

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)

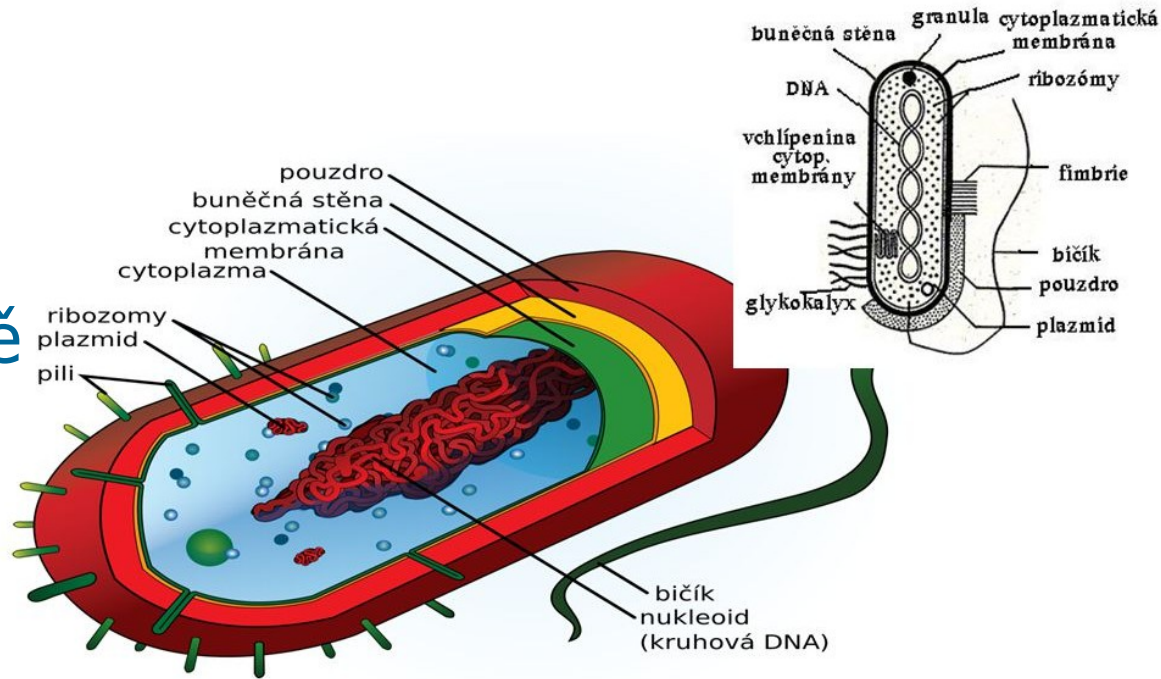
Mikroskopické
pozorování
(= pozorování
mikroba jako
morfologické
jednotky)

Kultivace
(= pozorování
růstových, tedy
fyziologických
vlastností mikroba)

Morfologie bakteriální buňky

- Prokaryota

- Chybí ohraničené jádro
- DNA ve formě cirkulárního chromozomu
- Transkripce a translace mohou probíhat současně

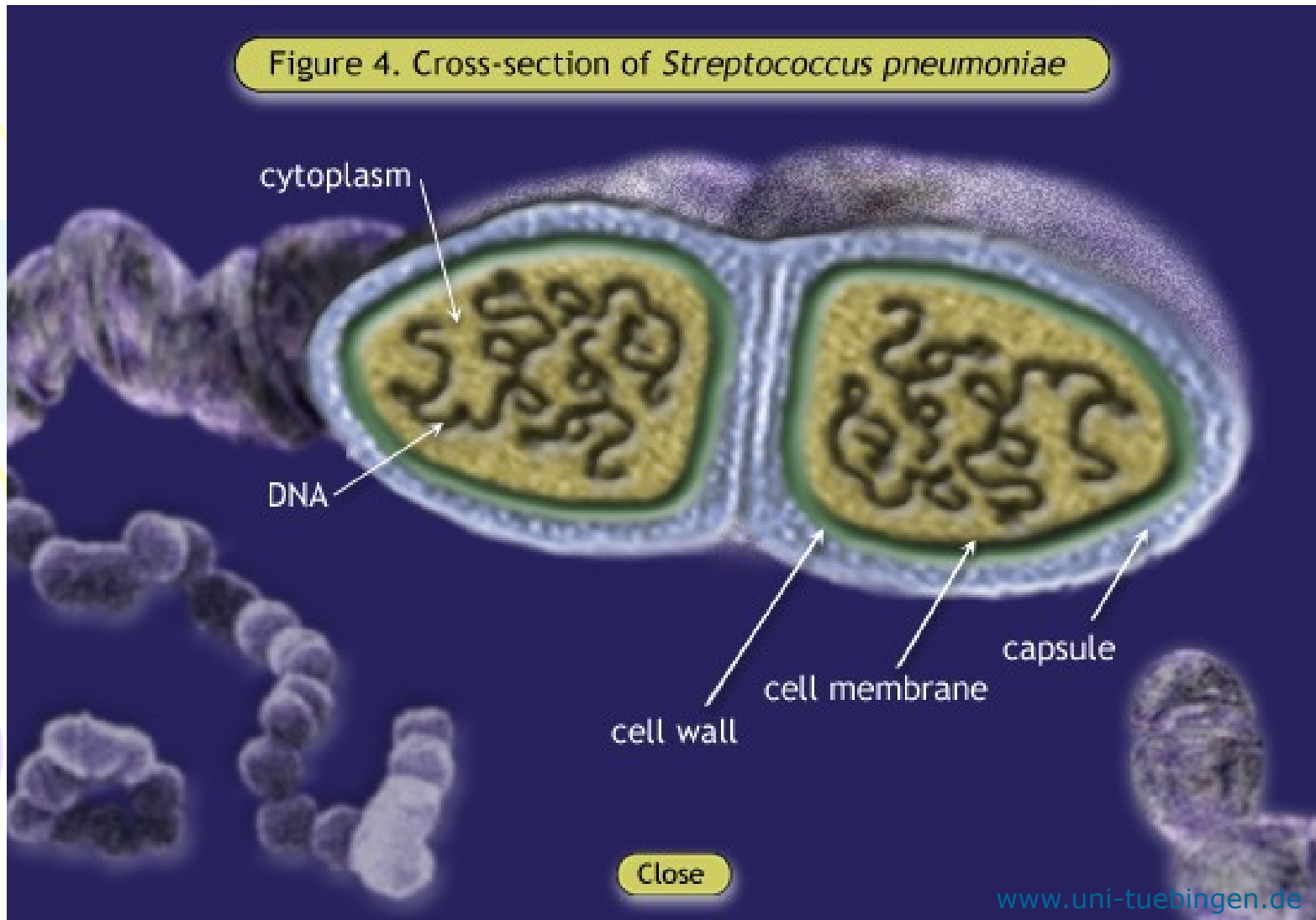


Z čeho se skládá bakteriální buňka

- Chromozom - nukleoid
 - Ribozomy, nutné k proteosyntéze
 - Cytoplasma, prostředí uvnitř buňky
 - Cytoplasmatická membrána
 - Buněčná stěna
 - Vakuoly, buněčné inkluze – dočasná záležitost
 - Plasmidy
 - Bičíky a fimbrie
 - Pouzdro
- } Vždy

