

## **Mikrobiologie, rozdělení, přehled mikroorganismů, základní vlastnosti bakterií**

### **Mikrobiologie**

- vědní obor, který studuje vlastnosti a život mikroorganismů, mikroskopických hub, virů a subvirových patogenů (priony, viroidy), jejich význam pro rostliny, živočichy a člověka

### **Mikroorganismy**

- jednobuněčné nebo mnohobuněčné organismy viditelné pouze pod mikroskopem (světelný, elektronový) – velikost v  $\mu\text{m}$
- nejsou schopny tvořit funkčně diferencované tkáně nebo pletiva

### **Rozdělení mikrobiologie**

#### **Obecná mikrobiologie**

- obecné zákonitosti životních projevů mikrobů, jejich tvar, velikost, metabolismus, rozmnožování, produkce toxinů, enzymů, taxonomie a genetiku
- k základním oborům patří: bakteriologie, virologie, mykologie, protozootologie, (parazitologie)

#### **Aplikovaná mikrobiologie**

- vlastnosti jednotlivých skupin a činnost mikroorganismů v určité oblasti
- lékařská, veterinární, potravinářská, zemědělská mikrobiologie

### **Výskyt mikroorganismů**

- součást všech ekosystémů na Zemi
- voda (i hlubiny moří, solná jezera, horká zřídla)
- půda
- vzduch
- rostliny
- živočichové
- potraviny
- člověk

### **Význam mikroorganismů**

- koloběh prvků v přírodě
- „samočištění“ vodních toků a biologické čištění odpadních vod
- průmyslové využití činnosti mikroorganismů (kvasný průmysl, mlékárenství a masný průmysl, farmaceutický průmysl, atd.)
- onemocnění člověka, zvířat a rostlin (patogenní mikroorganismy)
- rozklad potravin, potravinových surovin, textilií, papíru, kůže, dřeva, atd. (mikrobiální koroze)

### **Nebuněčné organismy (soustavy)**

#### **Viry**

- nukleoproteinové částice schopné replikace pouze v hostitelské buňce
- postrádají translační systém
- genetická informace ve formě DNA nebo RNA uložená v kapsidě (bílkovinný obal) – DNA viry x RNA viry
- bakteriofágy, cyanofágy, virofágy, fytoviry, mykoviry, zooviry

#### **Replikace virů**

- Adsorpce – navázání viru na buňku
- Penetrace – proniknutí viru do buňky
- Eklipta (vlastní replikace) – uvolnění NK z kapsidy, replikace virové NK, syntéza virových bílkovin

- Maturace – dokončení replikace (autoagrace, u obalených virů obklopení membránou, uvolnění viru z buňky – rozpad buňky)

#### **VIROIDY (satelity)**

- cirkulární RNA nekódující žádný protein bez obalu
- infekční onemocnění vyšších rostlin
- replikace v jádru buňky

#### **PRIONY**

- infekční částice tvořené pouze molekulou bílkoviny
- patogenní priony se od fyziologických liší pouze konformačním uspořádáním
- původci degenerativních změn CNS (scrapie, BSE, Creutzfeld-Jakobova choroba,...)
- extrémně odolné proti fyzikálním a chemickým vlivům

### **Prokaryotní organismy**

- převážně jednobuněčné organismy (příp. jednoduchá seskupení podobných buněk, např. vláknité, myceliové formy)
- kruhový chromozóm
- nemají jadernou membránu
- cytoplasmatická membrána vytváří měchýřkovité, lamelovité nebo trubicovité výstupky do cytoplazmy
- většinou obsahují pevnou buněčnou stěnu (obsahuje peptidoglykan)
- ribosomy jsou rozptýleny v cytoplazmě
- výživa vyžadována v molekulární formě

#### **Rozdělení prokaryot**

**Doména Archaea** – extremofilové

**Doména Bacteria** – gramnegativní bakterie, grampozitivní bakterie, bakterie postrádající buněčnou stěnu (mykoplazmata)

#### **Velikost, tvar a uspořádání bakteriálních buněk**

- velikost od desetin po desítky  $\mu\text{m}$
- mykoplazmata (cca 0,2  $\mu\text{m}$ ), rickettsie (cca 0,5  $\mu\text{m}$ ), spirochety (až 60  $\mu\text{m}$ )
- většina bakterií patogenních pro člověka 1 – 3  $\mu\text{m}$

