

# Úvod ke cvičením Mikrobiologie

Jaro 2010

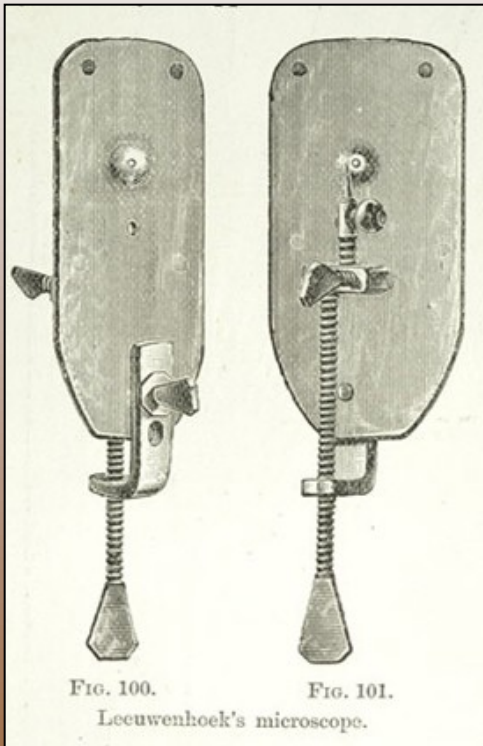


"The role of the infinitely small in nature is infinitely large"  
Louis Pasteur

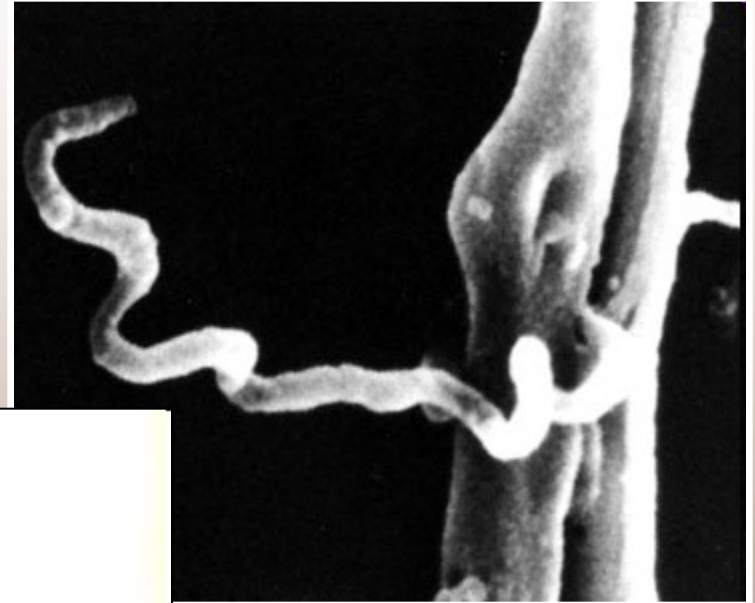
# Cytologie a morfologie bakterií



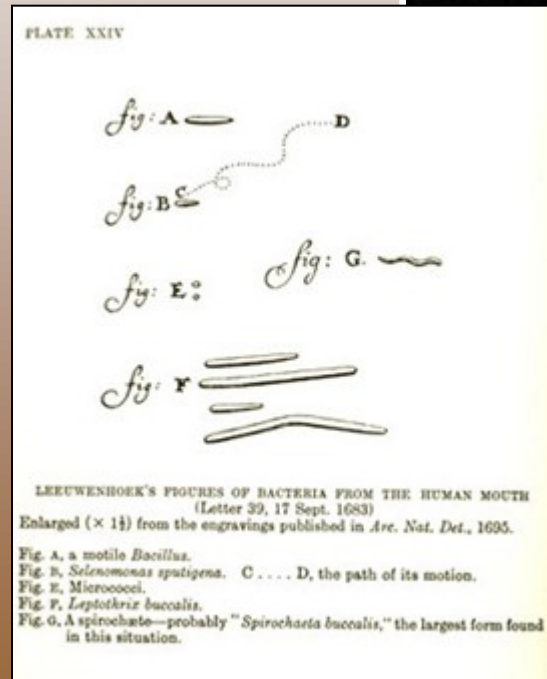
Janssenovi Z 9 x



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)

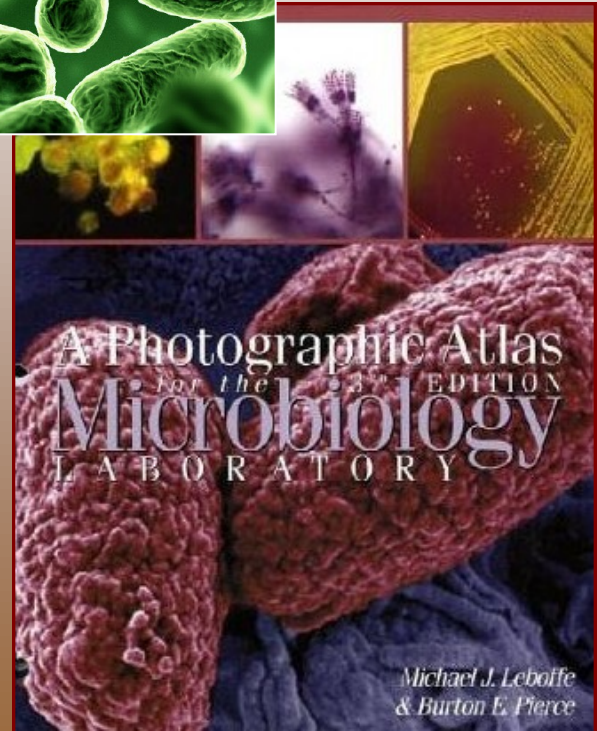
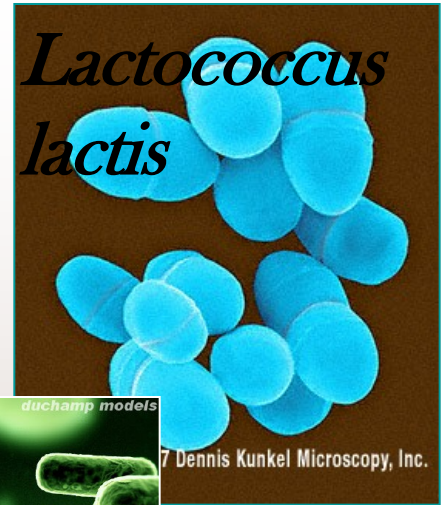
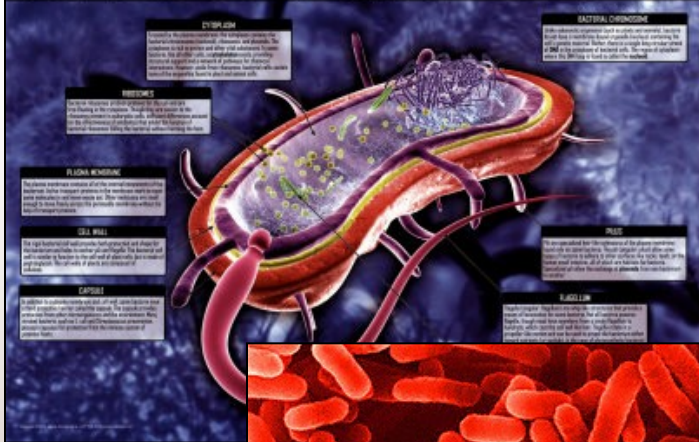
# Sylabus cvičení