Buňky *Streptococcus pneumoniae*

Figure 4. Cross-section of *Streptococcus pneumoniae*



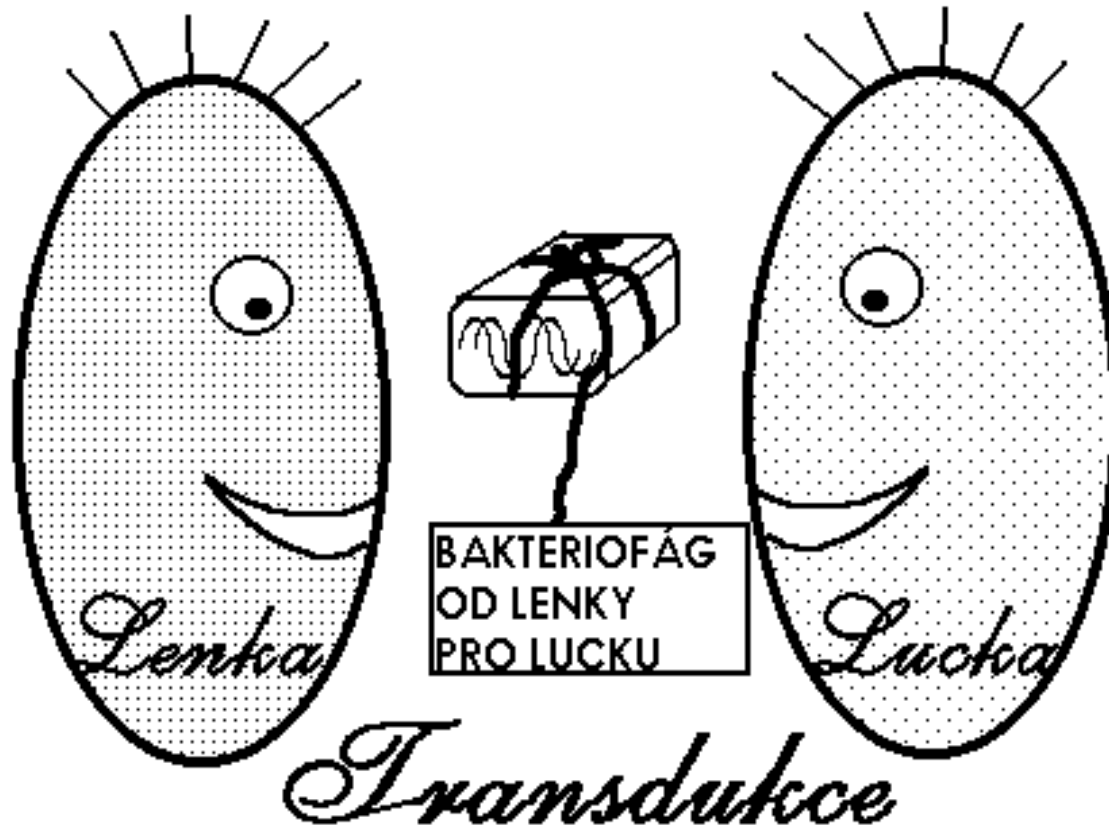


Genetická informace bakteriální buňky

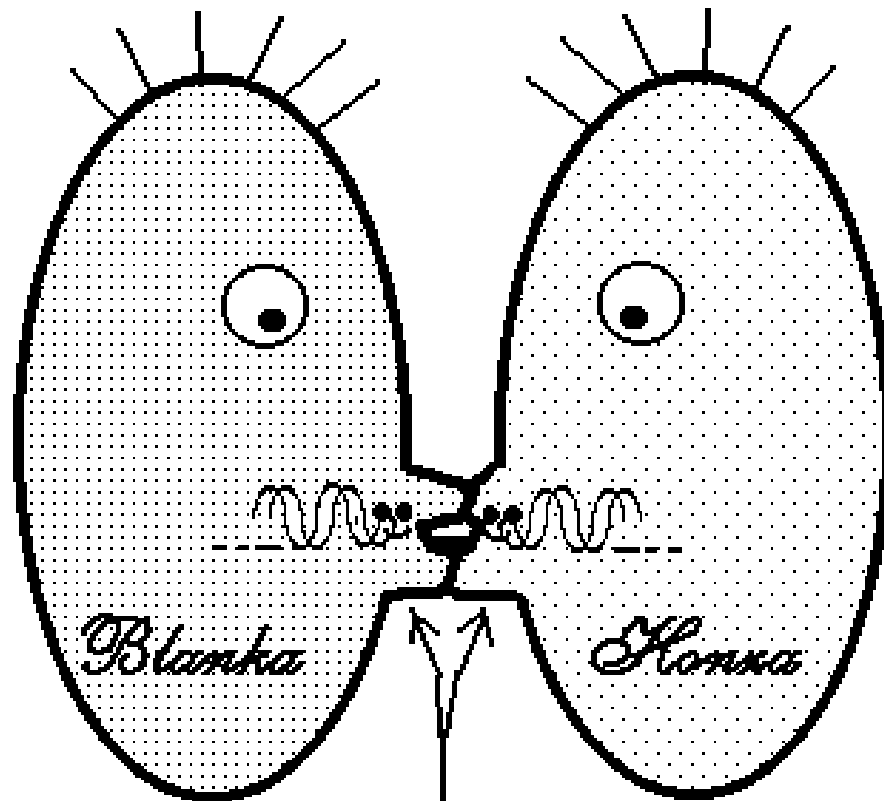
- Chromozom kruhového tvaru
 - nukleoid není viditelný v optickém mikroskopu
 - neobsahuje introny
- Kromě chromozomu může být genetická informace i extrachromozomální
 - **plazmidy**
- Malé kruhové molekuly DNA
 - obsahují přídatnou genetickou informaci
 - replikují se autonomně
 - postradatelné

Jak může buňka přijít k plazmidu

- Buňka nemůže plazmid sama vyrobit
- **tři způsoby**: transdukce, transformace a konjugace
- Pro různé bakterie je typický ten nebo onen, anebo žádný způsob
- Je to i prakticky významné – plazmidy kódují např. rezistenci na antibiotika, produkci toxinů, produkci antibiotik



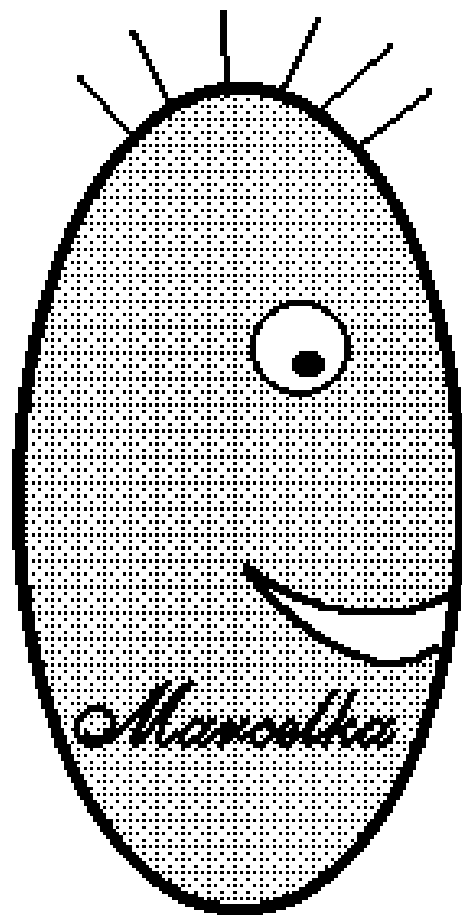
Fragment chromozomální DNA max. odpovídající přibližně délce genomu fága je omylem vbalen do kapsidy místo vlastní DNA fága
Rozšířený: bacillus, corynebacterium, escherichia, klebsiella, streptococcus a staphylococcus



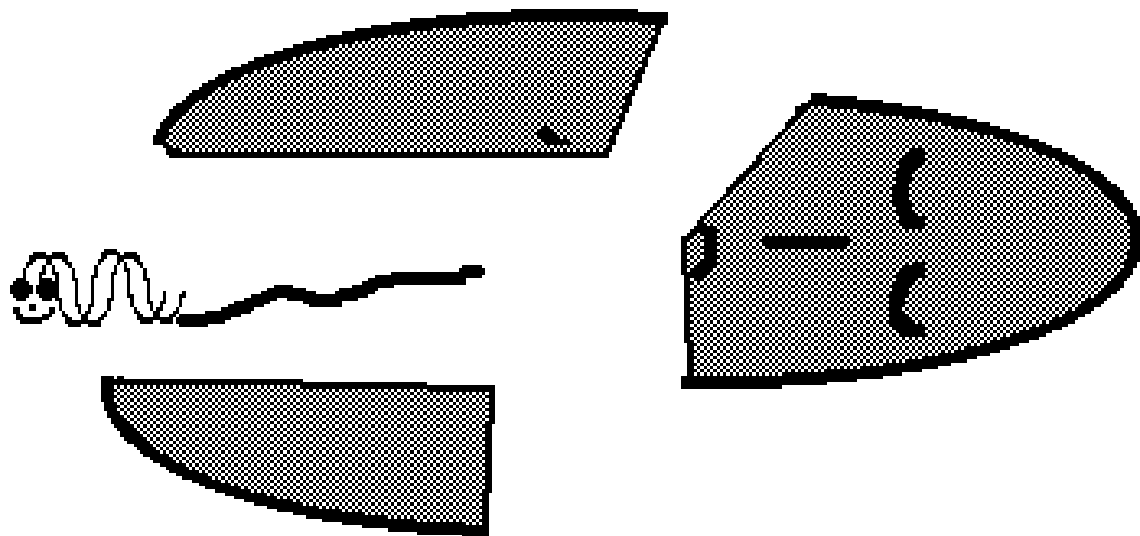
Kon- jugace

"SEX" PILLI (FIMBRIE)

Autonomně přenosné plazmidy, konjugační pili u G-
bakterií,
u G+ „sex feromonem“ buňky se přiblíží a přilnou -
streptokoky



rozpadající se bakterie, ze které se uvolňuje DNA



Transformace



Ribozómy

- Ribozómy jiné než v eukaryotních buňkách
- Volně v cytoplazmě
- Poblíž nepravého jádra
- Poblíž cytoplazmatické membrány – syntetizují bílkoviny určené do membrány
- Dvě podjednotky 30S a 50S; 70S



Cytoplazma

- Cytoplazma – velmi viskózní
- obsahuje
 - 50 % bílkovin buňky – všechny mají enzymatickou funkci – enzymy glykolýzy, Krebsova cyklu, dehydrogenázy, esterázy, katalázy
 - přijaté živiny, zplodiny metabolismu, ionty
 - obsahuje velké množství biogenní molekul

Cytoplazmatická membrána

- Jediná biologická membrána prokaryotické buňky
- probíhá na ní řada chemických procesů
- transport látek do buňky
- transformace energie
 - respirační řetězec
- procesy, které využívají rozdílů v koncentraci určitých iontů vně a uvnitř buňky
- Protonový gradient - pohání bičík
- Membrána zároveň chrání buňku před chemickými a jinými vlivy

Buněčná stěna

- Má roli buněčného skeletu – uděluje buňce tvar a chrání ji mechanicky, chemicky, proti vyschnutí, nepříznivým osmotickým podmínkám
- Obnažené buňky s cytoplazmatickou membránou
 - Protoplasty
 - Sféroplasty
 - L-formy bakterií

