

Úvod ke cvičením

Mikrobiologie

Jaro 2009

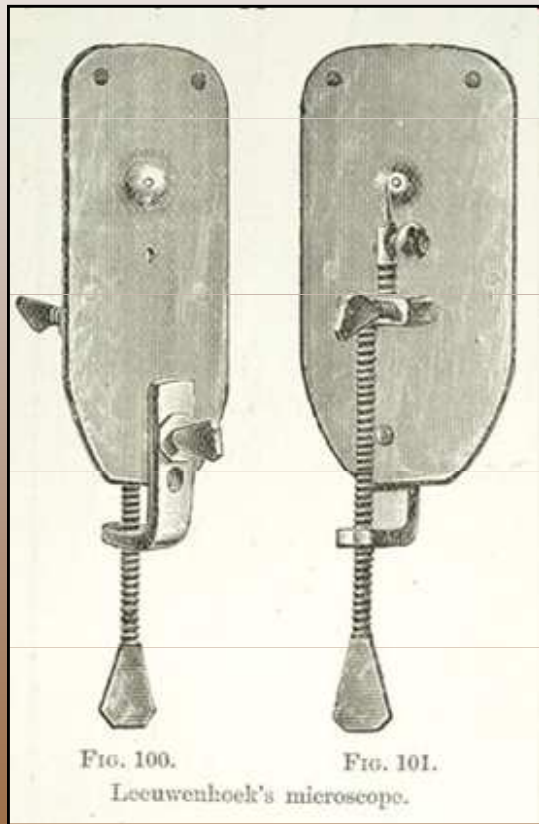


"The role of the infinitely small in nature is infinitely large"
Louis Pasteur

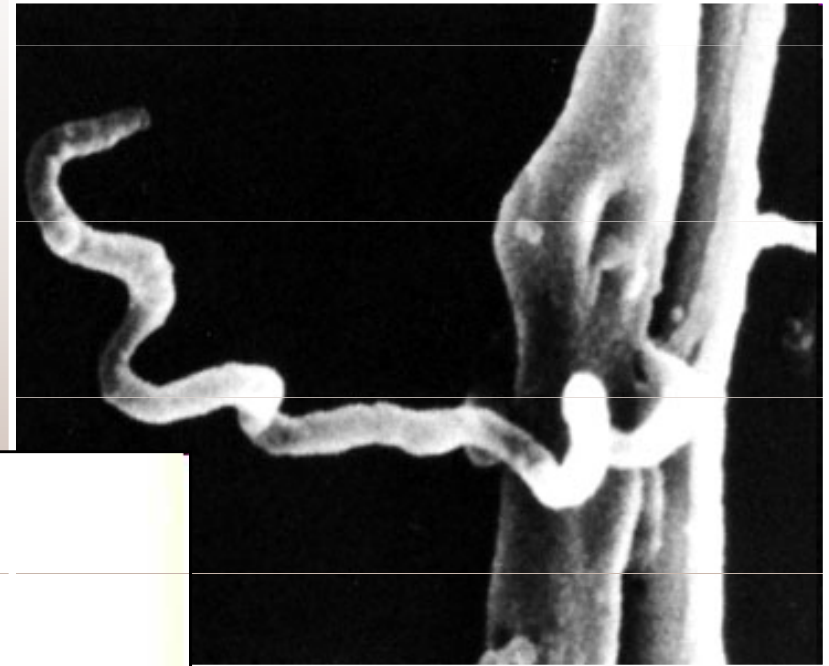
Cytologie a morfologie bakterií



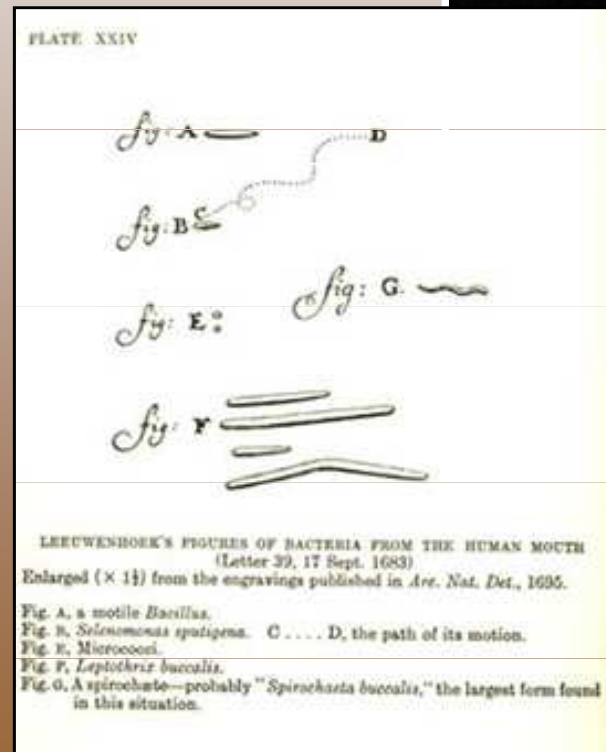
Janssenovi Z 9 x



Anthony van Leeuwenhoek
Z 50 - 275 x



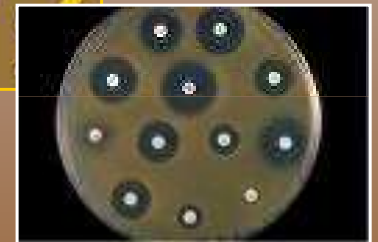
SEM *Treponema pallidum*
útočící na membránu
savčí buňky