- 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



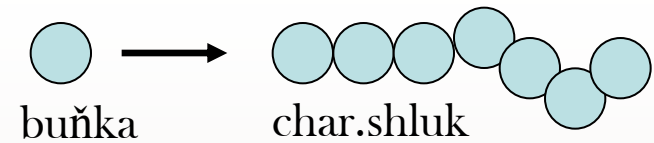


# BACTERIA CELL

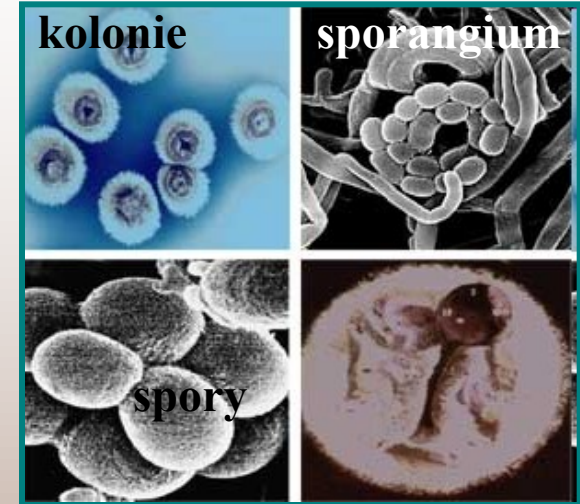




# Morfologie



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



Většinou druhově charakteristické  
= identifikační znak

Pozor na: fázi růstového cyklu!

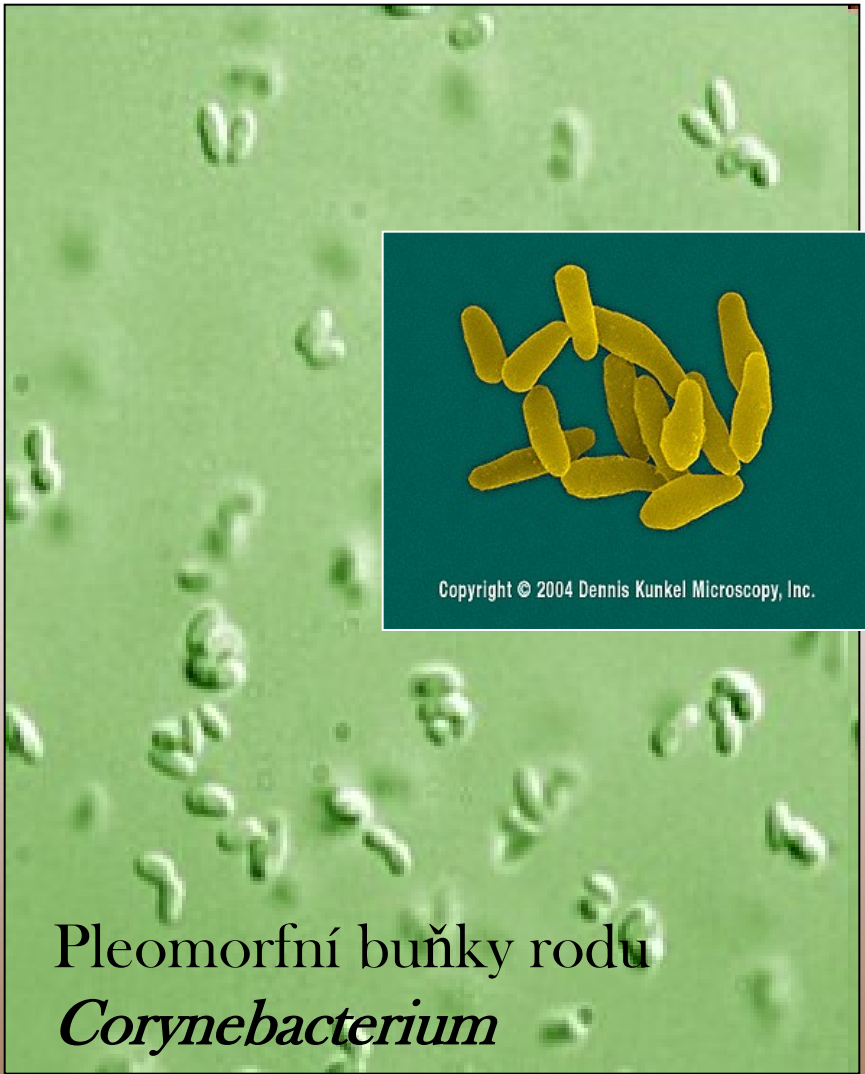
endospory vyklenující buňku

stáří kultury

pleomorfní buňky

*Clostridium  
botulinum*





Copyright © 2004 Dennis Kunkel Microscopy, Inc.

Morfologie pleomorfních buněk.

Další potíže:

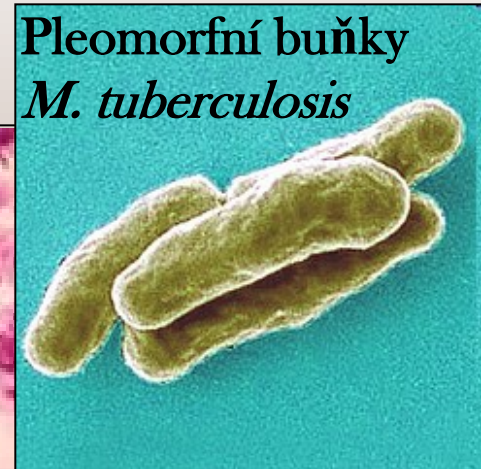
Jsou barvitelné Gramem?

*Haemophilus* - ano

Bez b.s.

Mykobakteria, mykoplazmata - nikoli

Mykolové kys



Pleomorfní buňky  
*M. tuberculosis*



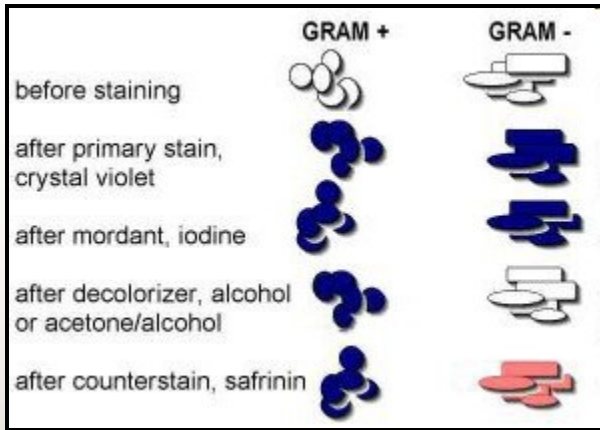
*Mycobacterium avium-intracellulare*

Acidorezistentní buňky:

Odmítají Gramovo barvení

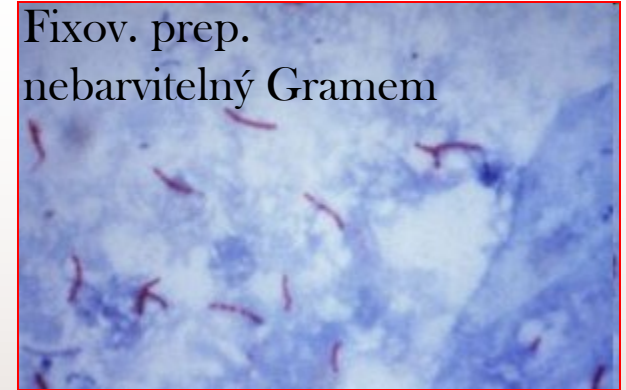
Odmítají se po nabarvení odbarvit ethanolem i kyselinou. Př: *Corynebacterium*, *Nocardia*...

