

Lékařská mikrobiologie pro ZDRL

Týden 2: Morfologie bakterií, mikroskopie

Upraveno podle MUDr. O. Zahradníčka

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



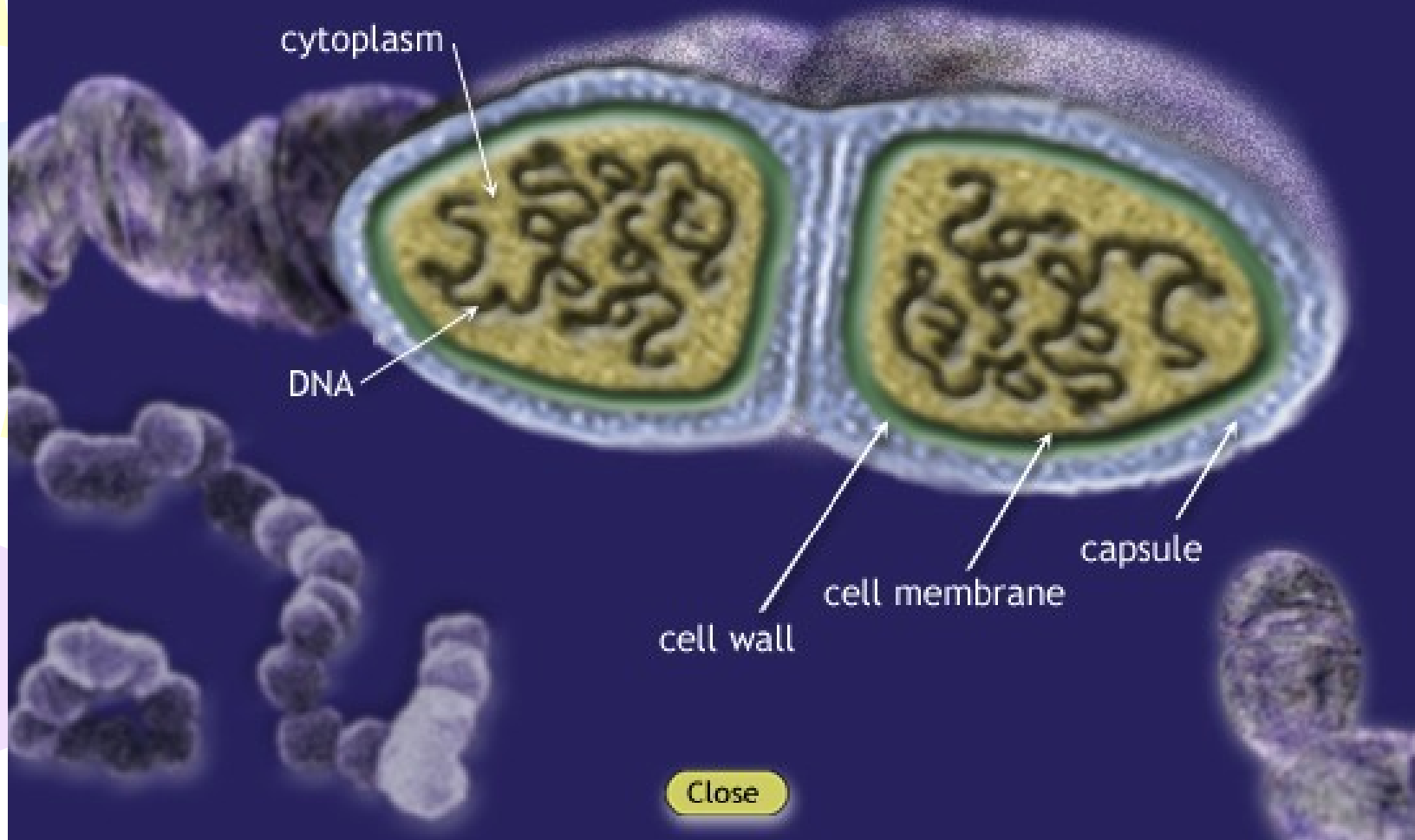
Z čeho se skládá bakteriální buňka

- 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*

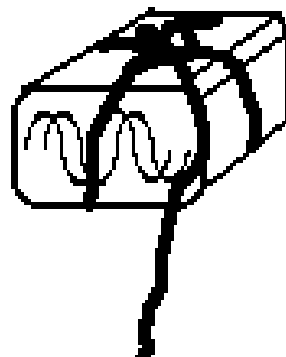
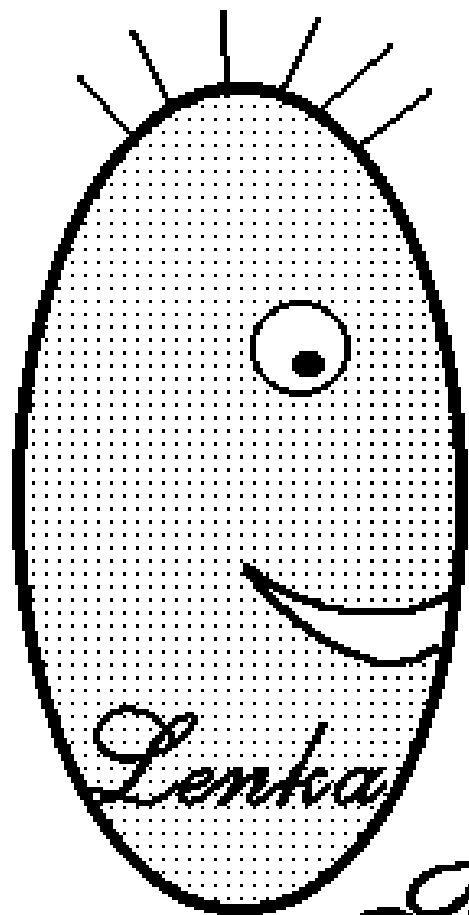


Chromozom a ribozomy

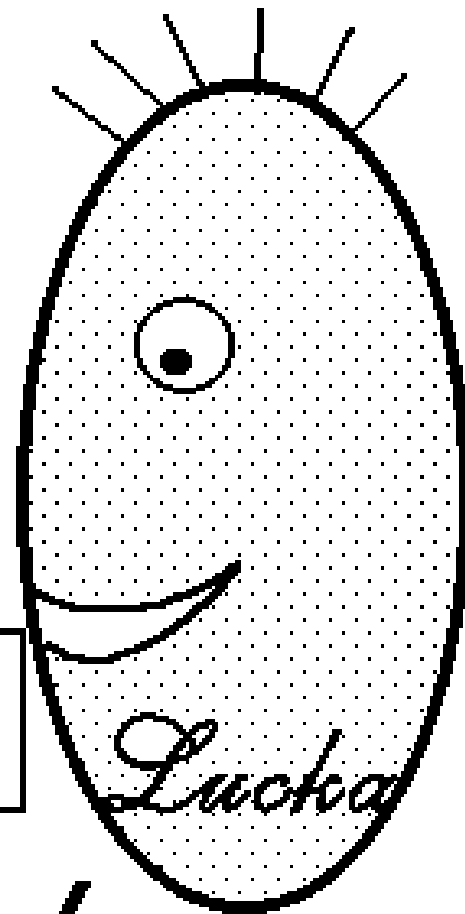
- Chromozom kruhového tvaru
- Ribozomy jiné než v eukaryotních buňkách
- Bakteriální „jádra“ nejsou viditelná v optickém mikroskopu
- Kromě chromozomu může být genetická informace i v plasmidech (často virového původu)

Jak může buňka přijít k plasmidu

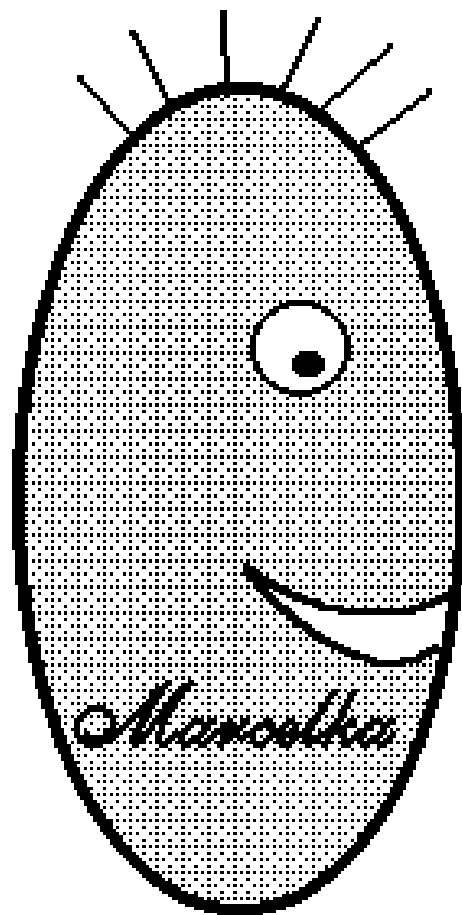
- Existují v zásadě tři způsoby: transdukce, transformace a konjugace
- Pro různé bakterie je typický ten nebo onen, anebo žádný způsob
- Je to i prakticky významné – plasmidy kódují třeba i rezistenci na antibiotika



