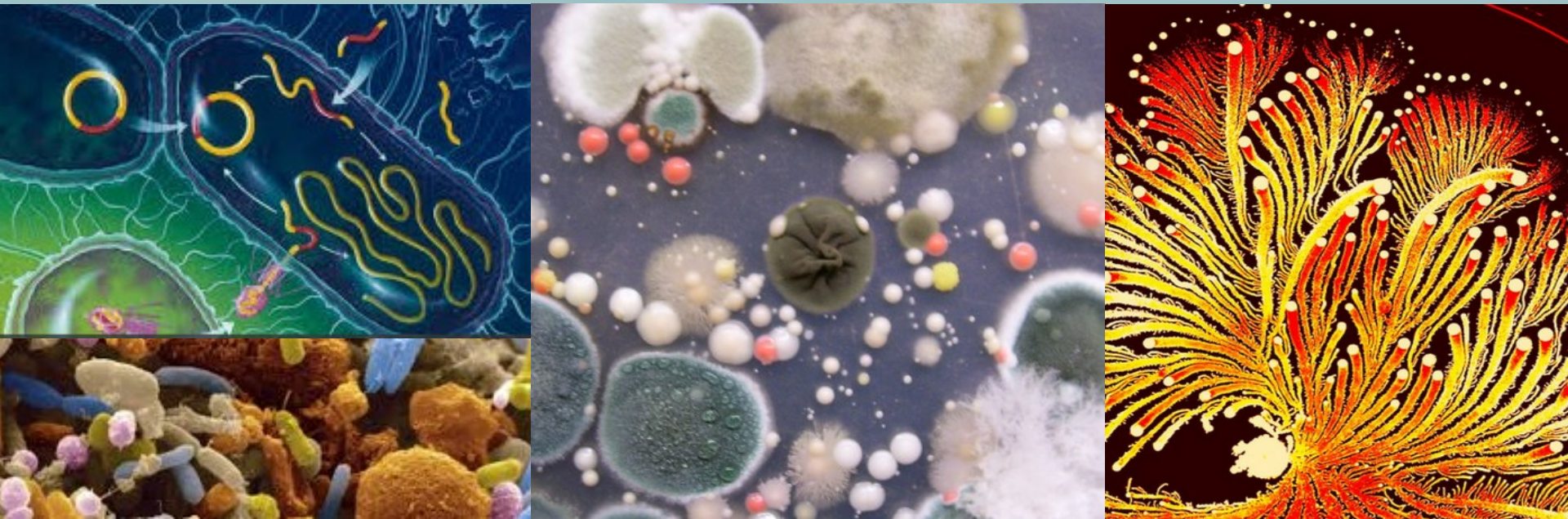
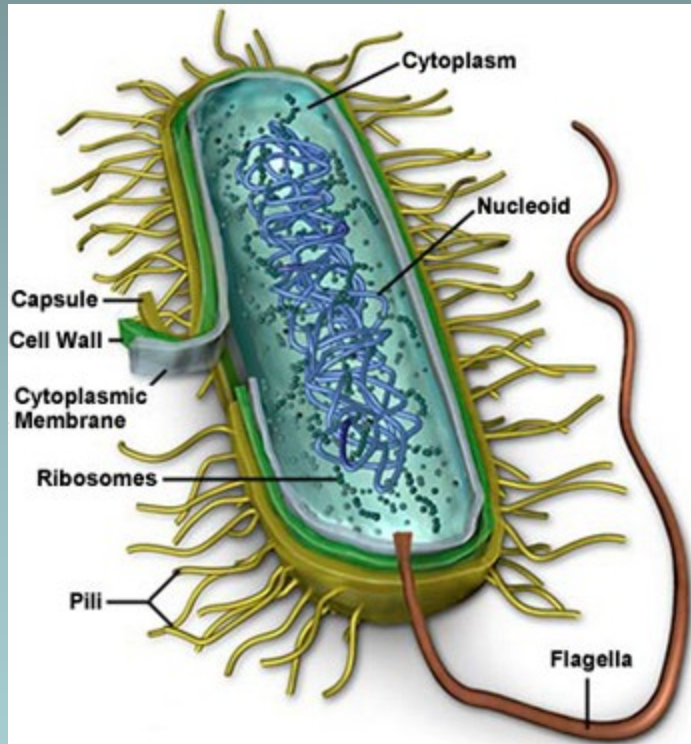


