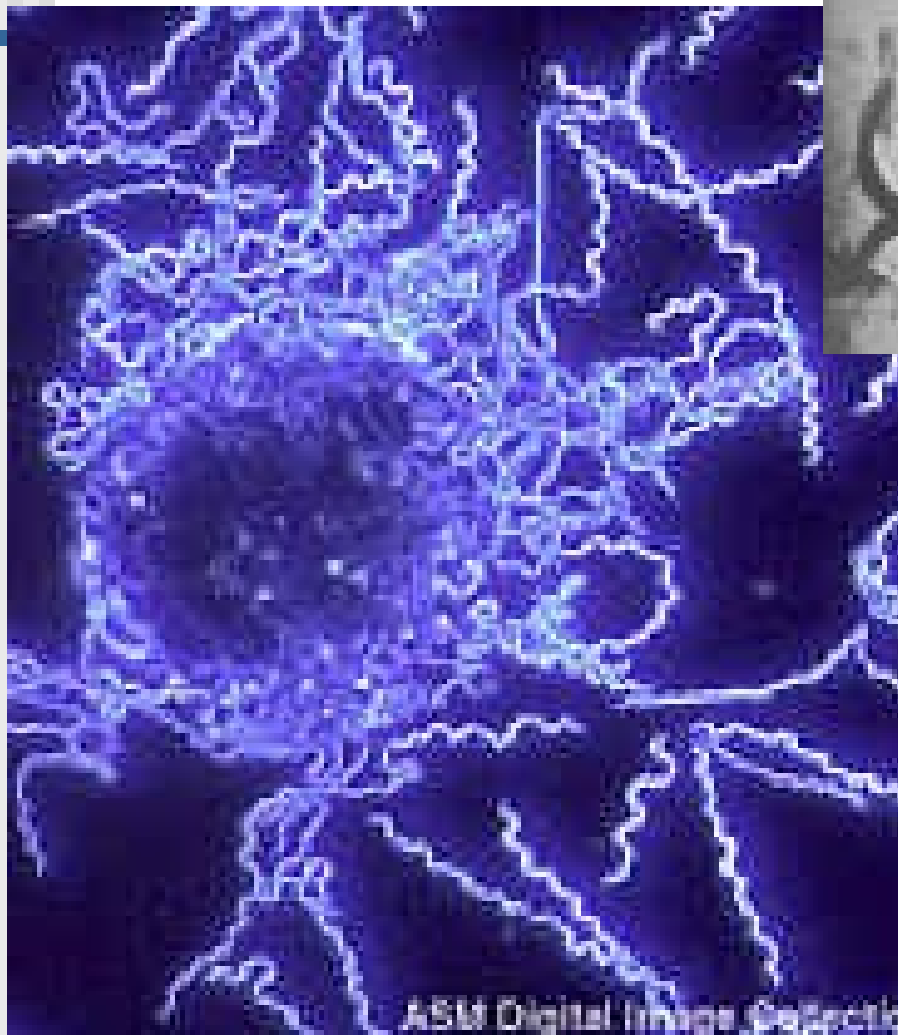
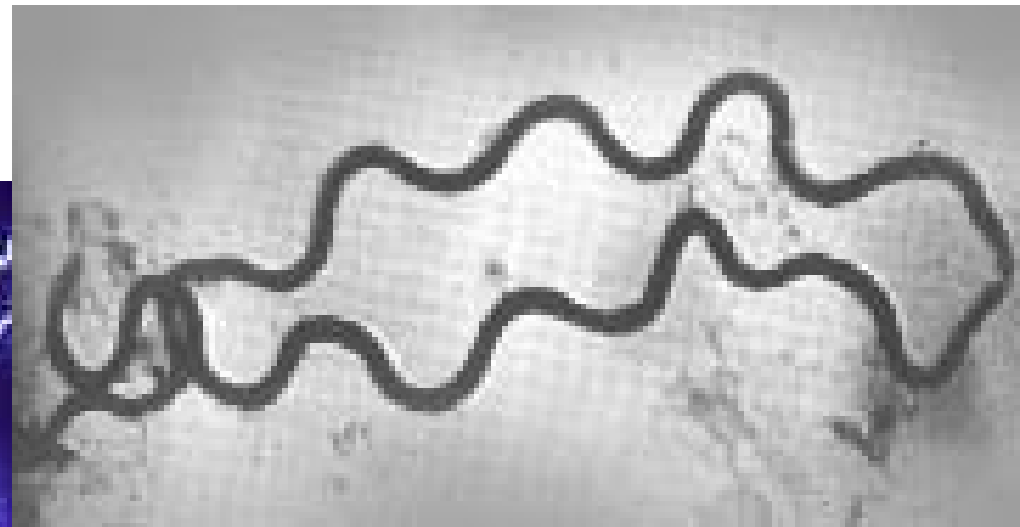
Tvarové možnosti bakterií