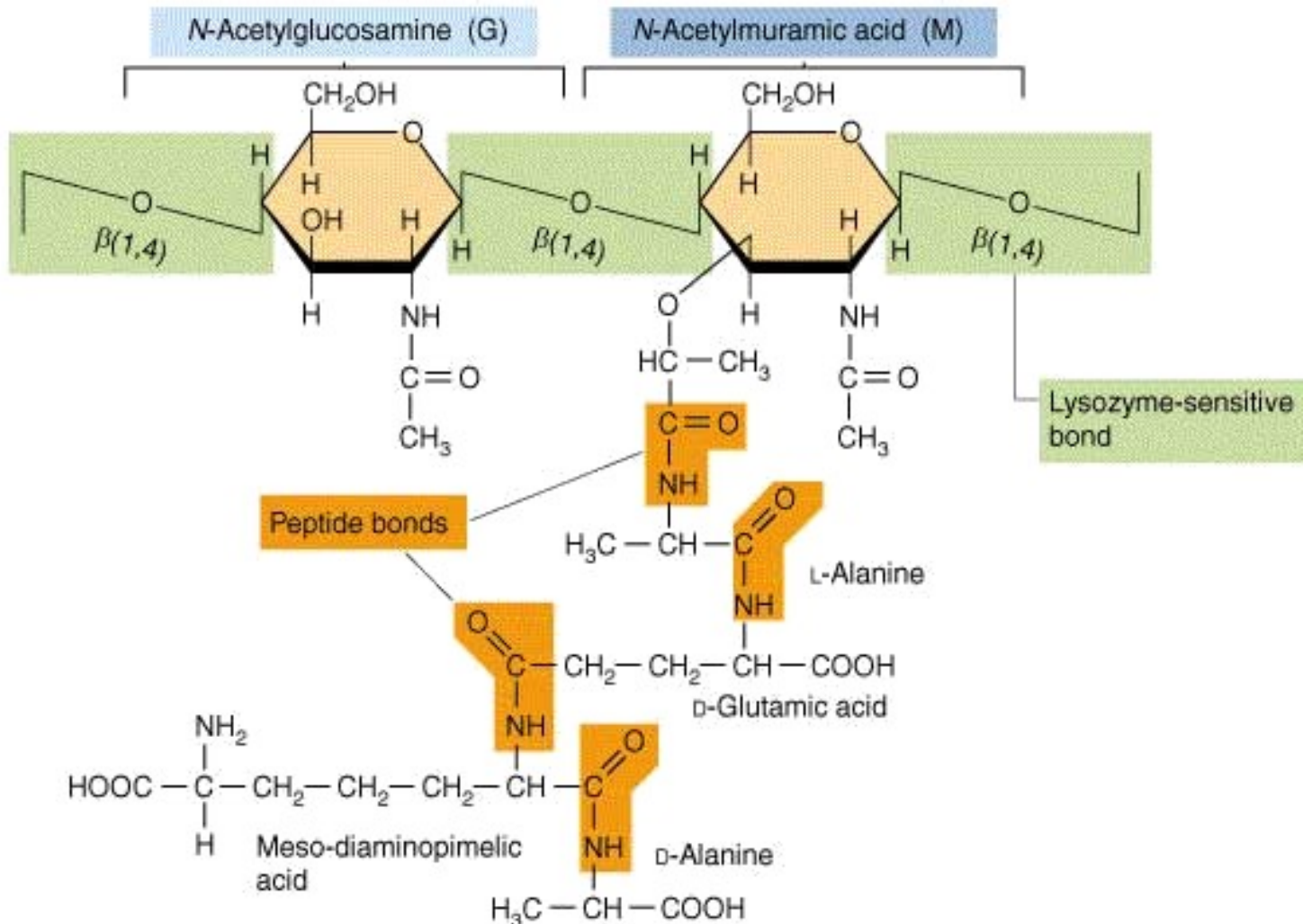
Buněčná stěna

- Hlavní složka **peptidoglykan (murein)** z cukrů (N-acetylglukosamin a N-acetylmuramová kyselina) a aminokyselin
- **Barvení dle Grama** – základní metoda identifikace a detekce bakterií

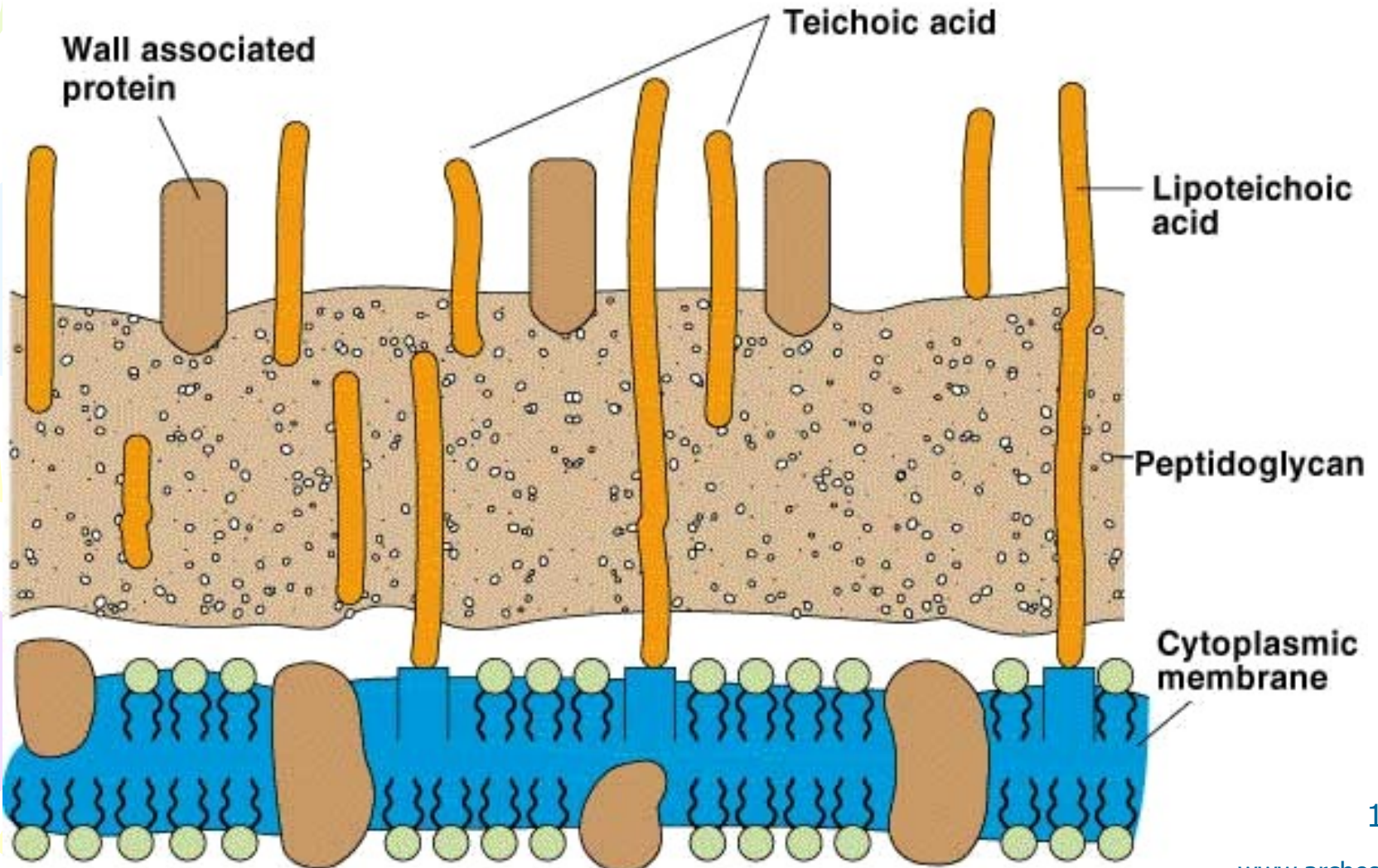
Buněčná stěna

- Grampozitivní bakterie mají buněčnou stěnu tlustou (20-80 nm) a jednoduchou
- Gramnegativní bakterie mají buněčnou stěnu tenkou (5-10 nm) a složitější
- Některé bakterie mají jinou buněčnou stěnu (mykobakteria – acidorezistentní, v buňce jsou mykolové kyseliny)
- Některé bakterie (mykoplasmata) buněčnou stěnu vůbec nemají

Základem každé buněčné stěny je peptidoglykan (murein)

