

Úvod ke cvičením Mikrobiologie



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

Sylabus cvičení

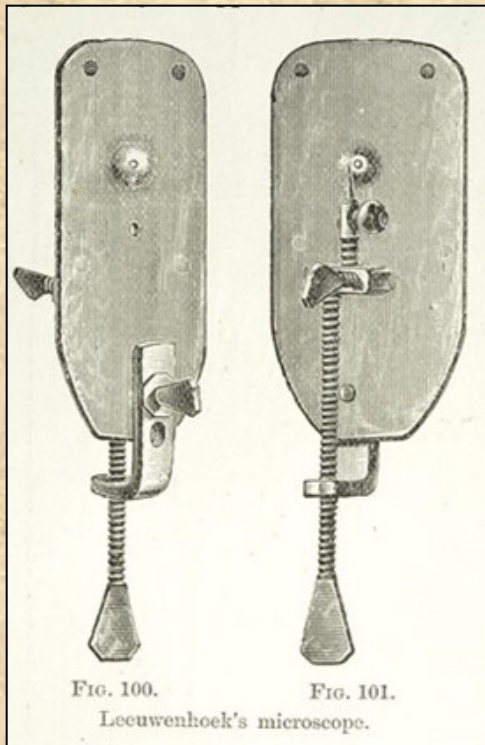
- Příprava a sterilizace živných medií
- Očkování a uchovávání mikroorganismů
- Makroskopické a mikroskopické pozorování
- Počítání životaschopných bakterií - sporulace
- Izolace půdních mikroorganismů
- Mikrobiologický rozbor vody
- Průkaz bakteriálních spor
- Kvasinky; vitální test
- Bakterie a jejich citlivost na antibiotika
- Základní biochemické testy
- Bakteriofág



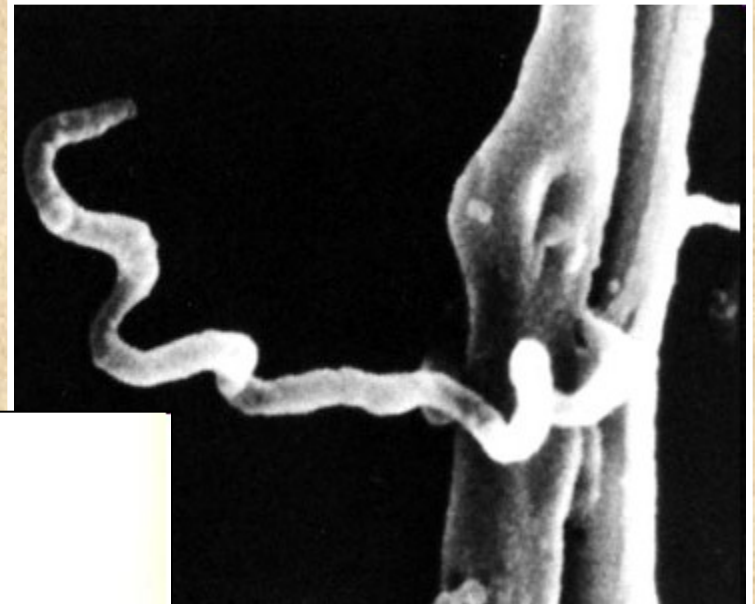
Cytologie a morfologie bakterií



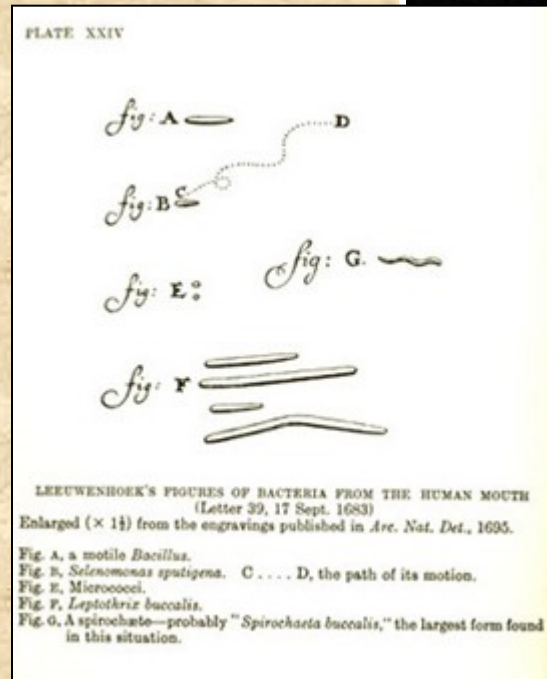
Janssenovi Z 9 x



Anthony van Leeuwenhoek
Z 50 - 275 x

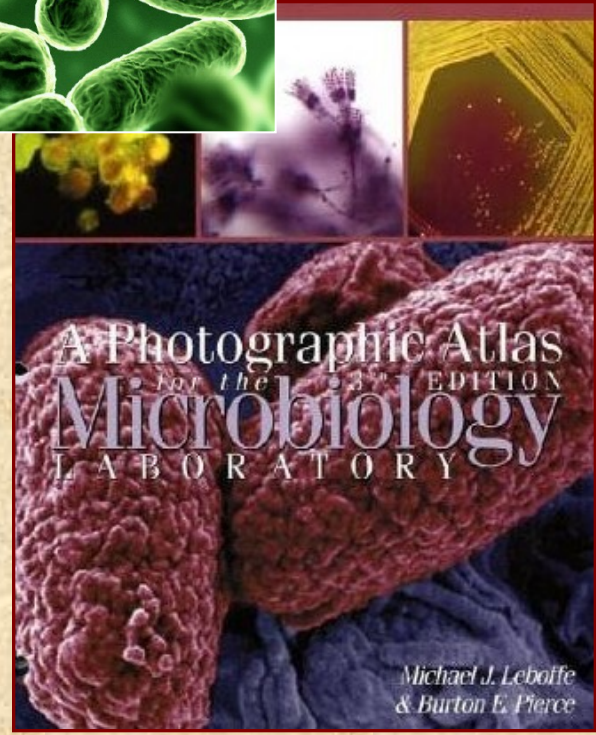
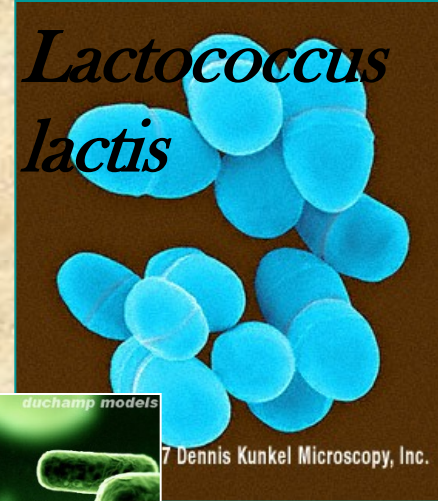
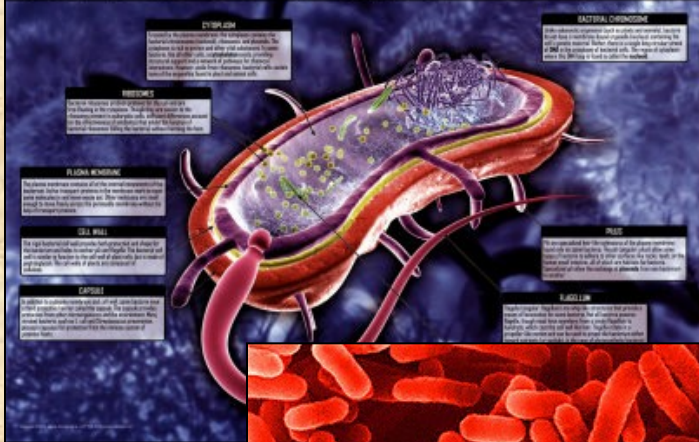


SEM *Treponema pallidum*
útočící na membránu
savčí buňky

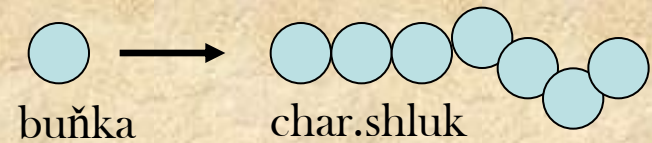


Anthony van Leeuwenhoek
První nákresy bakterií
(z ústní dutiny člověka)