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

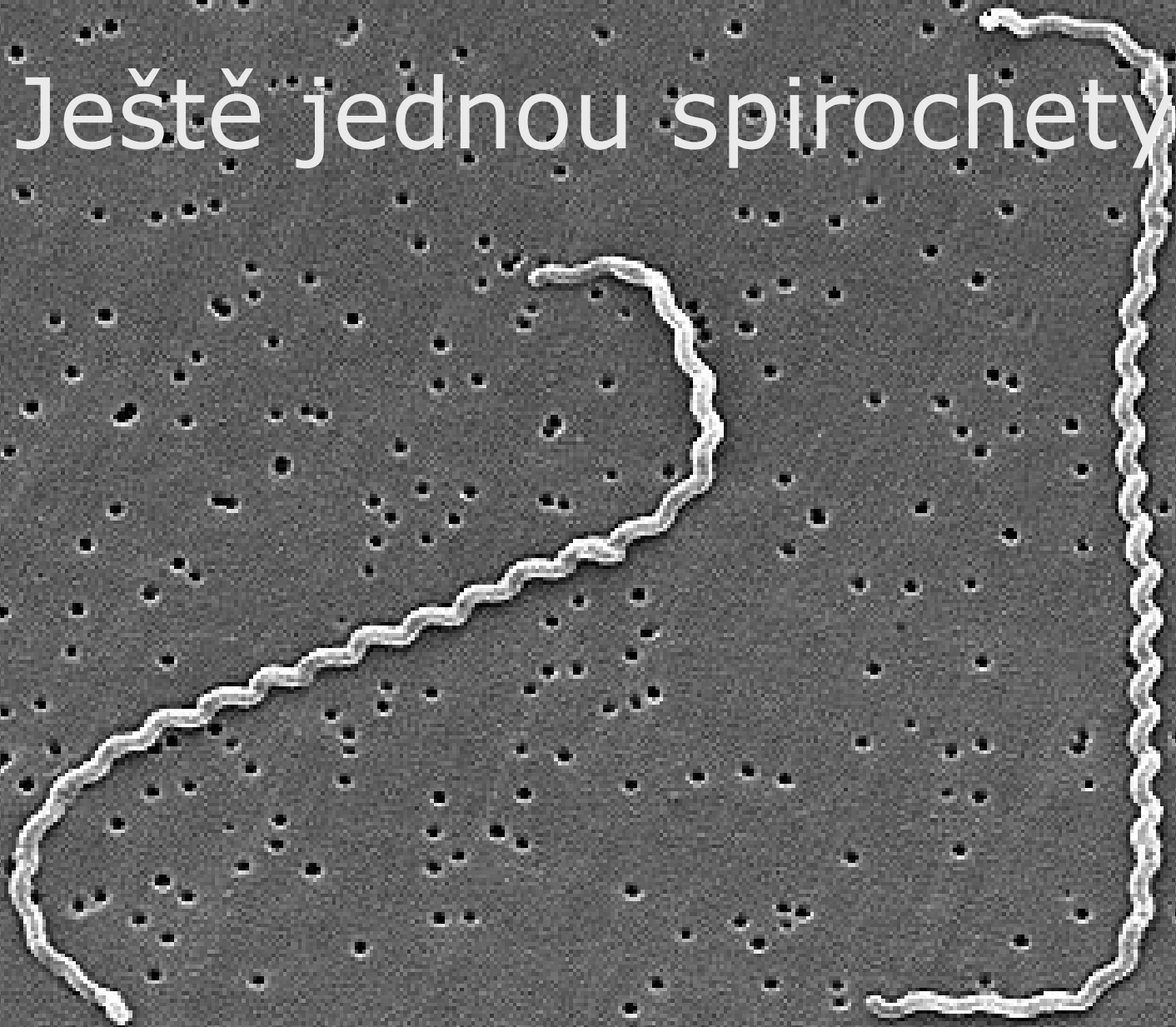
Zprohýbaná tyčinka – helikobakter



Spirochety