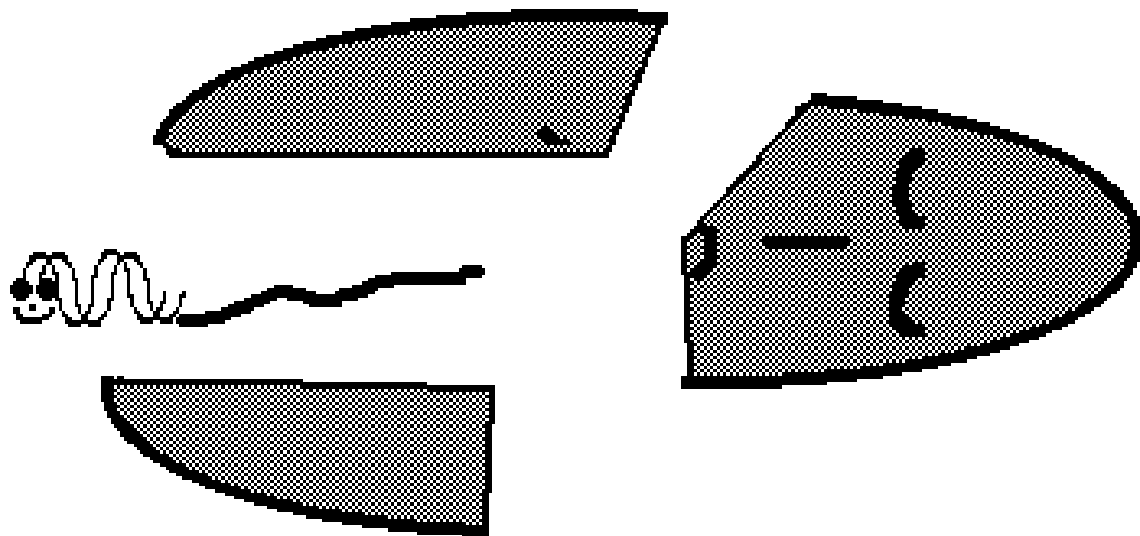
BAKTERIOFÁG
OD LENKY
PRO LUCKU



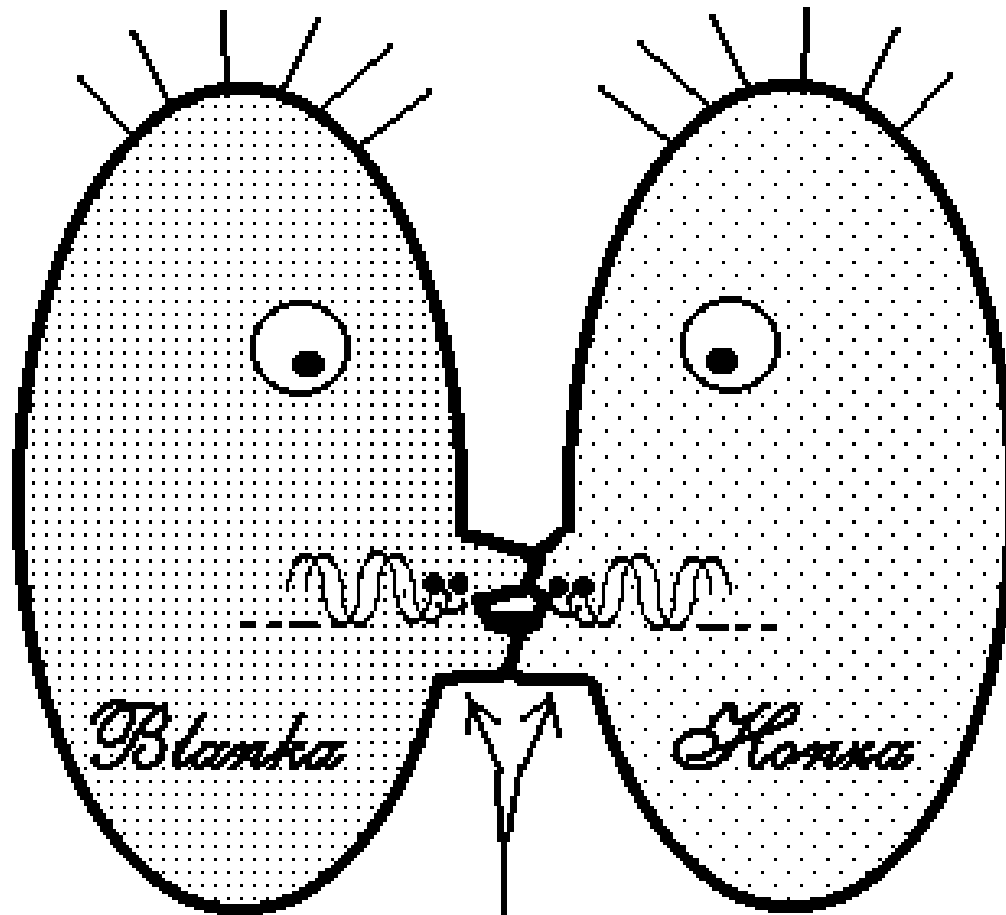
Transdukce



rozpadající se bakterie, ze které se uvolňuje DNA



Transformace



"SEX" PILLI (FIMBRIE)