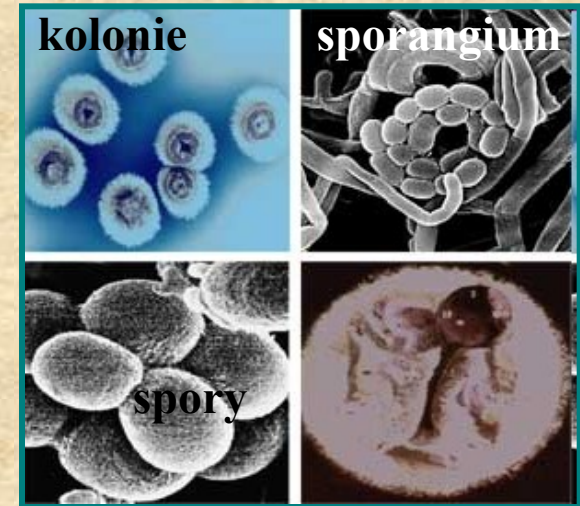
BACTERIA CELL



Morfologie



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



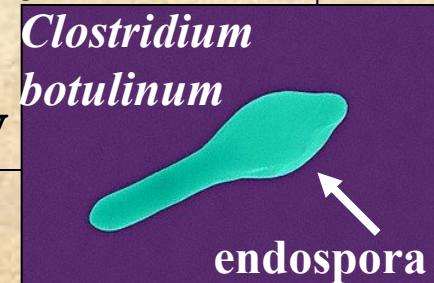
Většinou druhově charakteristické
= identifikační znak

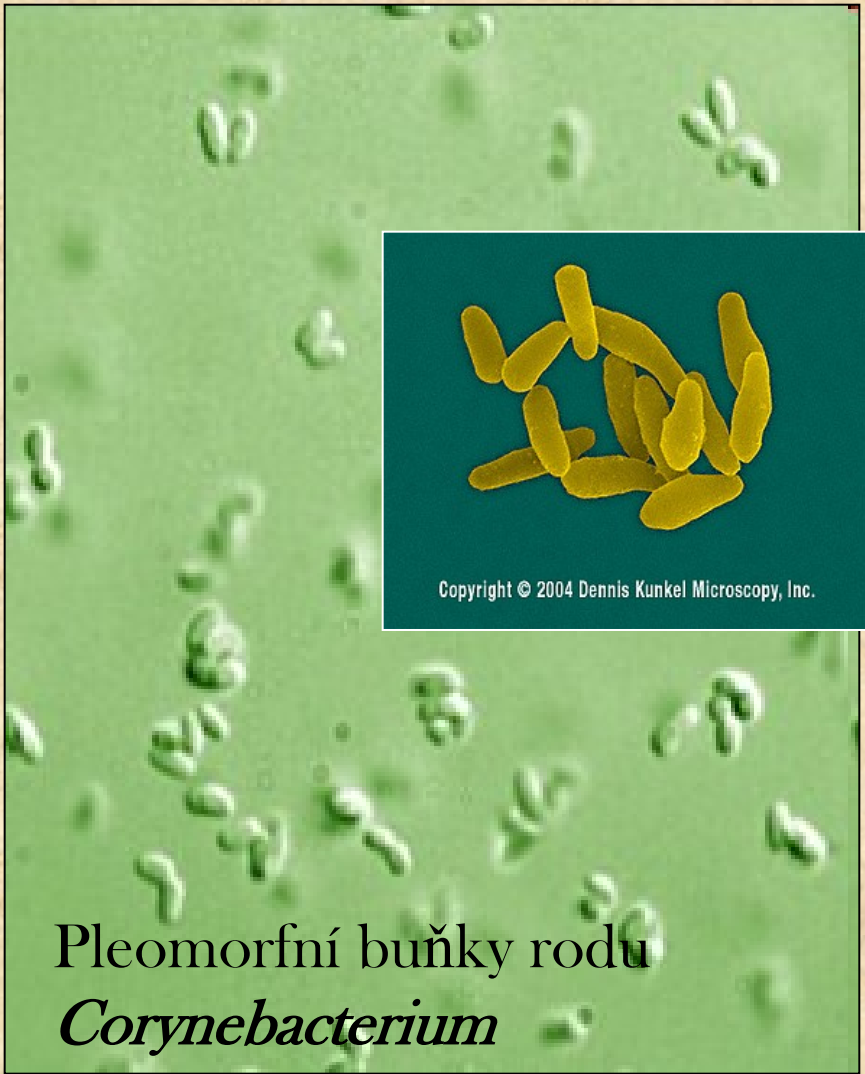
Pozor na: fázi růstového cyklu!

endospory vyklenující buňku

stáří kultury

pleomorfní buňky





Copyright © 2004 Dennis Kunkel Microscopy, Inc.

Pleomorfní buňky rodu *Corynebacterium*

Acidorezistentní buňky:

Odmítají Gramovo barvení

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

Morfologie pleomorfních buněk.

Další potíže:

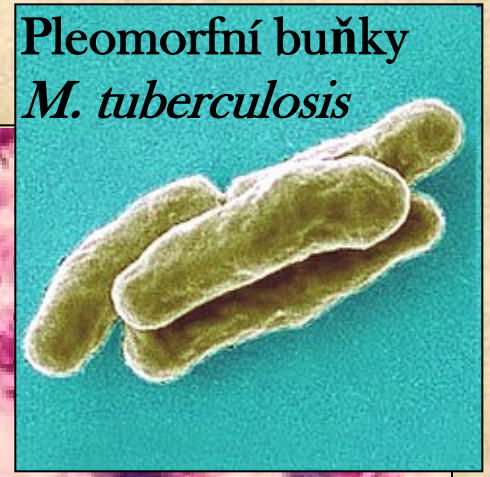
Jsou barvitelné Gramem?

Haemophilus - ano

Bez b.s.

Mykobakteria, mykoplazmata - nikoli

Mykologové kys

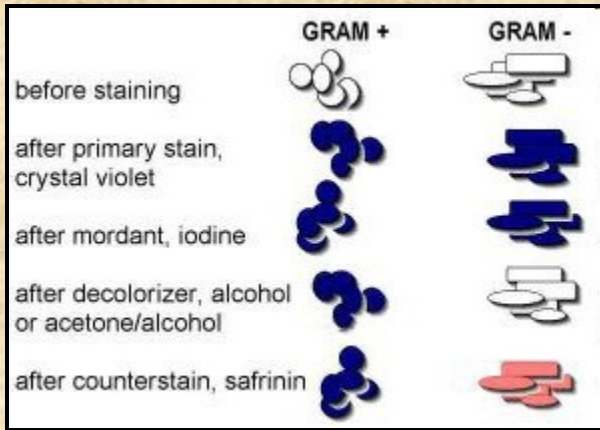


Pleomorfní buňky *M. tuberculosis*



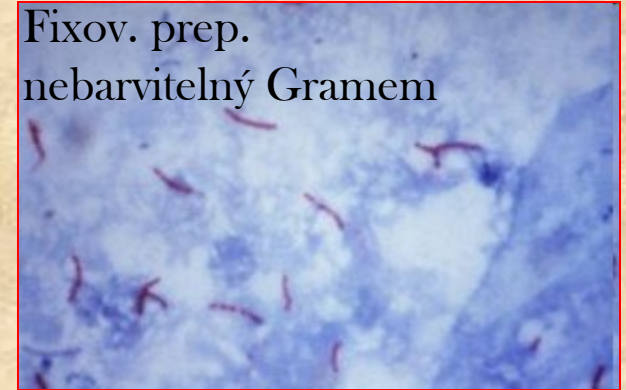
Mycobacterium avium-intracellulare

Acidorezistentní barvení buněk histologického řezu lymfatické uzliny



Je neznámý vzorek vůbec barvitelný Gramem? Není gramlabilní?