Acidorezistentní barvení buněk histologického řezu lymfatické uzliny



Je neznámý vzorek vůbec barvitelný Gramem?  
Není gramlabilní?

Fixov. prep.  
nebarvitelný Gramem

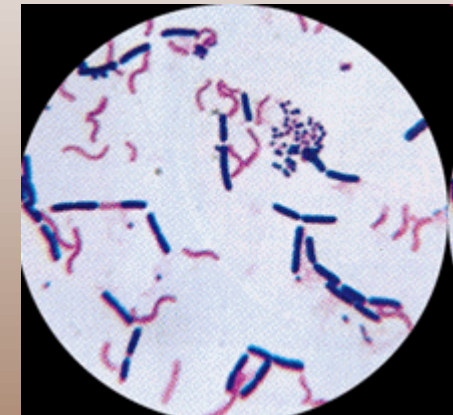


*Mycobacterium tuberculosis*  
Zeihl-Neelsonovo barvení (červeně)



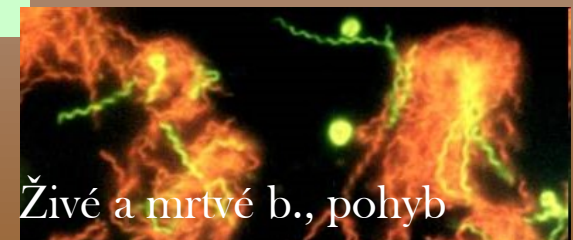
S barevným filtrem

C1  
mikroskopie?  
Typ preparátu  
Typ mikroskopie  
(typ b. stěny,  
průkaz struktur,  
růstového cyklu)



Fixov. prep. - tvar a typ b.

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



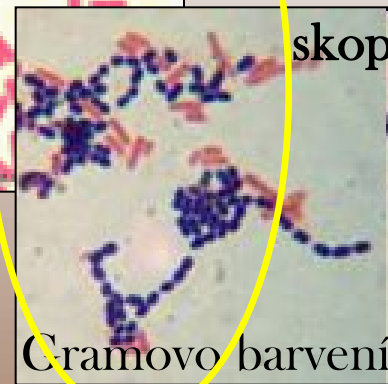
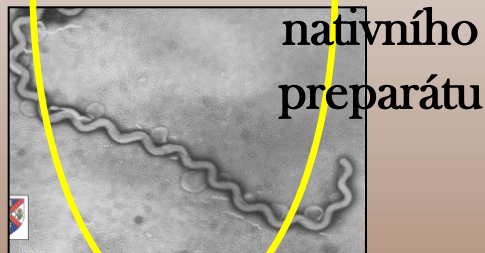
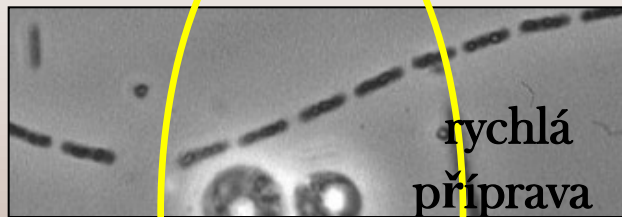
Živé a mrtvé b., pohyb

# Morfologie buňky

## • PREPARÁT

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

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



Světelná  
Fázový kontrast  
Fluorescenční  
Elektronová...

světelná  
mikro-  
skopie

pohyb buňky  - fázový kontrast, fluorescence

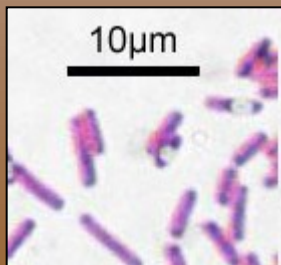
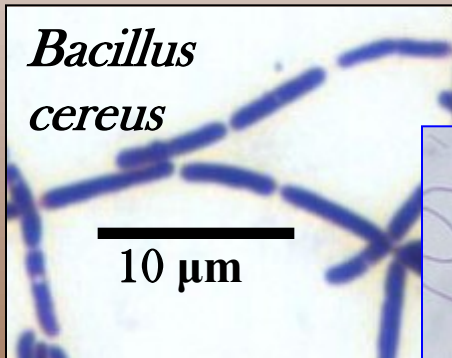
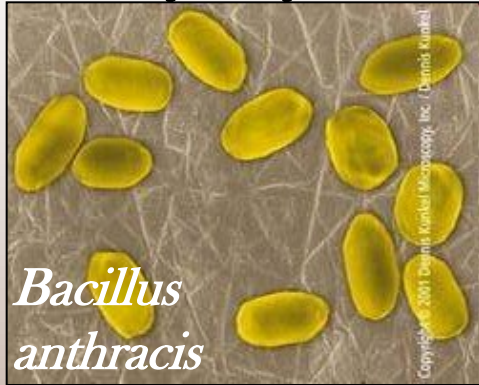
barvené struktury  - pomáhají identifikaci (PHB, síra)

typ buněčné stěny  - Gramovo a acidorezistentní b.



# U jednoho bakteriálního rodu různý vzhled char. tvaru buňky!

- Př: tyčky bacilů

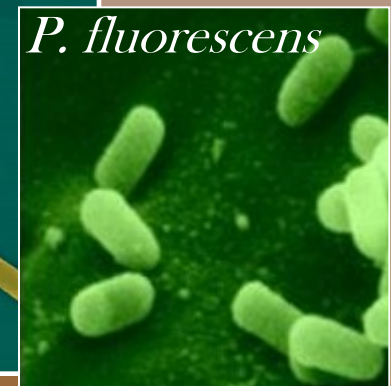
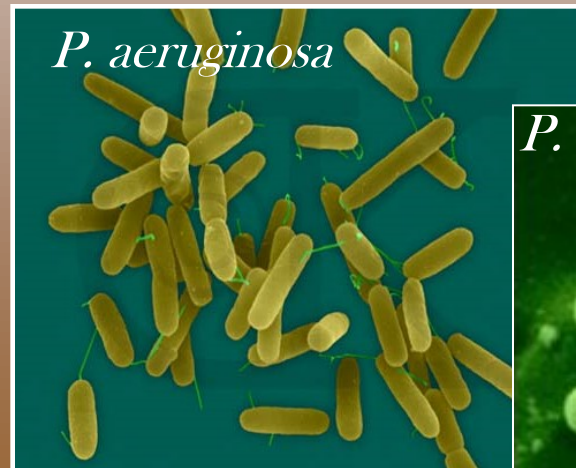


*Bacillus subtilis*

- *Haemophilus*



- *Pseudomonas*



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

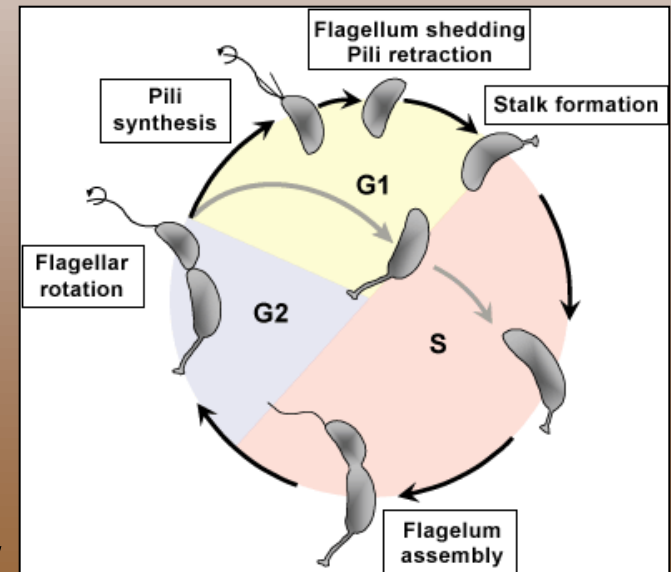
1) Prochází tento druh růstovými cykly?