*Kon-
jugace*



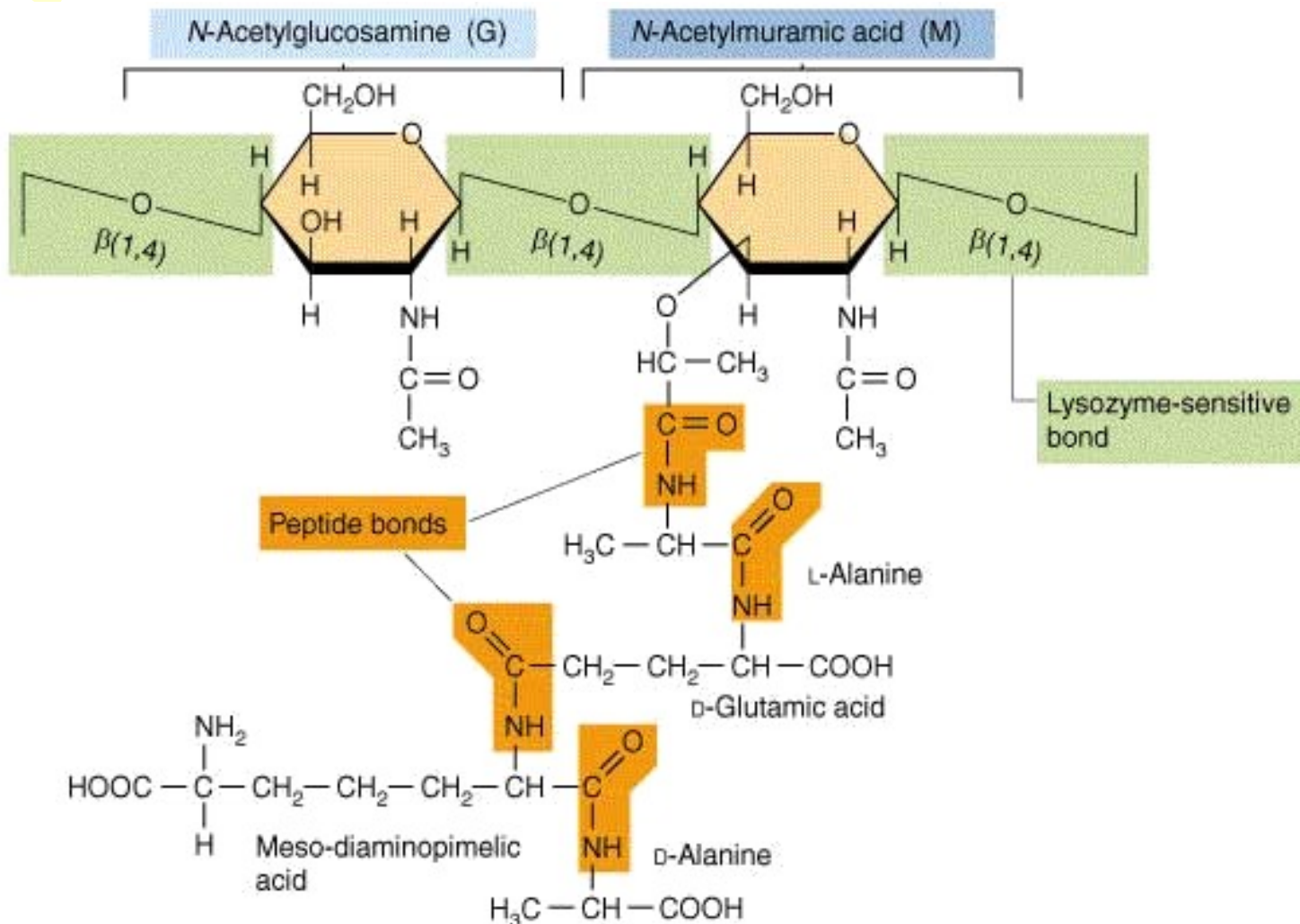
Cytoplasma a cytoplasmatická membrána

- 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

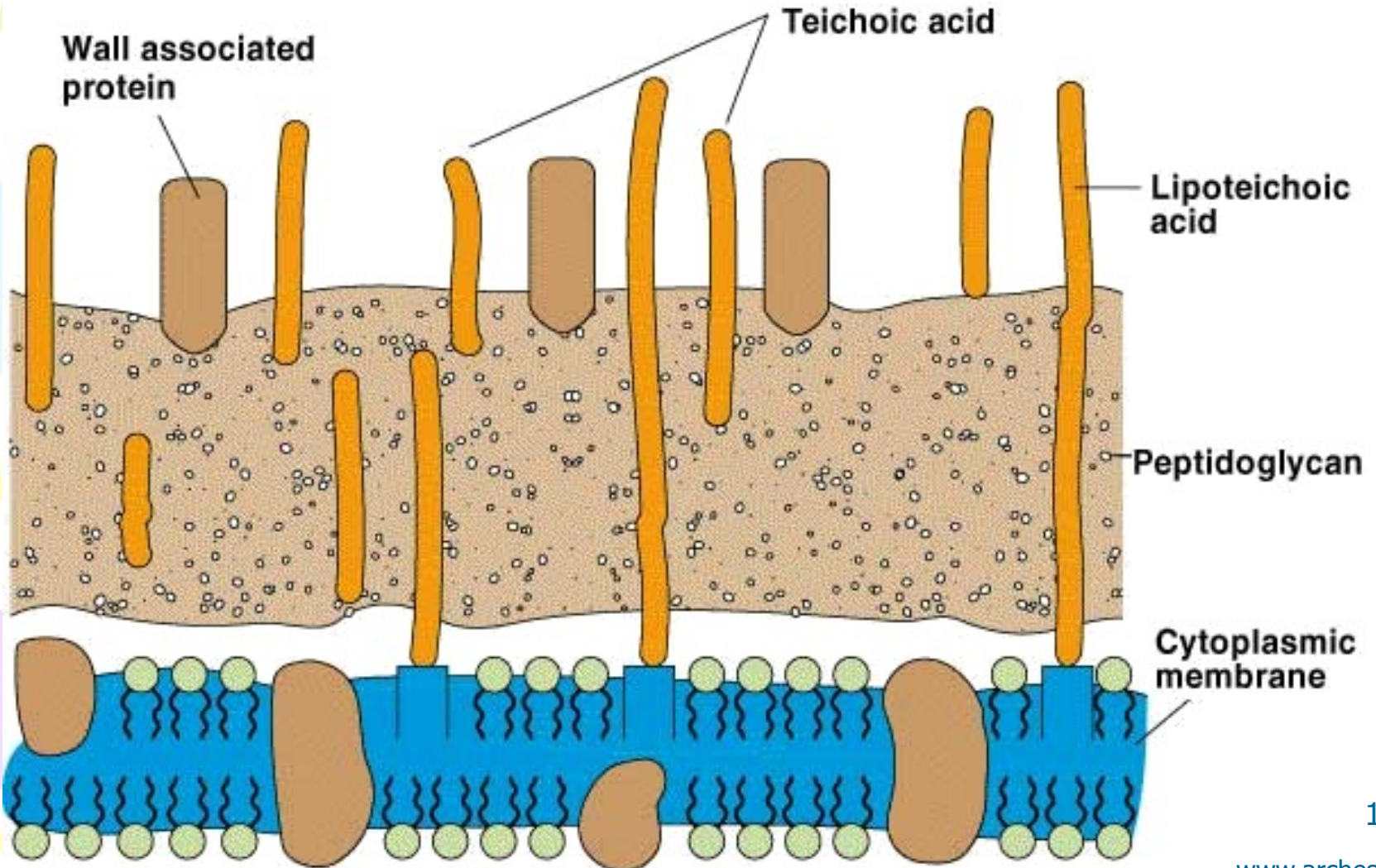
Buněčná stěna

- 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)