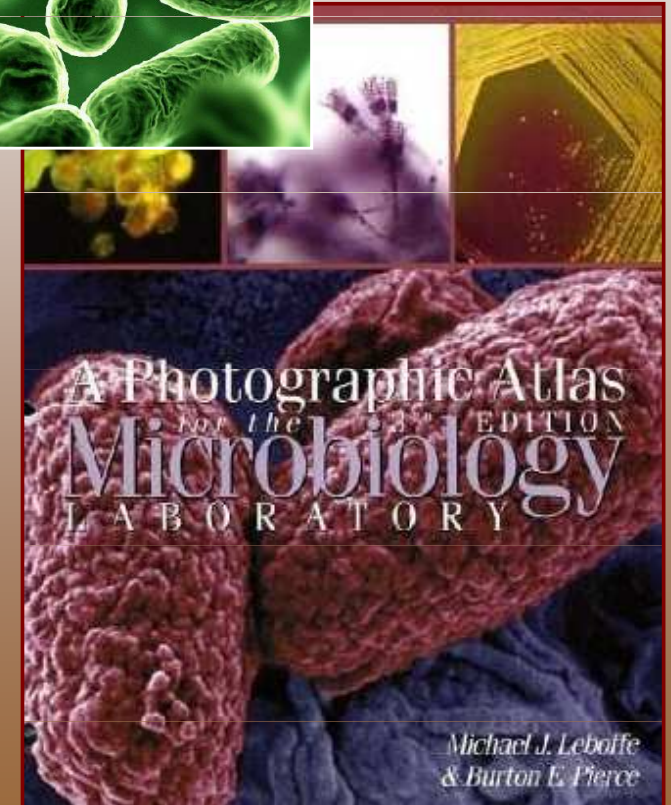
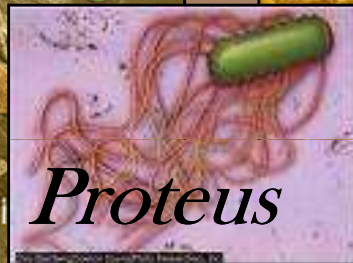
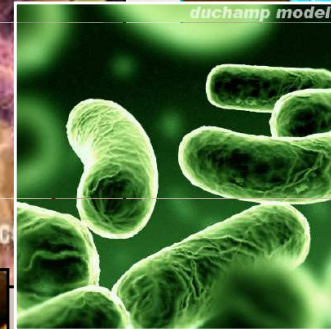
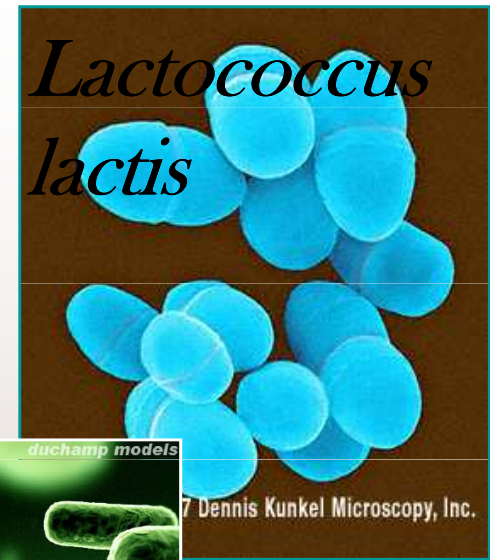
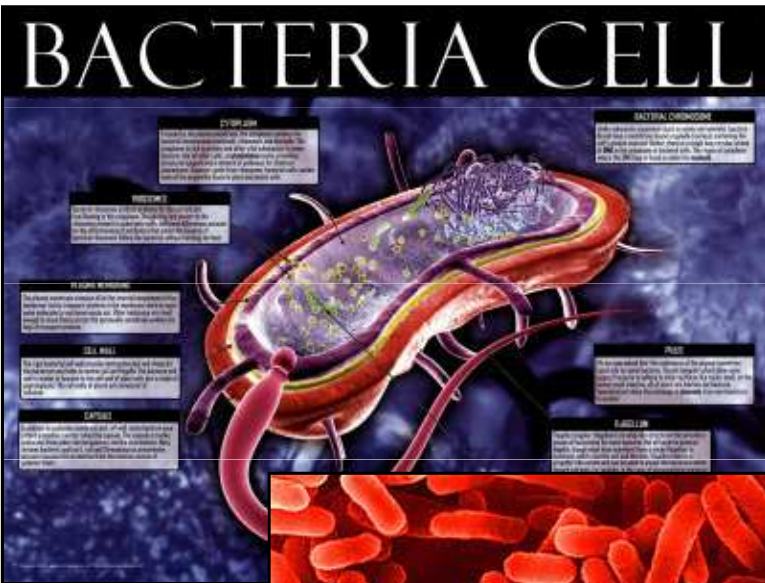


Anthony van Leeuwenhoek
První nákresy bakterií
(z ústní dutiny člověka)

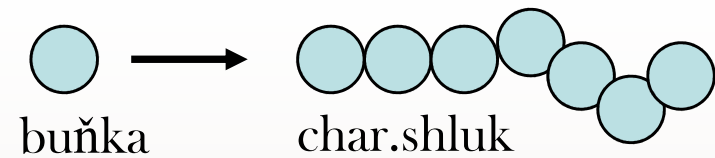
Sylabus cvičení

- Příprava a sterilizace živných medií
- Očkování a uchovávání mikroorganismů
- Makroskopické a mikroskopické pozorování
- Počítání životaschopných bakterií - sporulace
- Izolace půdních mikroorganismů
- Mikrobiologický rozbor vody
- Barvení a pozorování pouzder a spor
- Kvasinky
- Bakterie a jejich citlivost na antibiotika
- Základní biochemické testy

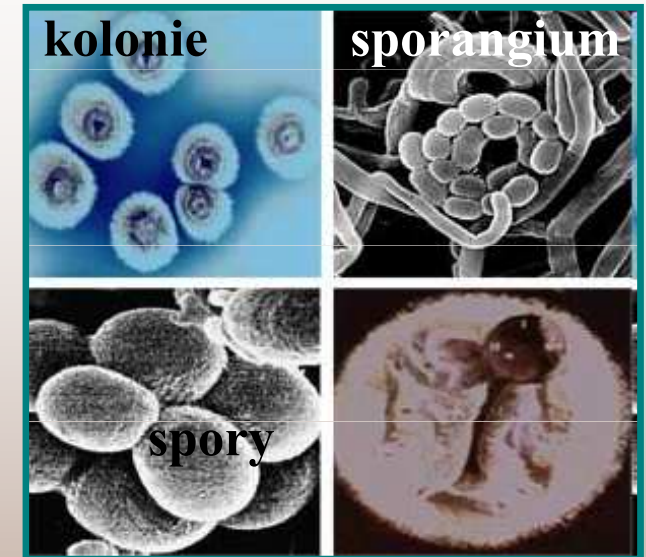




Morfologie



- Buňky
- Charakteristických shluků buněk
- Extracelulárních útvarů (spory, konidie, sporangia, pouzdra..)
- Bakteriální kolonie



Většinou druhově charakteristické
= identifikační znak

Pozor na: fázi růstového cyklu!

endospory vyklenující buňku

stáří kultury

pleomorfní buňky

*Clostridium
botulinum*



Morfologie pleomorfních buněk.

Další potíž:

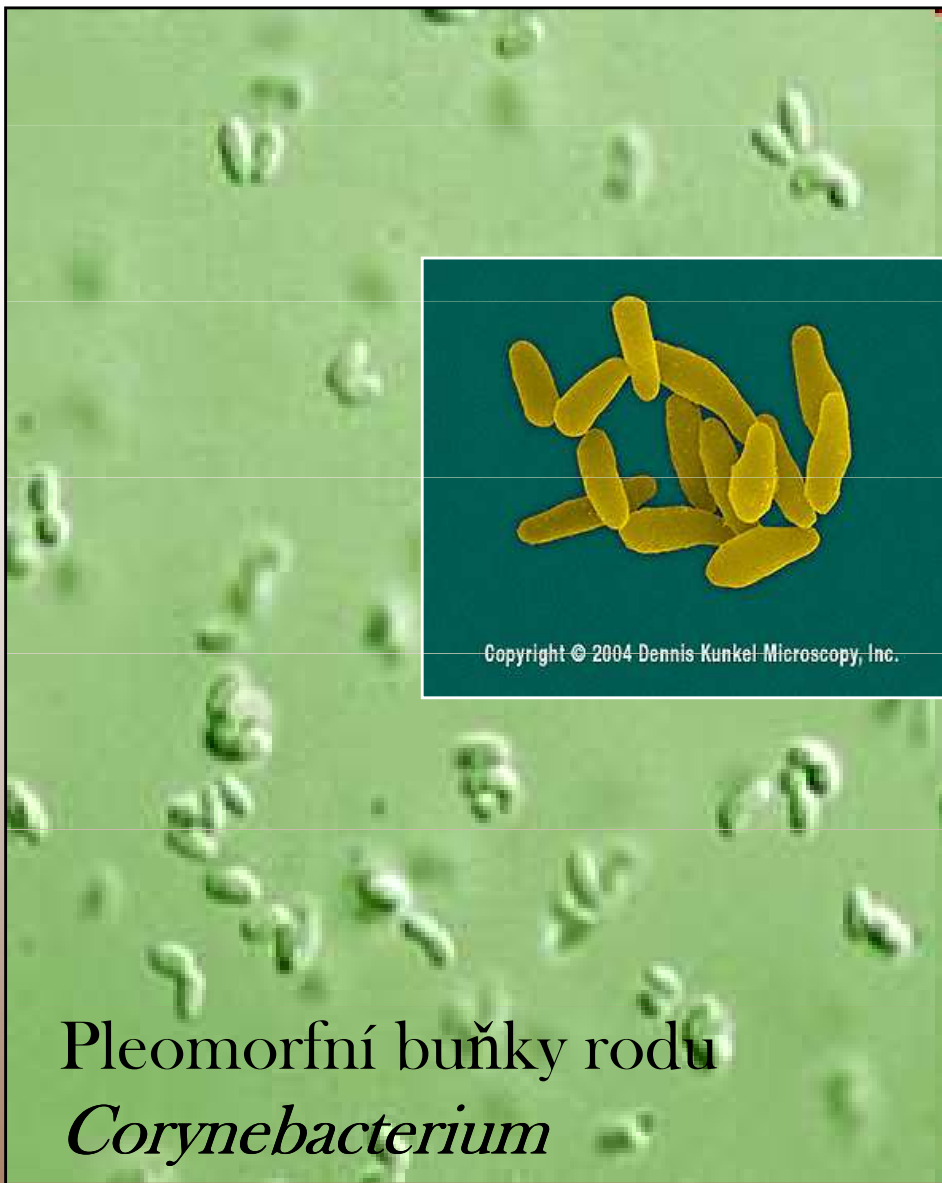
Jsou barvitelné Gramem?