### **Chemické složení bakteriální buňky**

Voda – 70 – 98 % (opouzdřené a slizotvorné bakterie mají vyšší obsah vody)

Sušina – cca 20 %

- bílkoviny – 50 – 80 % sušiny
  - globuliny, albuminy, nukleoproteiny, polypeptidy, aminokyseliny, purinové a pyrimidinové látky
  - určují základní fyzikálně-chemické vlastnosti mikrobů, jako je např. izoelektrický bod, chování k barvivům, dále biologickou aktivitu, tj. virulenci a udávají i antigenní strukturu
- polysacharidy - 5 – 20 % sušiny
  - glykogen u sporulujících bakterií, granulóza u anaerobních klostridií, celulóza ve slizu vylučovaném rodem *Acetobacter*
- lipidy - 5 – 15 % sušiny

### **Struktura bakteriální buňky**

#### **Buněčná stěna**

- peptidoglykan (murein) - tvořen vrstvami polysacharidových řetězců, v němž se střídá N-acetylglukosamin a N-acetylmuramová kyselina
- charakter síta, mohou přes ni pronikat molekuly

Funkce buněčné stěny:

- dává buňce tvar
- mechanická ochrana
- chrání před chemickým poškozením, zářením, vyschnutím
- schopnost odolávat vysokému nitrobuněčnému osmotickému tlaku

Stavba buněčné stěny gram pozitivních a gram negativních bakterií

### **Bičíky**

- tenká vlákna složená z proteinu flagelinu – molekuly uspořádány do šroubovice, uvnitř je vlákno duté
- obsahuje tři části: vlákno, háček (kolénko) a bazální část (osa a kruhové destičky).
- označení bakterií dle umístění a počtu bičíků
- vizualizace: barvení stříbřením / elektronový mikroskop

### **Pili (fimbrie)**

- tenké štětinovité výběžky na povrchu většinou gram negativních bakterií viditelné jen elektronovým mikroskopem (usnadňují adhezi na površích)

### **Sex pili**

- jen u gram negativních bakterií, širší a delší než fimbrie,
- tvorba je kódována plazmidem (F+ faktor)
- slouží k přenosu DNA do recipientní buňky konjugací

### **Curli**

- štíhlá vlákna na povrchu některých střevních bakterií (*E. coli*, salmonely)
- vážou bílkoviny nezbytné pro srážení krve, mohly by proto odpovídat za příznaky sepse (salmonely)

### **Extracelulární polymery**

- některé bakterie vytváří okolo buněk slizovitý obal z polysacharidových vláken - glykolalix
- je-li tato vrstva kondenzovaná a ostře ohraničená, pevně přisedá k buněčné stěně označuje se jako pouzdro (kapsule) - např. *E. coli*, klebsiely)
- může být i ve formě volné amorfni slizovité hmoty (např. *Leuconostoc mesenteroides* – rosolovatění slazených nápojů, *B. cereus* – nitkovitost pečiva)
- lepší adherence bakterií k sobě navzájem i na různé povrchy - podíl při tvorbě biofilmů, zubního plaku

### **Cytoplazmatická membrána**

- tenká membrána (7 nm) složená z fosfolipidů a proteinů. V některých místech vybíhají do cytoplasmy vychlípeniny - mesozomy. Ty se vyskytují hlavně v místě, kde při dělení vzniká přepážka.

Funkce cytoplazmatické membrány:

- semipermeabilita (volná difuze malých molekul / transport velkých molekul pomocí permeáz)
- osmotická bariéra (rovnováha osmotického tlaku)
- transformace energie
- lokalizace enzymových systémů
  - dýchací enzymy
  - systém oxidační fosforylace
  - enzymy syntézy a hydrolýzy fosfolipidů
  - enzymy syntézy složek buněčné stěny a pouzdrových obalů
- separace molekul DNA (připojení DNA na mesozomy)
- ukotvení bičíku

- lokalizace bakteriochlorofylu, barviv

### **Cytoplasma**

- koloidní roztok globulárních bílkovin (enzymy, DNA, RNA, AMK, nukleotidy, rezervní látky, atd.)