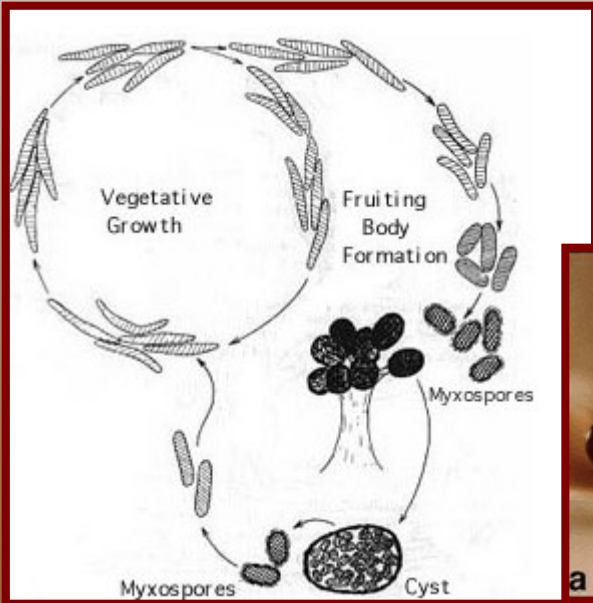
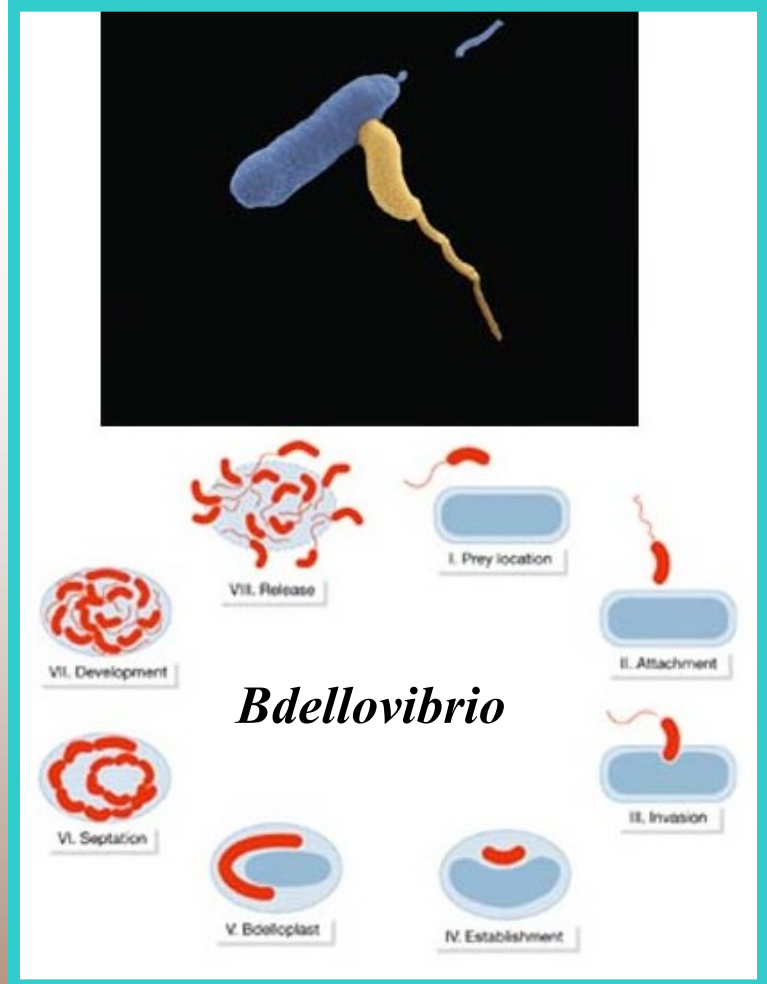
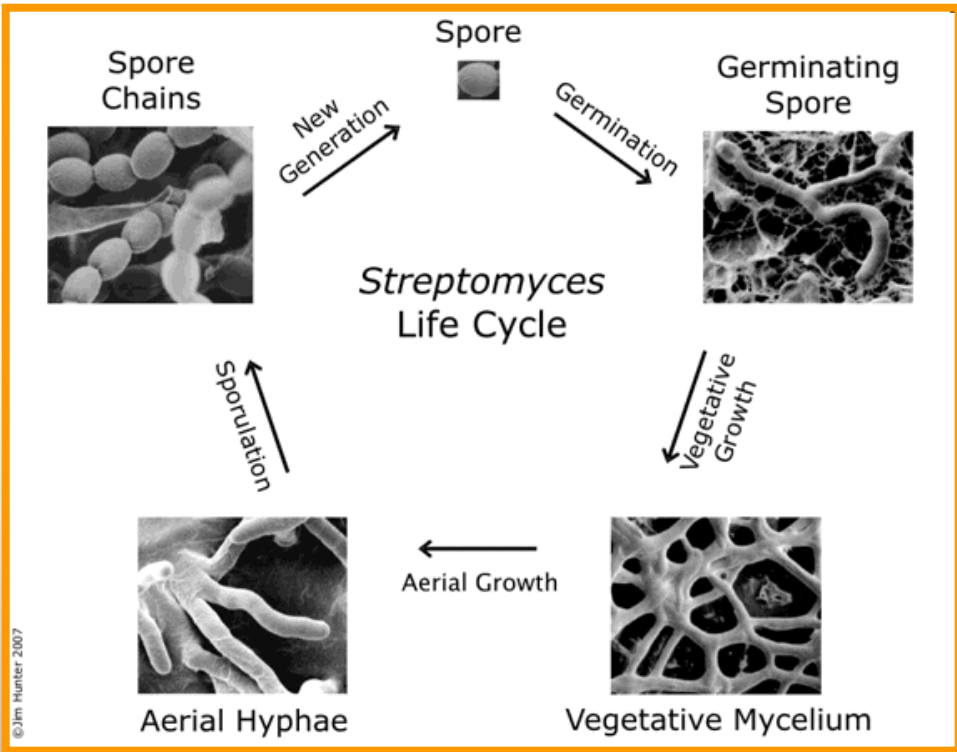
- v každém z nich má pak buňka jinou morfologii!