Fixov. prep. nebarvitelný Gramem

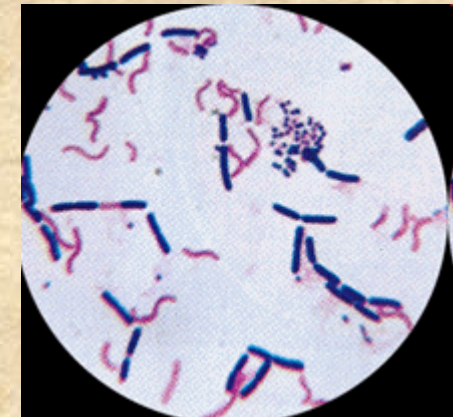


Mycobacterium tuberculosis
Zeihl-Neelsonovo barvení (červeně)



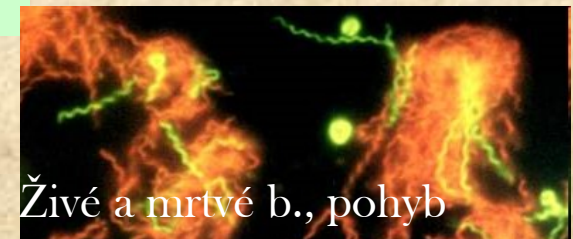
S barevným filtrem

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



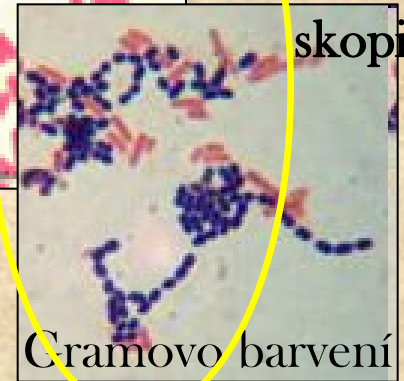
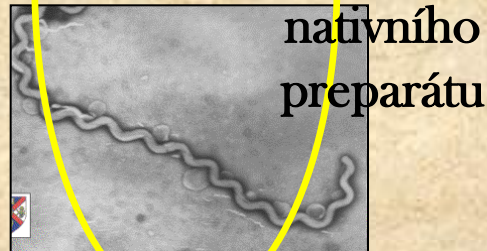
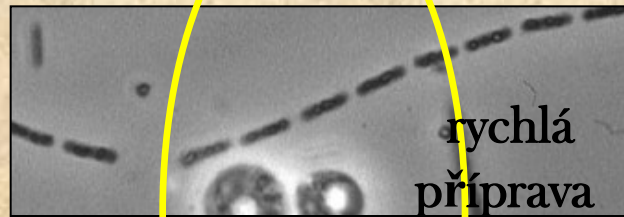
Živé a mrtvé b., pohyb

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

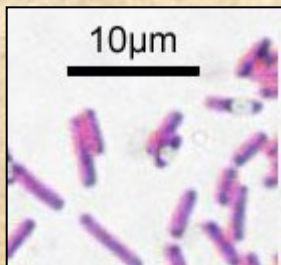
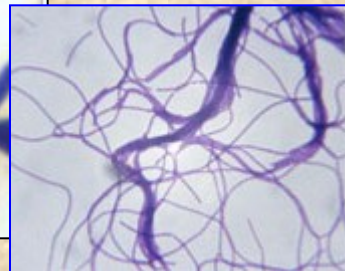
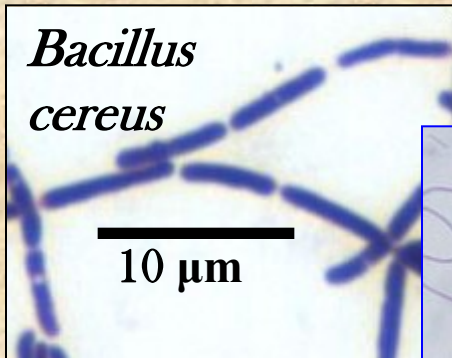
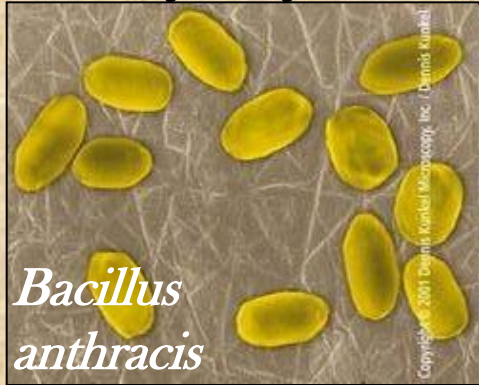
pohyb buňky - fázový kontrast, fluorescence

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

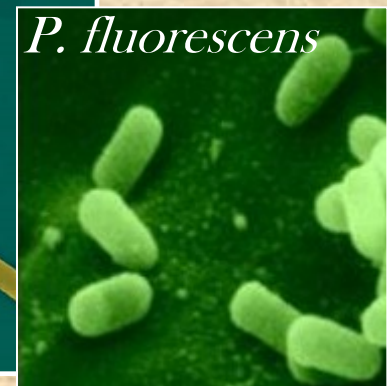
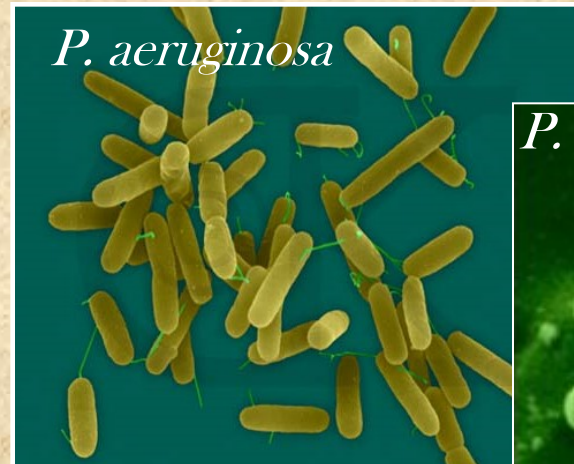


Bacillus subtilis

- *Haemophilus*



- *Pseudomonas*



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

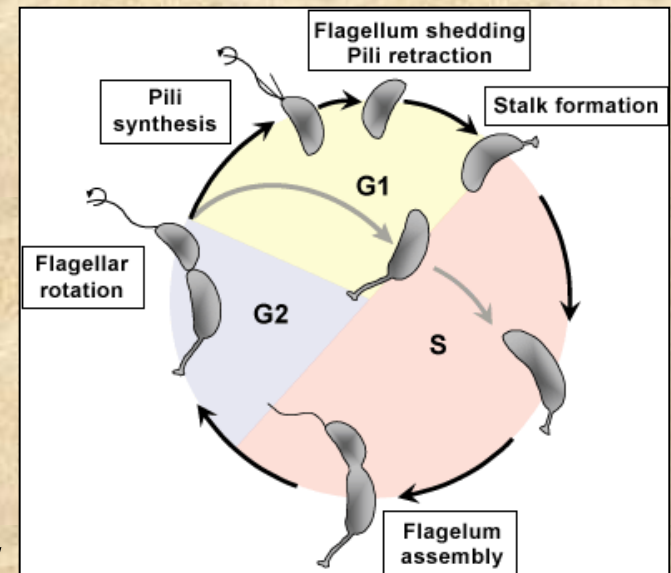
1) Prochází tento druh růstovými cykly?