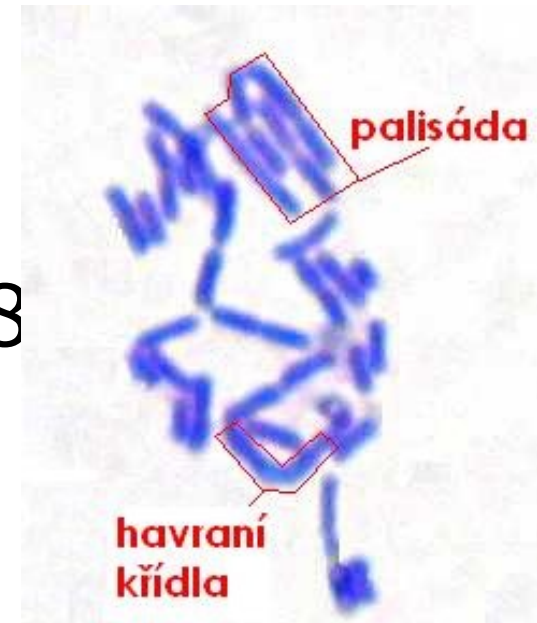
Ještě jednou spirochety



Možnosti uspořádání bakterií

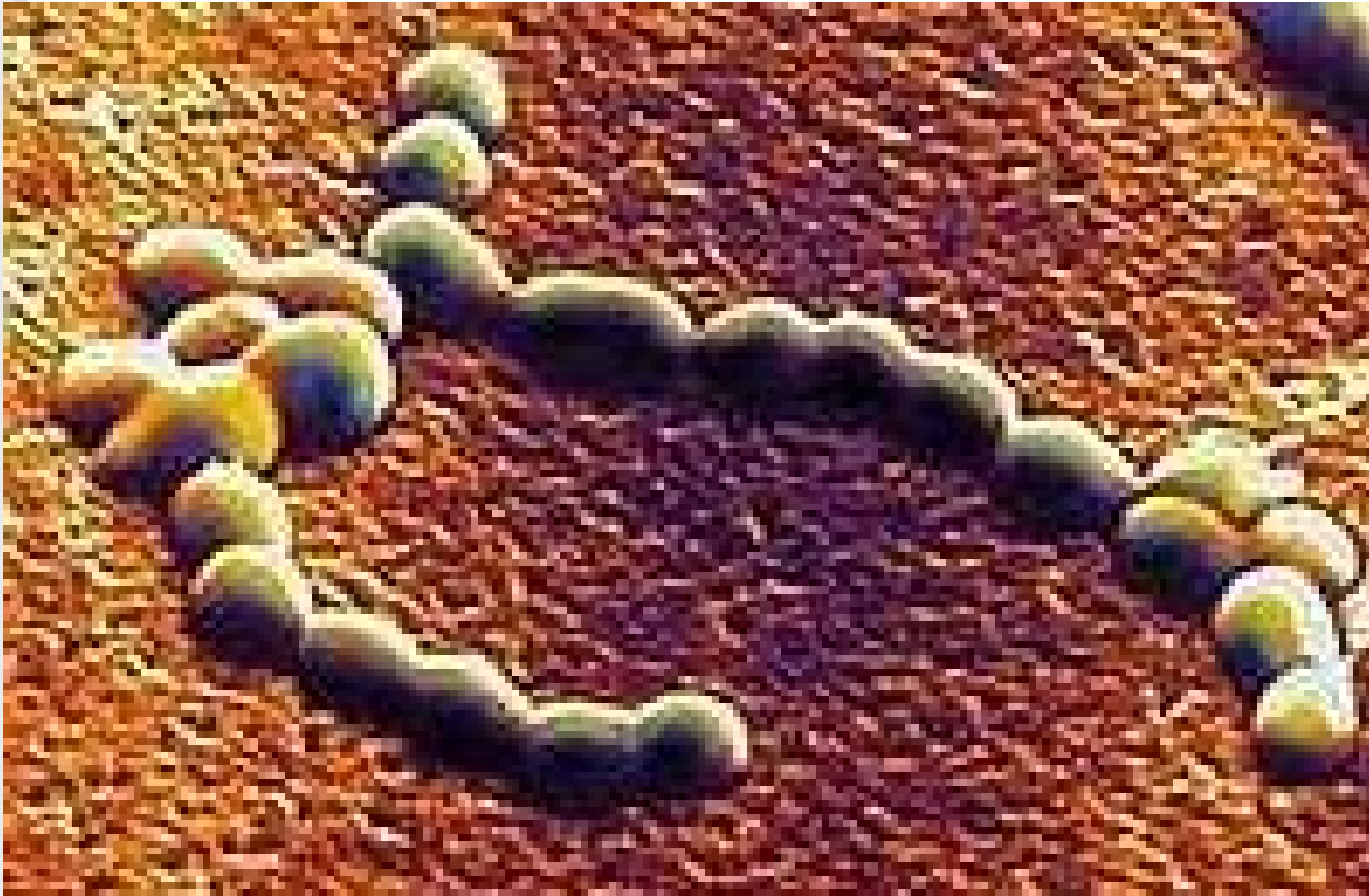
Foto O. Z.