Cytologie a morfologie bakterií

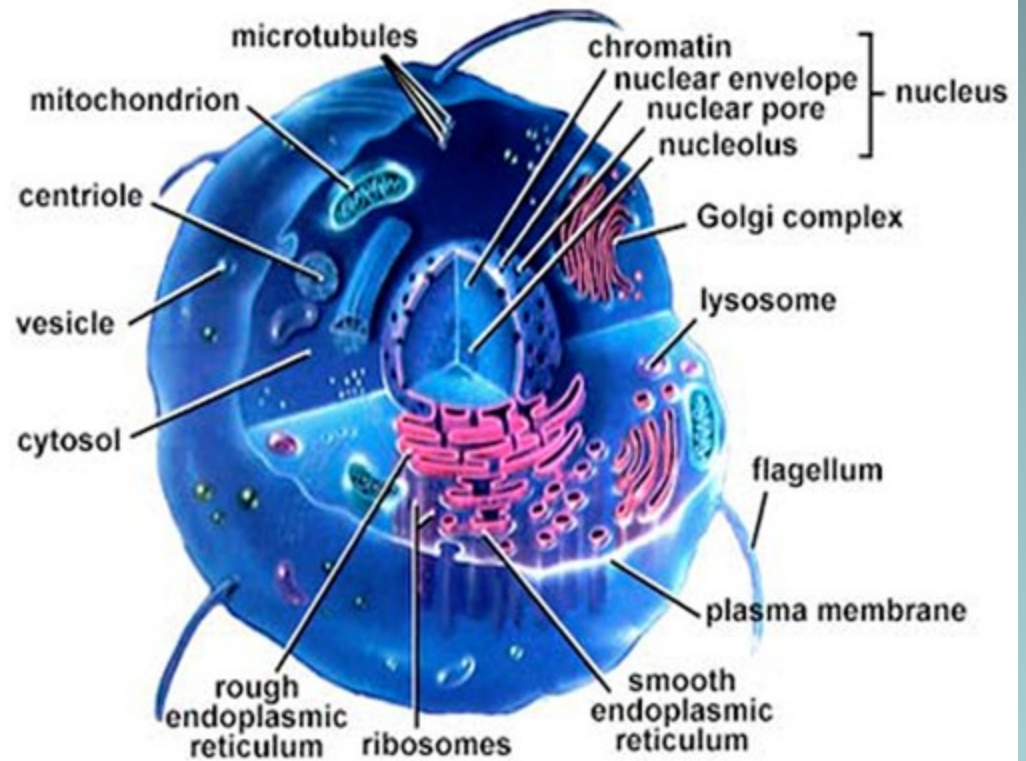


I.