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

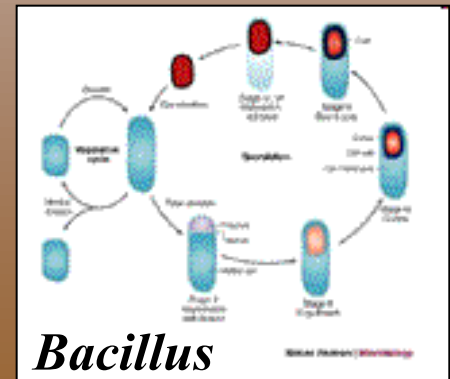
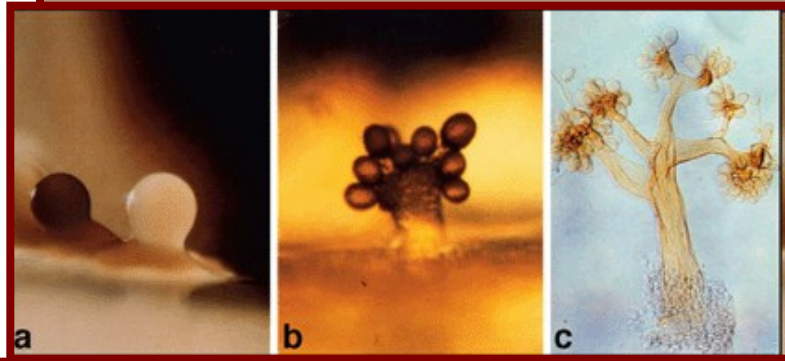
Mění se nejen vzhled buňky,  
ale buňka v cyklech prochází  
typickou změnou vnitřních  
struktur.

Buněčný cyklus  
*Caulobacter crescentus*



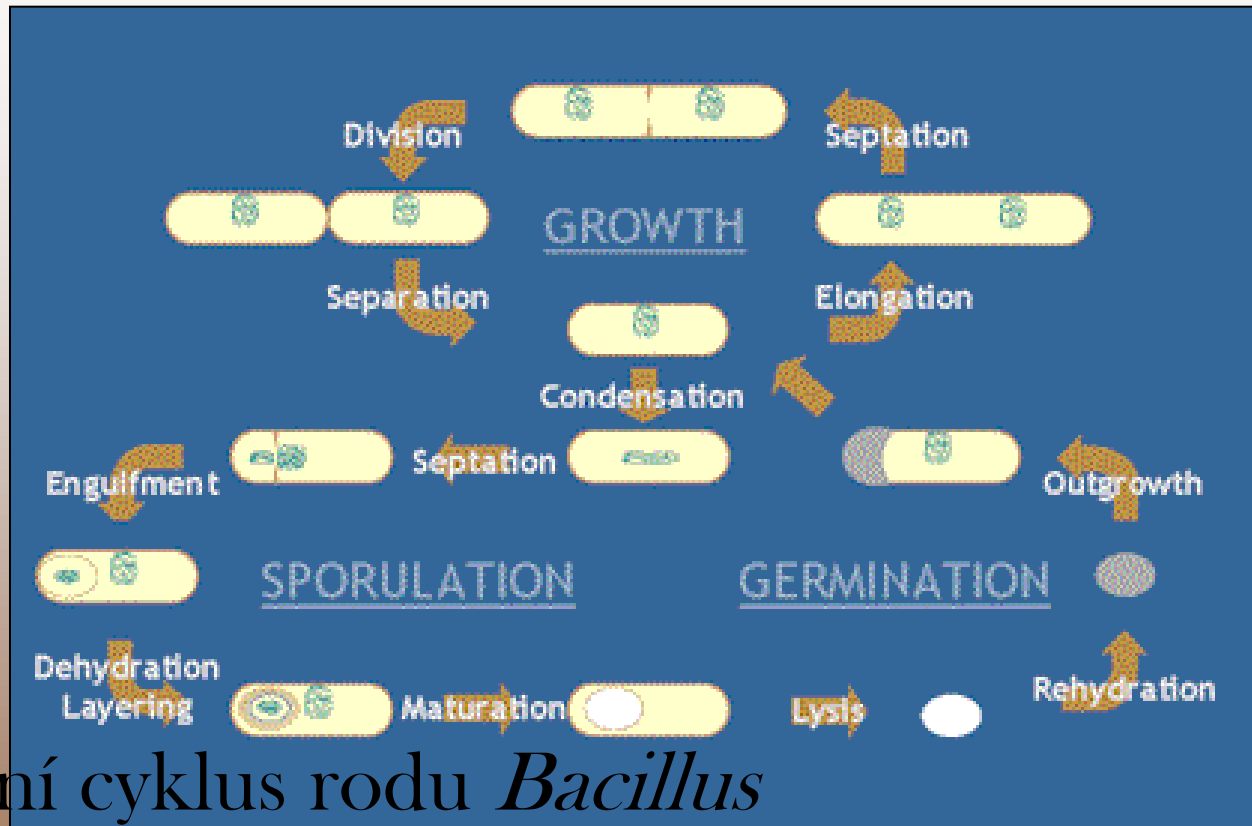


**Myxobakterie**





# 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

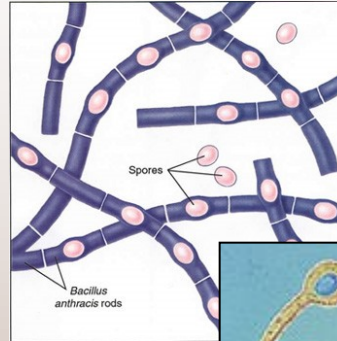
→ při popisu preparátu nutno uvažovat stáří buněk!

## 2) Vytváří posuzovaný druh endospory?

- v preparátu pak mohou měnit tvar buněk!