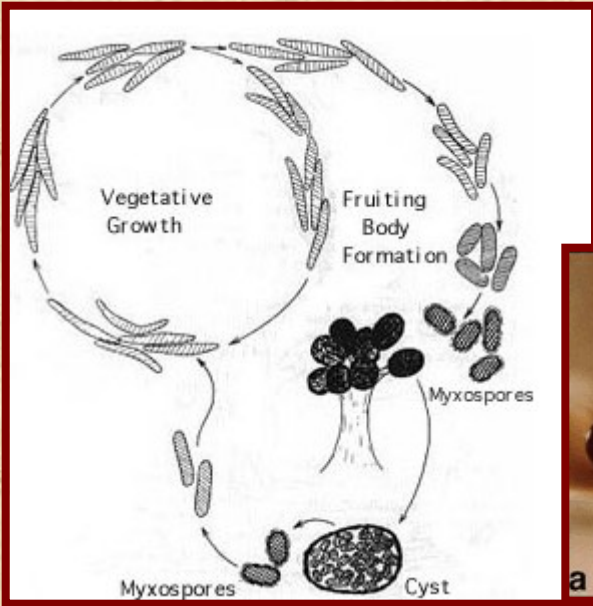
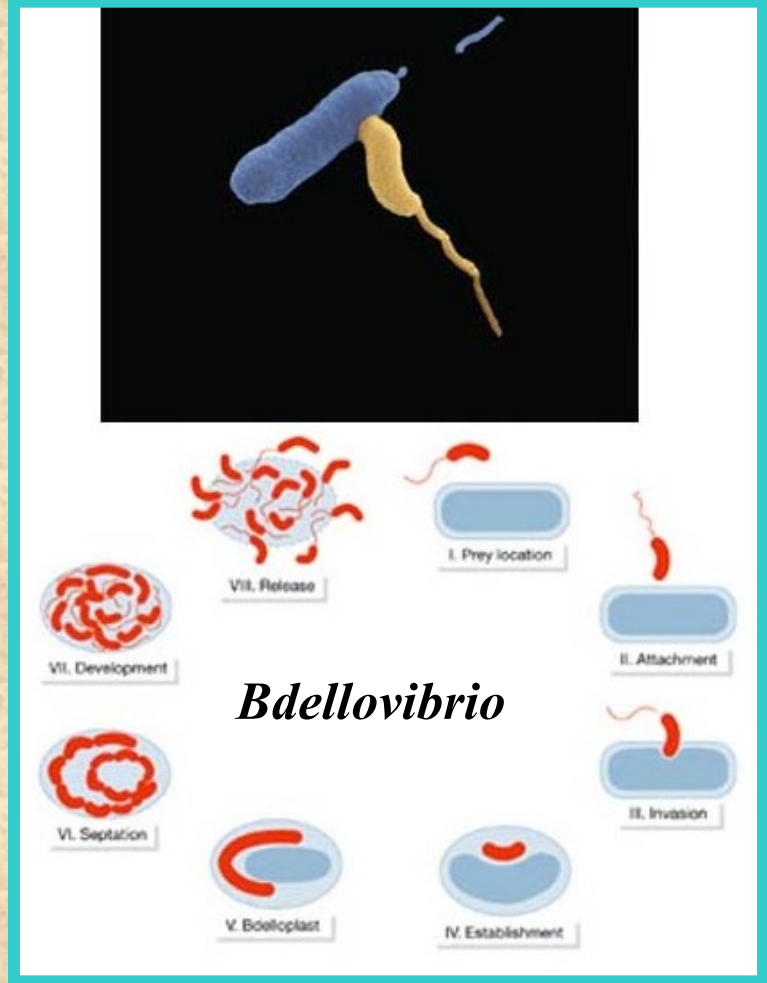
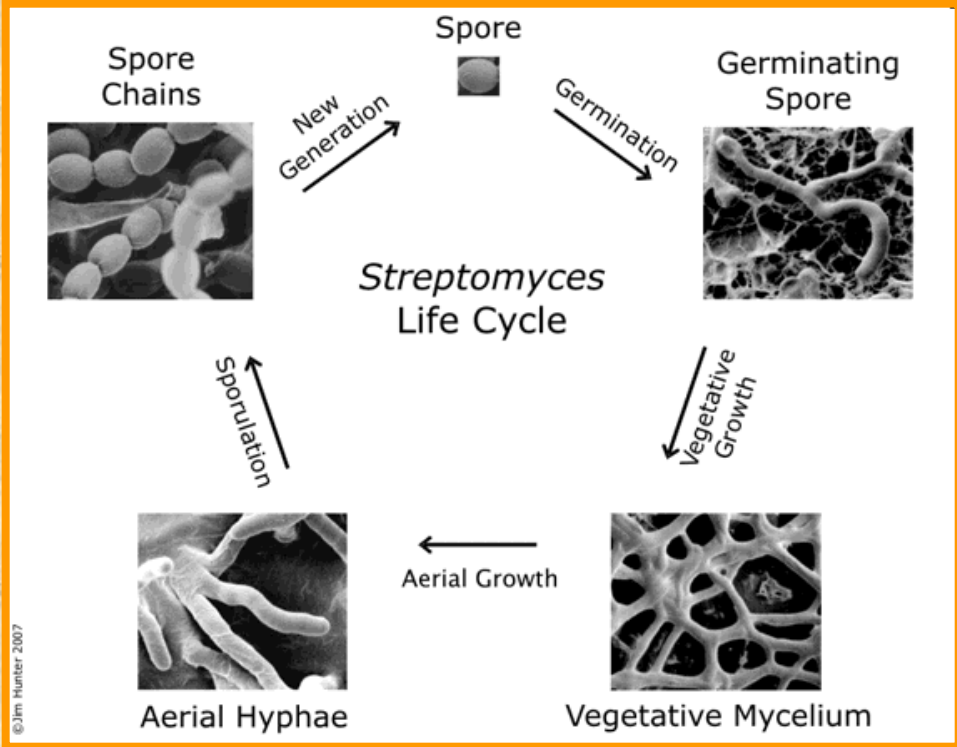
- v každém z nich má pak buňka jinou morfologii!

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

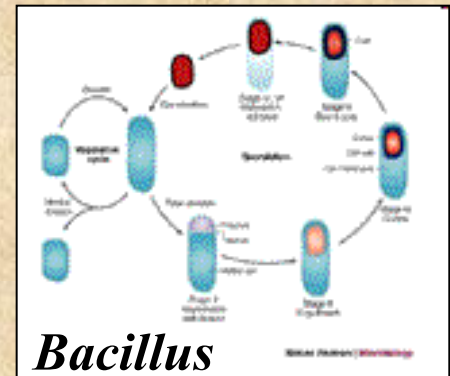
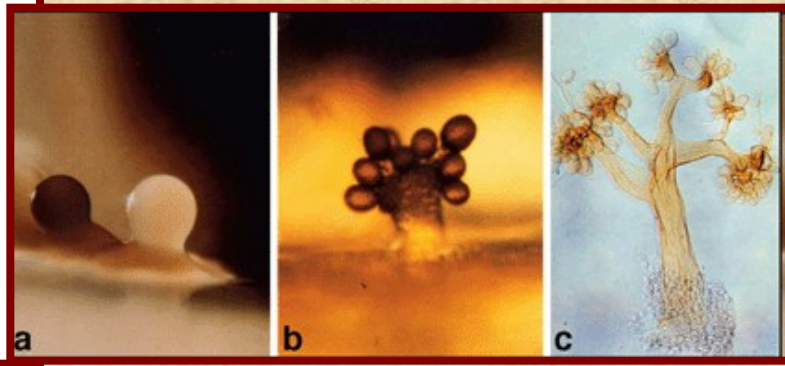
Mění se nejen vzhled buňky, ale buňka v cyklech prochází typickou změnou vnitřních struktur.