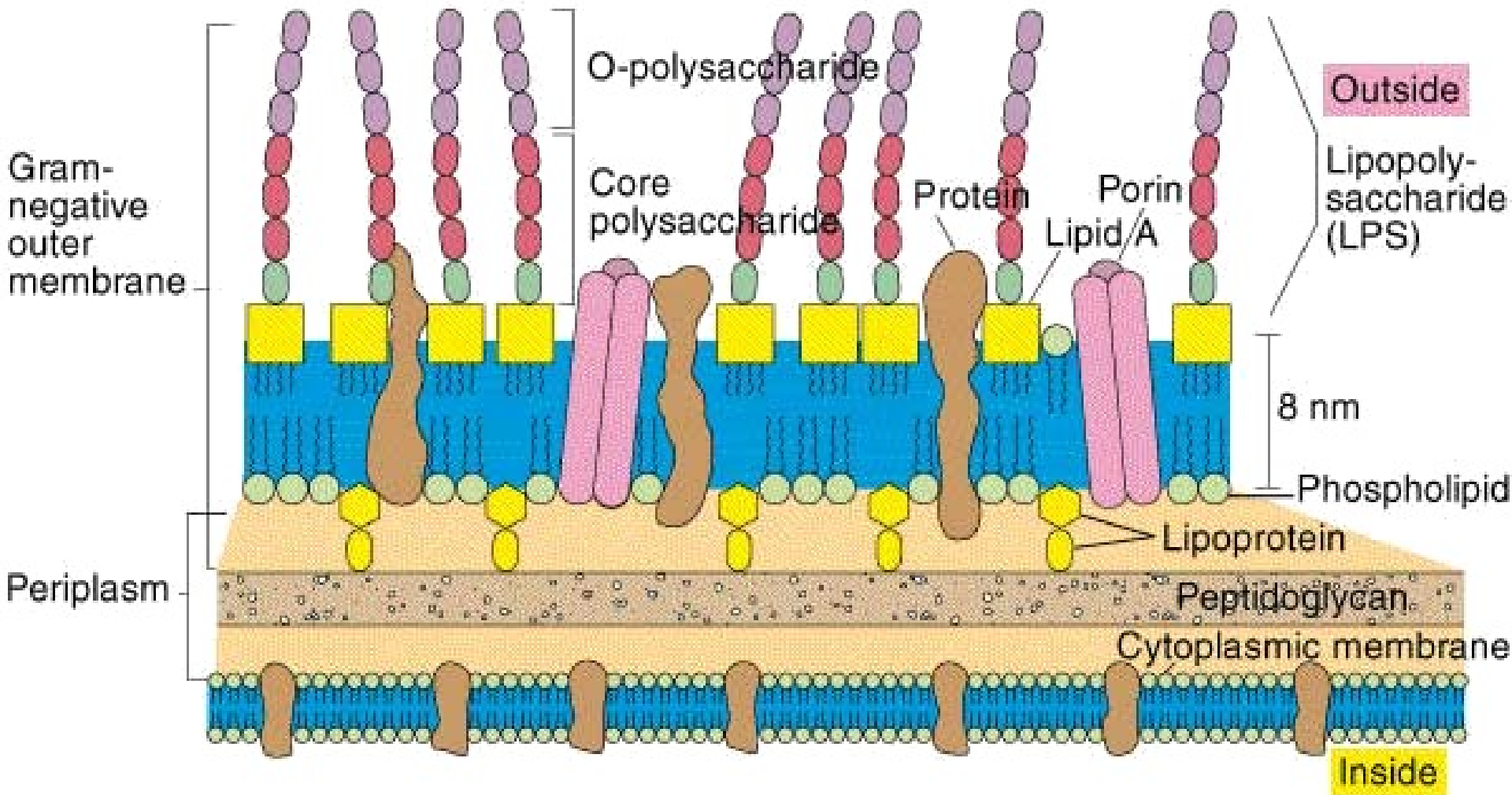


Grampozitivní buněčná stěna



Gramnegativní buněčná stěna

www.arches.uga.edu



Gramnegativní buněčná stěna

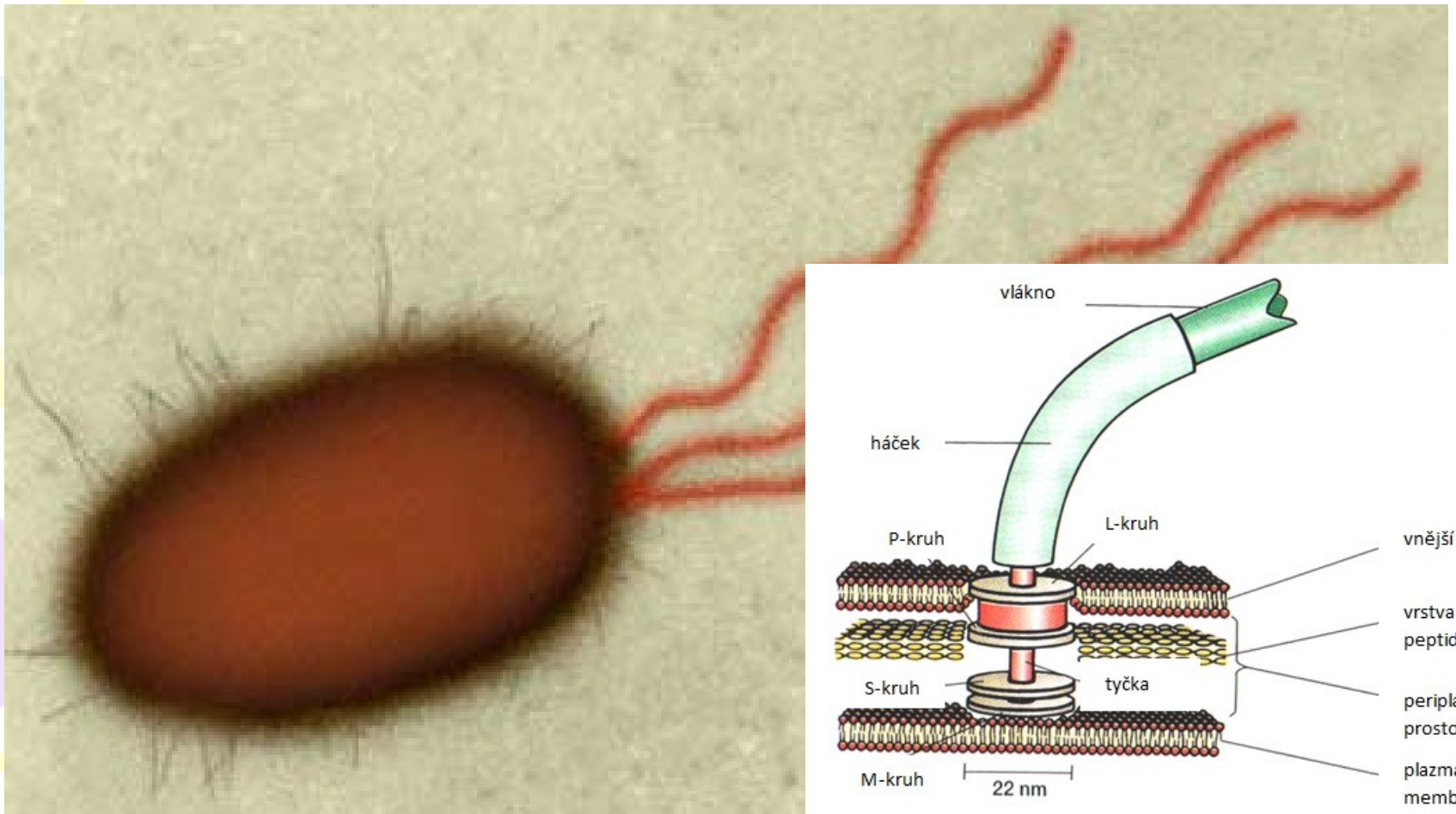
- Lipid A = endotoxin - hydrofobní
- Nespecifický polysacharid (základní polysacharid) – společný pro příbuzné druhy bakterií
- Specifický polysacharid – je nositelem antigenicity těla bakterie – O antigen u G-bakterií
- Vnější membrána – propouští živiny, chrání před lytickými účinky žlučových kyselin, enzymů (např. střevního traktu, lysozymu)
- LPS – chrání pře imunitní protilátkovou odpovědí

Fimbrie (pili), curli a bičíky

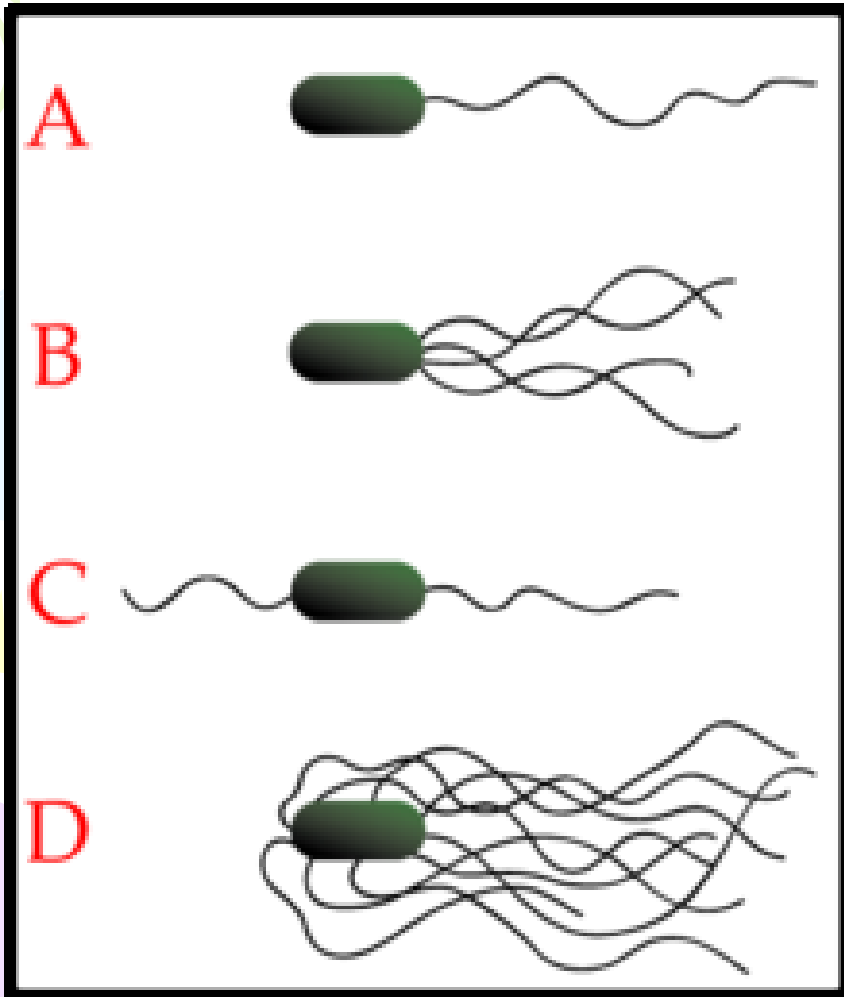
- Mnohé bakterie jsou schopny pohybu
 - K pohybu slouží hlavně bičíky
 - **Bičík bakterií** – rotuje jako lodní šroub, až 20 μm , proteinem - flagelin – druhově specifický
- Fimbrie mohou vedle pohybu sloužit např. i k adhezi bakterie na povrch, ke konjugaci (sex pili), větší množství může chránit před fagocyty hostitele
- Curli jsou podobné jako pili, ale zakroucené

Bakterie s bičíky (*Escherichia coli*)

www.biotox.cz

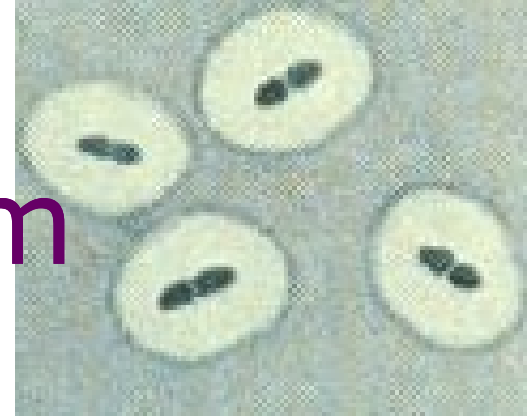


Umístění bičíků bakterií



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

Pouzdro a biofilm



- Pouzdro obklopuje jednotlivou bakterii, popř. dvojici.
 - většinou polysacharidové, které buňku chrání – slizovitý povrch
 - faktor virulence
- **Biofilm** je souvislá vrstva, vzniklá z bakterií, jejich pouzder a dalšího materiálu.
 - je mnohem odolnější než jednotlivá bakterie, žijící v tzv. planktonické formě

Stádia vývoje biofilmu

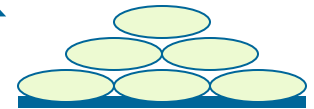
Kontakt planktonické bakterie
s povrchem



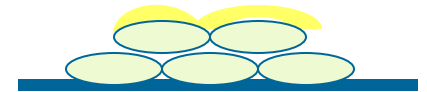
navázání na tento povrch



adhese, růst a shlukování buněk
do mikrokolonií



produkce polymerické hmoty
(matrix, nebuněčná složka)