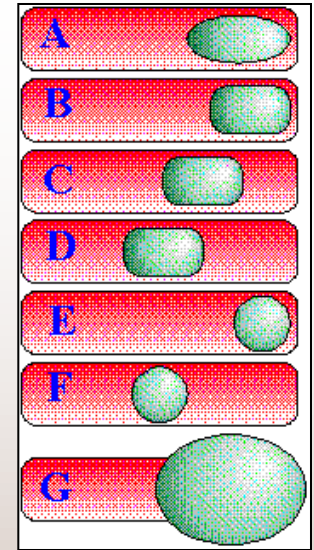
*Clostridium difficile*



*Bacillus anthracis*



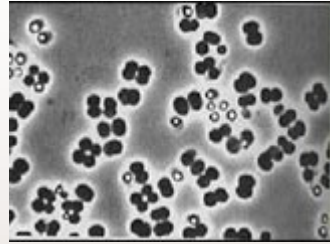
*Clostridium tetani*



„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



*Sporosarcina* - balíčky 8 buněk  
fázový kontrast

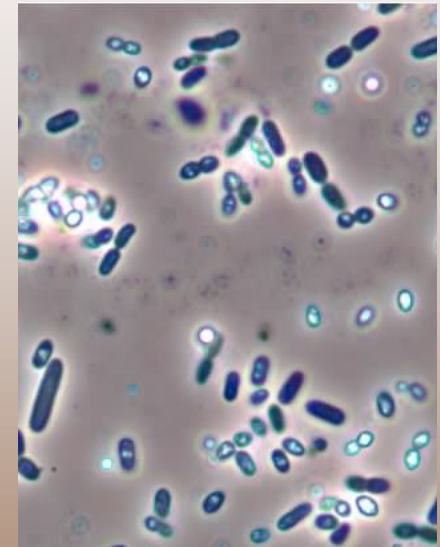
termorezistentní

*Bacillus, Clostridium, Sporosarcina,  
Sporolactobacillus, Thermoactinomyces*

- G- bakterie - exospory

Méně rezistentní, odolné zejm. vůči vysychání

*Azotobacter, Methylosinus*



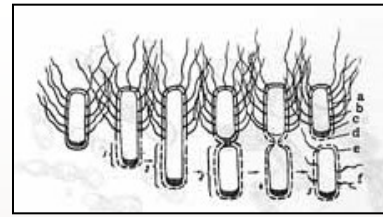
*Azotobacter*

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

- Konidie: Actinobacteria



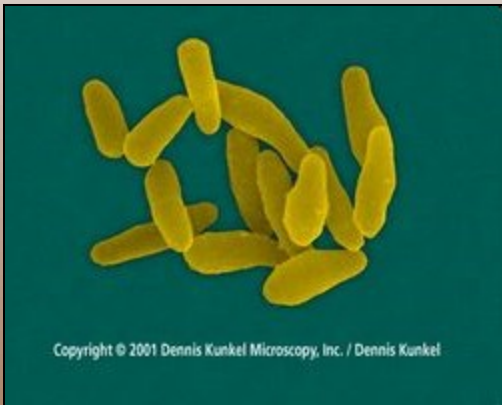
3) Stárnutím mění buňky tvar



4) Závislost tvaru buňky na vnějším prostředí

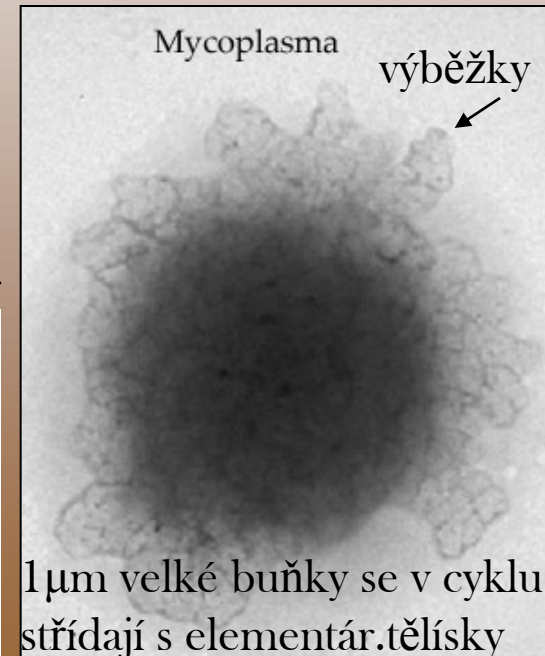
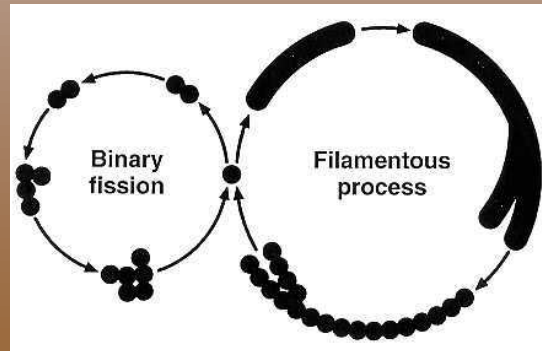
- živiny, tlak, osmolarita...

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



*Corynebacterium*

Pleomorfní mykoplazmata:  
nejmenší bakteriální  
buňky (0,2 - 0,3  $\mu\text{m}$ );  
bez buněčné stěny! Poté:  
Nepůsobí betalaktamy  
Osmoticky stabilní v host.b.



1  $\mu\text{m}$  velké buňky se v cyklu  
střídají s elementár.tělísky

# Morfologie charakteristických shluků buněk

- typické shluky napomáhají identifikaci

řetízky koků: *Streptococcus*



řetízky bacilů: *Bacillus*

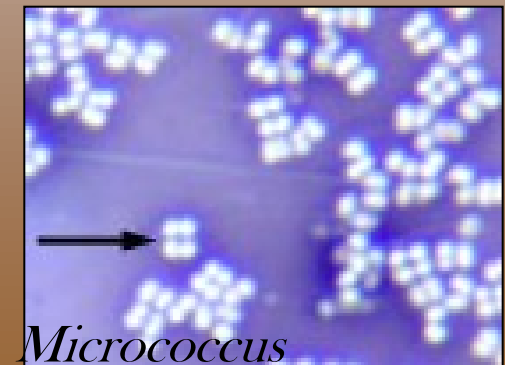
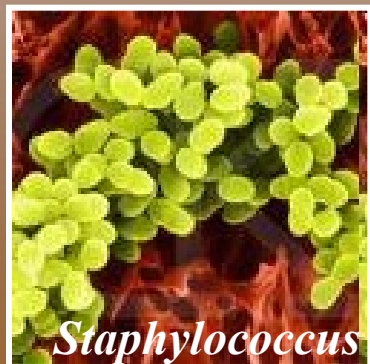


palisády: *Corynebacterium*

tetrády koků: *Micrococcus*

balíčky = sarciny *Sarcina*

hrozníčky: *Staphylococcus*



# Morfologie bakt. kolonií

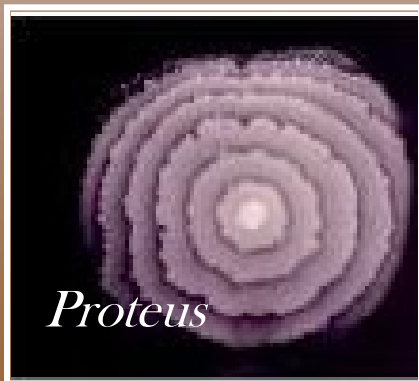
- potřeba zvážit typ media, ne kterém kolonie hodnotíme!  
kultivace - zda vůbec kultivovatelné?? - sledování typu kolonií

Př: sledování morfologie kolonií

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

S-, R- a M-formy

sledování pohybu terasovitě kolonie (Př: *Proteus*)