Haemophilus - ano

Bez b.s.

Mykobakteria, mykoplazmata - nikoli

Mykologové kys



Pleomorfní buňky

M. tuberculosis



Mycobacterium avium-intracellulare

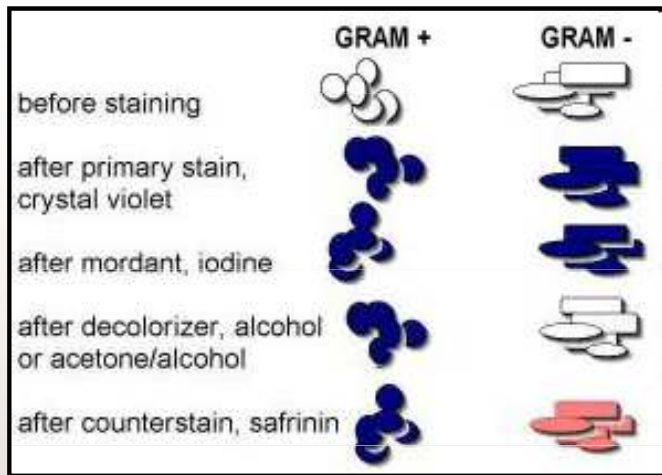
Acidorezistentní barvení buněk histologického řezu lymfatické uzliny

Pleomorfní buňky rodu
Corynebacterium

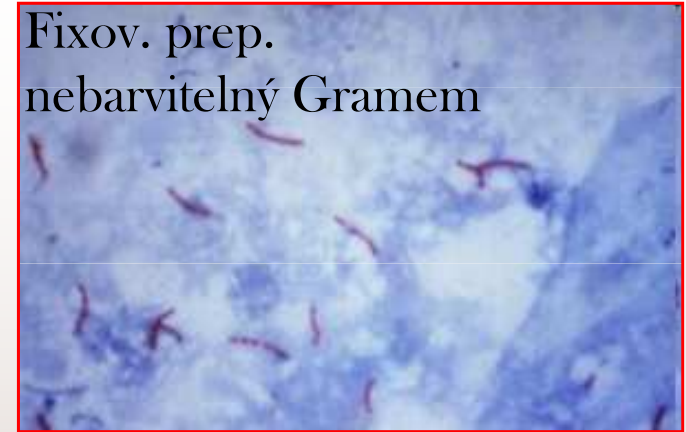
Acidorezistentní buňky:

Odmítají Gramovo barvení

Odmítají se po nabarvení odbarvit ethanolem i kyselinou. Př: *Corynebacterium*, *Nocardia*...



Je neznámý vzorek vůbec barvitelný Gramem? Není gramlabilní?



Fixov. prep. nebarvitelný Gramem

Mycobacterium tuberculosis
Zeihl-Neelsonovo barvení (červeně)

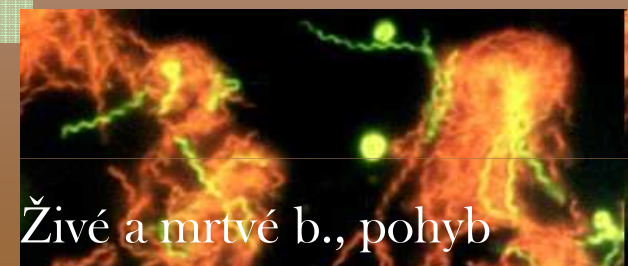


S barevným filtrem

Cíl mikroskopie?
Typ preparátu
Typ mikroskopie (typ b. stěny, průkaz struktur, růstového cyklu)



Fixov. prep. - tvar a typ b.



Živé a mrtvé b., pohyb

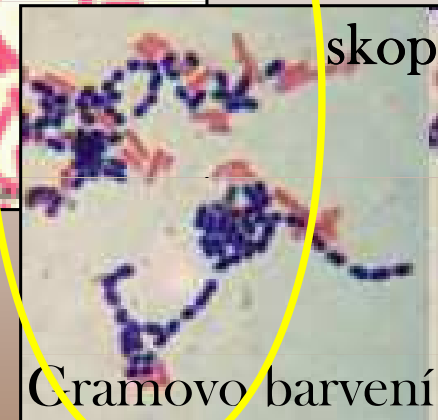
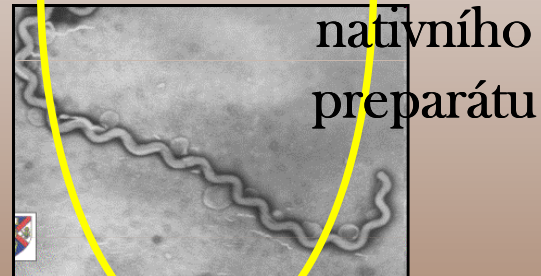
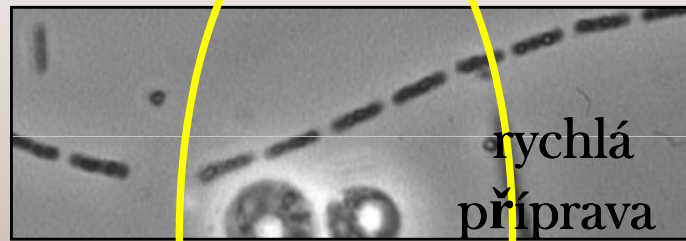
Živý (nativní) preparát bez fixace - vidíme nedeformovaný tvar buňky, spory, morfologii seskupení buněk, pohyb buněk

Morfologie buňky

- **PREPARÁT**

- co chceme vidět? - podle toho preparát a typ mikroskopie

tvar buňky - fázový kontrast, barvený fixovaný prep.
a struktur



Světelná
Fázový kontrast
Fluorescenční
Elektronová...

světelná
mikro-
skopie

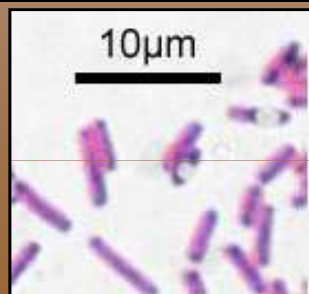
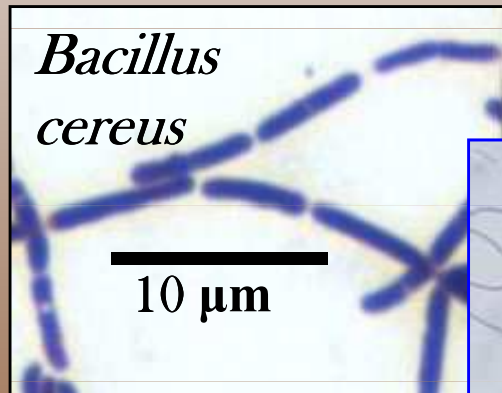
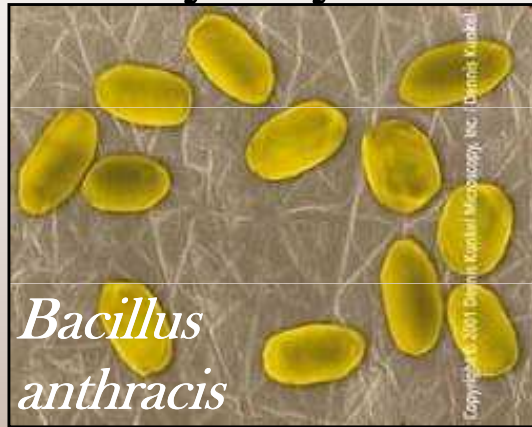
pohyb buňky - fázový kontrast, fluorescence

barvené struktury - pomáhají identifikaci (PHB, síra

typ buněčné stěny - Gramovo a acidorezistentní b.