Vytvoření trojrozměrné struktury
známé jako biofilm

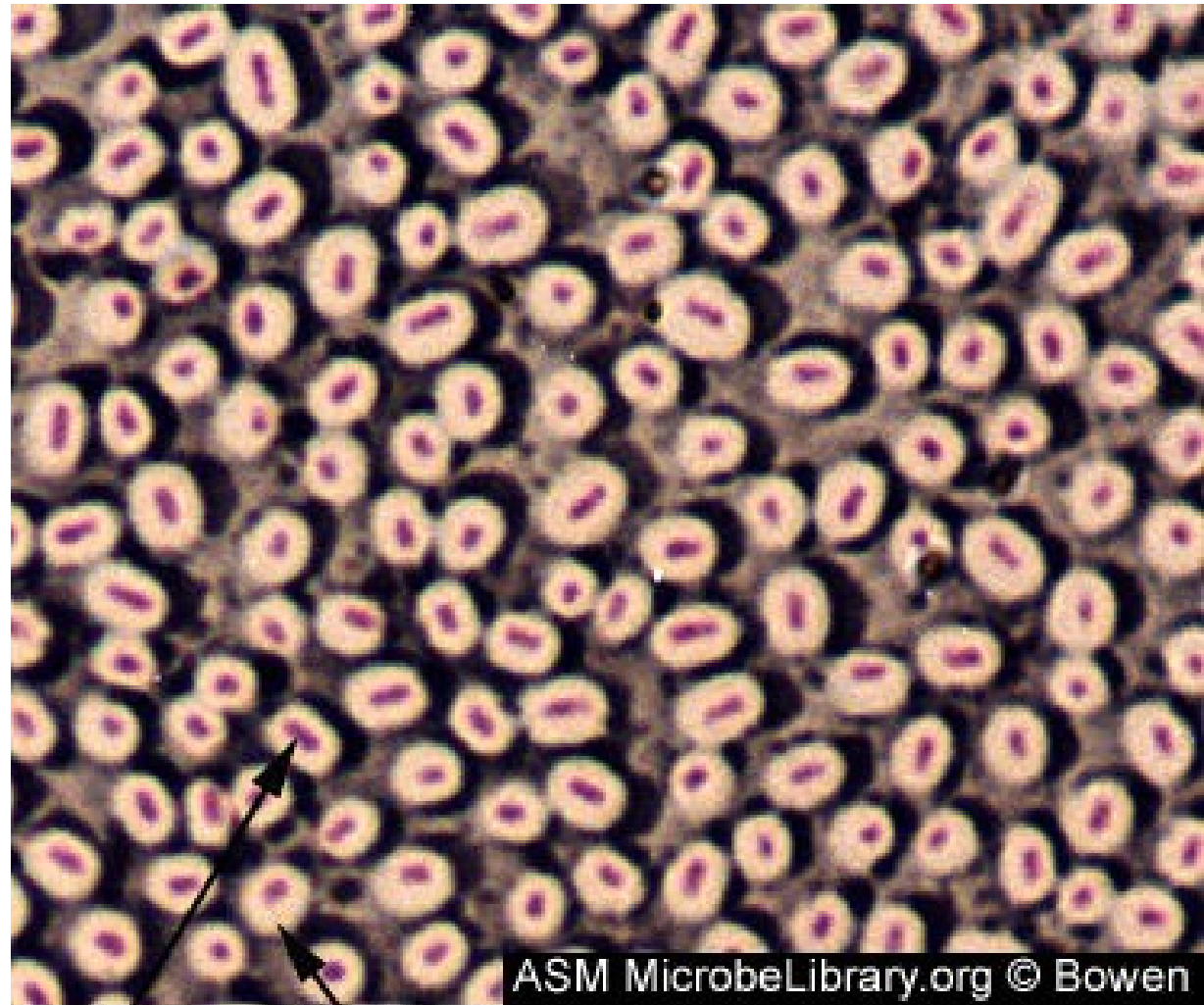


(Převzato z prezentace dr. Černožorské)

Neobarvené pouzdro

pathmicro.med.sc.edu

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



ASM MicrobeLibrary.org © Bowen

Cell

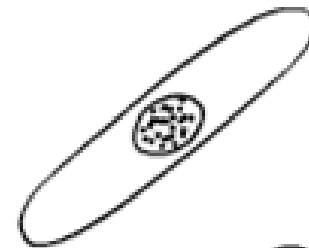
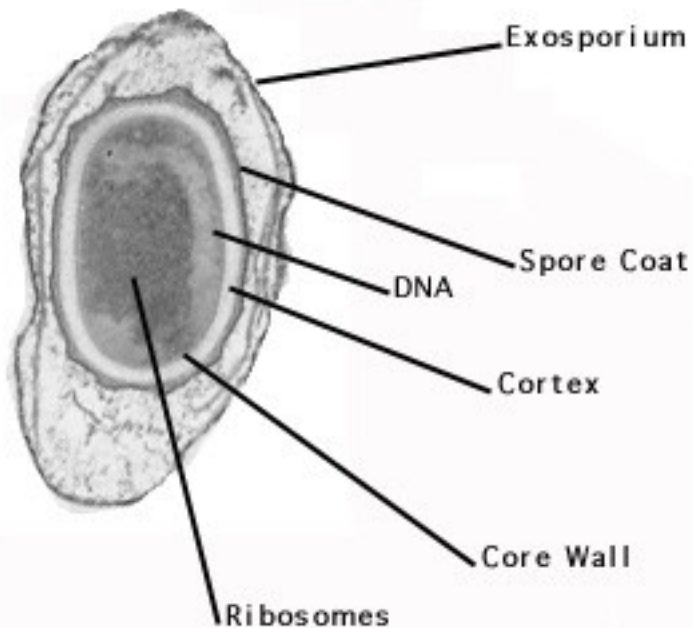
Capsule

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 (uvnitř buňky): buňka se dělí asymetricky
- z menší poloviny – endospora obsahuje kompletní genom a malé množství proteosyntetického aparátu - obalená mnoha vrstvami
- je zavzata do té druhé větší poloviny
- spora obsahuje jen minimum vody →
- vysoká odolnost k zvýšené teplotě
- velké množství kys. dipikolinové a Ca^{2+}

Spora

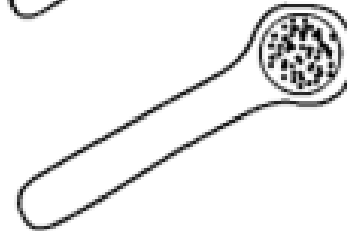
Sporulující bakterie r. *Bacillus* a r. *Clostridium*



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



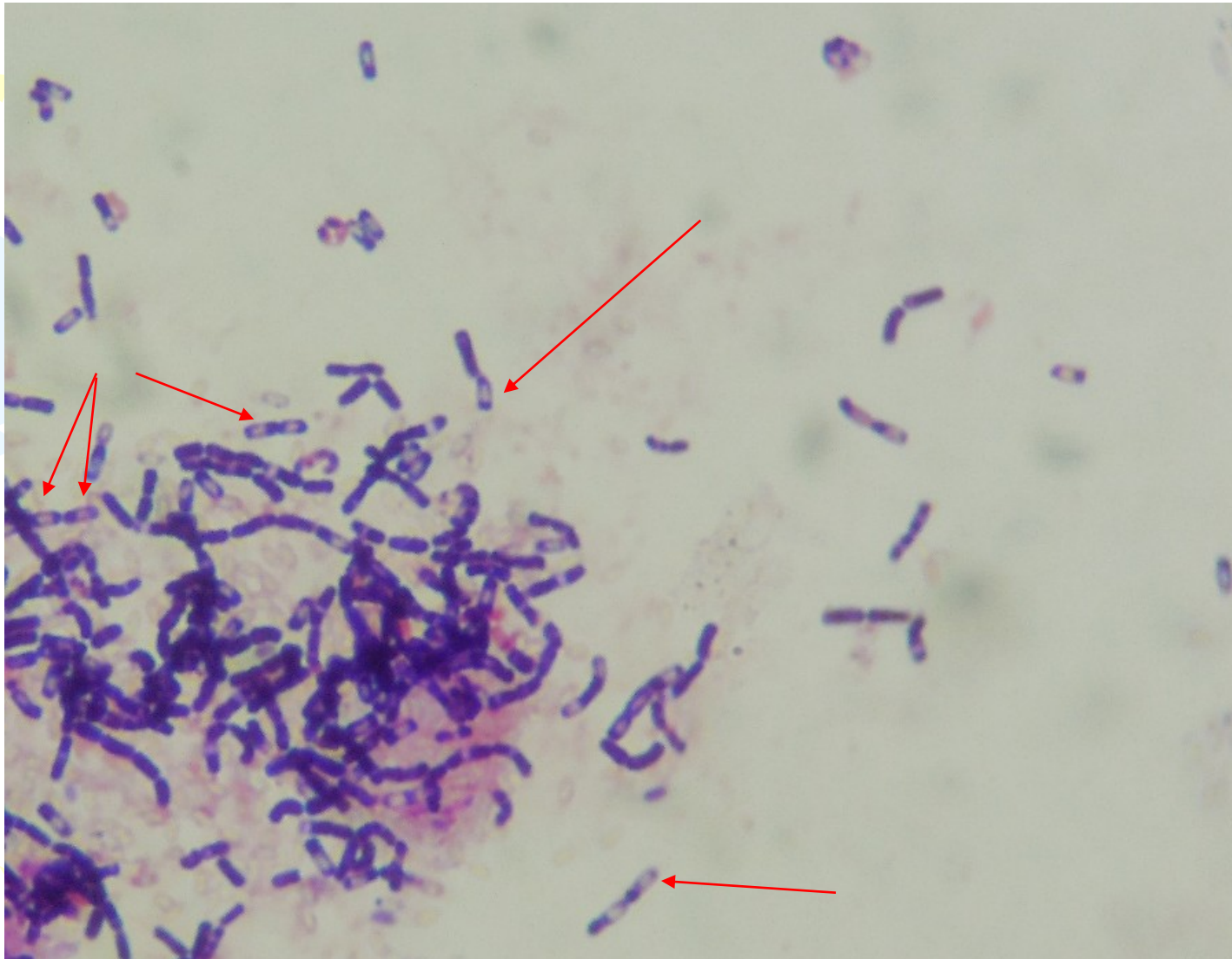
ex : *B. Polycyama* (fixe le N₂)



ex : *B. Pasteurii* (dégrade l'Urée)