Unikátní vlastnosti prokaryotických buněk



prokaryotic cell

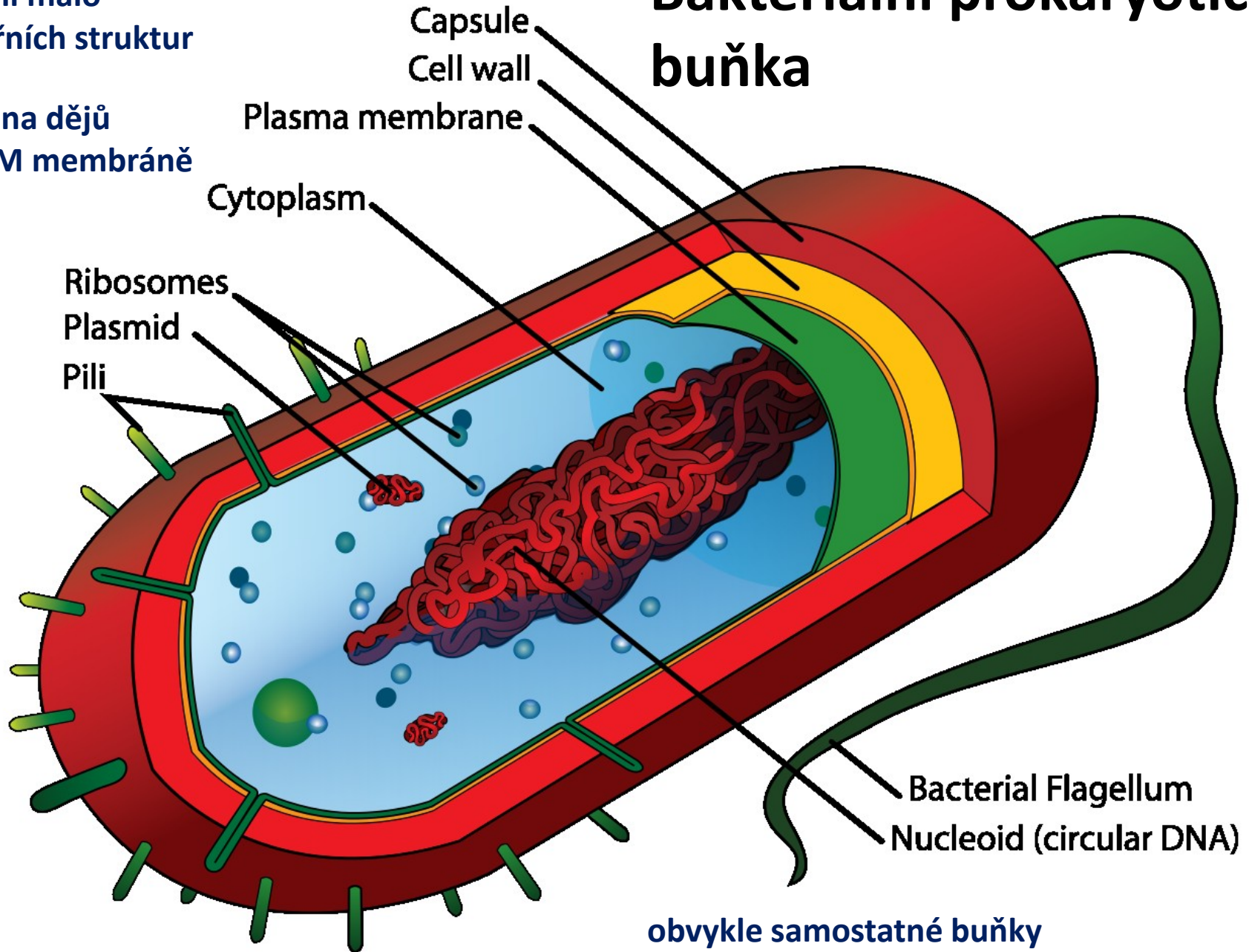


eukaryotic cell

Bakteriální prokaryotická buňka

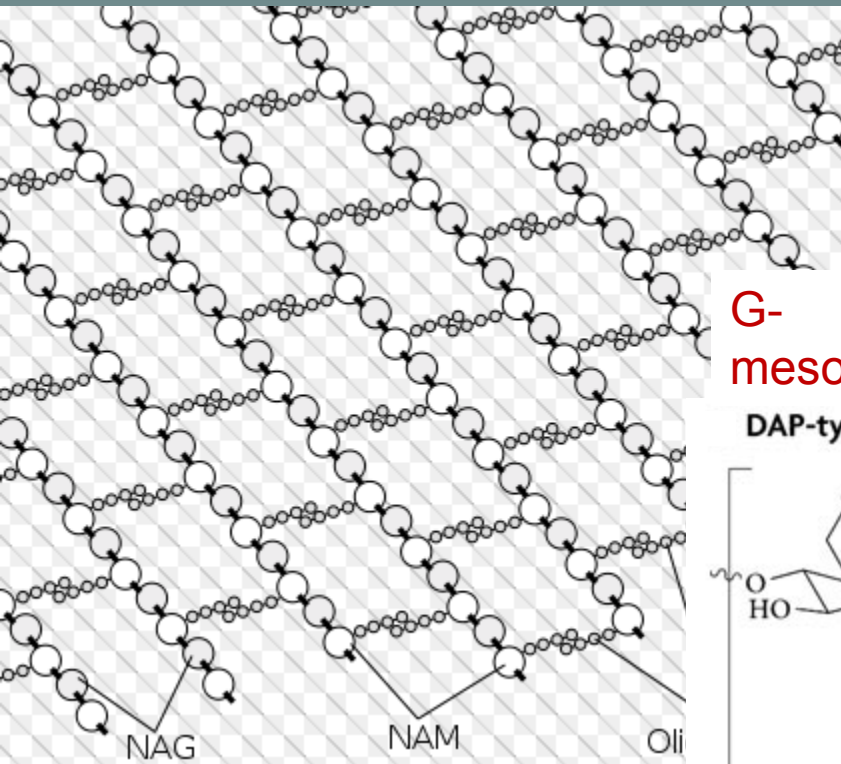
Velmi málo
vnitřních struktur

Většina dějů
na CM membráně