Buněčný cyklus
Caulobacter crescentus

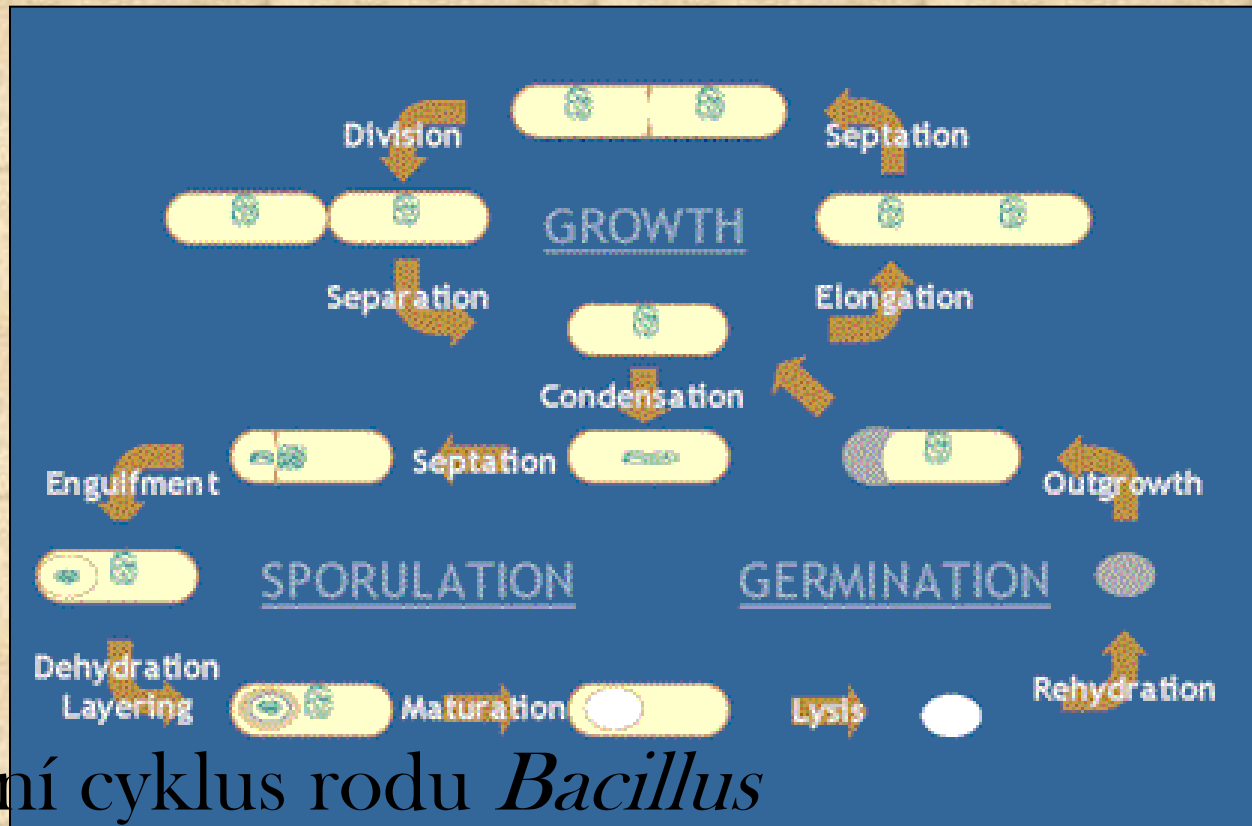




Myxobakterie



Morfologie buňky vprostřed buněčného cyklu



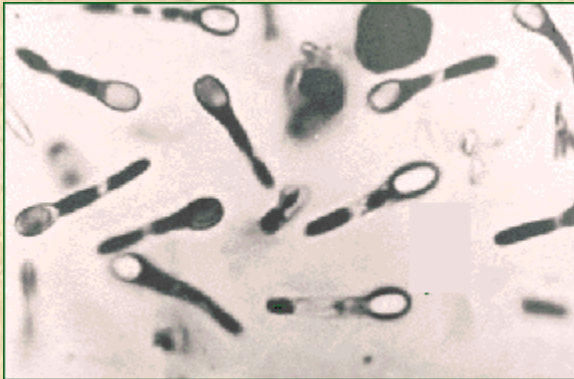
Životní cyklus rodu *Bacillus*

- u některých jeho druhů i u jiných rodů navíc různá barvitelnost Gramem při různém stáří buněk - až gramlabilní

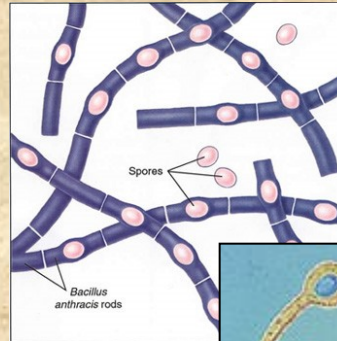
→ při popisu preparátu nutno uvažovat stáří buněk!

2) Vytváří posuzovaný druh endospory?

- v preparátu pak mohou měnit tvar buněk!



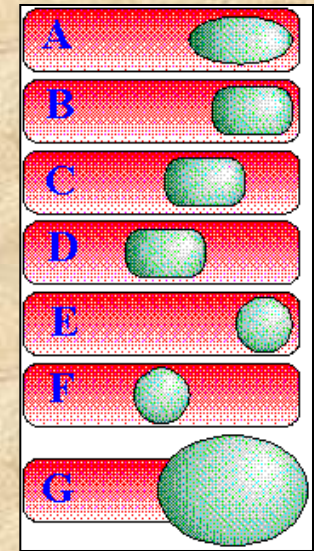
Clostridium difficile



Bacillus anthracis



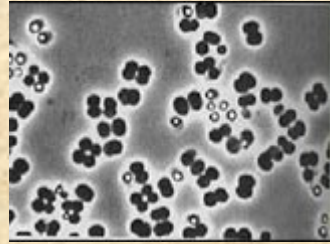
Clostridium tetani



„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

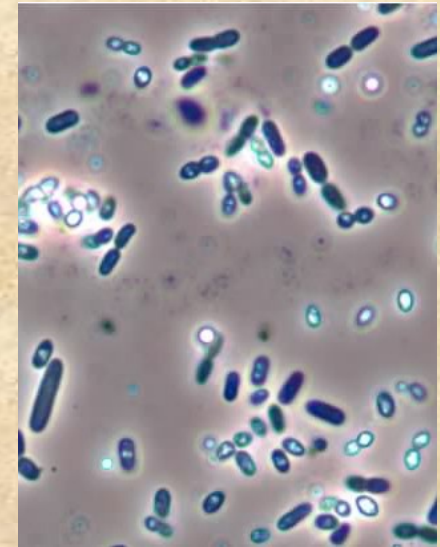
termorezistentní

*Bacillus, Clostridium, Sporosarcina,
Sporolactobacillus, Thermoactinomyces*

- G- bakterie - exospory

Méně rezistentní, odolné zejm. vůči vysychání

Azotobacter, Methylosinus

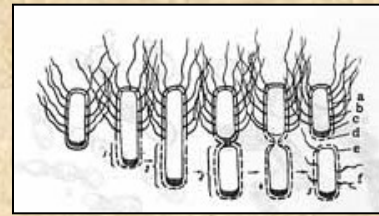


Azotobacter

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

- Konidie: Actinobacteria

3) Stárnutím mění buňky tvar

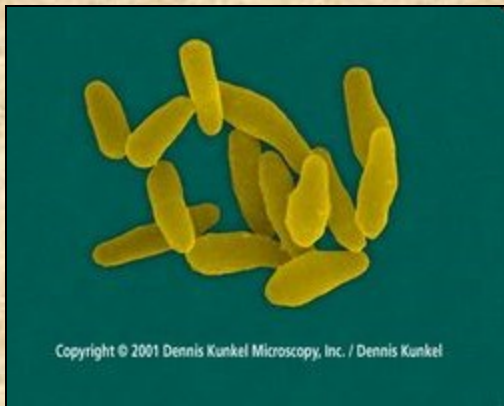


4) Závislost tvaru buňky na vnějším prostředí

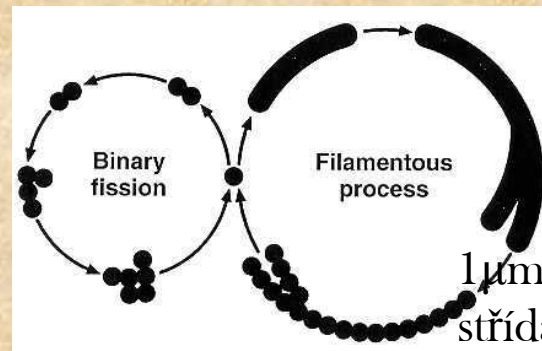
- živiny, tlak, osmolarita

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

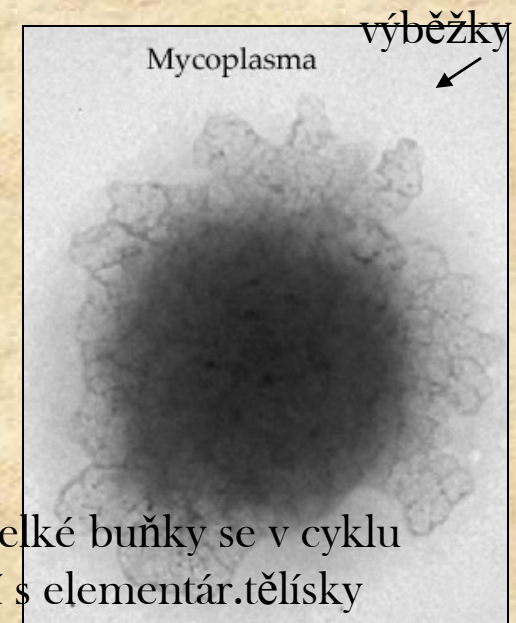
Pleomorfní mykoplazmata:
nejmenší bakteriální
buňky (0,2 - 0,3 μm);
bez buněčné stěny! Poté:
Nepíší beta-laktamy
Osmoticky stabilní v host.b.