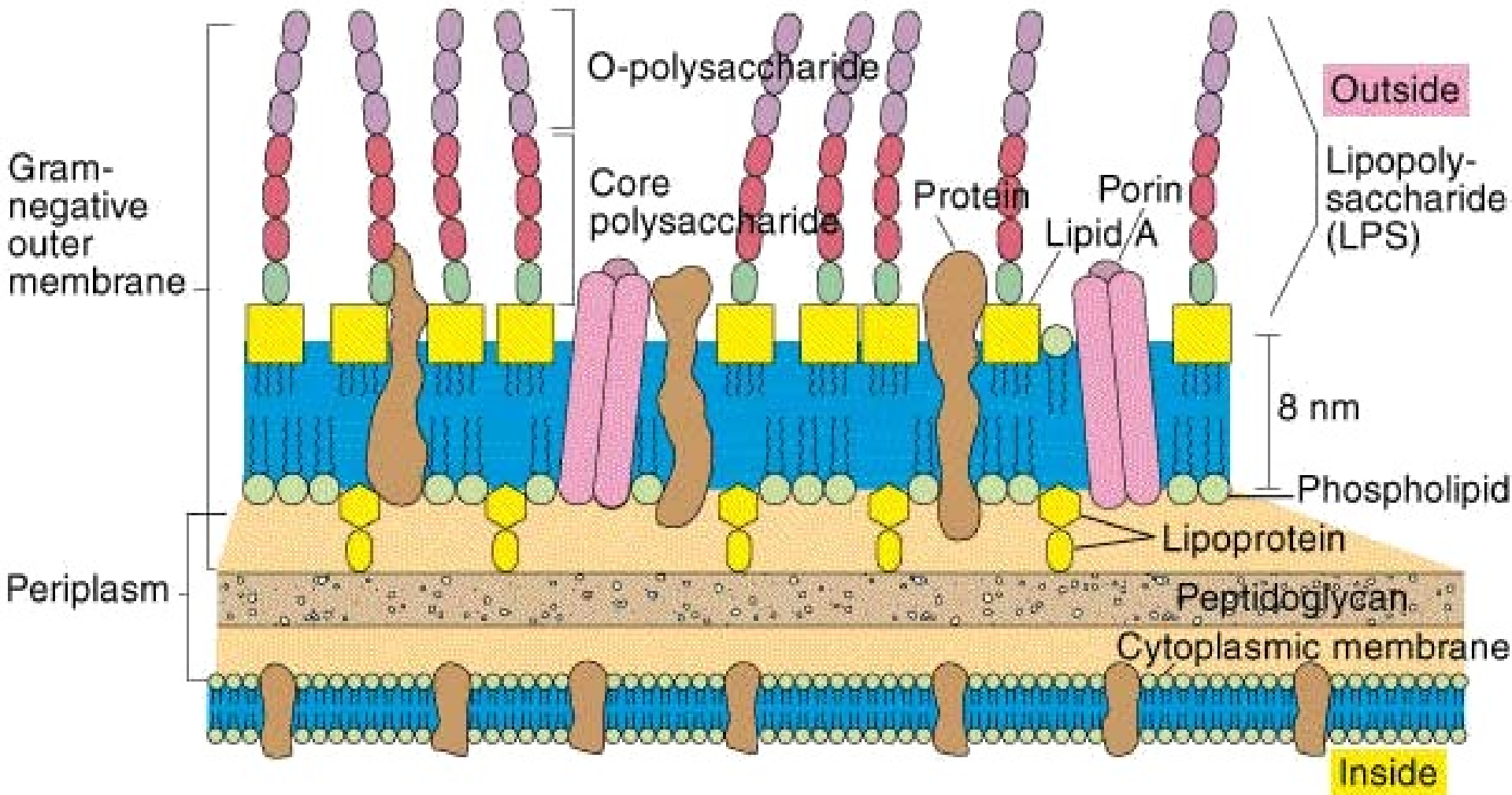


Gram pozitivní buněčná stěna



Gramnegativní buněčná stěna

www.arches.uga.edu



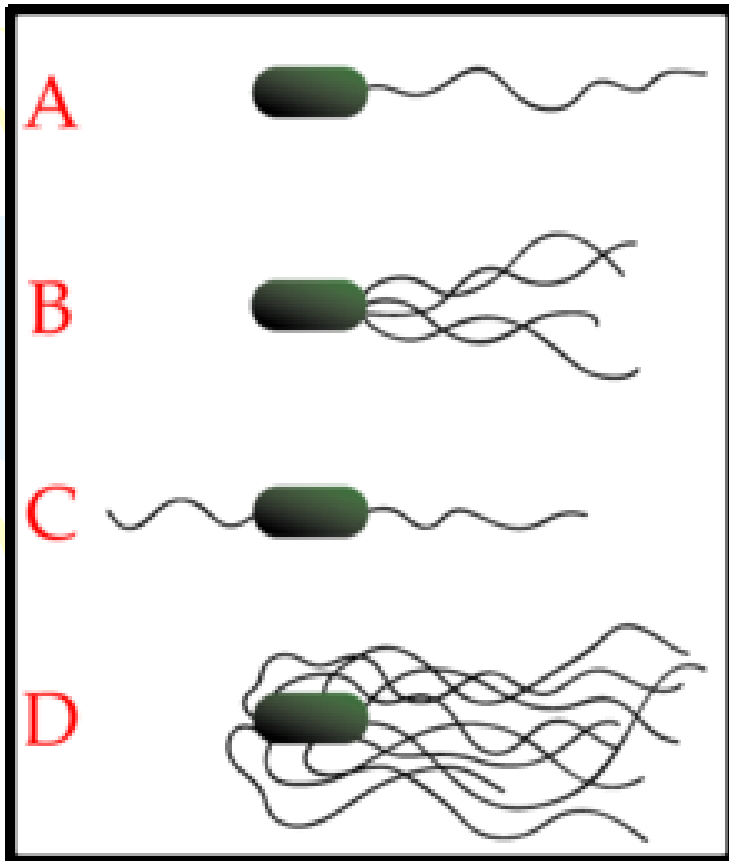
Fimbrie (pili), curli a bičíky

- 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

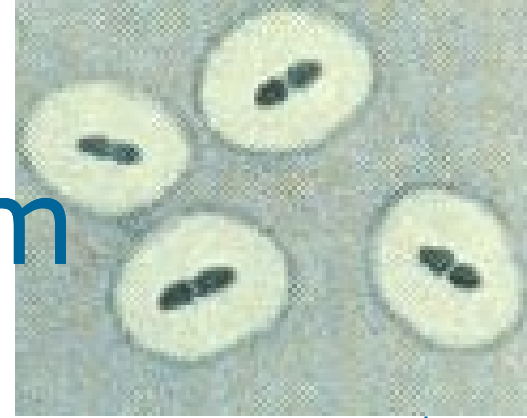




Počet a uspořádání bakteriálních bičků:
A. monotricha,
B. lofotricha,
C. amfitricha,
D. peritricha

<http://cs.wikipedia.org/wiki/Bi%C4%8D%C3%ADk>

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

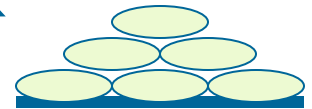
Kontakt planktonické bakterie
s povrchem



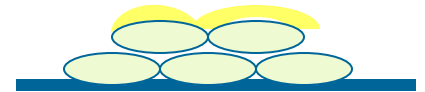
navázání na tento povrch



adhese, růst a shlukování buněk
do mikrokolonií



produkce polymerické hmoty
(matrix, nebuněčná složka)



Vytvoření trojrozměrné struktury
známé jako biofilm

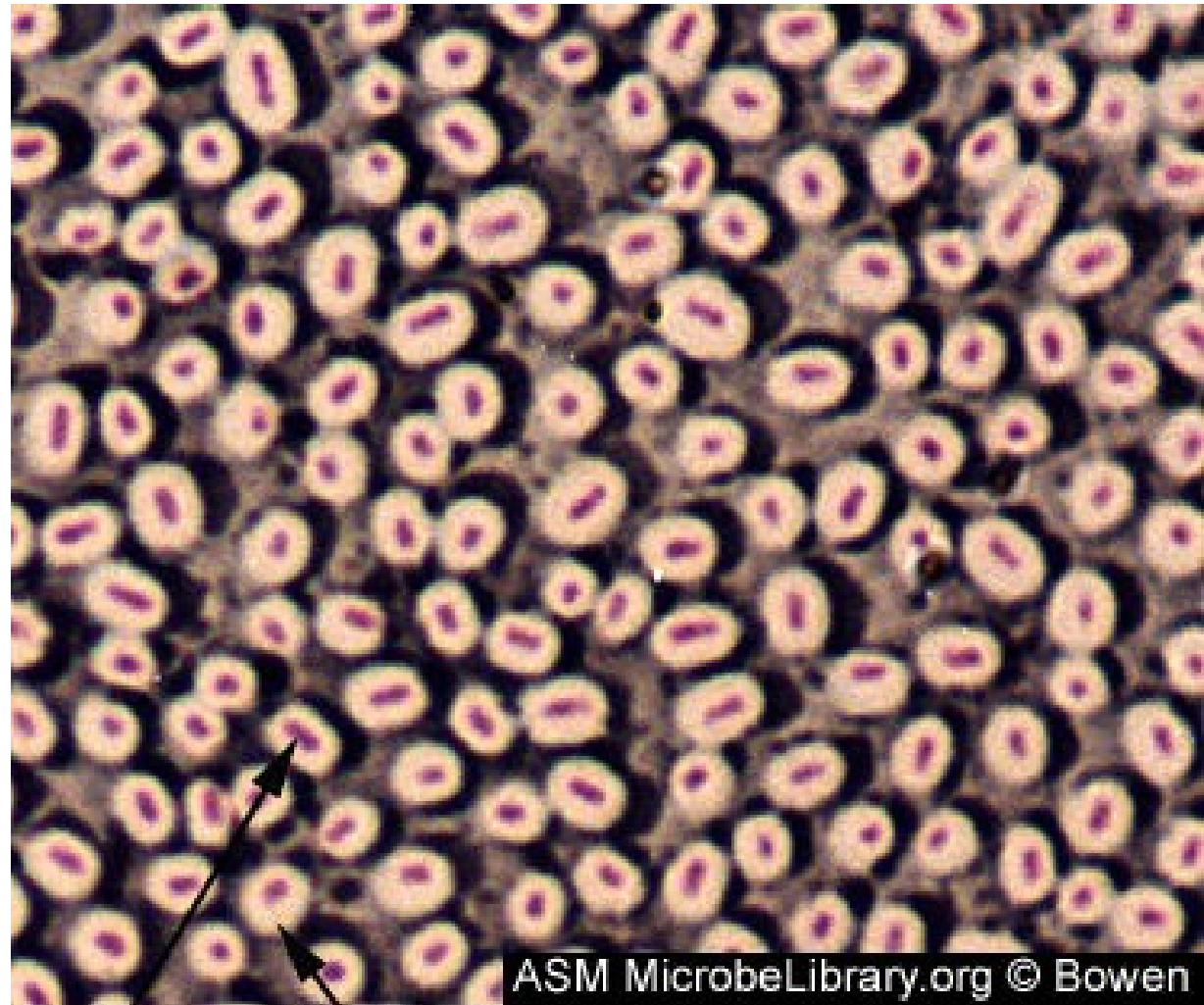


(Převzato z prezentace dr. Černohorské)

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



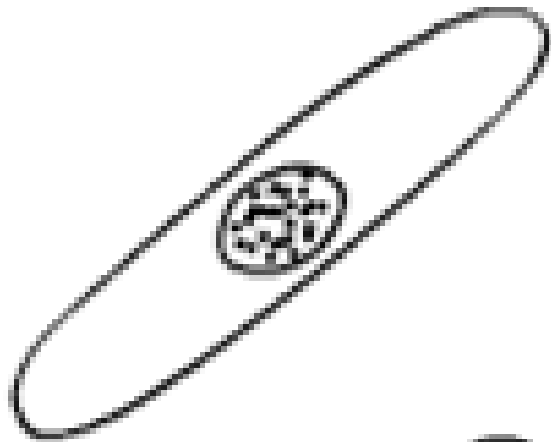
ASM MicrobeLibrary.org © Bowen

Cell

Capsule

Sporulace

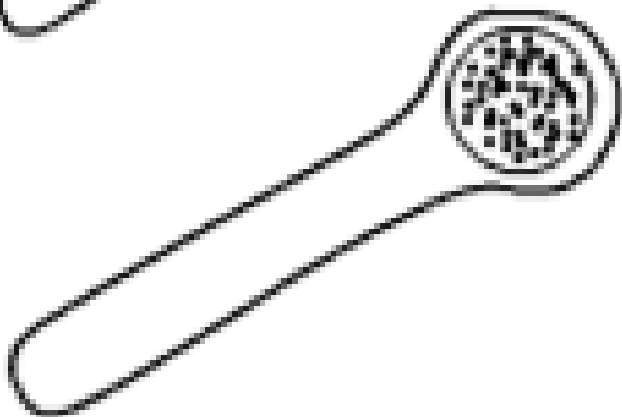
- Sporulace je něco jako zimní spánek, ale dovedený oproti zimnímu spánku zvířat k mnohem větší dokonalosti
- Spory přežijí velmi vysoké teploty, vyschnutí, desinfekci a podobně
- Spora vzniká jako endospora: buňka se rozdělí, ale neoddělí úplně: jedna část se mění ve sporu, která je zavzata do té druhé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