U jednoho bakteriálního rodu různý vzhled char. tvaru buňky!

- Př: tyčky bacilů

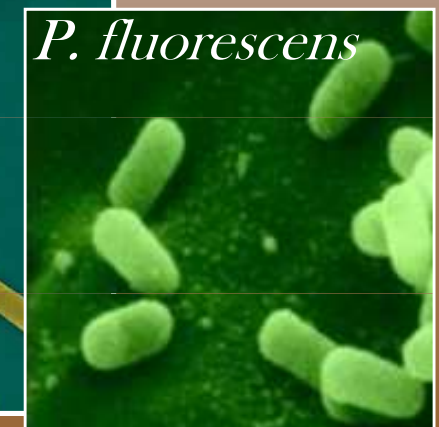
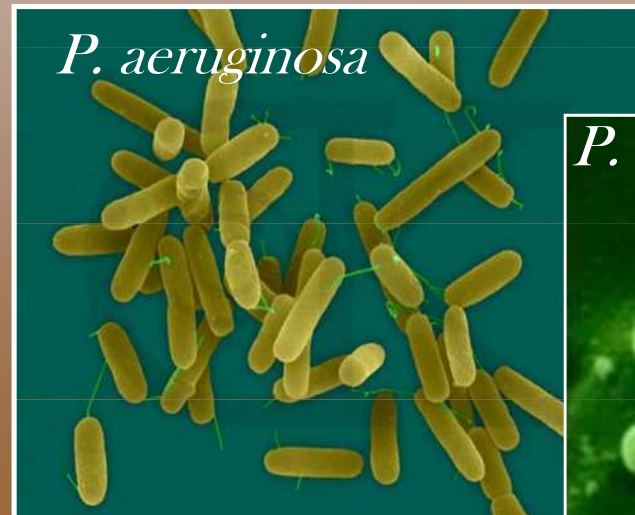


Bacillus subtilis

- *Haemophilus*



- *Pseudomonas*



Posuzujeme-li vzhled buňky
určitého bakteriálního druhu, je třeba si
uvědomit:

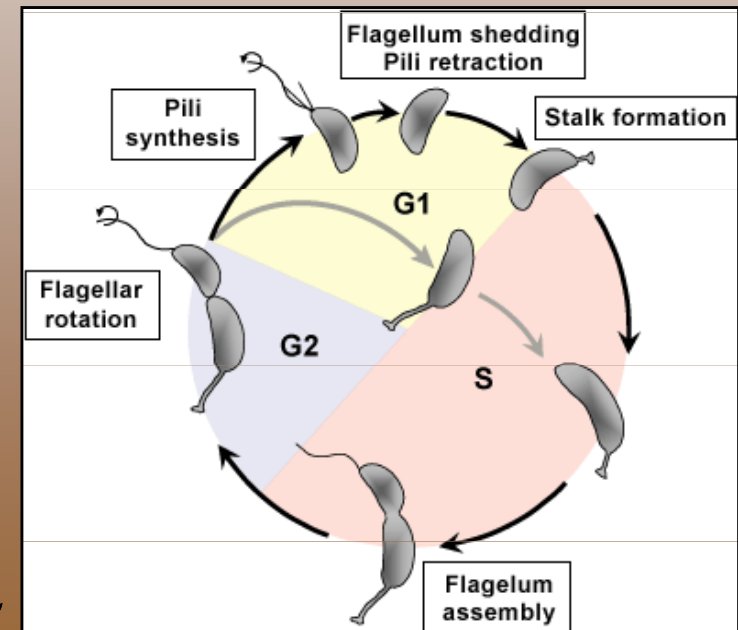
1) Prochází tento druh růstovými cykly?