membres.lycos.fr

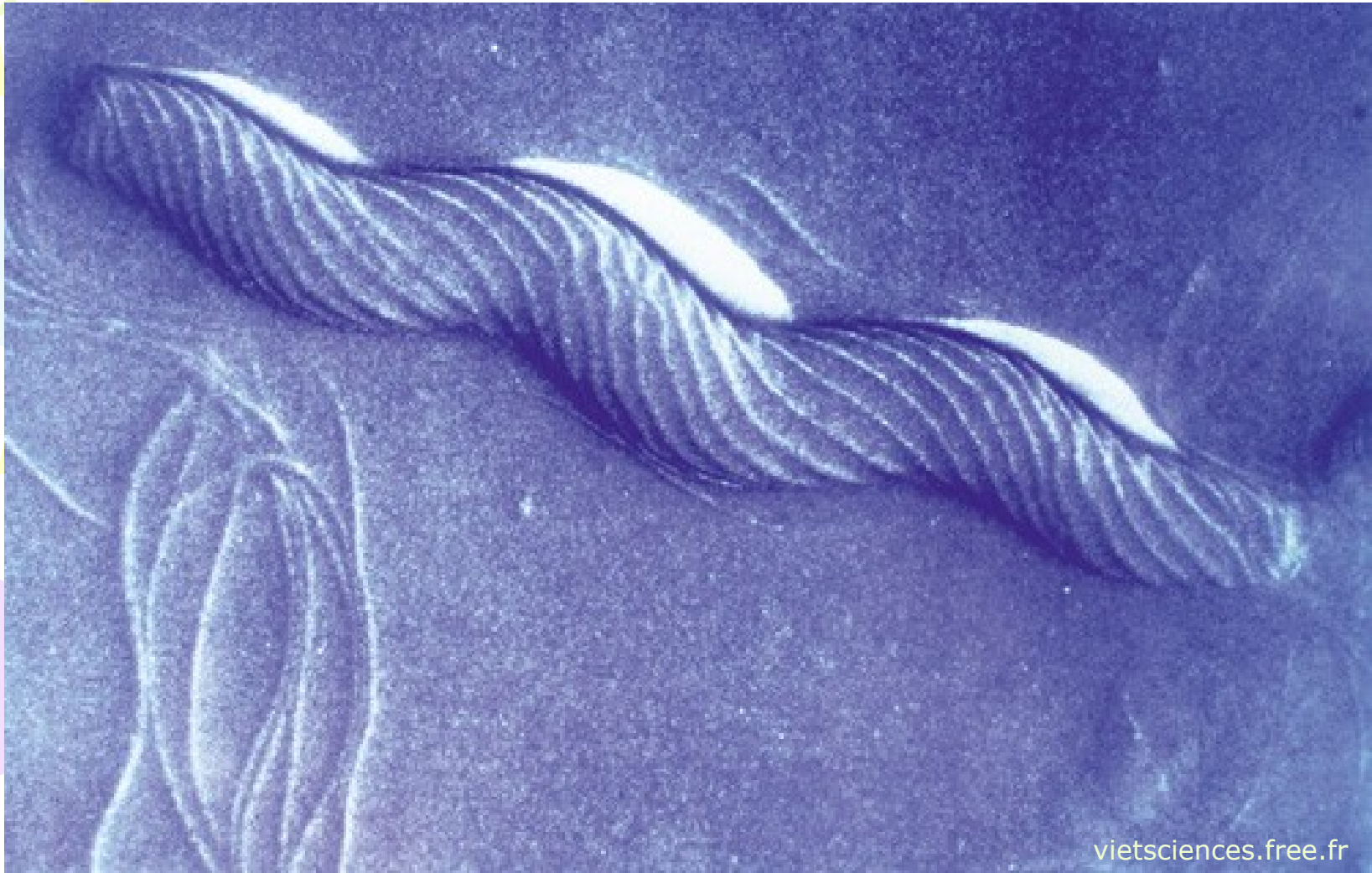
Spory jsou biochemicky neaktivní,
samy o sobě se nebarví



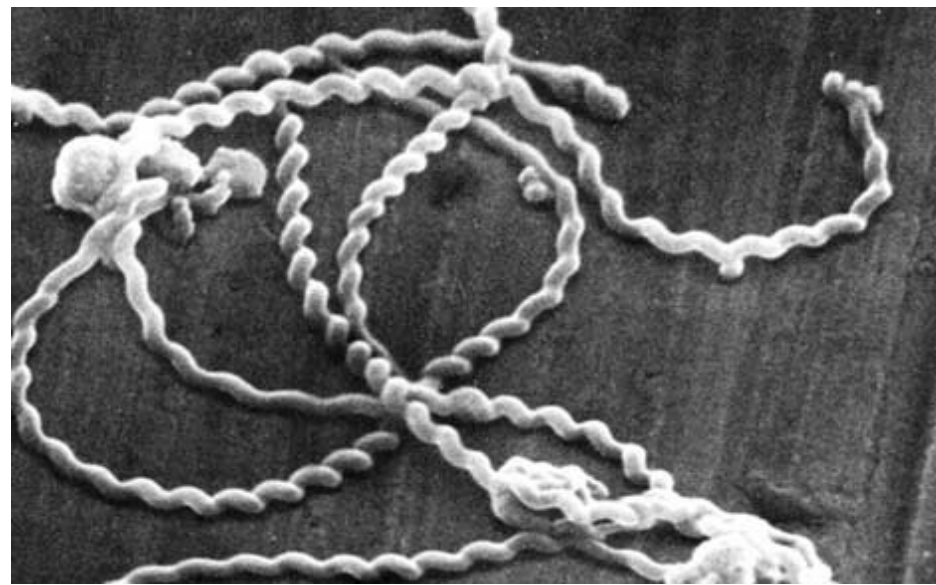
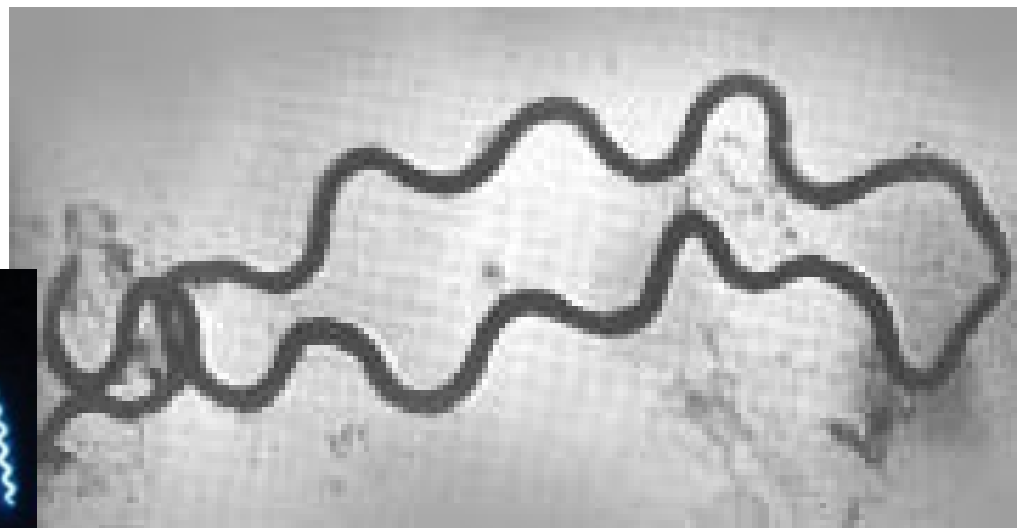
Tvarové možnosti bakterií