### **Obsahuje**

- Nukleoid - nejedná se o pravé jádro (cirkulární DNA bez jaderné membrány)
- Ribosomy – jiná stavba a velikost než u eukaryot, uskutečňuje se zde syntéza bílkovin
- Inkluze, granula, vakuoly - zásobárna živin a energie (glykogen, poly- $\beta$ -hydroxymáselná kyselina)
- Endospory
- Plasmidy – malé cirkulární molekuly DNA nezávislé na chromozomu

### **Nukleoid**

- jaderný materiál bakterií tvoří dsDNA
- kovalentně do kruhu uzavřená molekula DNA
- je uzavřená do superhelicity – nadšroubovicové vinutí
- většinou je napojena na vnitřní stěnu cytoplazmatické membrány (mesozom)
- molekula DNA se skládá ze dvou polynukleotidových vláken složených ze čtyř typů nukleotidových podjednotek
  - purinové báze (adenin, guanin)
  - pyrimidinové báze (thymín, cytosin)
- obě vlákna jsou propojena vodíkovými můstky mezi bázemi nukleotidů

### **Plasmidy**

- dvouřetězcové kruhové molekuly DNA nezávislé na chromozomu
- mohou kódovat některé významné funkce bakteriální buňky, např. rezistenci na antibiotika a těžké kovy, produkci toxinů, produkci bakteriocinů
- konjugativní plasmidy (tzv. konjugativní faktory) se uplatňují při spájení = konjugaci buněk
- přenos plasmidů se děje konjugací, transdukci či transformací

### **Struktury dovolující přežití za nepříznivých podmínek**

- Endospory – vznikají zevnitř bakteriální buňky, při hladovění na zdroje uhlíku a dusíku
- Cysty – (např. u rodů *Azotobacter*, *Myxococcus*, *Sporocytophaga*), kdy je celá buňka obklopena protektivní vrstvou, vznikají ukládáním vrstev nad buněčnou stěnu, jsou odolné proti dehydrataci, ne však proti vysokým teplotám, jsou často přítomny u procesů fixace dusíku a při ochraně buňky
- Exospory (např. u *Streptomyces*)- termostabilní
- Konidie – termosenzitivní asexuální reprodukční struktury produkované různými rody aktinomycet

### **Bakteriální spory (endospory)**

- pod mikroskopem vysoce světlolomná tělíska
- vytváří se za nepříznivých podmínek u některých rodů např. *Clostridium* a *Bacillus*
- vysoce odolné k vysychání, vysoké teplotě, pH, UV, desinfekci, atd.
- přežívají i stovky let
- zničení sterilizací autoklávem
- nízký obsah vody, obsahují dipikolinát vápenatý

sporulace – tvorba spor

germinace – klíčení spor

## Taxonomie prokaryot

### Hlavní funkce:

- identifikovat a popisovat základní taxonomické jednotky - druhy
- navrhnout vhodný způsob zařazování a katalogizace těchto jednotek
- zabývá se klasifikací, nomenklaturou a identifikací mikroorganismů

### Klasifikace

- uspořádání organismů na základě vzájemných vztahů a podobností do skupin – taxonů
- vyžaduje znalost význačných morfologických, biochemických, fyziologických, chemických, molekulárně-biologických a genetických charakteristik prokaryot
- Neexistuje žádná oficiální klasifikace bakterií ani archeí
- jeden z klasifikačních systémů představuje Bergey's Manual of Systematic Bacteriology

Znaky sloužící ke klasifikaci bakterií:

- morfologické – např. tvar a velikost buněk, přítomnost bičíků, barvitelnost, vzhled kolonií
- fyziologické – např. schopnost využívat různé zdroje živin a energie, vztah ke kyslíku, stavba buněčné stěny
- sérologické a chemické - např. antigenní struktura, chemické složení buněčné stěny či buněčných struktur
- molekulární - např. obsah G+C, primární struktura DNA)
- genetické - schopnost výměny genů transformací, transdukci nebo konjugací

### Nomenklatura

- pojmenovávání jednotlivých taxonů, označení jednotek definovaných pomocí klasifikace
- každý taxon má platné vědecké jméno (pocházejí z latiny či řečtiny)
- principem je binomické názvosloví (rod +druh)

Druh se označuje dvěma slovy

- podstatným jménem rodu (lat. *genus*)
- přídatným jménem druhu (lat. *species*)

Příklady: *Listeria monocytogenes*

*Staphylococcus aureus*

Platná (validní) vědecká jména bakterií – po jejich uvedení v International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM)