ex : *B. Subtilis*
B. Cereus
B. Thuringiensis
B. Anthracis

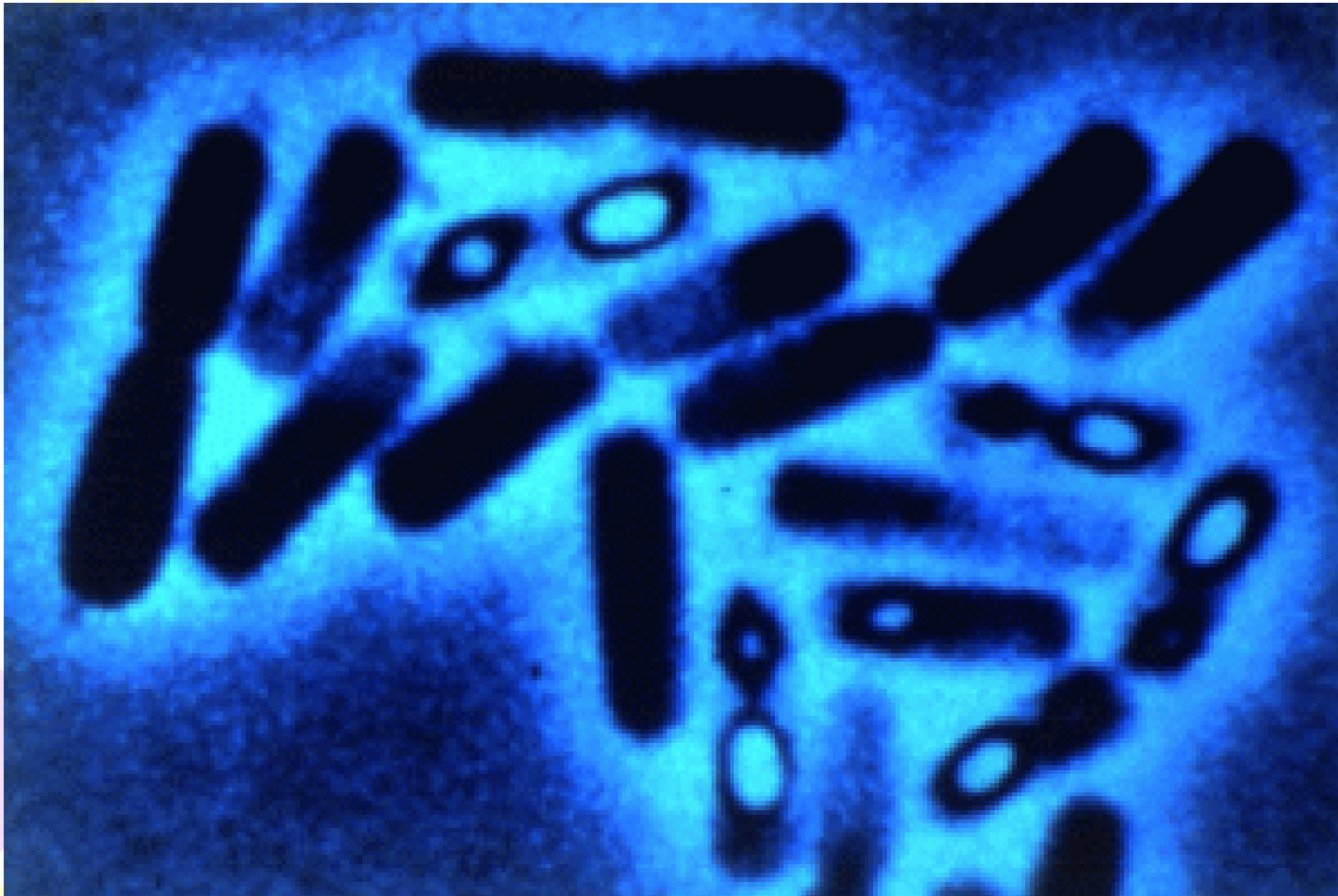


ex : *B. Polyxyma* (fixe le N₂)



ex : *B. Pasteurii* (dégrade l'Urée)

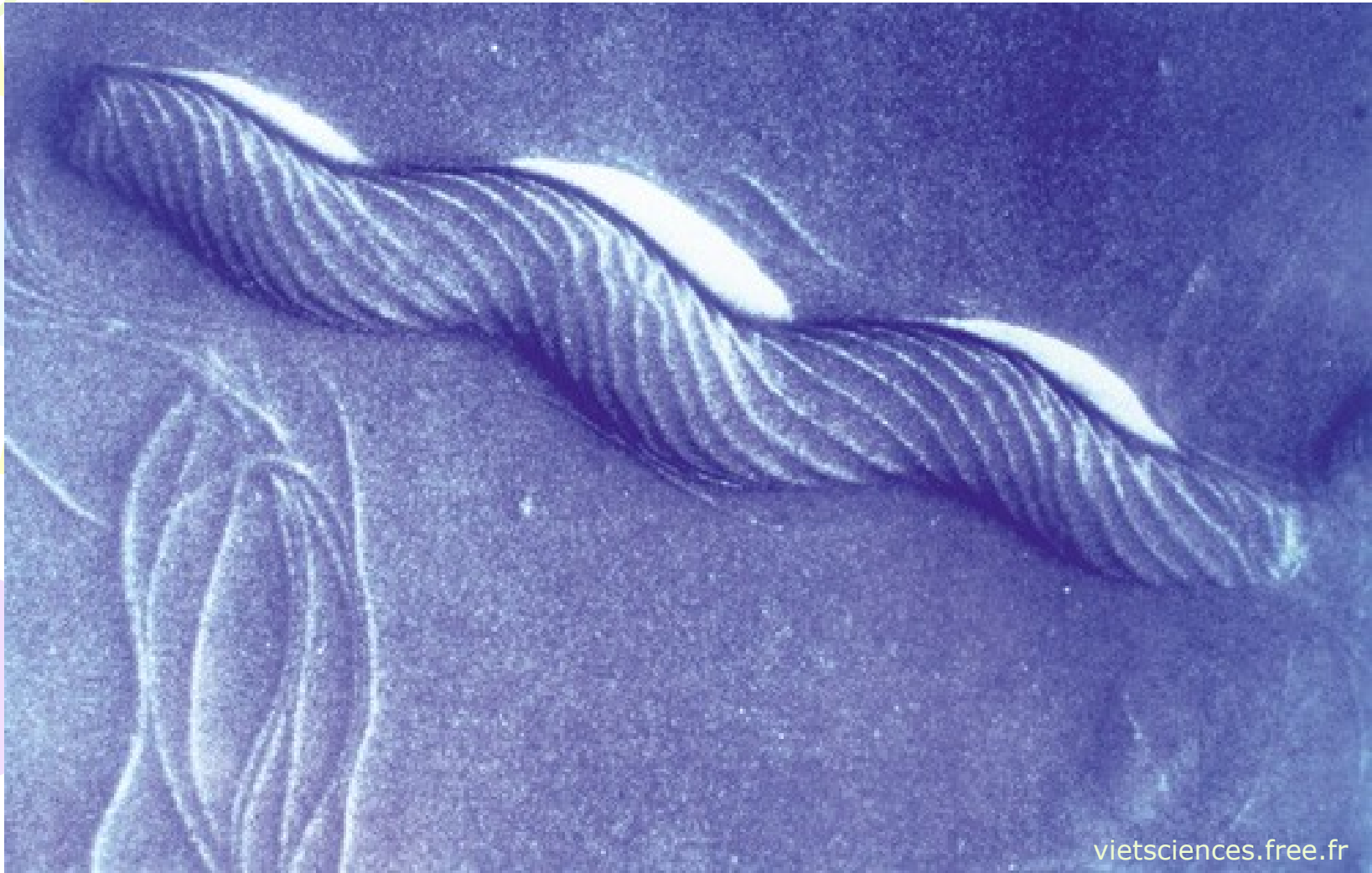
Spory jsou biochemicky neaktivní,
samy o sobě se nebarví