- Jednotlivě
- Dvojice
- Čtveřice, skupiny po 8
- Shluky
- Řetízky
- U tyčinek: palisády (|||||), řetízky (-----)



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

www.morgenwelt.de



© Řetízky v Gramově barvení



mikroby.blox.pl

medianovo.de
© 2011 Medianovo Medien-Veranstalt

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 barvicích 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 objektivy 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

Pohádka (teda, ono to má i reálný základ 😊)

- Byl jednou jeden Dán, a ten se jmenoval **Christian Gram**. Barvil si bakterie a byl naštvaný. Občas nabarvil vzorek od pacienta, jenže kromě bakterií si obarvil i epitelie, a to se mu nelíbilo. „Hnusné epitelie, zakrývají mi bakterie!“, nadával.
- A tak začal bádat. Hledal nějaký postup, při kterém by bakterie zůstaly nabarvené, ale epitelie by barevné nebyly...

Pokračování na další obrazovce

Pokračování pohádky

- Přišel na to, že když vzorek obarví krystalovou nebo genciánovou violetí, a pak vazbu barviva na buněčnou stěnu posílí Lugolovým roztokem, neodbarví se bakterie ani alkoholem. Zato epitelie se odbarví. „Hurá“, zakřičel, když to zjistil.
- Jenže záhy zjistil, že s epiteliemi se mu odbarví i část bakterií. „Do pr...kýnka“, zabručel, vypil zbytek alkoholu, co měl na odbarvování, a svou práci mrštil do kouta...

A pohádka končí...

- O nějakých dvacet let později jistý mladý badatel našel v koutě jedné badatelny zaprášenou práci pana Christiana Grama.
- Jak si to tak pročítal, pokyvoval hlavou a říkal si –hm, nebylo to špatné, jen to chtělo něco přidat.
- A tak na závěr procesu Gramova barvení přidal dobarvení **safraninem** (nebo **Gabbetem** čili **karbolfuchsinem**). Sice obarvil na červeno nejen odbarvené bakterie, ale i epitelie, ale to mu vůbec nevadilo. Vždyť o přítomnosti epitelii ve vzorku může být užitečné vědět!
- A tak vzniklo Gramovo barvení v dnešní podobě.

Prof. Hans Christian Gram



Hans Christian Joachim Gram (13. září 1853 – 14. listopadu 1938) byl dánský bakteriolog. Gram studoval botaniku na Kodaňské Univerzitě a byl botanickým asistentem zoologa Japeta Steenstrupa. V roce 1878 začal studovat medicínu a promoval 1883. V roce 1884 v Berlíně vyvinul metodu, která dnes slouží k rozlišení dvou hlavních tříd bakterií. V roce 1891 se Gram stal přednášejícím farmakologie, a v témže roce byl jmenován profesorem Kodaňské univerzitě. V roce 1900 převzal vedení farmakologického ústavu.

en.wikipedia.org/wiki/Hans_Christian_Gram.

Gramovo barvení – princip 1

- **Grampozitivní bakterie** mají ve své stěně tlustší vrstvu peptidoglykanu mureinu.
 - Díky tomu se na ně pevněji váže krystalová nebo genciánová violet...
 - ...a po upevnění této vazby Lugolovým roztokem...
 - ...se neodbarví ani alkoholem.
- **Gramnegativní bakterie** se naopak odbarví alkoholem a dobarví se pak na červeno safraninem.

Gramovo barvení – princip 2

Chemikálie	Grampozitivní	Gramnegativní
Krystal. violeť	Obarví se fialově	Obarví se fialově
Lugolův roztok	Vazba se upevní	Upevní se méně
Alkohol	Neodbarví se	Odbarví se
Safranin	Zůstanou fialové	Obarví se červeně

Gramem se nebarvící bakterie se neobarví v prvním kroku kvůli absenci buněčné stěny (*Mycoplasma*) nebo proto, že jejich stěna je vysoce hydrofobní (*Mycobacterium*).

Spirochety by se barvily gramnegativně, ale jsou velmi tenké, takže i je lze také vlastně považovat za „Gramem se nebarvící“ a Gram se v jejich diagnostice nepoužívá.