- triviální názvy lze skloňovat a nepiší se kurzívou (např. stafylokoky, salmonely, laktobacily)

### Identifikace

- určování do kterého a jak pojmenovaného taxonu izolovaná bakterie náleží
- při identifikaci bakterií se využívají klasifikační charakteristiky
- klasifikační a identifikační schémata však nejsou totožná

Identifikační schéma:

- zvolené znaky musí být snadno stanovitelné
- obsahují pouze výběr nejvhodnějších rozlišujících charakteristik
- dnes využití mikrotestů, automatizovaných systémů, imunodiagnostických metod
- základní podmínkou je práce s čistou kulturou

### Základní taxonomická jednotka - bakteriální druh

- jasně vymezená skupina navzájem příbuzných kmenů, zahrnujících typový kmen
- sdílející 70% a vyšší DNA-DNA homologii komplementárních párů bází
- vykazující, až na výjimky, shodné fenotypové znaky
- a současně mající některé odlišné znaky od jiných skupin

## **Bakteriální kmen**

– populace pocházející z jediné mikrobiální buňky

## **Typový kmen**

– čistá kultura daného druhu deponovaná ve veřejných sbírkách kultur mikroorganismů (referenční kultura)

## **Taxonomická hierarchie**

1. Doména (Domain)
2. Kmen (Phylum)
3. Třída (Class)
4. Řád (Order)
5. Čeleď (Family)
6. Rod (Genus)
7. Druh (Species)
8. Poddruh (Subspecies)

### **Rozdělení mikroorganismů dle zdroje energie a uhlíku**

Fototrofní mikroorganismy: získávají energii ze slunečního záření a přeměňují ji na makroergické vazby – ATP

- fotolitotrofní – jako zdroj uhlíku využívají CO<sub>2</sub>
- fotoorganotrofní – zdrojem uhlíku jsou jednoduché organické látky

Chemotrofní mikroorganismy: získávají energii z organických a anorganických látek

- chemolitotrofní – zdrojem uhlíku je CO<sub>2</sub>
- chemoorganotrofní – využívají jako zdroj uhlíku organické sloučeniny

### **Rozdělení mikroorganismů podle vztahu ke kyslíku**

- Aerobní mikroorganismy - energii získávají výhradně aerobní respirací
- Anaerobní mikroorganismy – rostou v bezkyslíkatém prostředí, již nízké koncentrace O<sub>2</sub> jsou pro ně toxické
- Fakultativně anaerobní mikroorganismy – mohou růst v přítomnosti i nepřítomnosti kyslíku, patří zde i bakterie aerotolerantní (mléčné bakterie), které mohou růst v přítomnosti kyslíku, ale nejsou schopny jej využívat
- Mikroaerofilní mikroorganismy - jsou schopny žít v prostředí s nízkou koncentrací kyslíku, případně bez kyslíku

### **Rozdělení mikroorganismů podle vztahu k teplotě**

- Psychrofilní - optimální růst při teplotách < 16 °C, rostou poměrně dobře i při teplotách < 0 °C
- Psychrotrofní - optimální růst při teplotách > 20 °C, ale mohou růst i při teplotách 0 °C až 5 °C
- Mezofilní - minimální teplota pro jejich detekovatelný růst a dělení neklesá pod 5 °C a optimální teplota je < 45 °C, představují většinu mikroorganismů, bakterie z této skupiny mikroorganismů vyžadují pro optimální růst nejčastěji teplotu kolem 37 °C, kvasinky a plísňe kolem 30 °C
- Termofilní - optimální teplota růstu > 45 °C, nejčastěji je popsán optimální růst a dělení termofilů při 50 °C až 60 °C
- Termotolerantní – optimum při 37 °C, ale tolerují i teploty > 45 °C

## **Kultivace mikroorganismů**

Při kultivaci *in vitro* je nutno zajistit:

- dostatek vody, živin a zdrojů energie,
- optimální teplotu růstu,
- vhodné složení atmosféry,
- dále vhodné pH, osmotický tlak, redox potenciál, ochranu před zářením, atd.