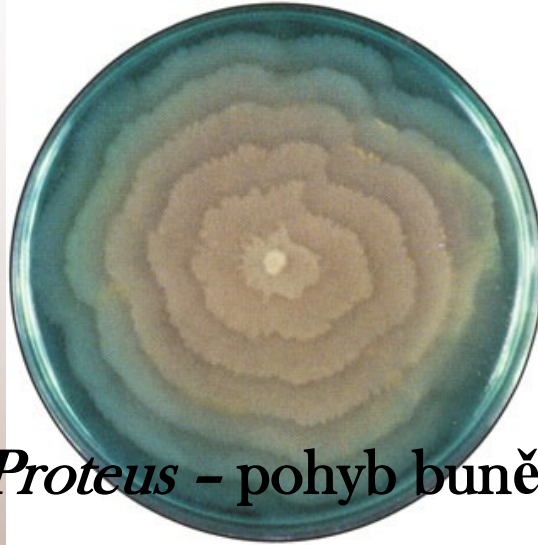


# Morfologie bakteriálních kolonií

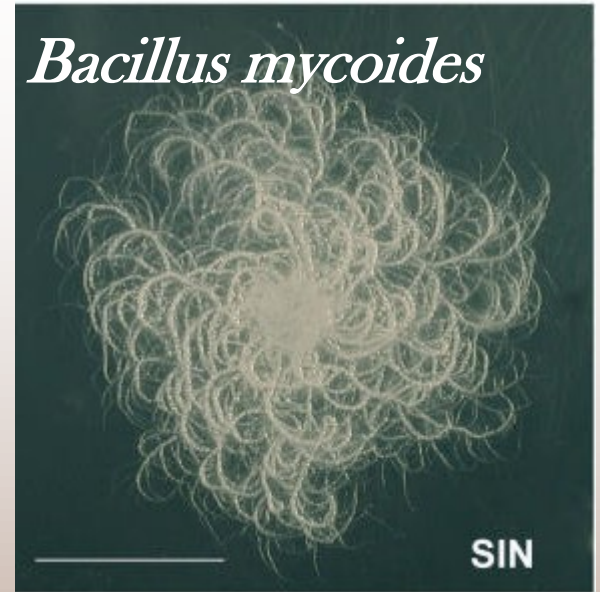
## I. na základních půdách



*Nocardia*



*Proteus* – pohyb buněk



*Bacillus mycooides*

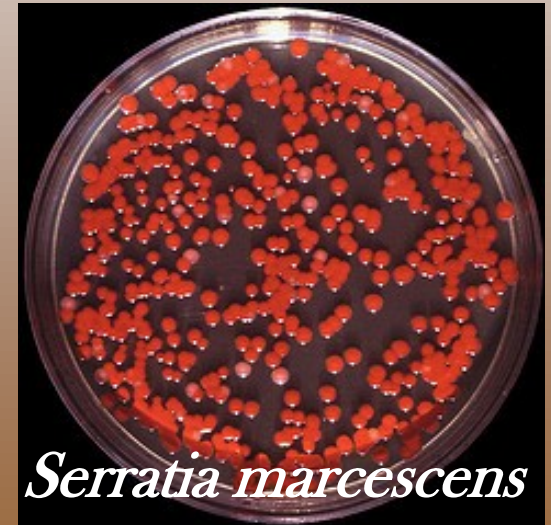
SIN



*Streptomyces*



*Streptomyces*



*Serratia marcescens*

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

Bakteriální kolonie na  
II. diagnost. půdách



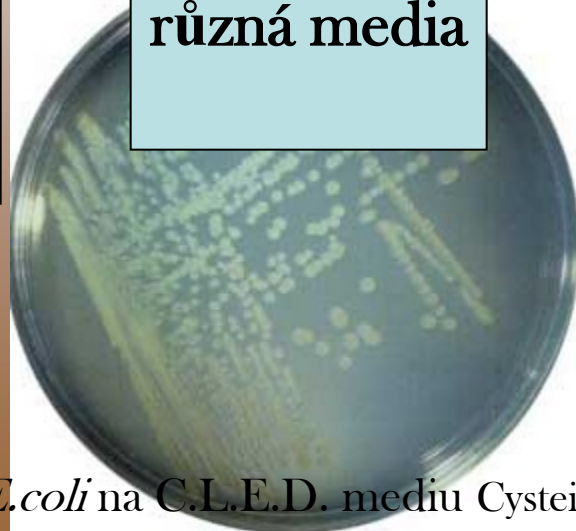
*E.coli* na krevním agaru



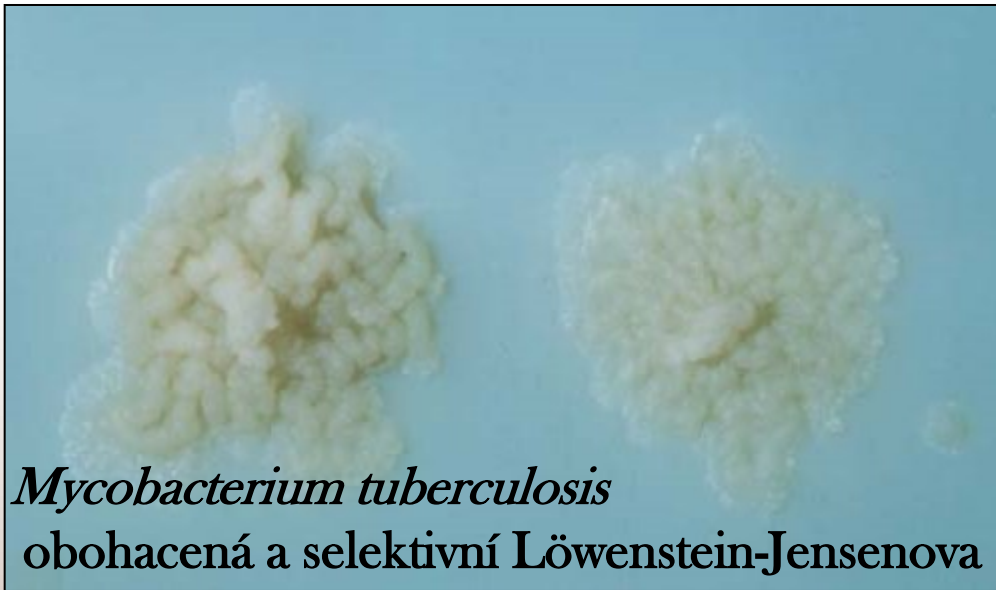
Jeden druh  
bakterie  
různá media



*E.coli* na MacConkey agaru



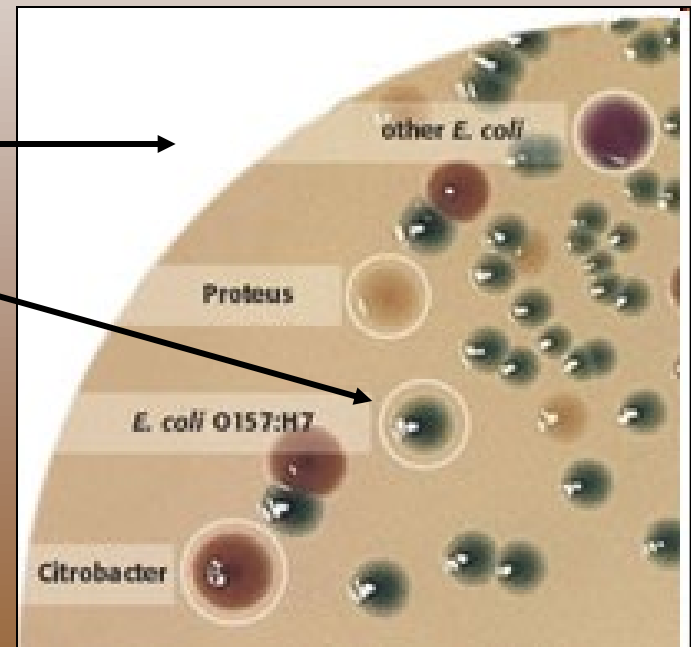
*E.coli* na C.L.E.D. mediu Cysteine Lactose Electrolyte Deficient Agar