obvykle samostatné buňky

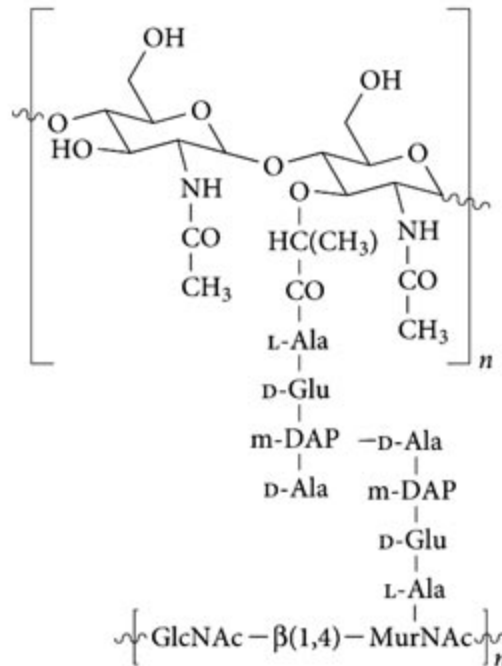
Peptidoglykan



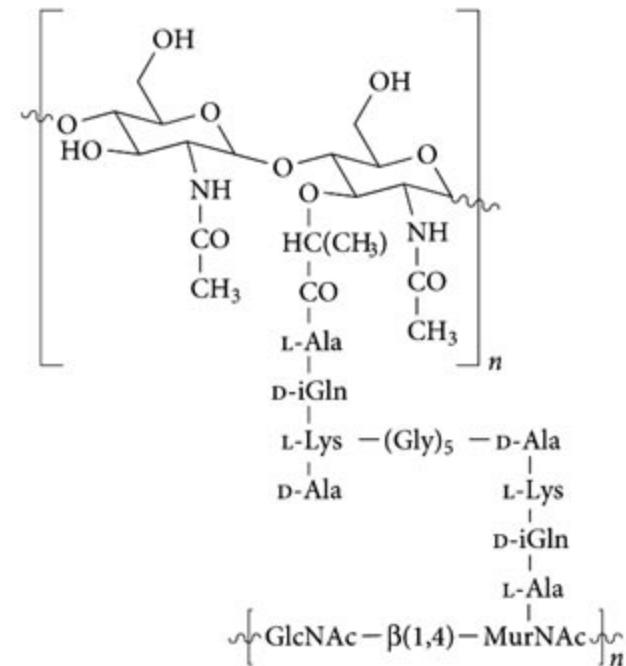
G-
meso-diaminopimelová kys.

G+
L-lysin

DAP-type peptidoglycan

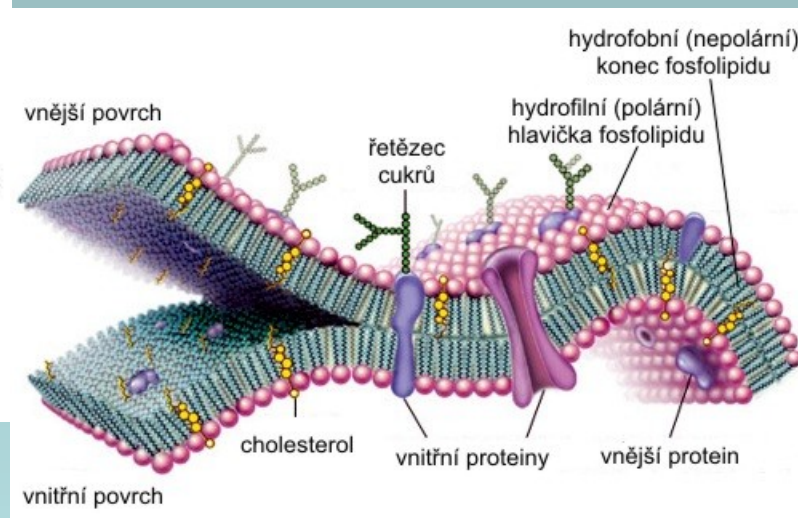
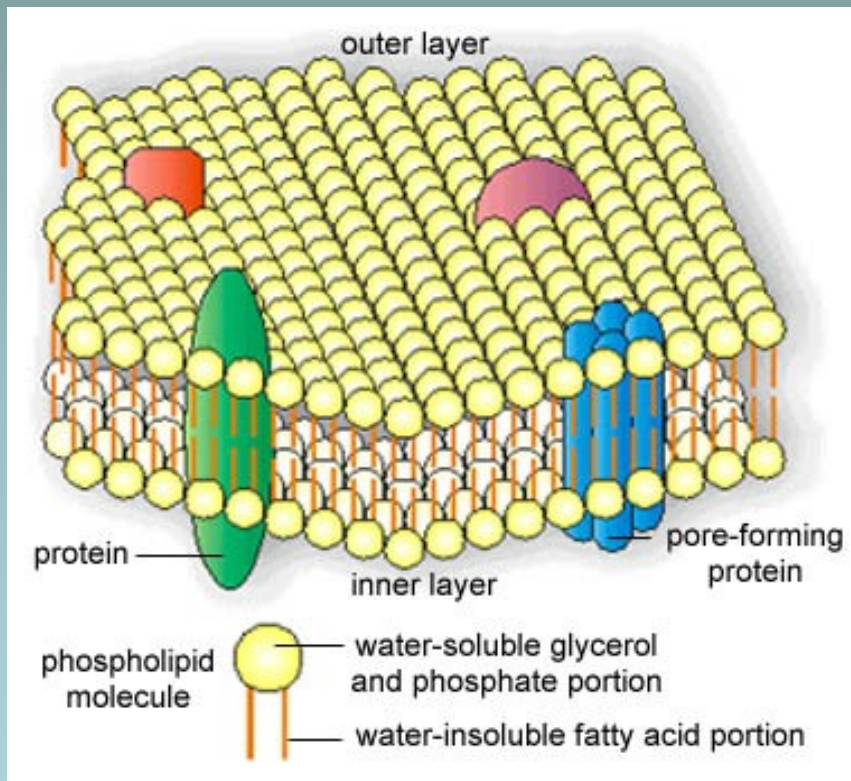