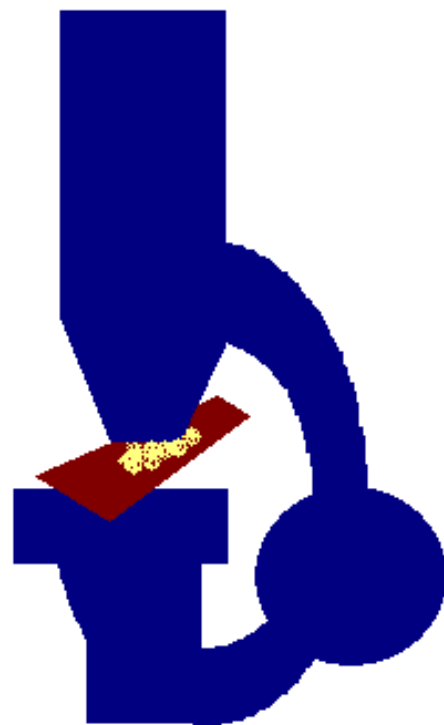
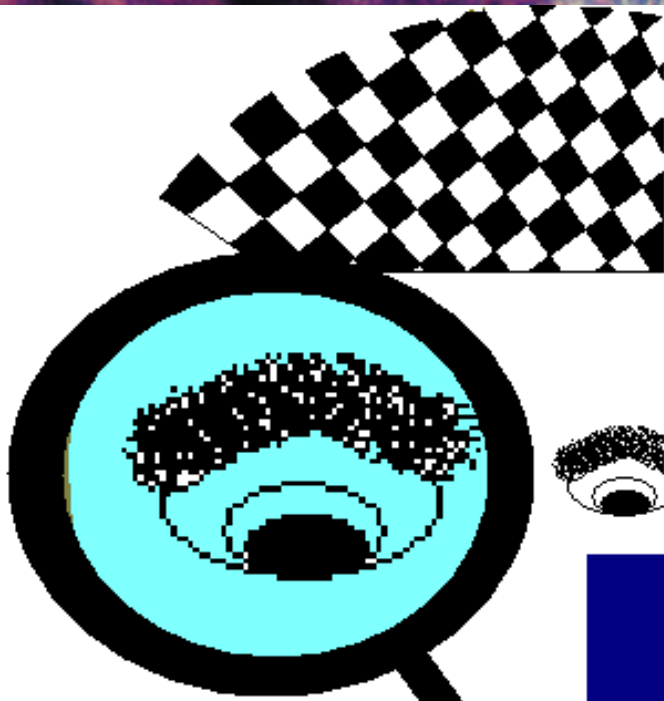
Vsuvka: Lugolův roztok je směs I_2 a KI

Jean Guillaume Auguste Lugol (18. 8. 1786 – 16. 9. 1851) byl francouzský lékař. Narodil se v Montaubanu. Studoval medicínu v Paříži a promoval v roce 1812. Roku 1819 se stal ordinářem v Nemocnici svatého Ludvíka, kde působil až do důchodu. Zajímal se o tuberkulózu a měl přednášku na Královské akademii věd v Paříži, kde se zastával čistého vzduchu, cvičení, studených koupelí a léků. Publikoval čtyři knihy o tuberkulózním onemocnění a jeho léčbě (1829, 1830, 1831, 1834). Navrhl, že by se jeho jódový roztok mohl používat k léčbě tuberkulózy. To tehdy vzbudilo velkou pozornost. I když se Lugolův roztok k léčbě TBC nehodil, byl zato Plummerem s úspěchem použit k léčbě thyreotoxikózy.

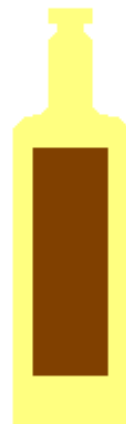
http://en.wikipedia.org/wiki/Jean_Guillaume_Auguste_Lugol



www.jergym.hiedu.cz



Violet'