Corynebacterium



1 μm velké buňky se v cyklu
střídají s elementár.tělísky



Co je možno vyčíst z tvaru buňky

- tvar buňky napovídá o metabolické aktivitě
(kokovité buňky vykazují max. metabol. aktivitu)

Cytologie

BAKTERIÁLNÍ BUŇKA x vs. eukaryotní

- nutno porovnat pro pochopení fyziologie
- bakteriální buňka méně diferencovaná, ale:
 - široký rozsah fcí membrány
 - adaptabilita, genetická a fyziologická flexibilita
 - málo buněčného materiálu, vysoká rychlost reprodukce
 - jiná komunikace mezi buňkami (receptory, quorum sensing, pili), jiná organizace genet. materiálu a membrány, jiný typ pohybu a dělení buňky, bakteriální b. nemají endocytózu
- reakce v cytoplazmě, periplazmatickém prostoru či mimo buňku!
- metody biochemické, mikroskopie – zde při pozorování struktur v preparátu pozor na artefakty (např. fixovaný preparát – mění podobu buňky)
- studijím cytologickým napomáhají studie fyziologické a genetické

- - ribozomy - rozdíl proti eukaryotům, proteiny, jiná molekul biol
- - genet materiál
- - bičík - struktura a fce (G- versus spirochety - periplazma, typy lokomoce), gradient p^+ ne ATP, pili, fimbrie - adheze, spiny
- - inkluze (karboxyzomy, magnetozomy, S, PHB, krystaly - thuringiensis)
- - pigmenty
- --- vztah k identifikaci, funkci pro buňku, pochopení fyziologie a naopak: př: morfologie genetického materiálu při kultivaci v různých mediích (jiná rychlost segregace a replikace genet. materiálu, jiná rychlost dělení buňky atd.)

- rozdíly ve strukturách v říši bakterií - G⁺ a G⁻ atd.
- Cytoplazmaticá membrána a buněčná stěna:

- peptidoglykan + složky v něm (teichoové k., mykolové kys)
- druhy bez buněčné stěny - kde v taxonomii
- CM membrána - poměry, fce a struktura proteinů, lipidů, vnější membrána G⁻, LPS, PS, LP, periplazma
- mezozomy, fce na membráně, fotosyntéza, typy metabolismu

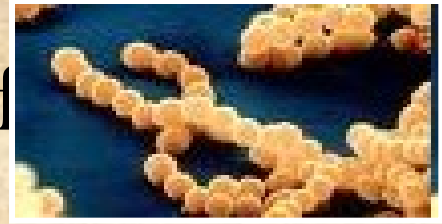
- Buněčné povrchy

- bílkovina, sacharid
- imunita makroorganismu

- **CYTOZOL.** často v prostředí (S-layer, pouzdra, slizy, biofilm)

Morfologie charakteristických shluků buněk

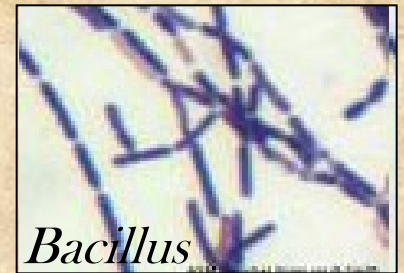
- typické shluky napomáhají identifikaci



řetízky koků: *Streptococcus*

Streptococcus

řetízky bacilů: *Bacillus*



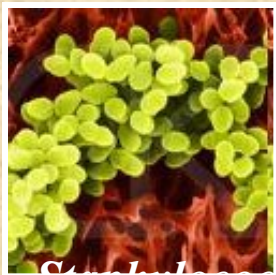
Bacillus

palisády: *Corynebacterium*

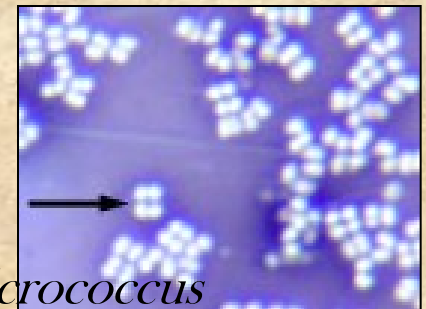
tetrády koků: *Micrococcus*

balíčky = sarciny *Sarcina*

hrozníčky: *Staphylococcus*



Staphylococcus



Micrococcus

Morfologie bakt. kolonií

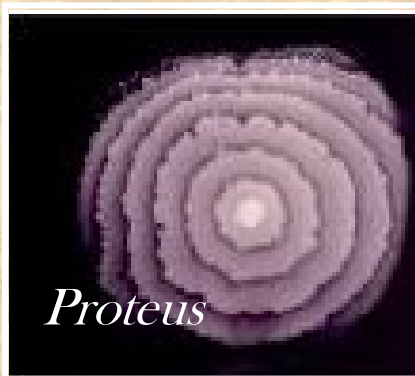
- potřeba zvážit typ media, ne kterém kolonie hodnotíme!
kultivace - zda vůbec kultivovatelné?? - sledování typu kolonií

Př: sledování morfologie kolonií

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

S-, R- a M-formy

sledování pohybu terasovitě kolonie (Př: *Proteus*)