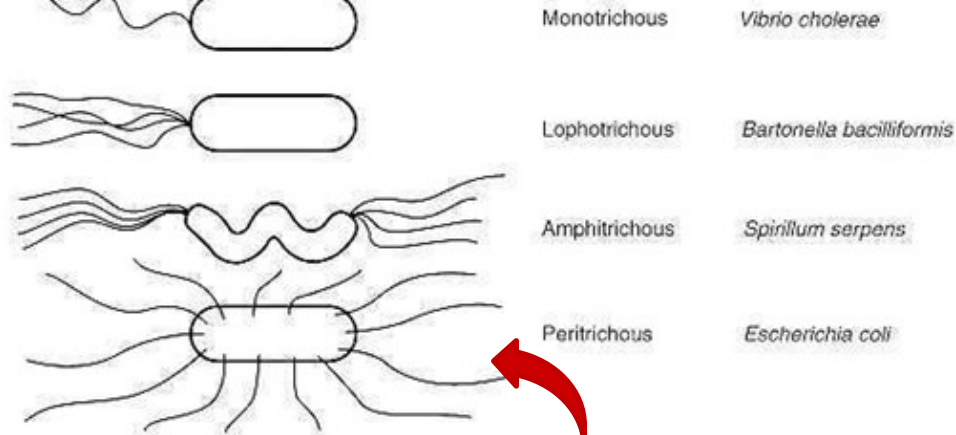
Lys-type peptidoglycan



Stěna spory: jiné a unikátní složení peptidoglykanu!

„Model tekuté mozaiky“ tvořený tekutou fází lipidů je prostoupen globulárními proteiny, které jsou jednak periferní (umístěné na povrchu membrány) a integrální, prostupující celou membránu.