## Bakteriální kolonie na III. selektivních půdách

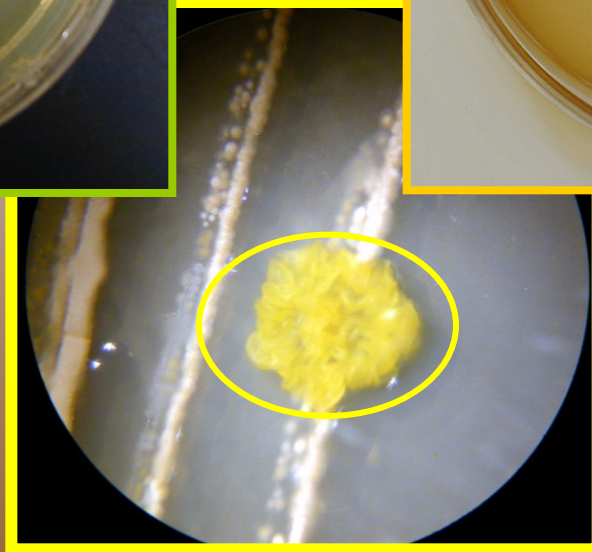
**O157:H7 ID Agar**

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





# Kontaminace na misce!

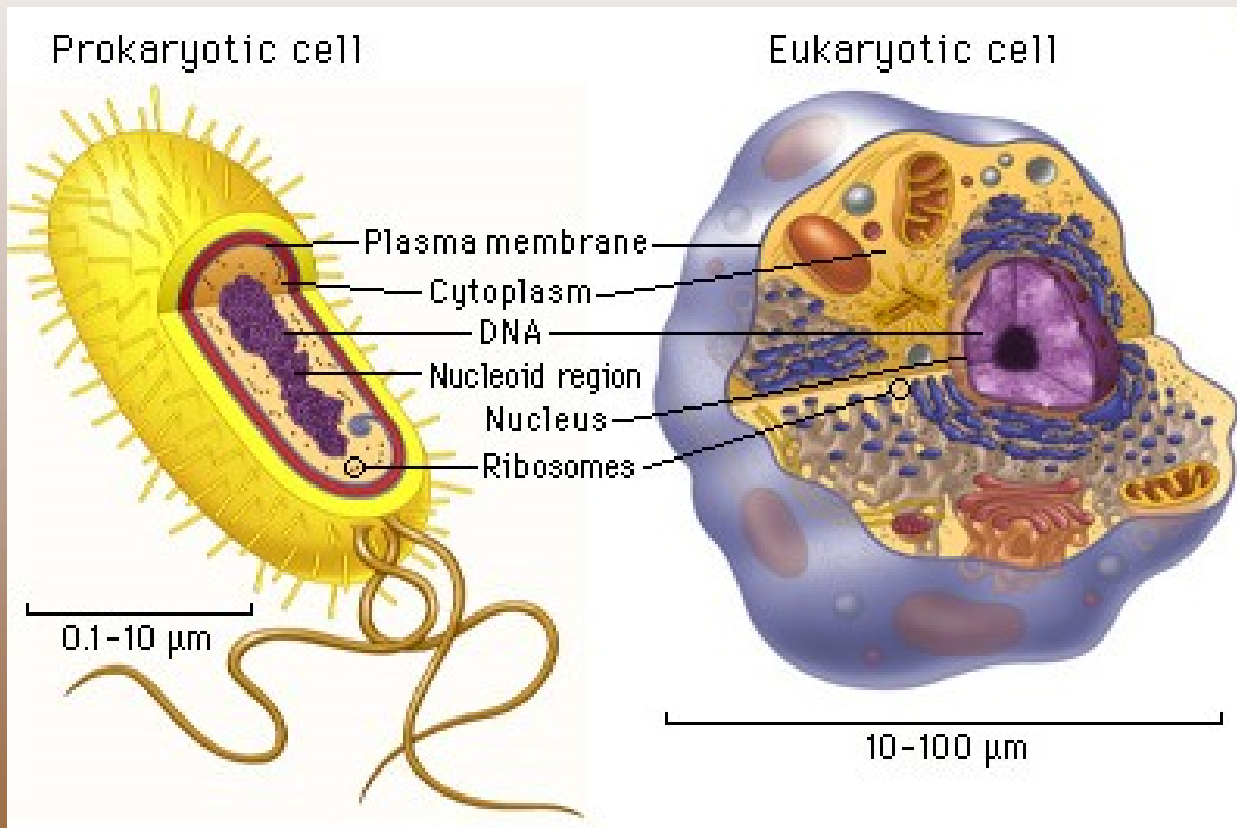




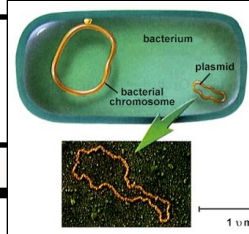
# Cytologie

## BAKTERIÁLNÍ BUŇKA x vs. eukaryotní

- nutno porovnat pro pochopení fyziologie



# Zvláštnosti prokaryotické buňky

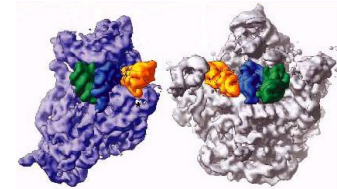


- živý, otevřený systém schopný regulace a autoreprodukce
- jádro neodděleno od CPL membránou, větš. kruhová (i lineární) DNA
- haploidní buňky (1 alela) množící se nepohlavně
- bez buněčných organel, jediná membrána je cytoplasmatická
- ribosomy se liší od ribosomů eukaryotních buněk - menší, volně v CPL vyjma Archea:

5S, 16S a 23S rRNA

translace začíná N-formylmethioninem

geny pro RNA bez intronů



bakteriální ribozom

specifické struktury a vlastnosti bakt. buňky:

**peptidoglykan** (až na mykoplasmata)

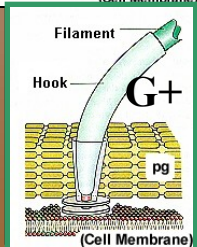
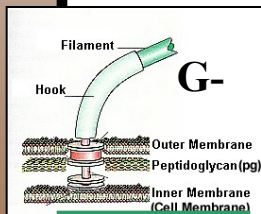
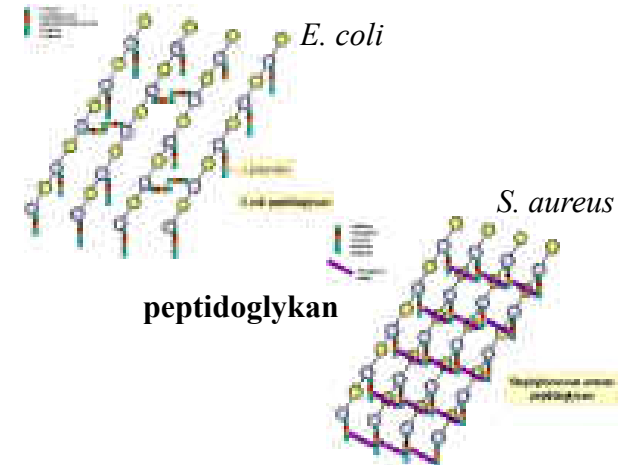
steroly v membránách zcela výjimečně

**bičík** - globul. bílk. flagelin, pohyb rotací

**anaerobiosa**, schopnost vázat N

tvorba kyseliny **PHB** (zásob.l.)

pokud **fotosyntéza** - anoxigenní



# Př: klasifikace: rod *Aeromonas*

- *Aeromonas* 22 species
- *Aeromonas hydrophila*
- *Aeromonas hydrophila* ssp. *hydrophila*
- *Aeromonas hydrophila* ssp. *hydrophila* CCCT 22 T
- *Aeromonas hydrophila* ssp. *hydrophila* CCCT 5

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

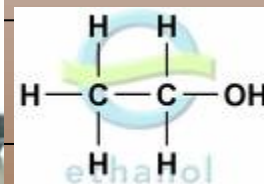
!!



:



případně



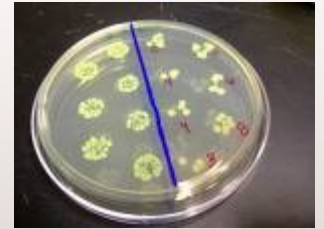
ethanol

Kahan zapnutý jen po dobu práce s ním

Nemluvit při očkovaní 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 - prosím příprava