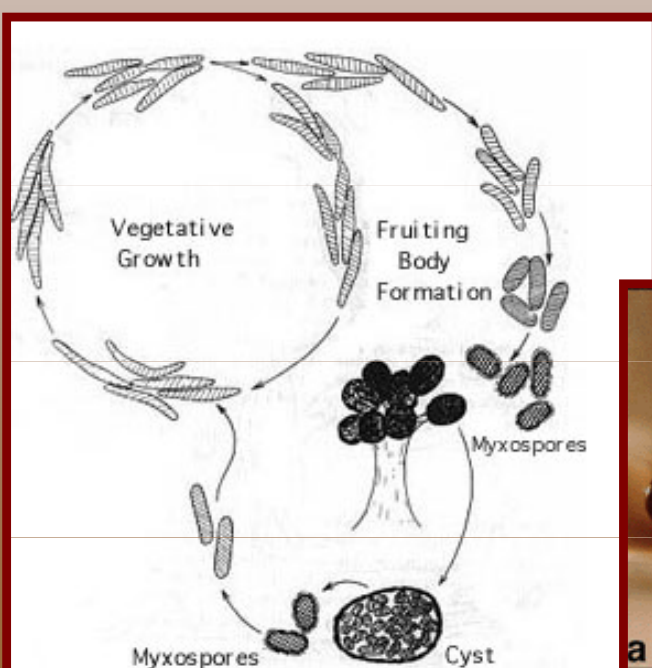
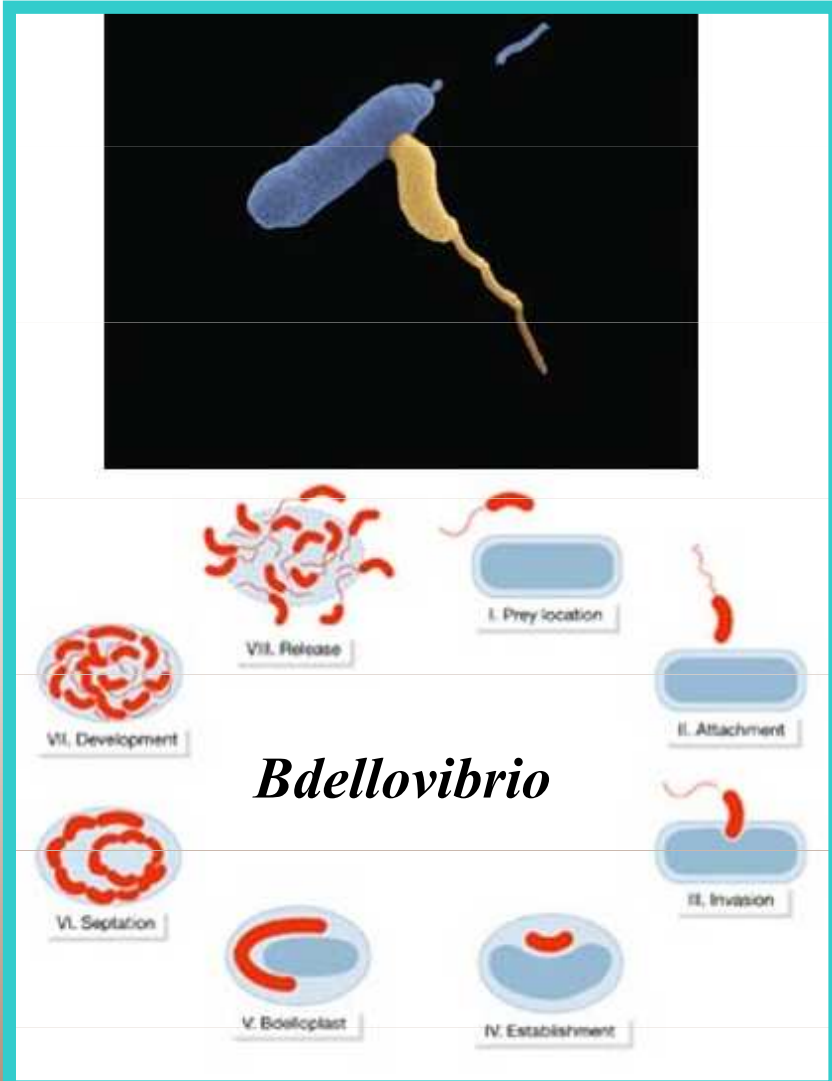
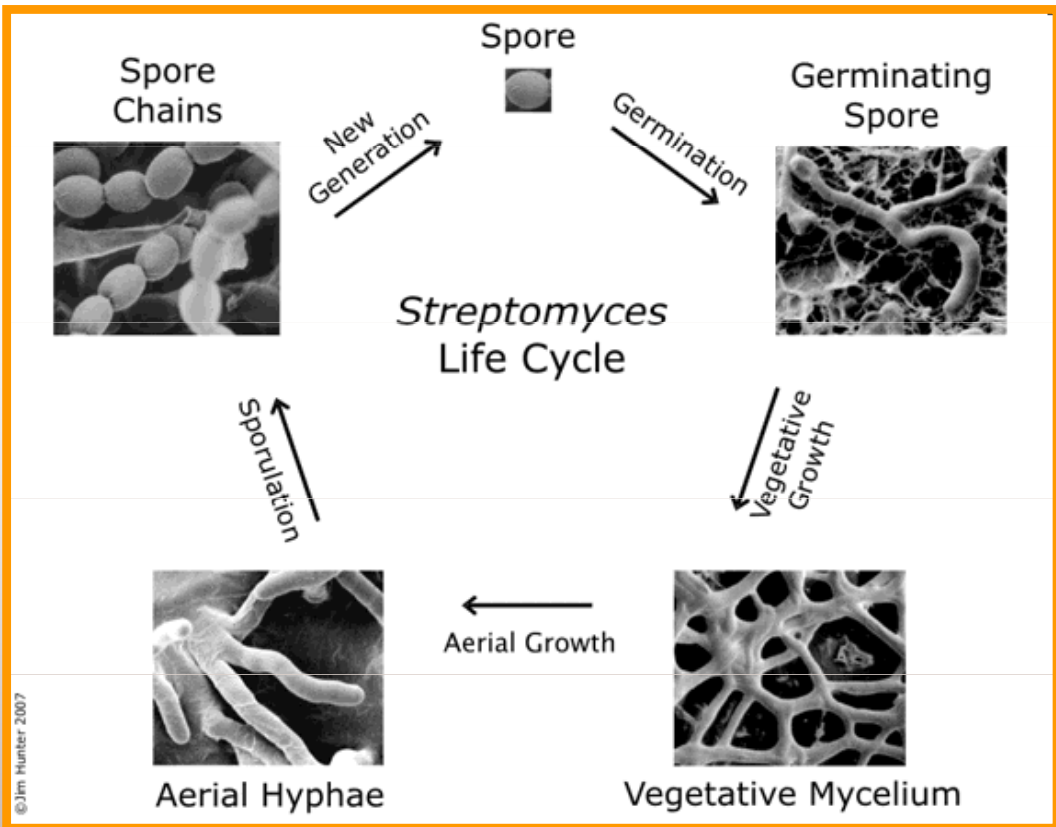
- v každém z nich má pak buňka jinou morfologii!

Př: *Chlamydia Bdellovibrio, Streptomyces, Caulobacter*, myxobakterie....

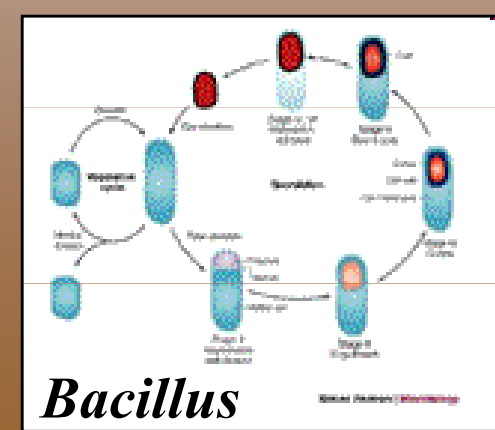
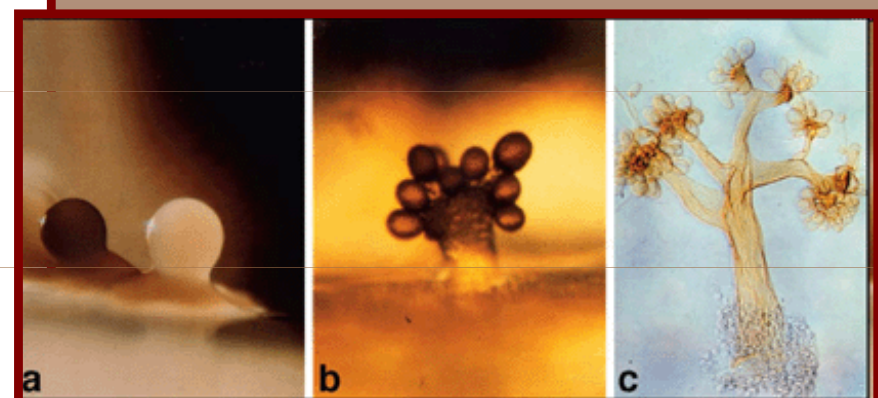
Mění se nejen vzhled buňky,
ale buňka v cyklech prochází
typickou změnou vnitřních
struktur.