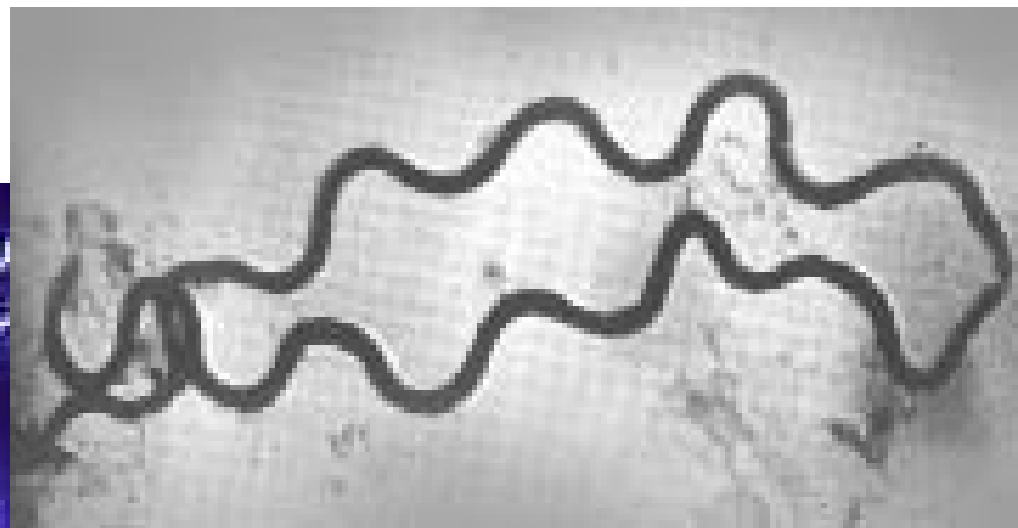
Tvarové možnosti bakterií

- 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

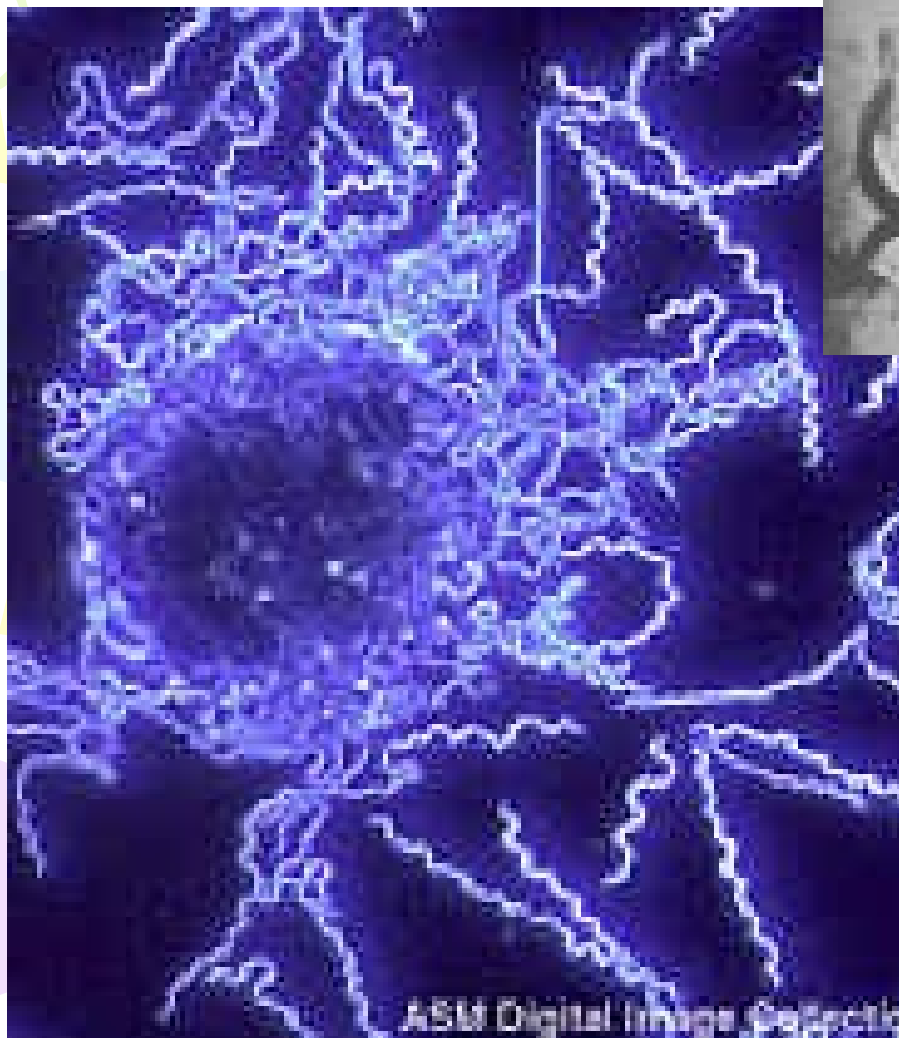
Zprohýbaná tyčinka – helikobakter



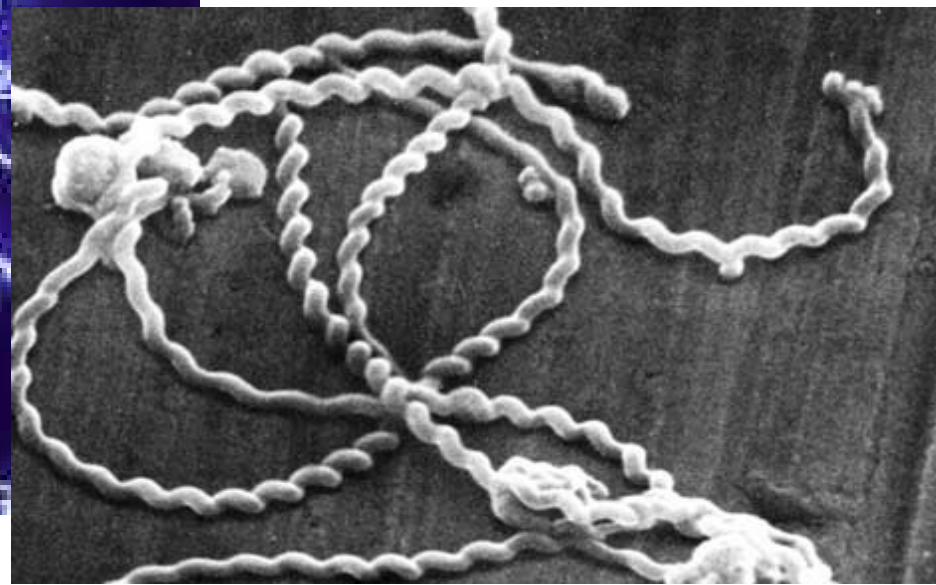
Spirochety



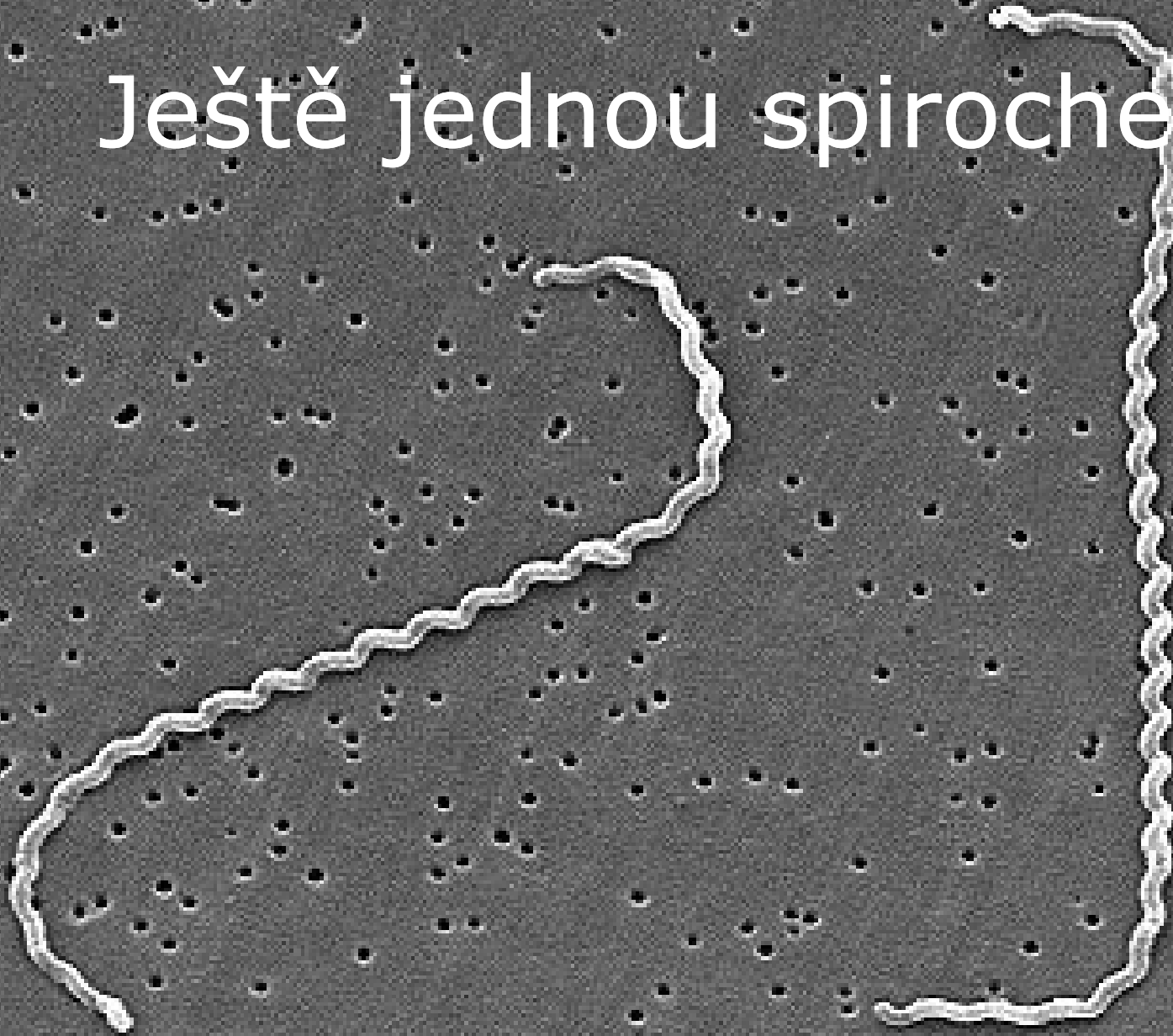
www.scidev.net



ASiM Digital Image Collection



Ještě jednou spirochety



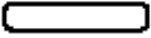

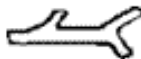




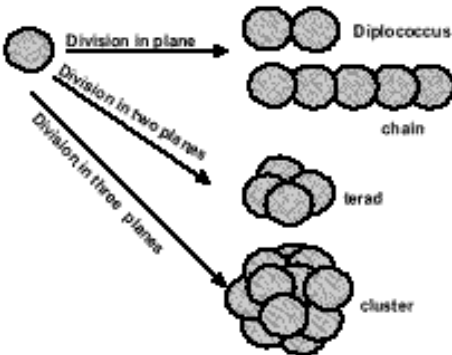
Možnosti uspořádání bakterií

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

Foto O. Z.