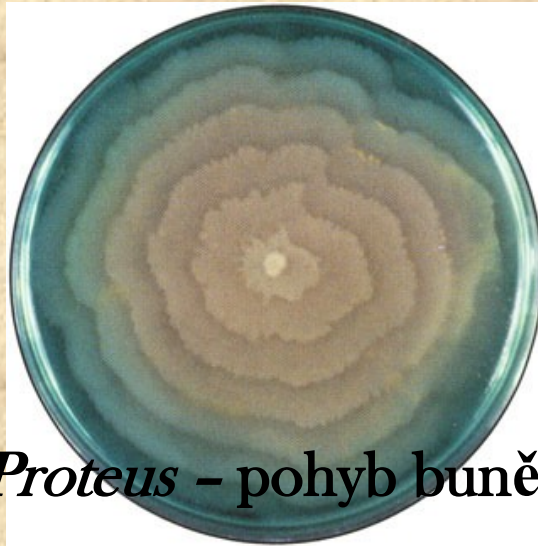


Morfologie bakteriálních kolonií

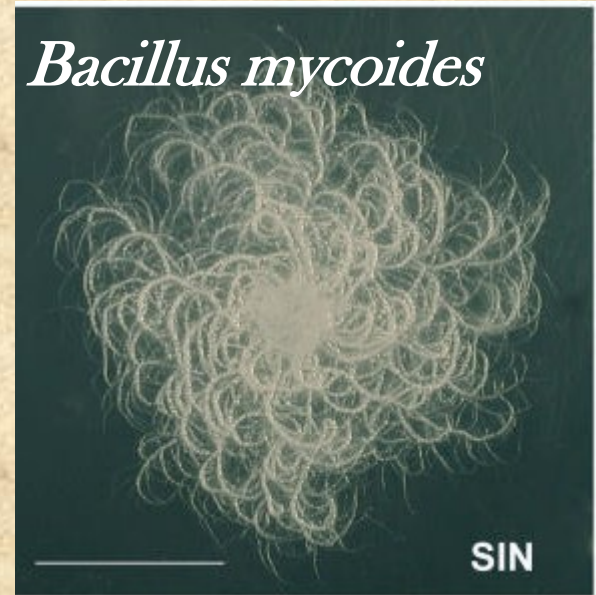
I. na základních půdách



Nocardia



Proteus – pohyb buněk



Bacillus mycooides



Streptomyces



Streptomyces



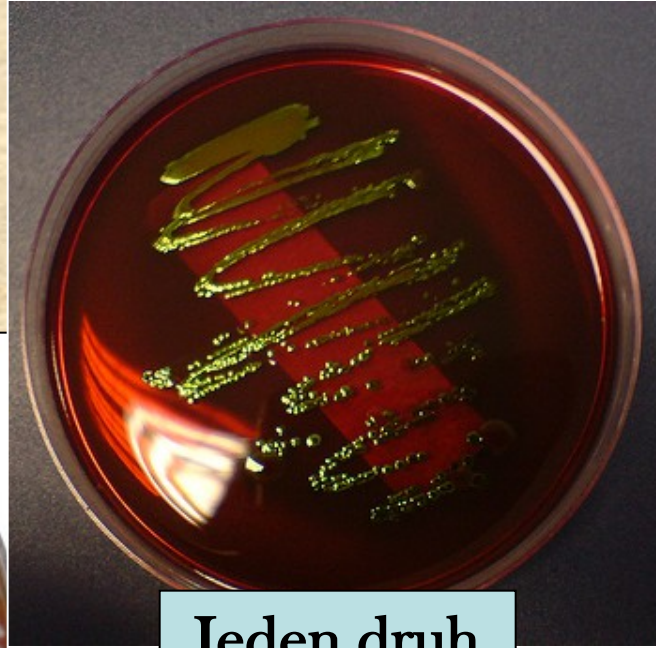
Serratia marcescens

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

Bakteriální kolonie na
II. diagnost. půdách



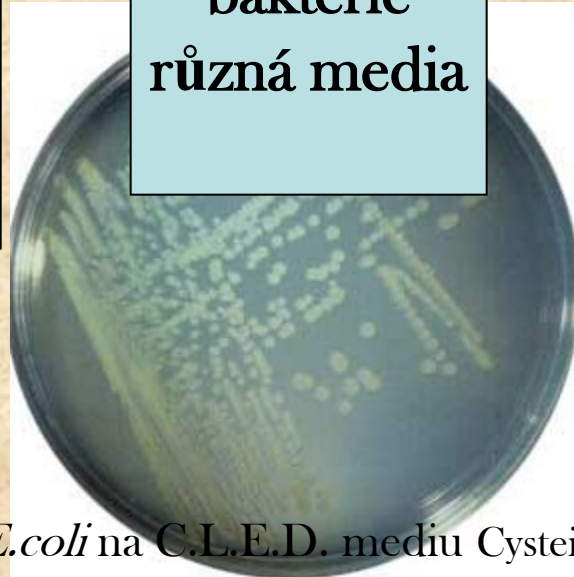
E.coli na krevním agaru



Jeden druh
bakterie
různá media



E.coli na MacConkey agaru



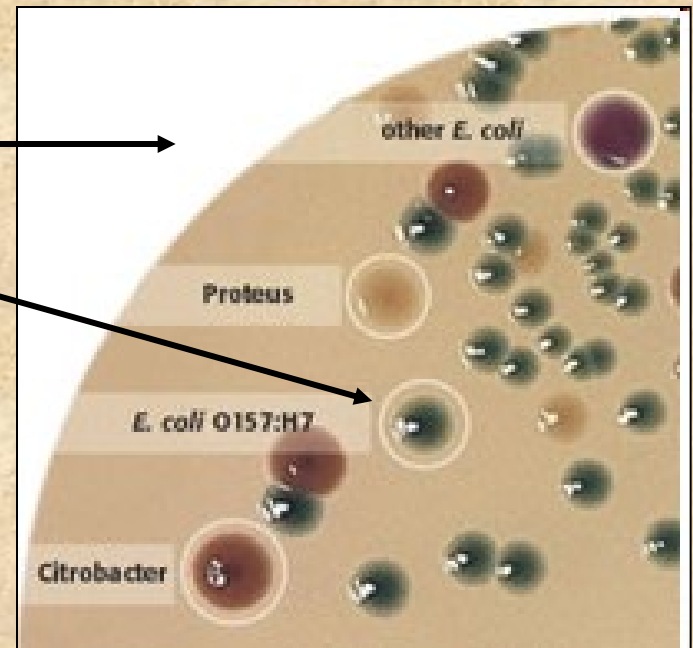
E.coli na C.L.E.D. mediu Cysteine Lactose Electrolyte Deficient Agar



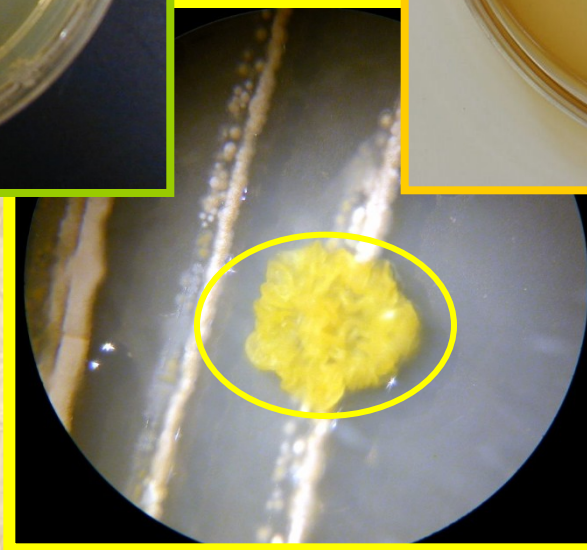
Bakteriální kolonie na III. selektivních půdách

O157:H7 ID Agar

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



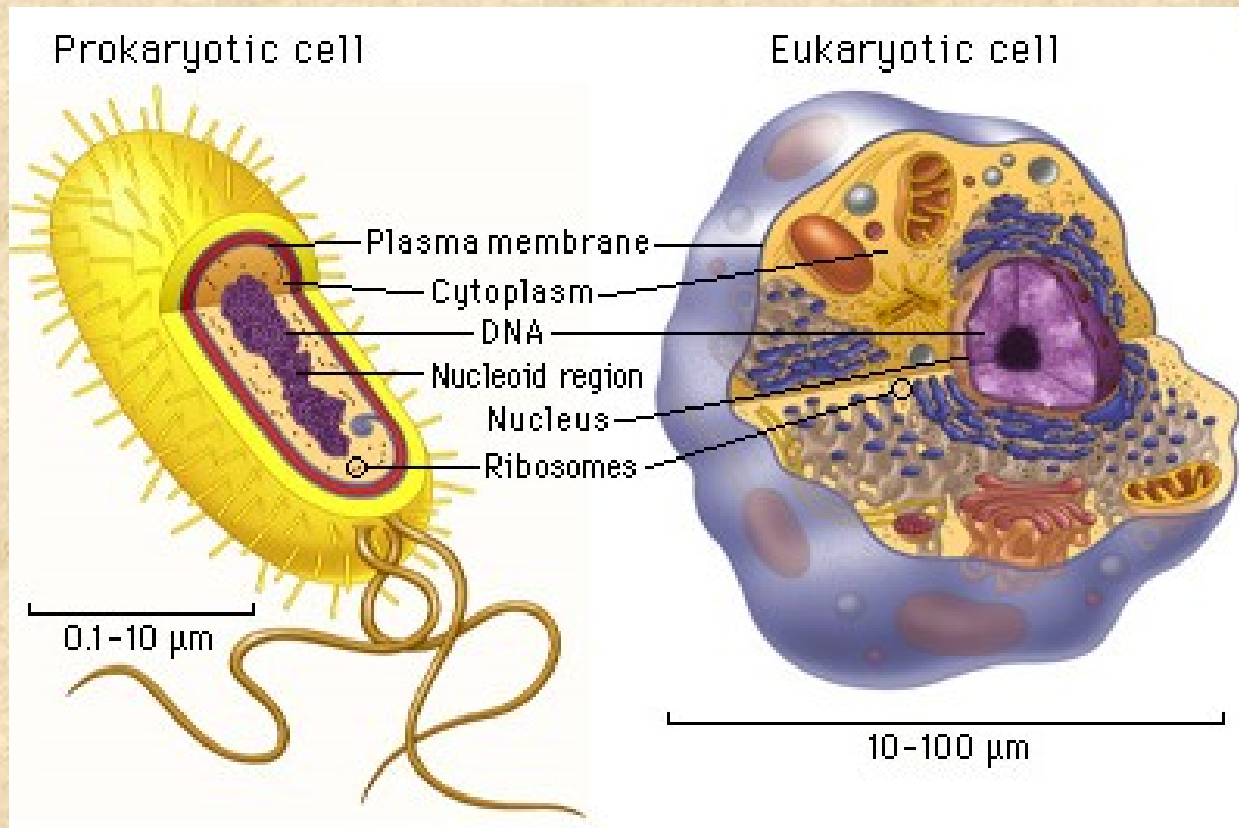
Kontaminace na misce!