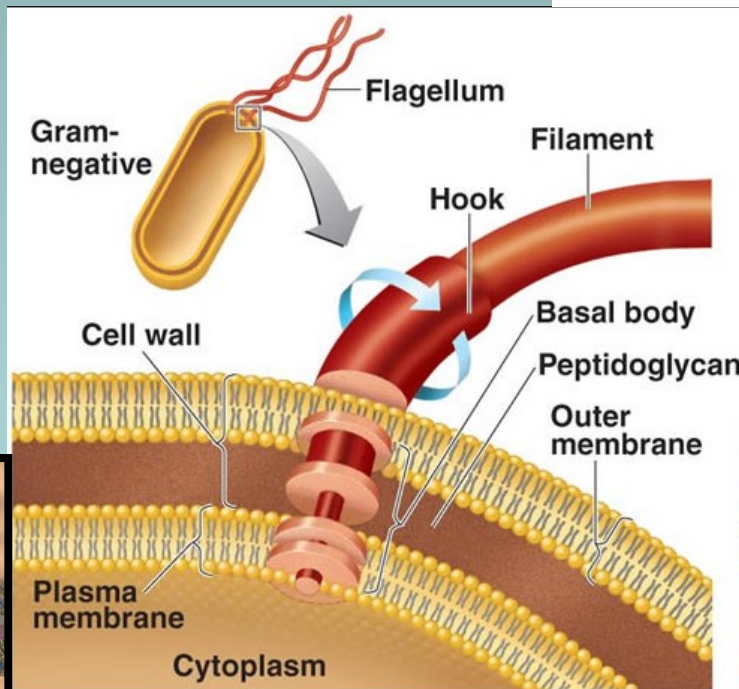
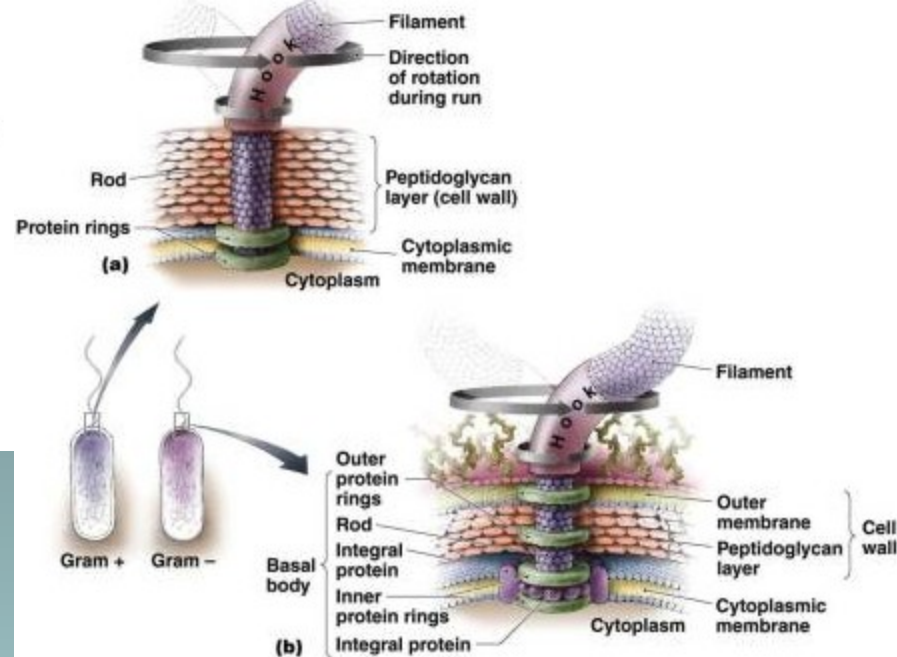