Lugol

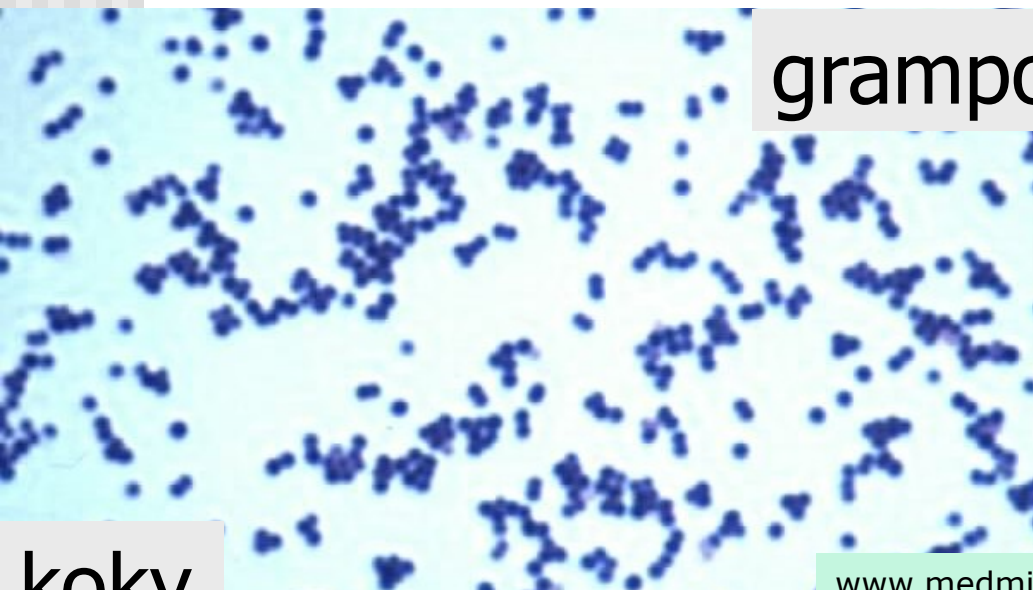


Alkohol

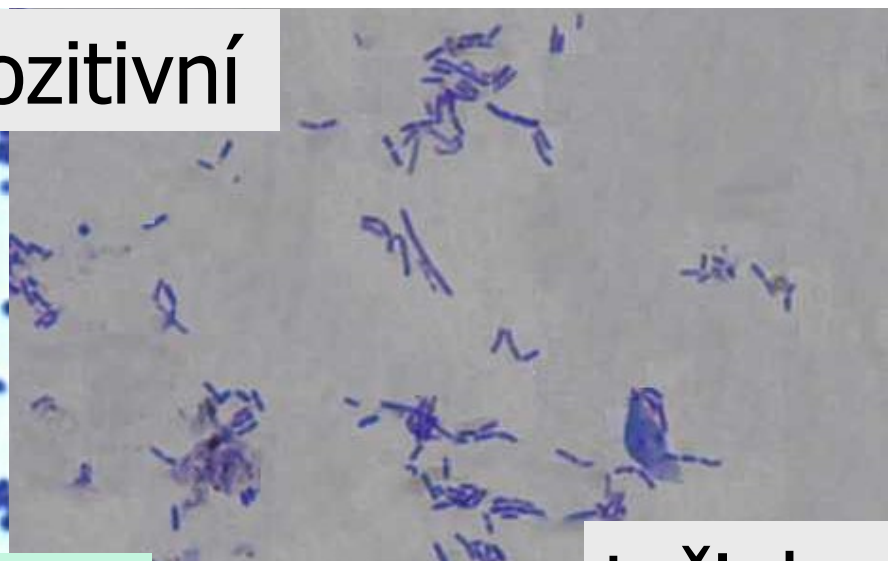


Safranin

Čtyři hlavní skupiny