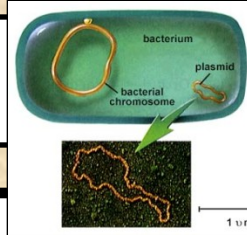
Cytologie

BAKTERIÁLNÍ BUŇKA x vs. eukaryotní

- nutno porovnat pro pochopení fyziologie



Zvláštnosti prokaryotické buňky

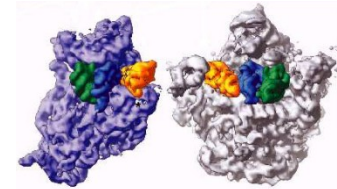


- živý, otevřený systém schopný regulace a autoreprodukce
- jádro neodděleno od CPL membránou, větš. kruhová (i lineární) DNA
- haploidní buňky (1 alela) množící se nepohlavně
- bez buněčných organel, jediná membrána je cytoplasmatická
- ribosomy se liší od ribosomů eukaryotních buněk - menší, volně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

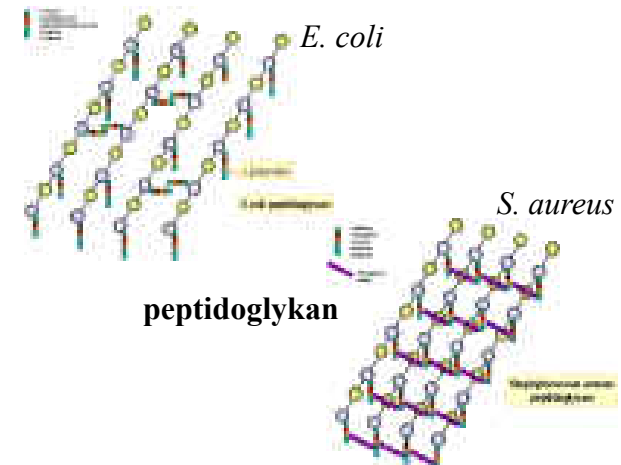
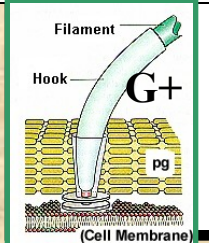
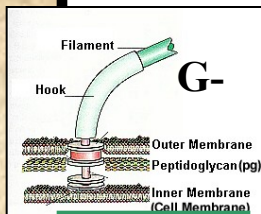
steroly v membránách zcela výjimečně

bičík - globul. bílk. flagelin, pohyb rotací

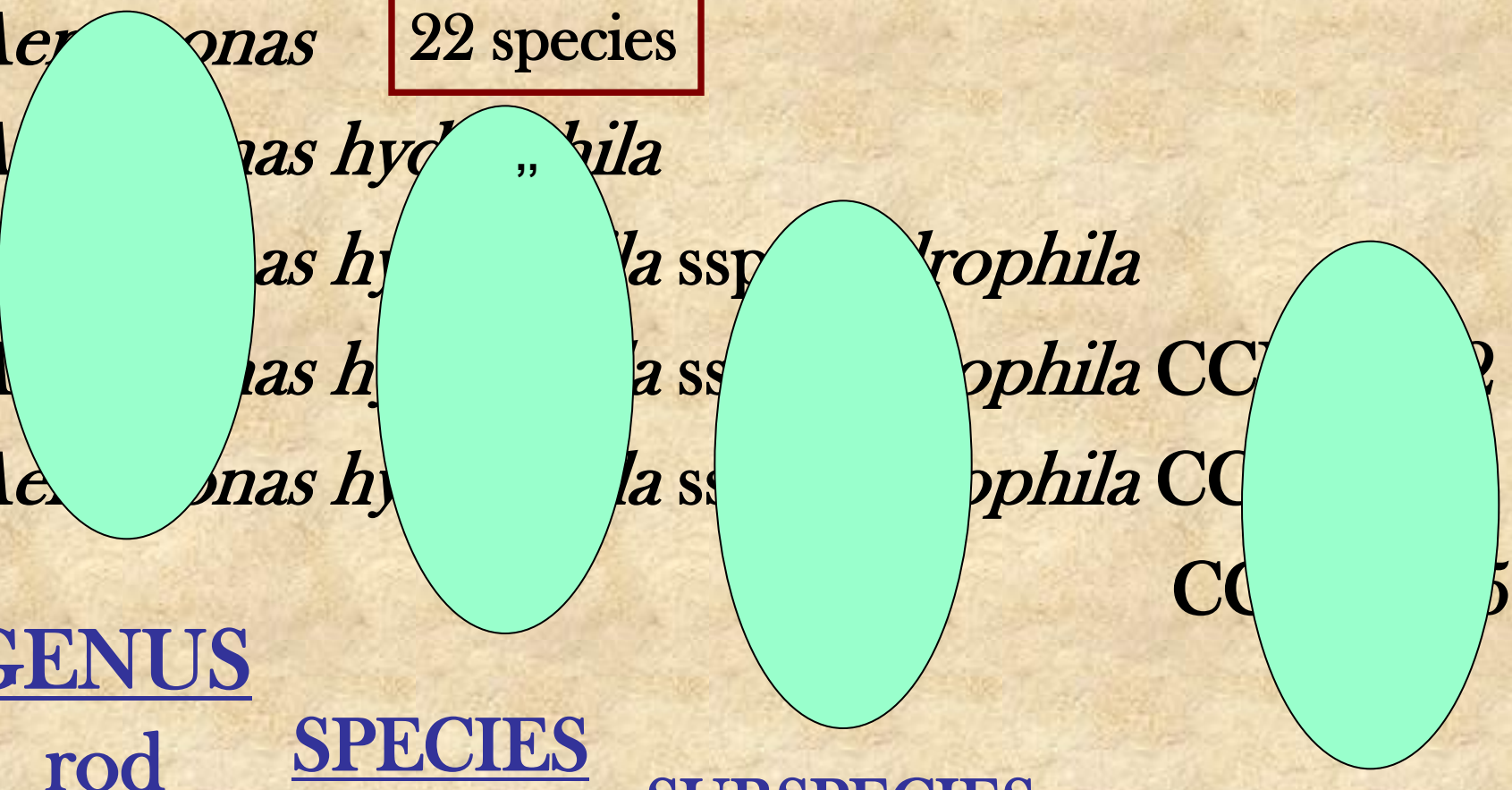
anaerobiosa, schopnost vázat N

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* CC7
 - *Aeromonas hydrophila* ssp. *hydrophila* CC5
- GENUS
rod
- SPECIES
druh
- SUBSPECIES
poddruh
- STRAIN
kmen
- 
- The diagram illustrates the taxonomic classification of the genus
- Aeromonas*
- . It features a list of five entries, each with a green oval highlighting a specific taxonomic level. The first oval covers the genus name. The second oval covers the species name. The third oval covers the subspecies name. The fourth and fifth ovals cover the strain identifiers. A vertical arrow on the right side points downwards, indicating the increasing level of specificity from genus to strain.

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

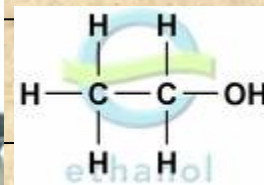
!!



:



případně



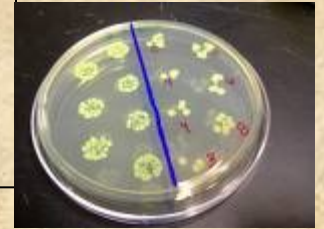
ethanol

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 - prosím příprava