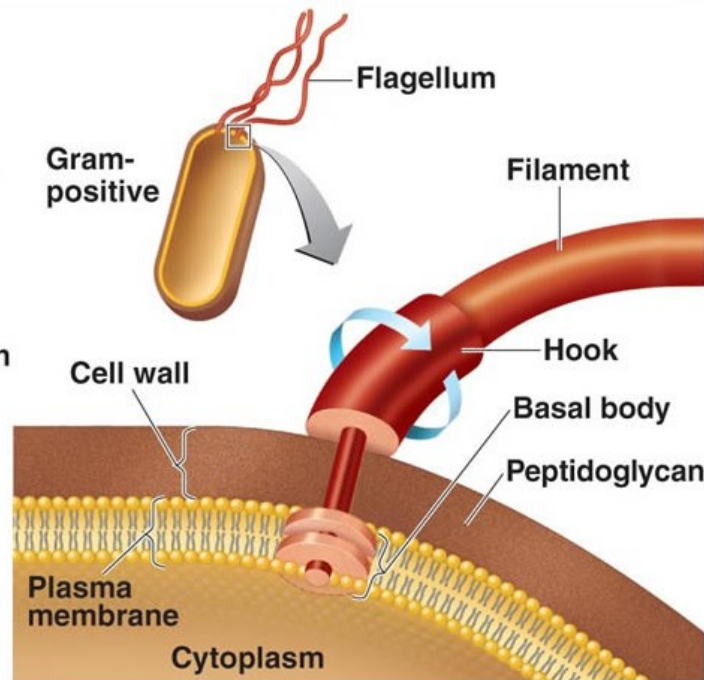
Uspořádání: taxonomický znak

Bičík

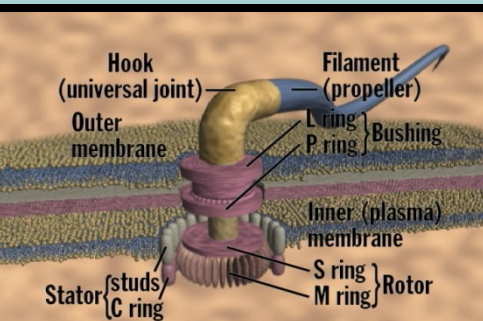
Rozdíl mezi G+ a G-

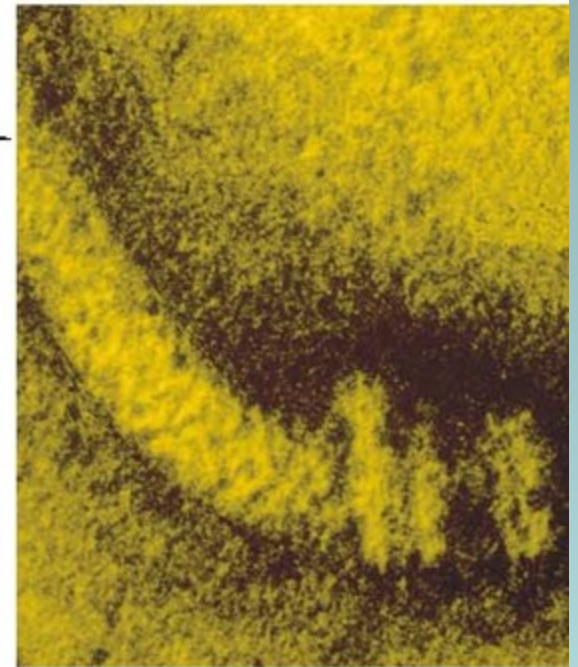
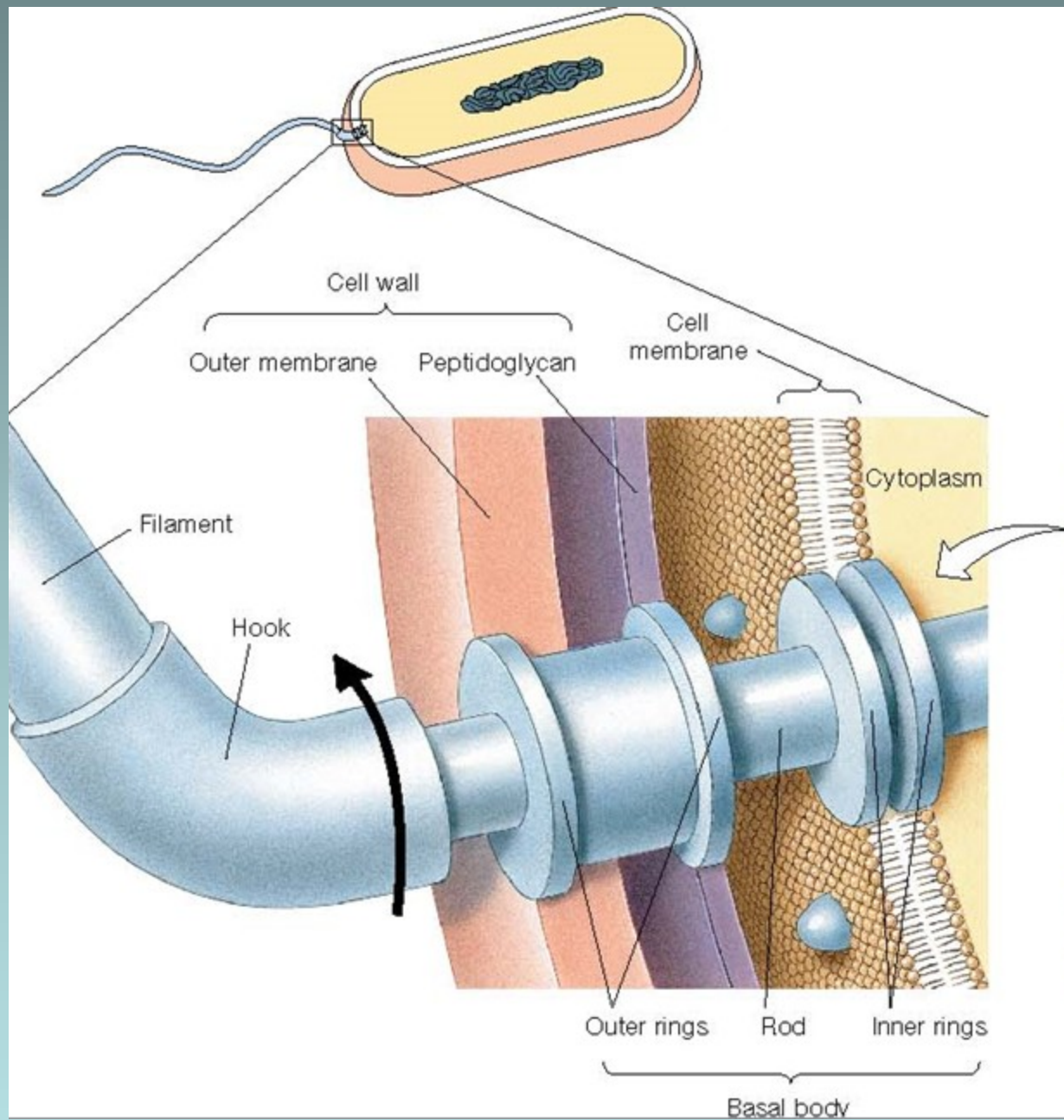