Buněčný cyklus
Caulobacter crescentus



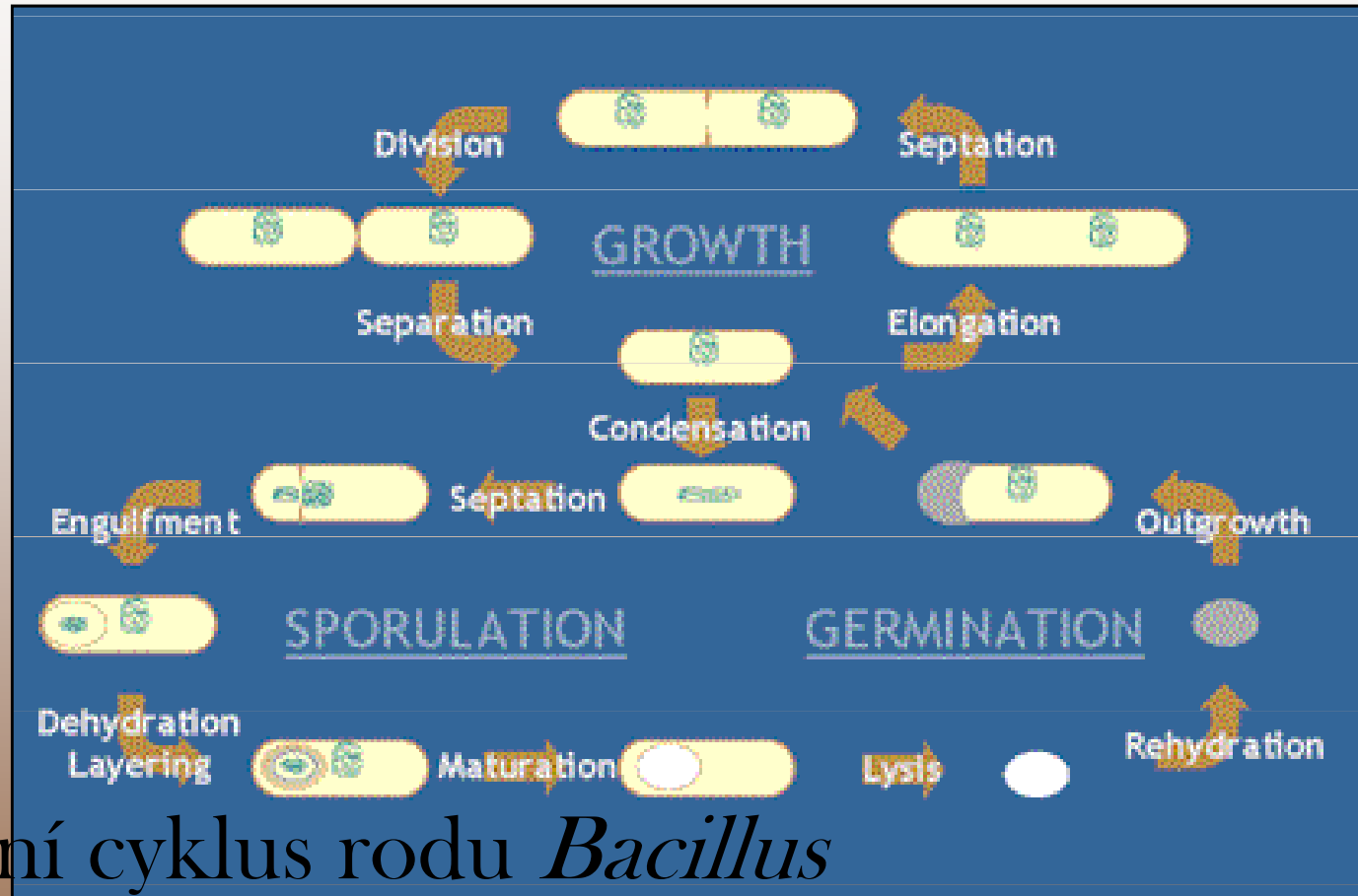


Myxobakterie



Bacillus

Morfologie buňky vprostřed buněčného cyklu



Životní cyklus rodu *Bacillus*

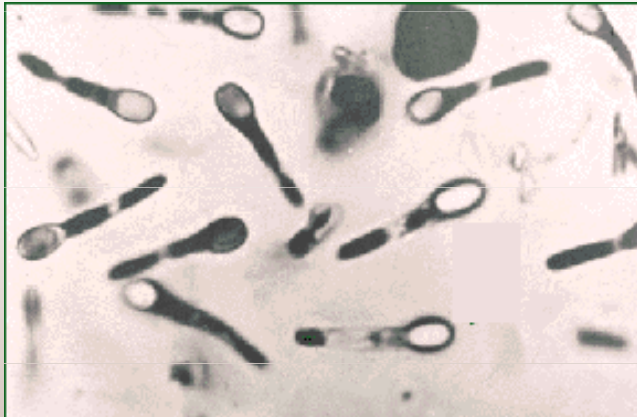
- u některých jeho druhů i u jiných rodů navíc různá barvitelnost

Gramem při různém stáří buněk - až gramlabilní

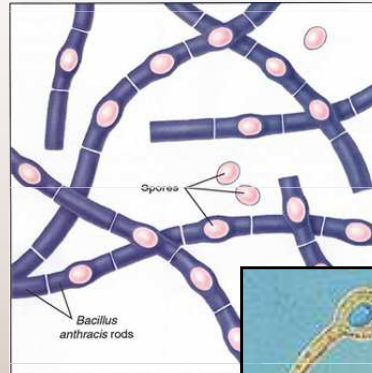
→ při popisu preparátu nutno uvažovat stáří buněk!

2) Vytváří posuzovaný druh endospory?

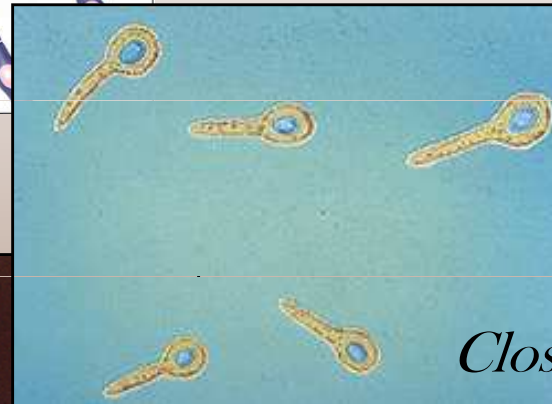
- v preparátu pak mohou měnit tvar buněk!



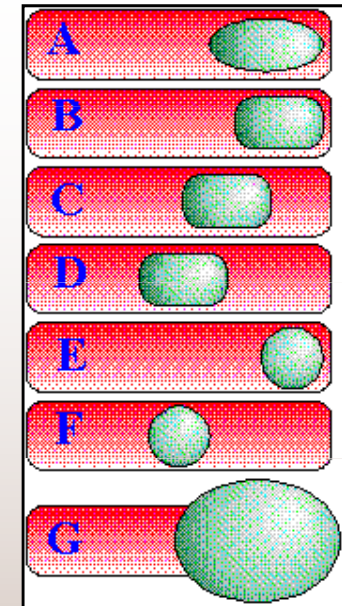
Clostridium difficile



Bacillus anthracis



Clostridium tetani



„Voják umírající na tetanus“

Sir Charles Bell

lukovité prohnutí zad (opisthotonus)

křečovitý výraz

Originál je k vidění:

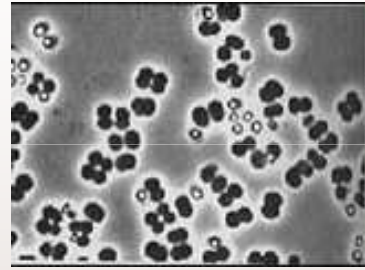
Royal College of Surgeons
of Edinburgh, Scotland.

Endospory vs. exospory

- G+ bakterie - endospory

termorezistentní

Bacillus, Clostridium, Sporosarcina,
Sporolactobacillus, Thermoactinomyces

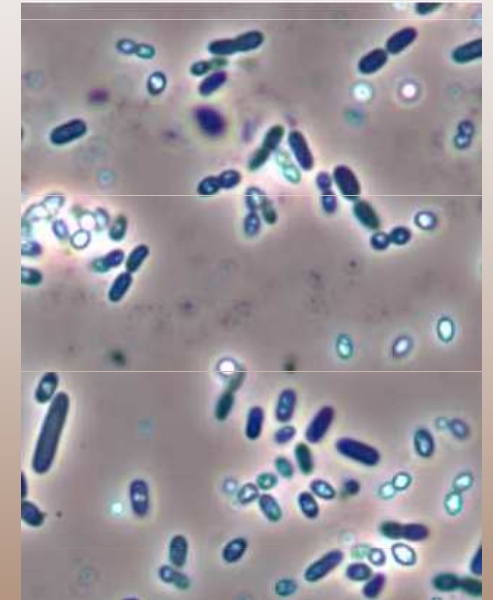


Sporosarcina - balíčky 8 buněk
fázový kontrast

- G- bakterie - exospory

Méně rezistentní, odolné zejm. vůči vysychání

Azotobacter, Methylosinus

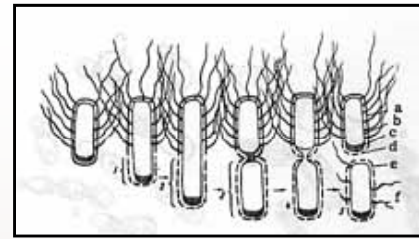


Azotobacter

ALE: Př: *Coxiella* je G- a tvoří endospory!