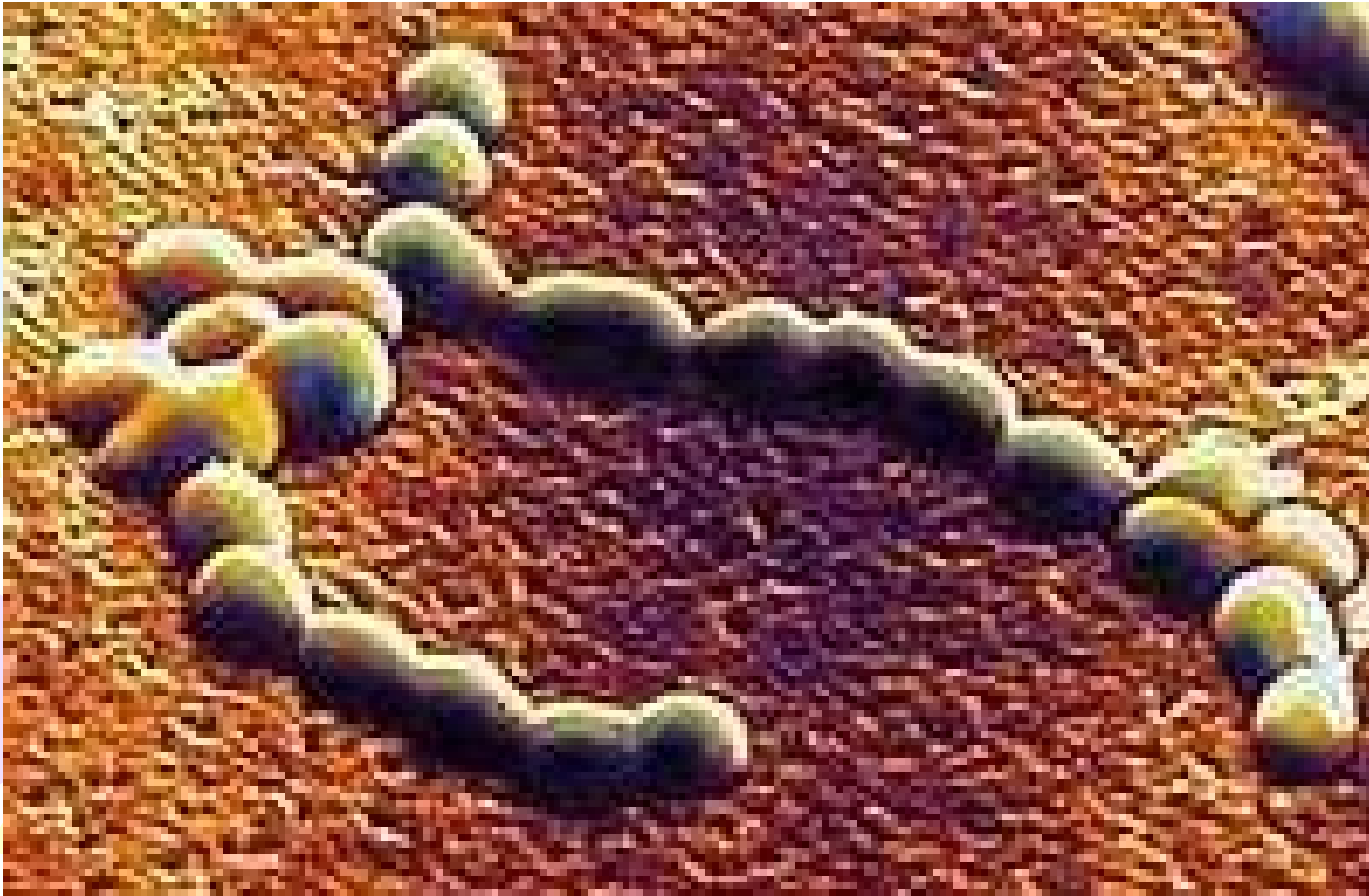
Tvarové možnosti bakterií

| <i>Bacterial Morphologies</i> | | <i>Examples</i> |
|---|--------------------|--|
|  | Straight rod | Escherichia |
|  | Club-shaped rod | Corynebacterium |
|  | Branching rod | Actinomyces |
|  | Spore forming rods | Bacillus |
|  | Spiral forms | Spirochaeta |
|  | Comma forms | Vibrio |
|  | Coccus | Staphylococcus |
|  | | Neisseria Streptococcus Saricina Staphylococcus |

<http://click4biology.info/c4b/2/cell2.2.htm>

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

www.morgenwelt.de



Řetízky v Gramově barvení



mikroby.blox.pl

medianovo.de
© 2007 Medianovo Medien-Service



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. Index lomu oleje je bližší indexu lomu skla, než index lomu 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 Steenstrup. 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. violet | 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.

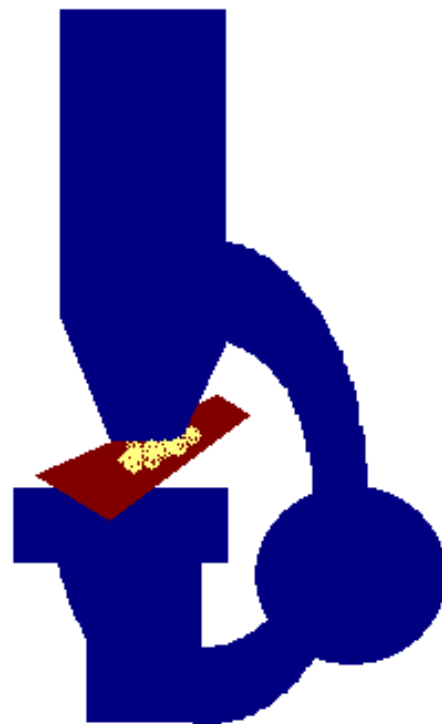
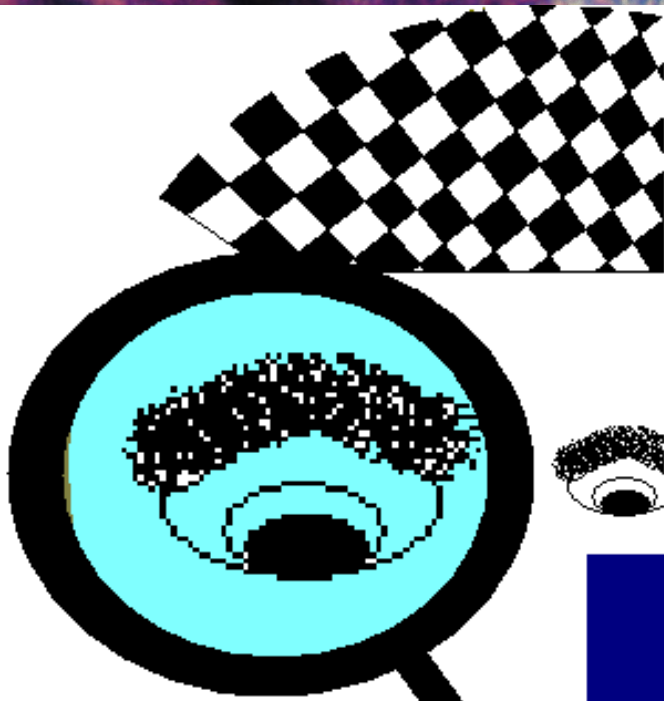
Vsuvka: Lugolův roztok je směs I_2 a KI

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.