- 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

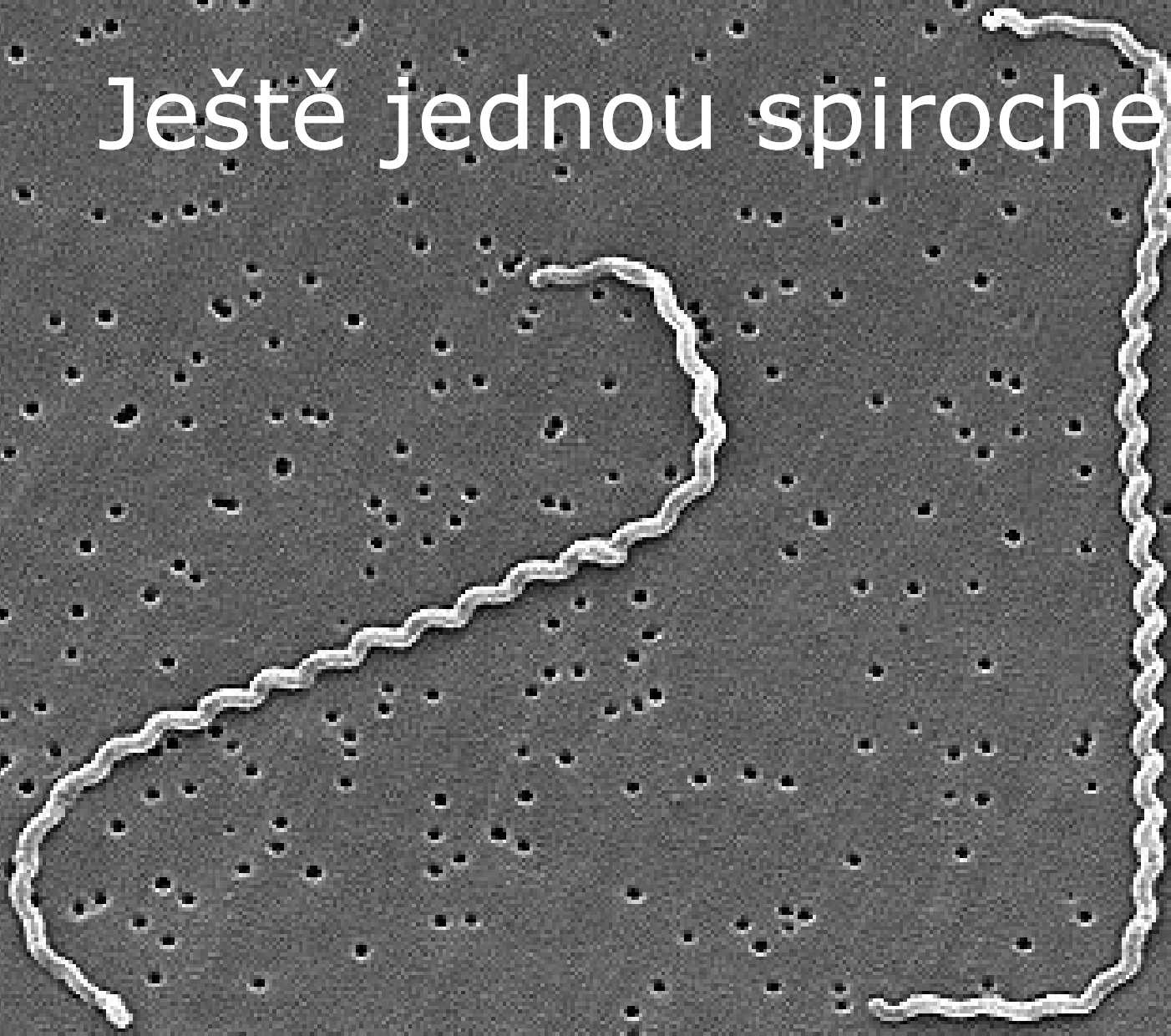
Zprohýbaná tyčinka – helikobakter



Spirochéty

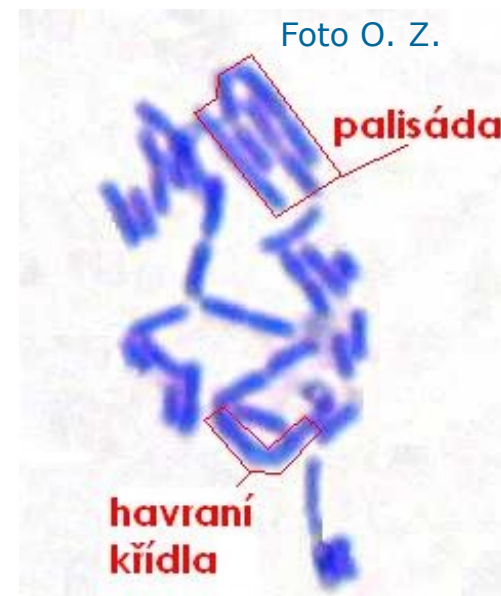


Ještě jednou spirochety

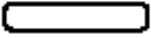

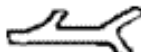




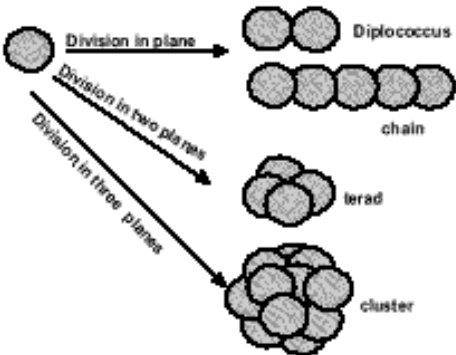


Možnosti uspořádání bakterií

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



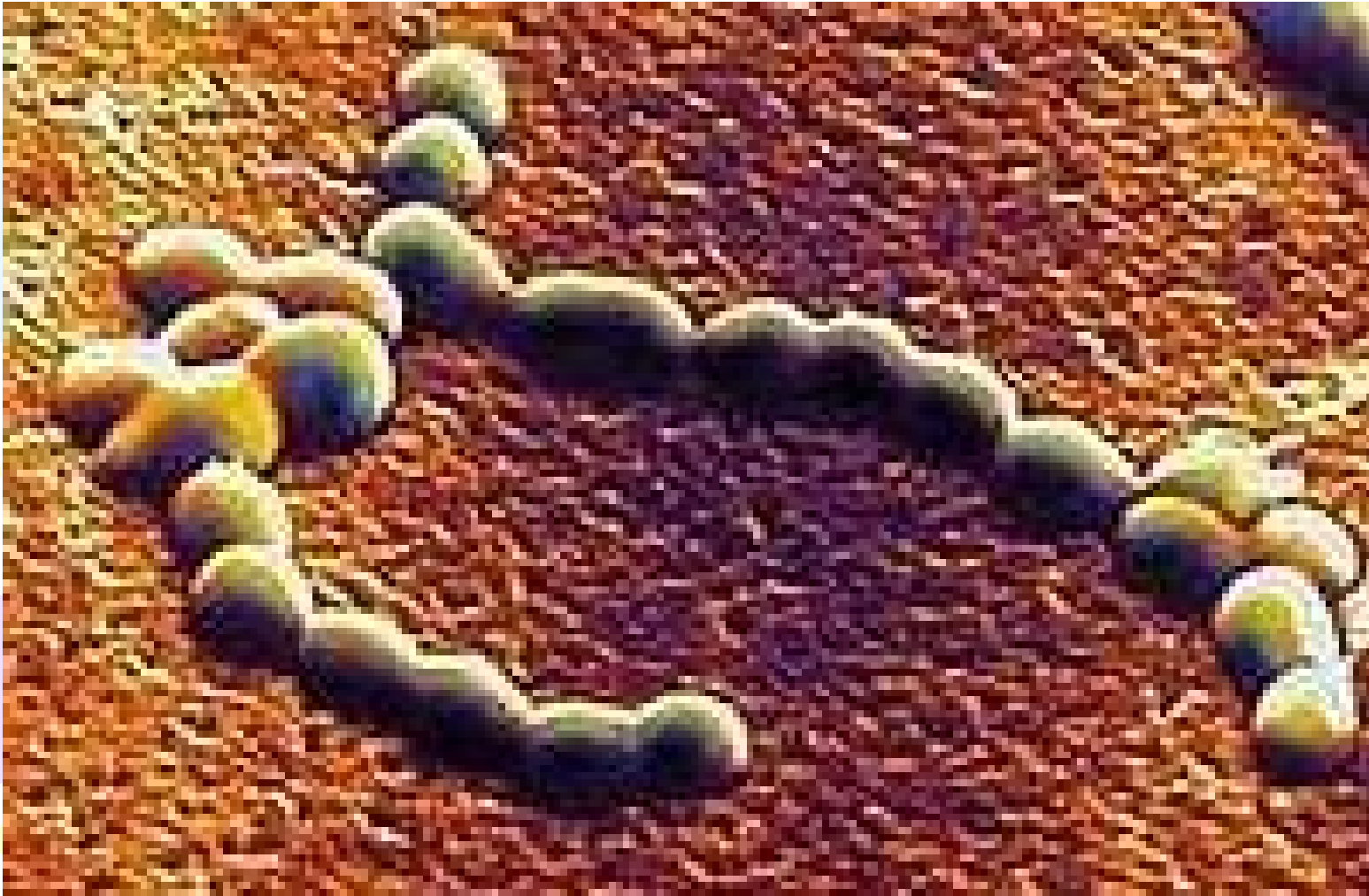
Tvarové možnosti bakterií

<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
© 2008 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**

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.

Mikroskop

Vypínač

Okulár

Objektivy

Mikroskop. stolek

Kondenzorová
clona

Regulátor pozice

Kolektorová clona

Regulátor světla

Mikrošroub a
makrošroub



Zvětšovací optika

- V mikrobiologii používáme zpravidla binokulární mikroskop s vyjímatelnými **okuláry** zvětšujícími $10\times$
- **Objektivy** se používají $4\times$, $10\times$, $20\times$, $40\times$, $60\times$ a **imerzní objektív** zvětšující $100\times$. „Imerzní“ znamená, že mezi preparát a objektív 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

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 univerzity. 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 violeť...
 - ...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

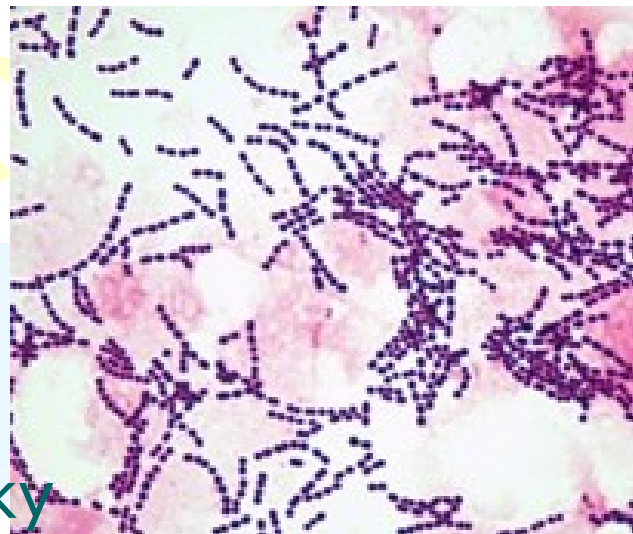
Chemikálie	Grampozitivní	Gramnegativní
Krystal. violeť	Obarví se fialově	Obarví se fialově
Lugolův roztok	Vazba se upevní	Upevní se méně
Alkohol	Neodbarví se	Odbarví se
Safranin	Zůstanou fialové	Obarví se červeně

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

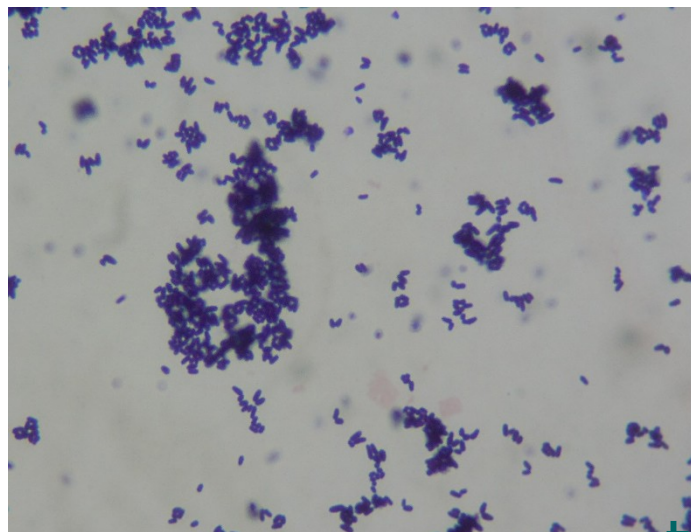
Spirochety by se barvily gramnegativně, ale jsou velmi tenké, takže i je lze také vlastně považovat za „Gramem se nebarvící“ a Gram se v jejich diagnostice nepoužívá.