bakterií podle Gramova barvení



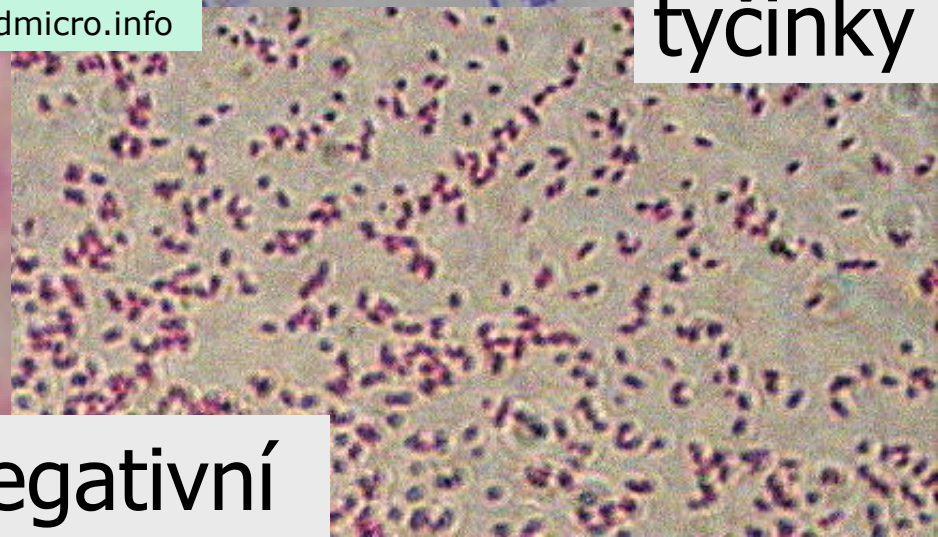
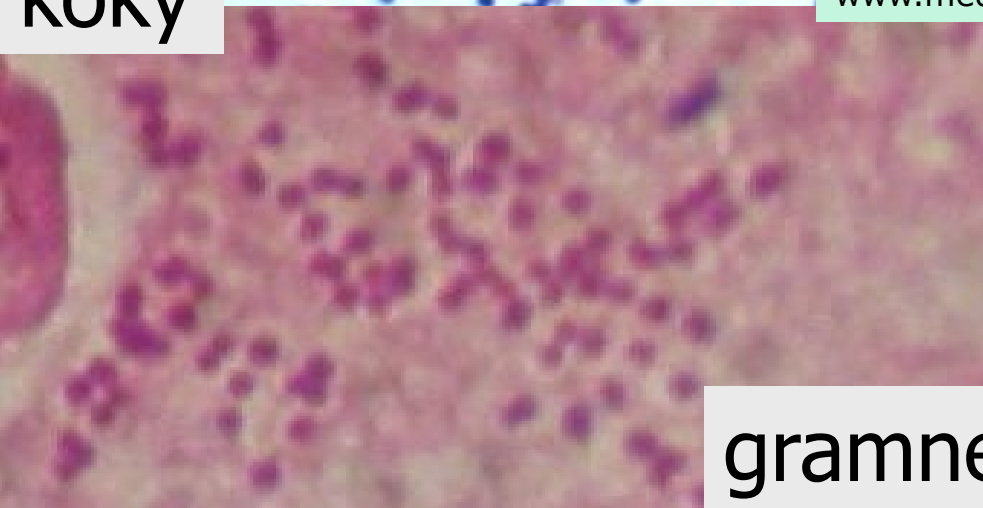
grampozitivní