## **Základní pojmy**

- Kultivace – pěstování mikroorganismů na speciálních půdách (agarech, médiích) k tomu určených
- Inkubace – proces, při němž se množí mikroorganismus
- Inokulace (očkování) – aseptické přenesení inokula (živých buněk žádaného druhu) na/do sterilní živné půdy
- Izolace mikroorganismu – získání čisté kultury určitého mikroorganismu z mikrobiální směsi

## **Kultivační média**

- složení přizpůsobeno nárokům na výživu mikroorganismů, pH, osmotický tlak, redox potenciál atd.

## **Dělení dle konzistence**

- půdy tekuté (bujóny)
- půdy pevné (agary) – příprava ztužením bujonového základu přidáním 1 - 2 % agaru (směs polysacharidů extrahovaných z rudých mořských řas)
- půdy polotuhé (semisolidní) – s přidavkem agaru do 0,5 %, např. stanovení pohyblivosti, serologické určení bičíkových antigenů

## **Dělení kultivačních půd podle složení**

Základní

- neobohacený jednoduchý živný základ (např. peptonová voda, živný agar)

Obohacené

- základ z kvalitnějších extraktů (např. mozkosrdcová infuze) obohacený bílkovinnými koncentráty, peptony, škrobem, krví apod. (např. agar s glukózou, tryptonem a kvasničním extraktem, krevní agar)

Selektivní

- určeny pro kultivaci vybraných skupin mikroorganismů, k základu živné půdy se přidávají inhibitory růstu nežádoucích mikroorganismů (např. půda s 10 % NaCl pro stafylokoky)

Diagnostické

- obsahují substrát a indikátor biochemické aktivity, např. změny pH (např. Triple Sugar Iron agar)

Selektivně diagnostické

- např. Endův agar, Baird-Parker agar

Chromogenní

- obsahují chromogen - běžný substrát (např. cukr) s navázanou barevnou molekulou – chromoforem, bakterie, chromogen absorbuje, rozštěpí, využije substrát, nerozpustný chromofor se hromadí v buňce – zbarvení kolonií

## **Dělení kultivačních půd podle účelu použití**

### Transportní

- k zachování životaschopnosti mikroorganismů během přepravy
- tekuté nebo polotuhé, místo živin obsahují látky omezující množení bakterií a látky absorbující toxické produkty jejich metabolismu (např. aktivní uhlí)

### Konzervační

- k zachování životaschopnosti mikroorganismů po delší dobu, většinou nutričně chudé půdy bez přítomnosti sacharidů

### Pomnožovací (resuscitační)

- umožňují mikroorganismům oslabeným technologickými procesy při výrobě potravin reparaci, obvykle tekuté půdy
- neselektivní (např. pufovaná peptonová voda) nebo selektivní (např. bujón podle Frasera)

### Izolační

- tuhé, polotuhé půdy podporující růst mikroorganismů
- neselektivní, selektivní, chromogenní

## **Příprava kultivačních médií**

- navážka dehydratovaného média
- rozpuštění v destilované vodě
- bobtnání u pevných půd (15 min. při laboratorní teplotě)
- rozvaření a úprava pH
- sterilizace (obvykle autoklárování 121 °C/15 min.) – ne všechna média!
- přidavek suplementů např. žloutková emulze, krev, antibiotika
- rozplnění do Petriho misek

## **Rozdělení kultivačních metod**

Kvantitativní metody – cílem je stanovení co nejpřesnějšího počtu dané skupiny či konkrétního mikroorganismu, výsledek se uvádí v KTJ (kolonie tvořící jednotky) na g/ml/cm<sup>2</sup>

- Metoda zalití
- Metoda roztěru
- Metoda MPN (most probable number)

Kvalitativní metody – cílem je průkaz přítomnosti/nepřítomnosti daného mikroorganismu

- Jednostupňová kultivace
- Dvoustupňová kultivace
- Rozočkování

## **Provoz mikrobiologické laboratoře**

Vyžaduje oddělené zóny za účelem zamezení křížové kontaminace pro:

- příjem, úchovu, úpravu a zpracování vzorků,
- přípravu a sterilizaci kultivačních půd a pomůcek,
- vlastní analýzu, tj. např. vážení, ředění, inokulaci, inkubaci, subkultivaci, úchovu mikrobiálních kmenů,
- molekulárně biologické analýzy,
- dekontaminaci, čištění pomůcek a ošetření odpadů vzniklých při mikrobiologickém zkoušení
- další zóny (např. vstupy, chodby, výtah pro materiál, administrativa, šatny, toalety, sklady...)