- Konidie: Actinobacteria

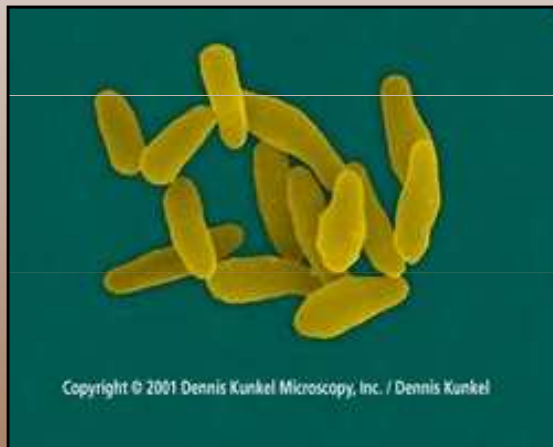
3) Stárnutím mění buňky tvar



4) Závislost tvaru buňky na vnějším prostředí

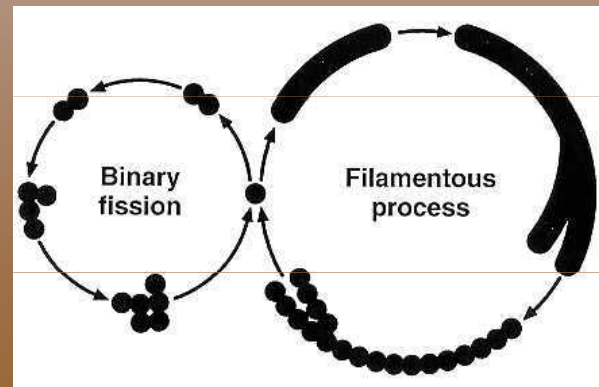
- živiny, tlak, osmolarita...

5) pleomorfní buňky - př. rody *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Haemophilus*, *Mycoplasma*



Corynebacterium

Pleomorfní mykoplazmata:
nejmenší bakteriální
buňky (0,2 - 0,3 μm);
bez buněčné stěny! Poté:
Nepůsobí betalaktamy
Osmoticky stabilní v host.b.



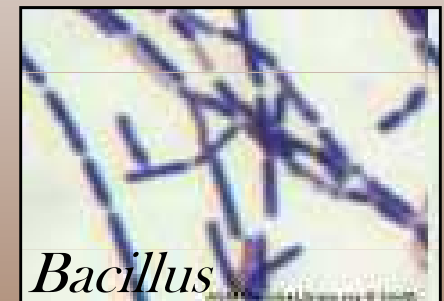
Morfologie charakteristických shluků buněk

- typické shluky napomáhají identifikaci

řetízky koků: *Streptococcus*



řetízky bacilů: *Bacillus*

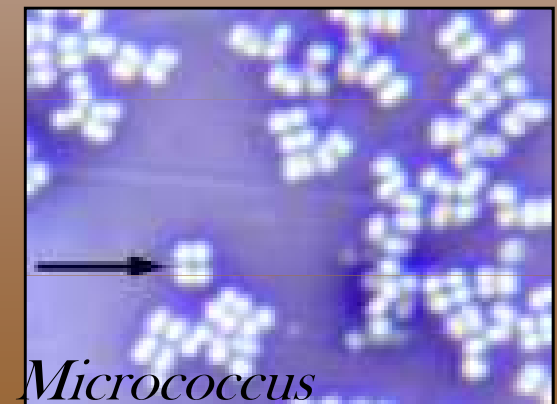
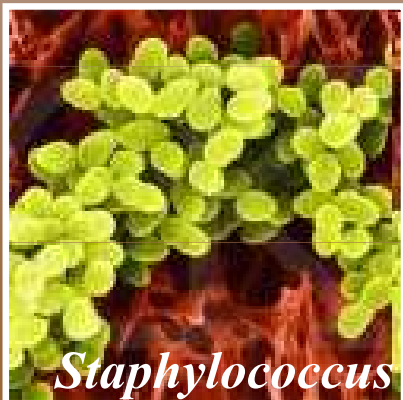


palisády: *Corynebacterium*

tetrády koků: *Micrococcus*

balíčky = sarciny *Sarcina*

hrozníčky: *Staphylococcus*



Morfologie bakt. kolonií

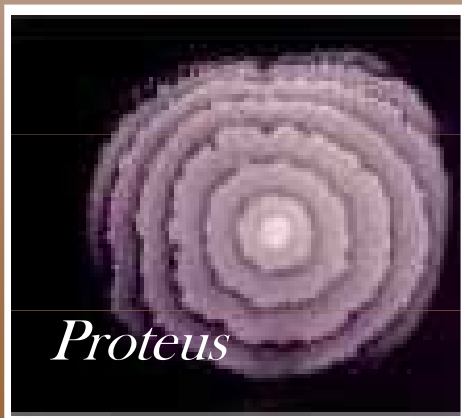
- potřeba zvážit typ media, ne kterém kolonie hodnotíme!
kultivace - zda vůbec kultivovatelné?? - sledování typu kolonií

Př: sledování morfologie kolonií

- univerzální media, jiný vzhled na selektivním - zda vůbec růst či ne? barevná reakce?)

S-, R- a M-formy

sledování pohybu terasovité kolonie (Př: *Proteus*)

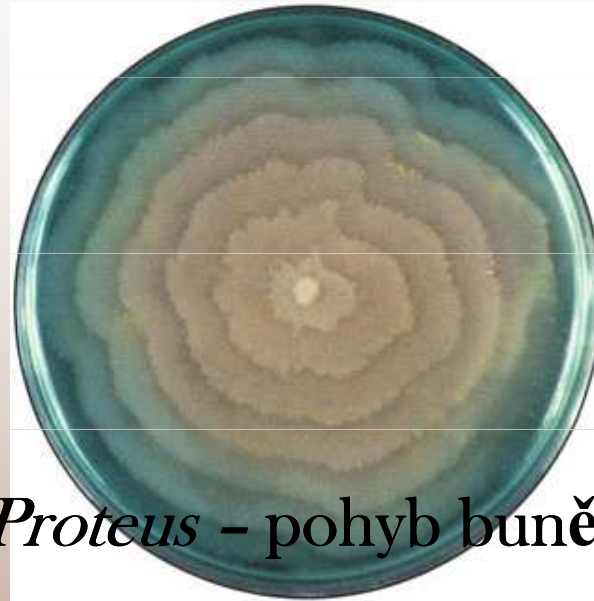


Morfologie bakteriálních kolonií

I. na základních půdách



Nocardia

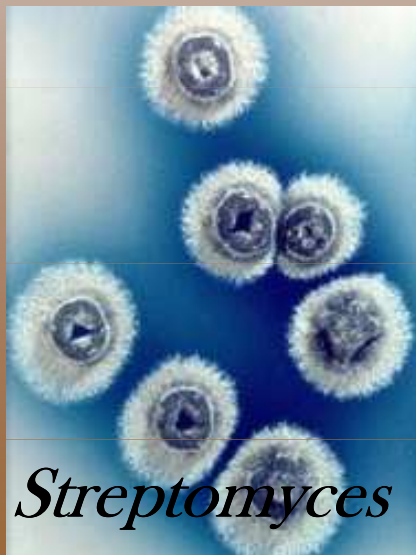


Proteus – pohyb buněk



Bacillus mycooides

SIN



Streptomyces



Streptomyces



Serratia marcescens

E.coli na agaru EMB (Eosin Methylene Blue Agar)