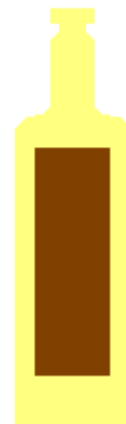


www.jergym.hiedu.cz

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



Violet'



Lugol

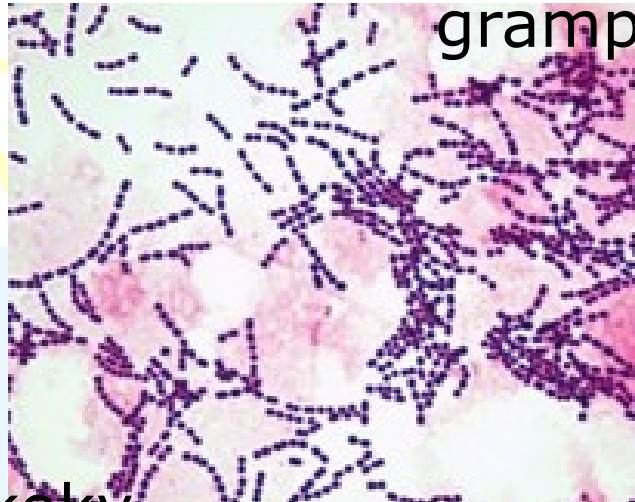


Alkohol



Safranin

Čtyři hlavní skupiny bakterií podle Gramova barvení



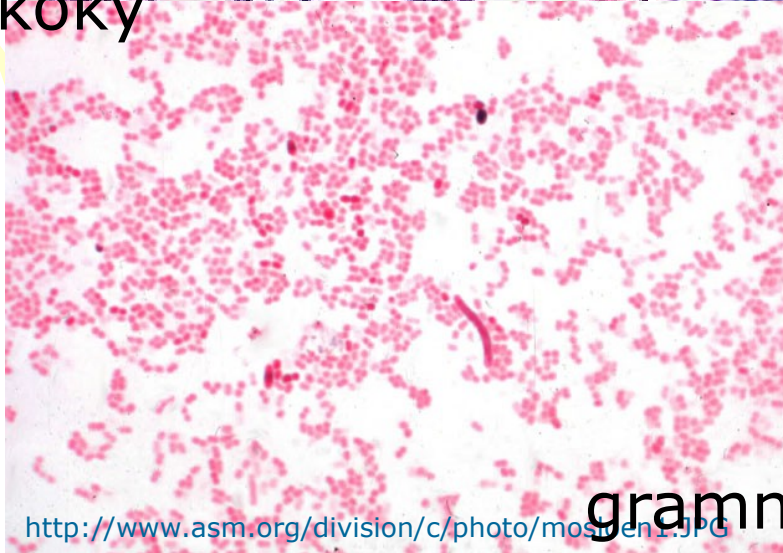
grampozitivní

koky



<http://faculty.mc3.edu/jearl/MLV/subtilis.jpg>

tyčinky



<http://www.asm.org/division/c/photo/mosbyen1.JPG>



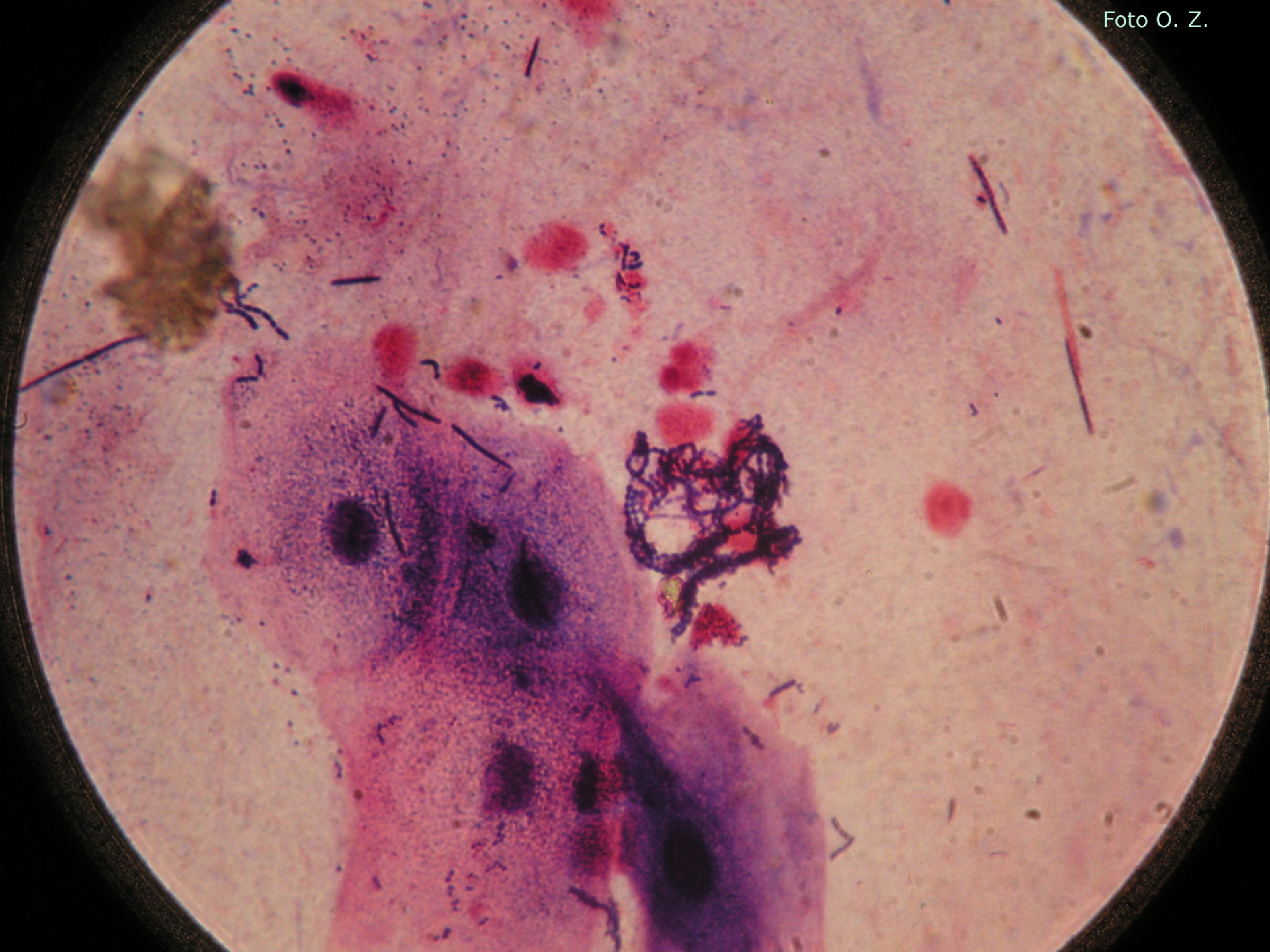
gramnegativní

http://www.billwilcox.net/1011/Ch27prokaryotes/gramnegative_rods.jpg

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
- 
- 

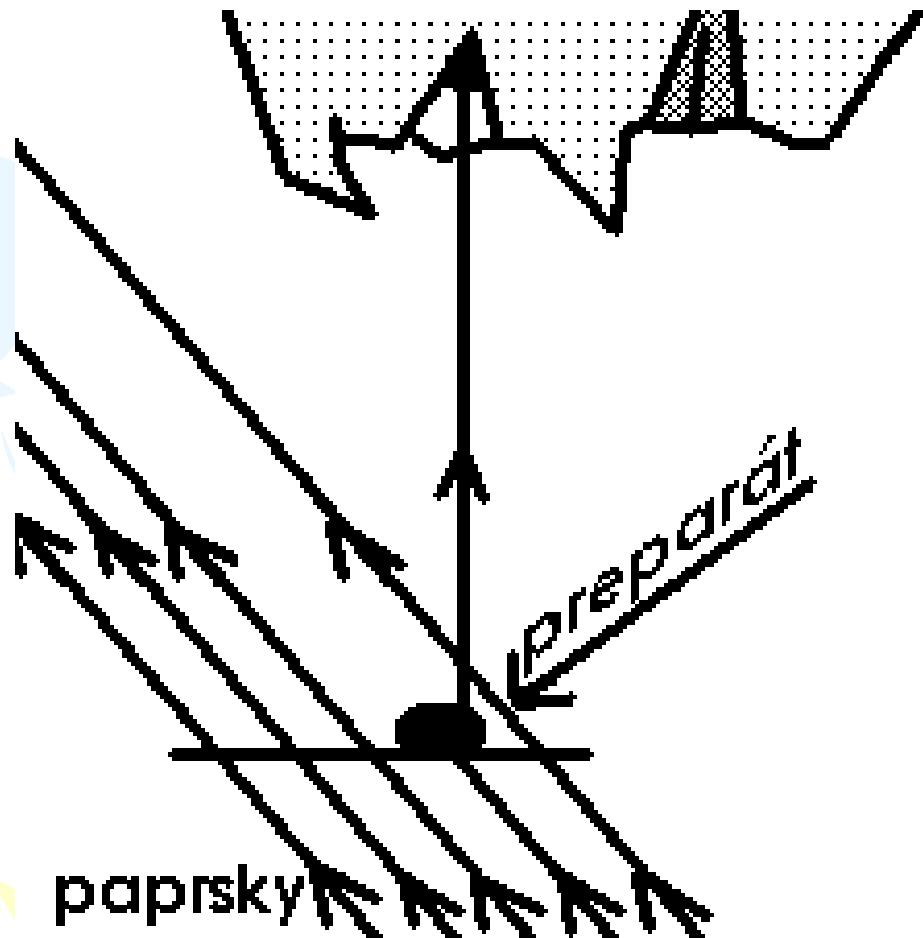
Fluorescenční barvení



Speciální mikroskopické techniky

- Mikroskopie v zástině – 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