koky

www.medmicro.info

tyčinky

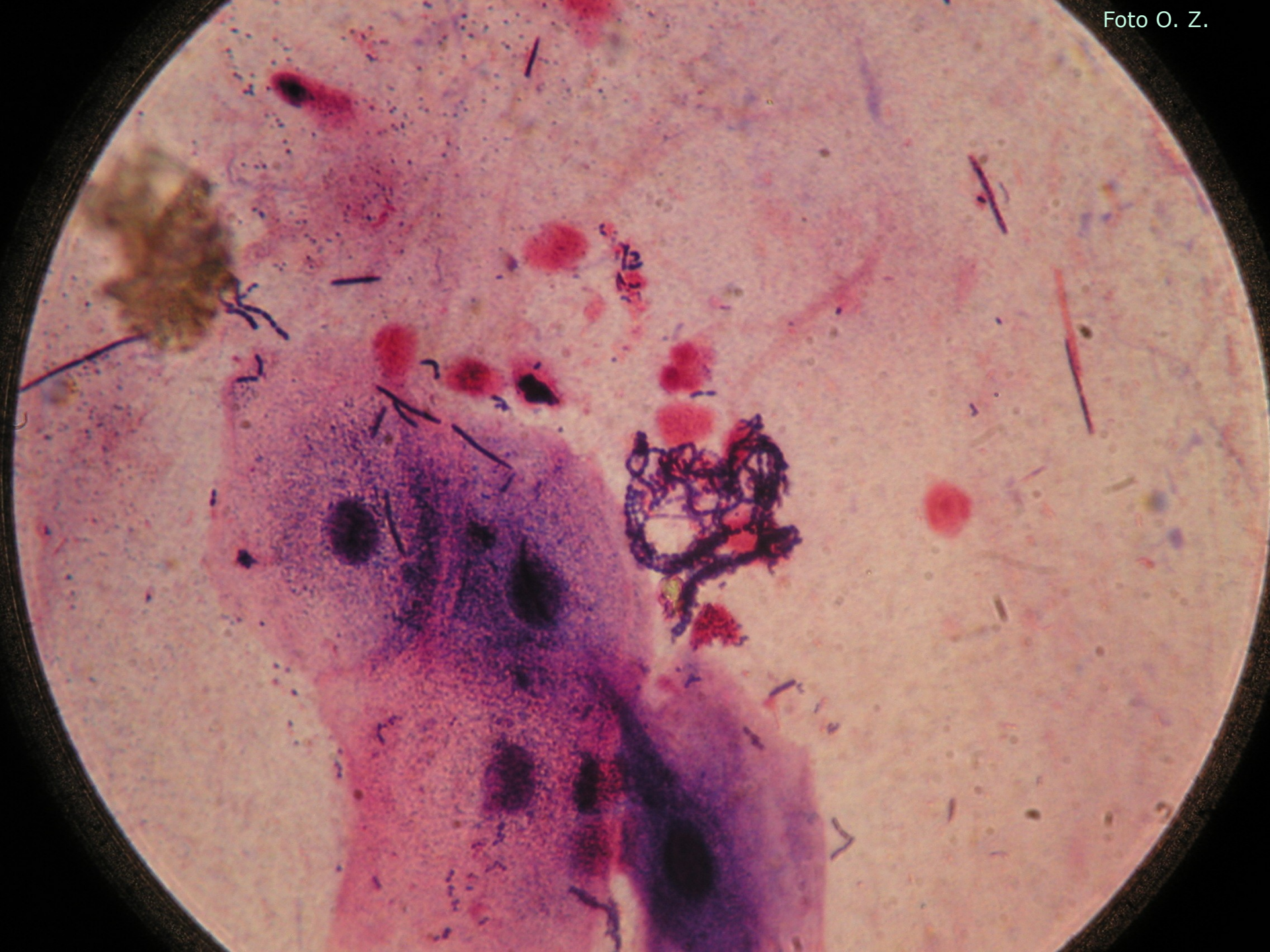


gramnegativní

Směs G+ a G- bakterií

www.arches.uga.edu





Další barvicí metody

- Barvení podle Giemsy – spíše na parazity
- Barvení dle Ziehl-Neelsena na acidorezistentní bakterie
- Barvení pouzder dle Burriho
- Barvení fluorescenčními barvivy

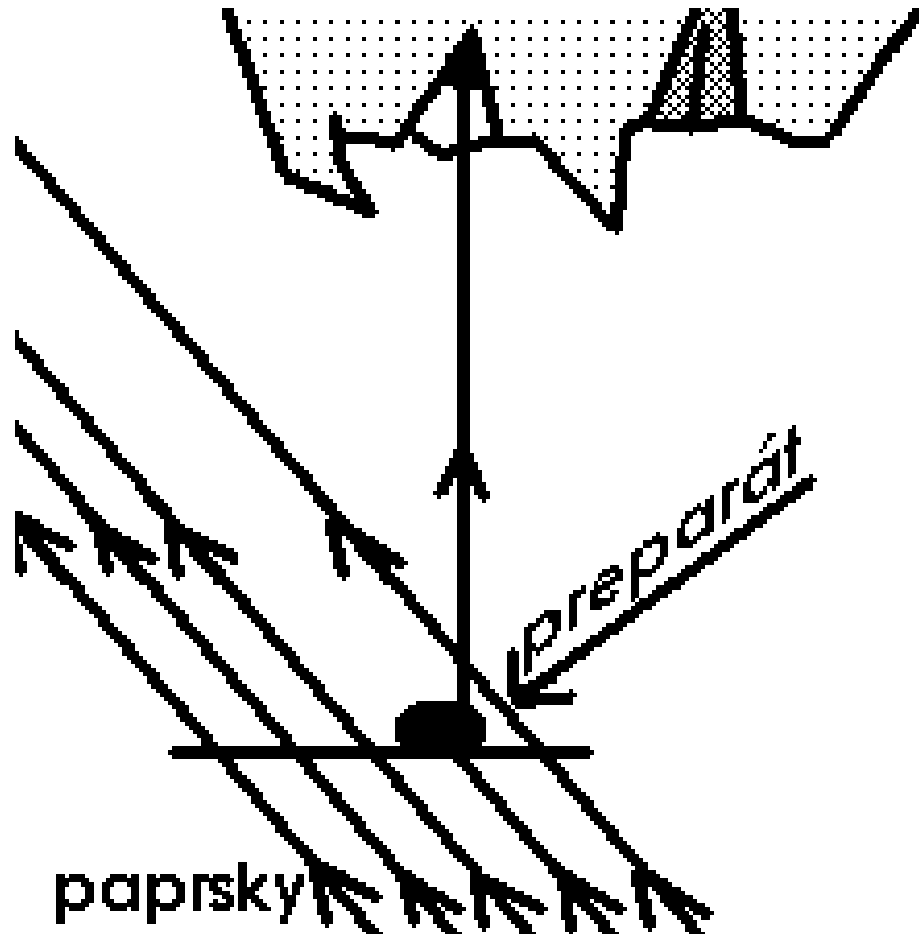
Fluorescenční barvení



Speciální mikroskopické techniky

- Mikroskopie v zástínu – 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