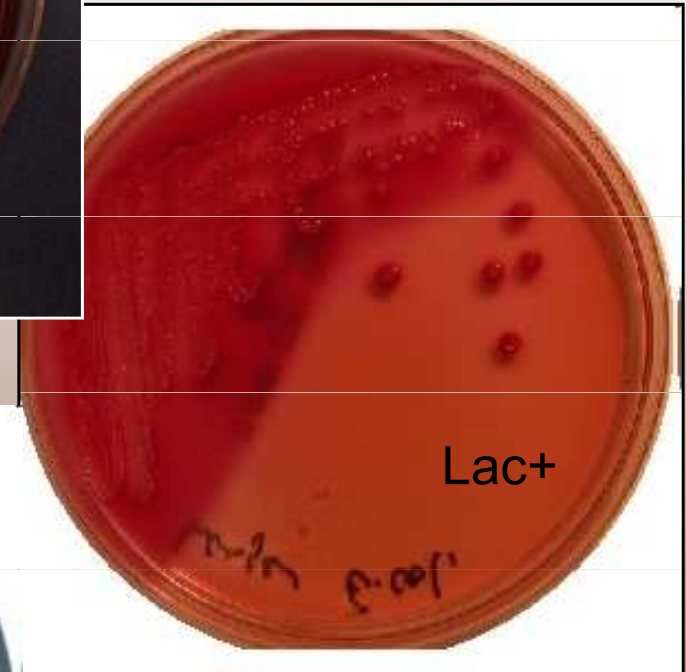
Bakteriální kolonie na
II. diagnost. půdách



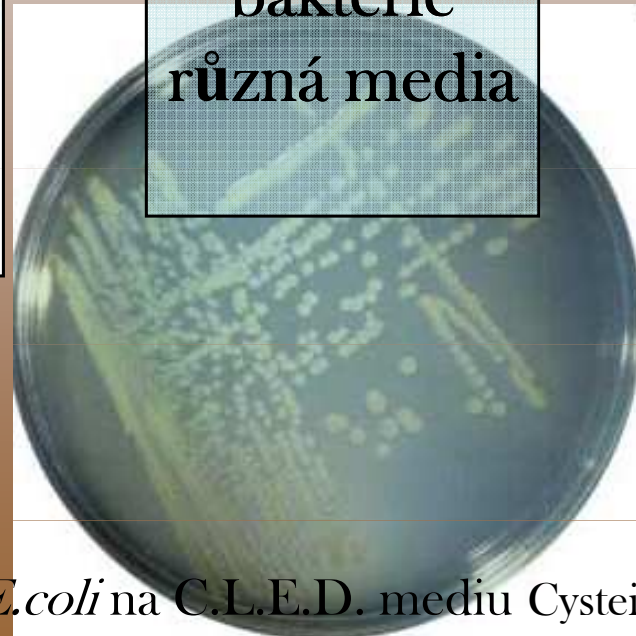
Jeden druh
bakterie
různá media



E.coli na krevním agaru



E.coli na MacConkey agaru



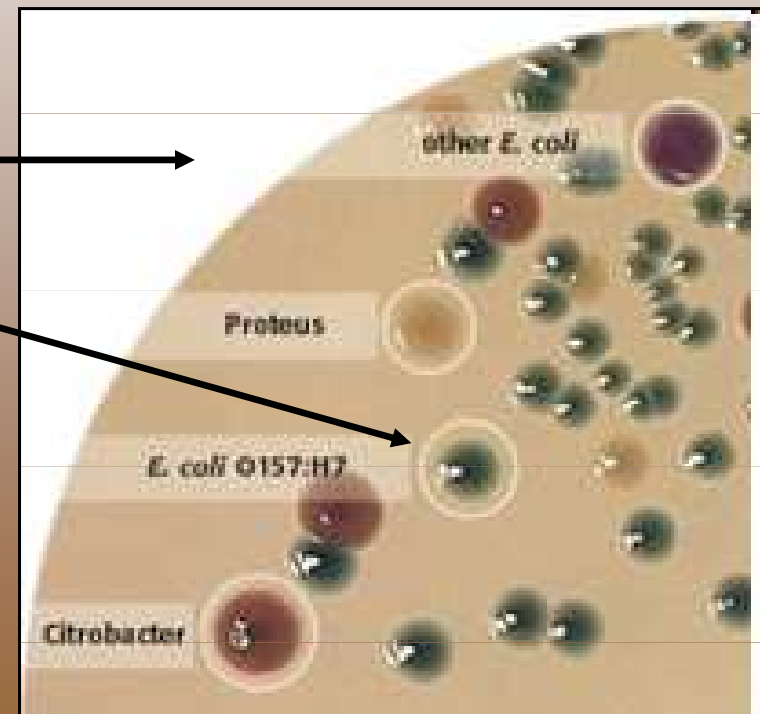
E.coli na C.L.E.D. mediu Cysteine Lactose Electrolyte Deficient Agar

Bakteriální kolonie na III. selektivních půdách

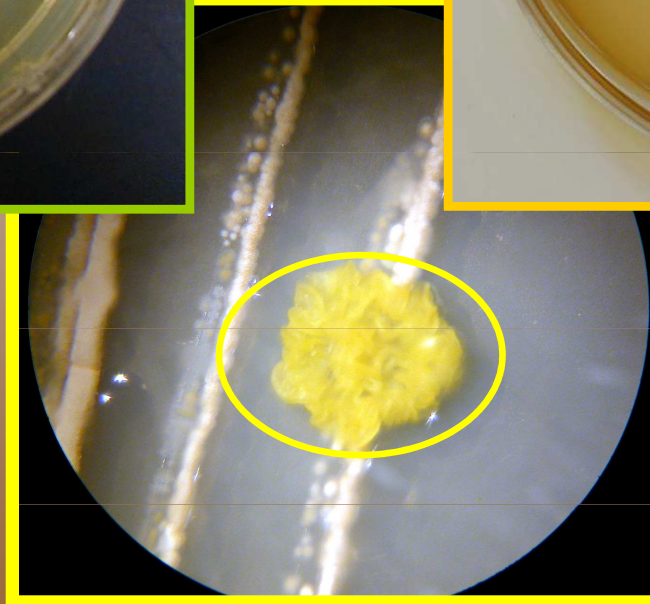


O157:H7 ID Agar

medium selektivní až na kmen!
Detekce kmene *E. coli* O157:H7
proti jiným kmenům *E. coli*



Kontaminace na misce!



Př: klasifikace: rod *Aeromonas*

- *Aeromonas* 22 species
- *Aeromonas hydrophila*
- *Aeromonas hydrophila* ssp. *hydrophila*
- *Aeromonas hydrophila* ssp. *hydrophila* CCM 7232^T
- *Aeromonas hydrophila* ssp. *hydrophila* CCM 1271
CCM 1275

GENUS

rod

SPECIES

druh

SUBSPECIES

poddruh

STRAIN

kmen

Česká sbírka mikroorganismů (CCM)



- uchovává kultury bakterií a hub pro
 - základní a aplikovaný výzkum
 - průmyslové využití, biotechnologii
 - referenční kmeny pro klinické laboratoře
humánního a veterinárního zaměření
 - výuku
- 2 500 kmenů bakterií (~ 280 rodů, 930 druhů)
- 600 kmenů vláknitých hub (~ 200 rodů, 560 druhů)

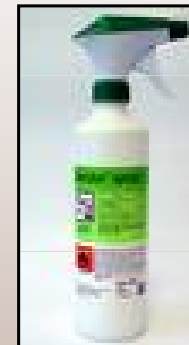


Bezpečnost a zásady práce

Plášť, přezůvky, skříňky, jídlo, pití

MO – Biohazard group 0

Stoly – před a po práci Incidur



Mytí rukou; test účinnosti mytí rukou

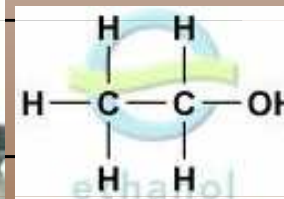
!!



:



případně



ethanol

Kahan zapnutý jen po dobu práce s ním

Nemluvit při očkování mikroorganismů



Popisování misek: zespodu, na dno
na víčko u polotekutého media



Nevylévat nic do odpadu, prosíme neodnášet kultury

O náplni cvičení se informovat předem
Viz Studijní materiály - příprava



Nejistota
- ptát se
ptát se ptát se!