Čtyři hlavní skupiny bakterií podle Gramova barvení

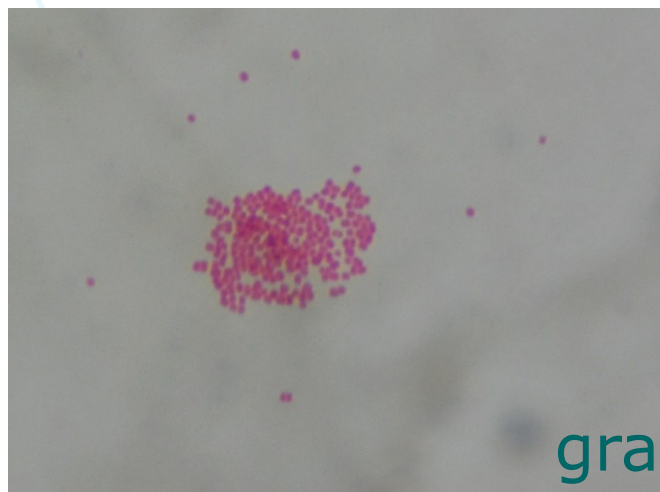
grampozitivní



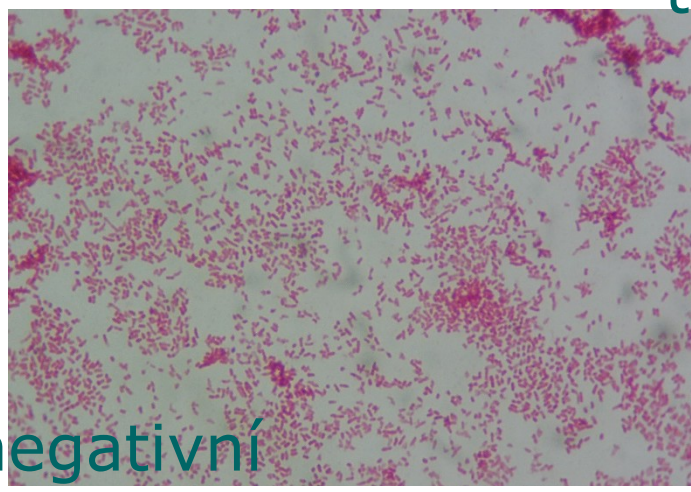
koky

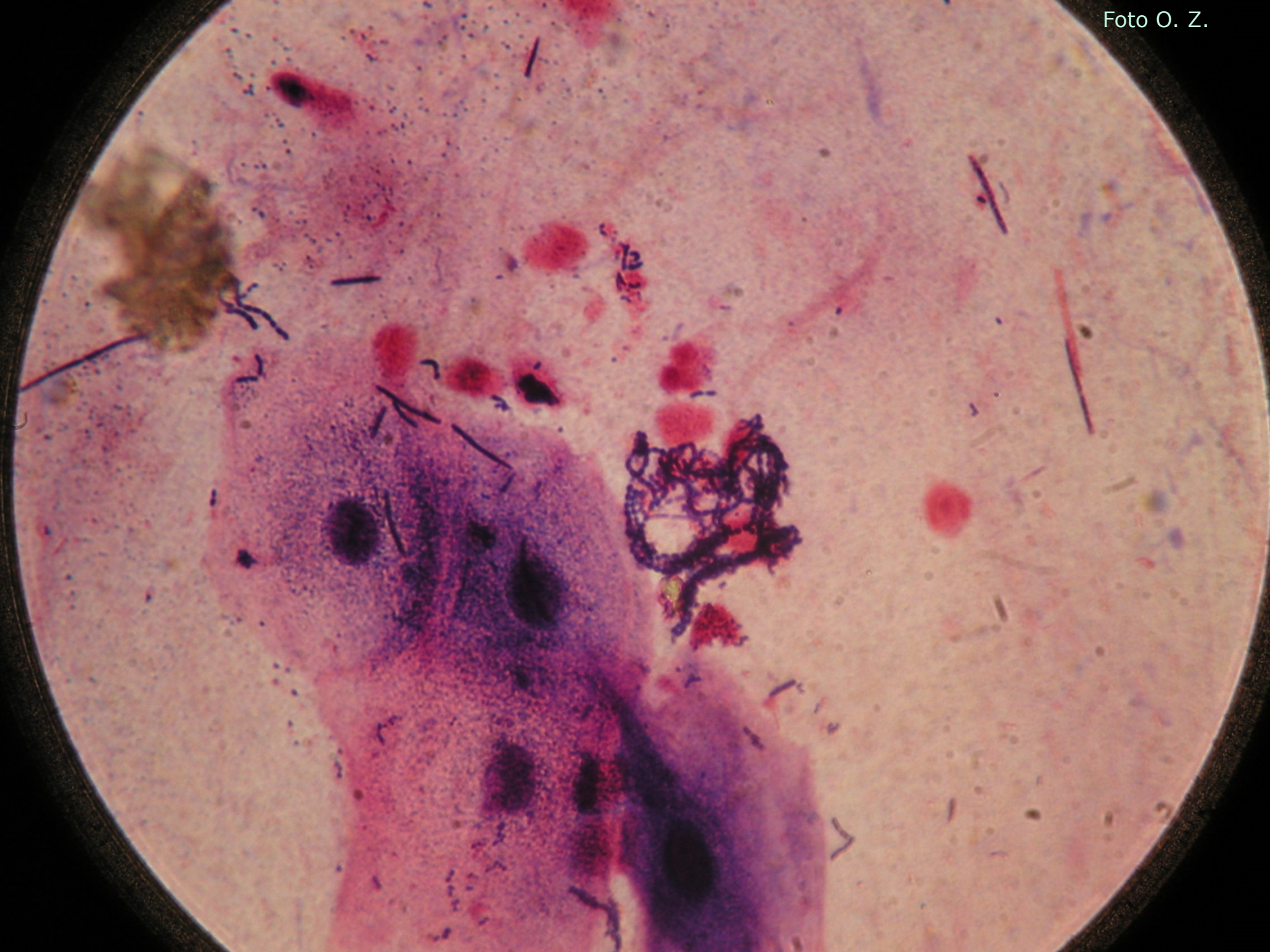


tyčinky



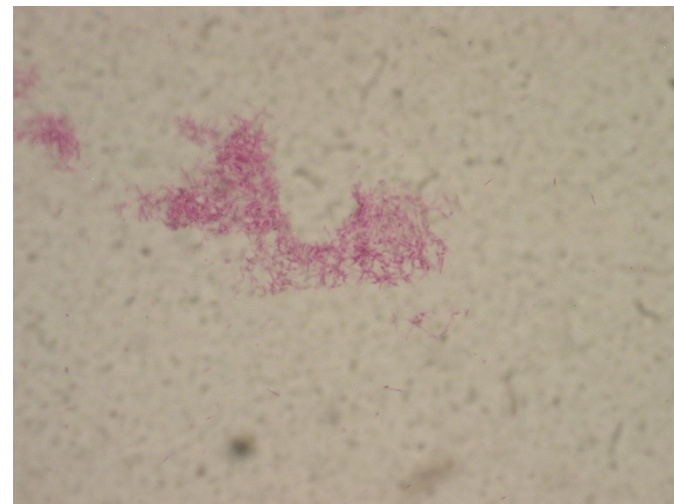
gramnegativní



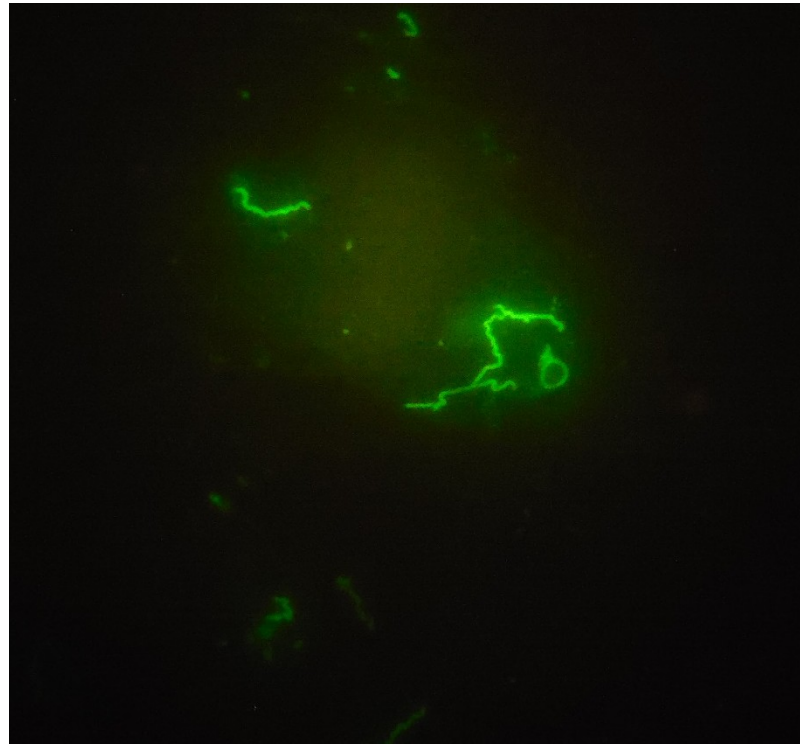


Další barvicí metody

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



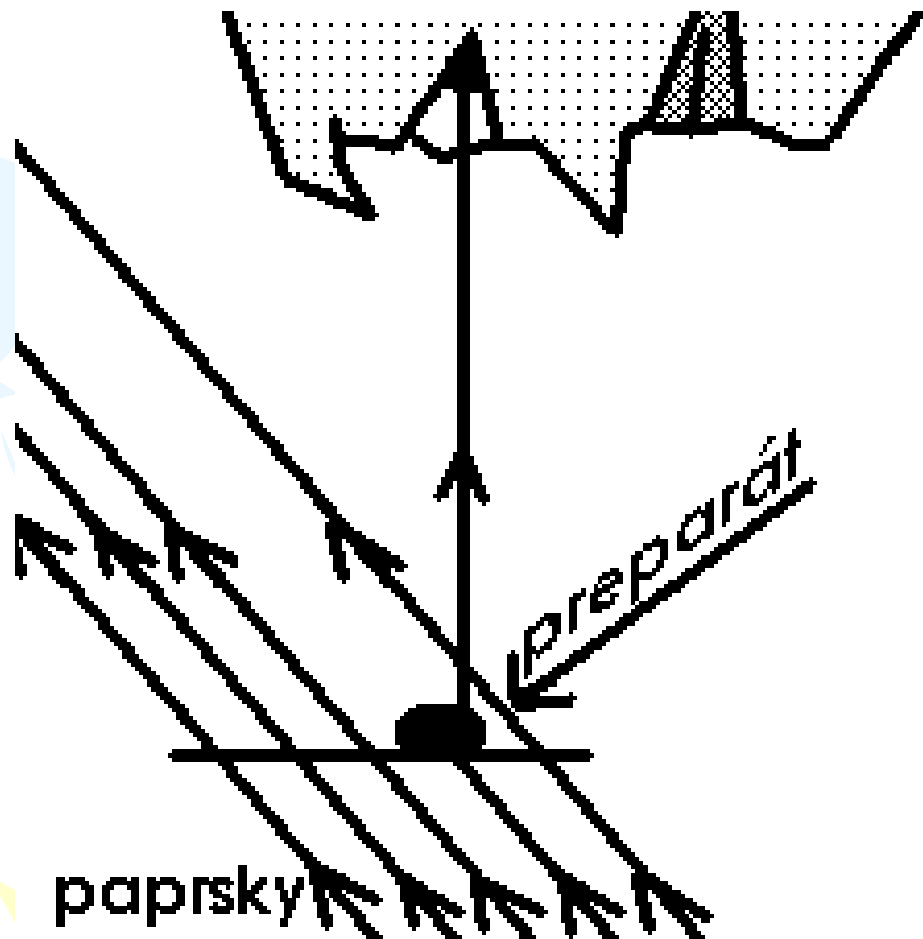
Fluorescenční barvení



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