(a) Parts and attachment of a flagellum of a gram-negative bacterium



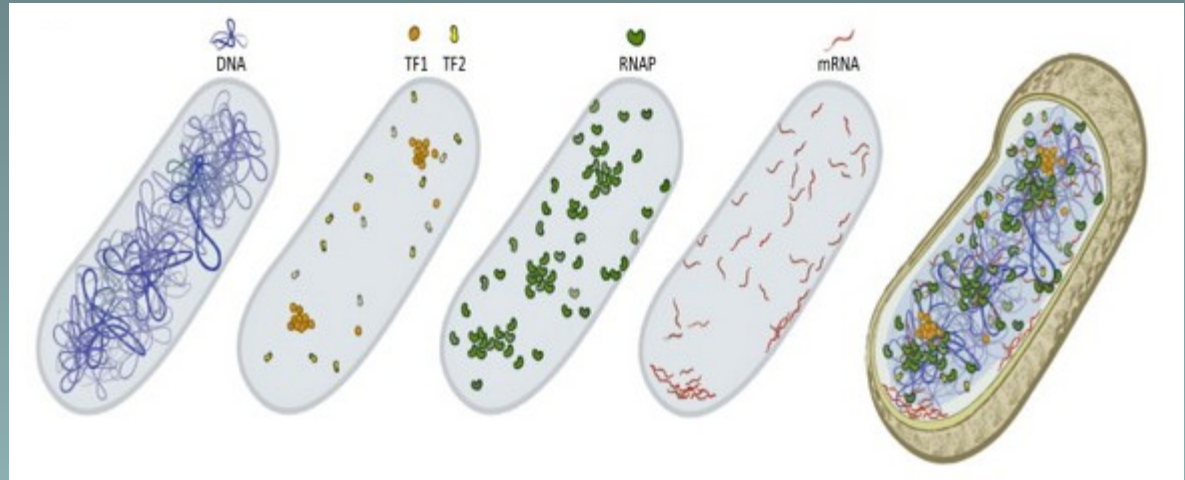
(b) Parts and attachment of a flagellum of a gram-positive bacterium





Cytoplazma

- Organizovaná
- Difúze či řízené mechanismy



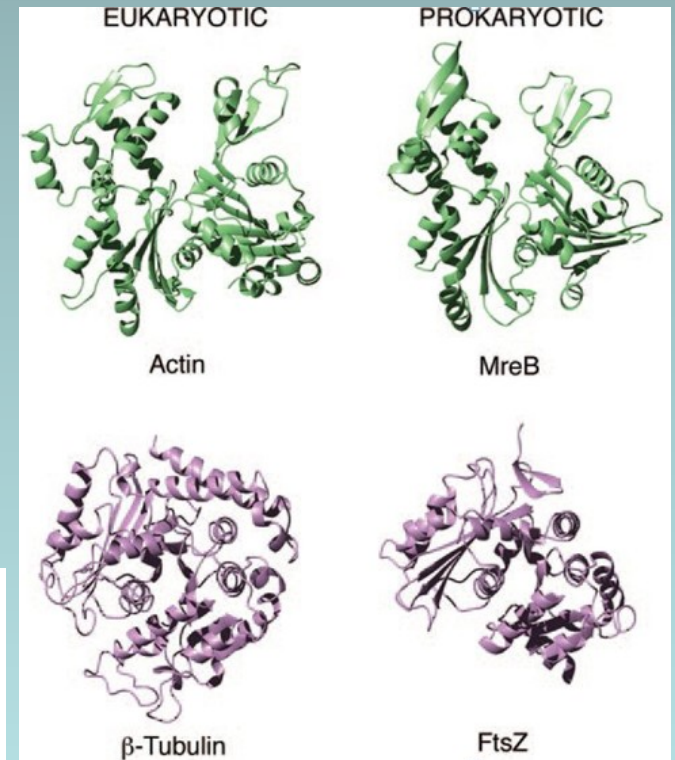
Weng and Xiao; 2014

Bakteriální cytoskelet

Bakteriální buňka obsahuje řadu **vláknitých proteinů** nutných pro:

- regulaci tvaru buňky
- buněčné dělení a
- segregaci chromozomů
- rozdělování plazmidů
- buněčné polaritě

Jsou analogické všem třem cytoskeletárním strukturám eukaryotní buňky (3D strukturou a biochemickými vlastnostmi)



	Division	Polarity	Shape
Eukaryotes	Tubulin	Actin	Intermediate filaments
Prokaryotes	FtsZ	MreB	CreS

Bakteriální buňka je polarizovaná

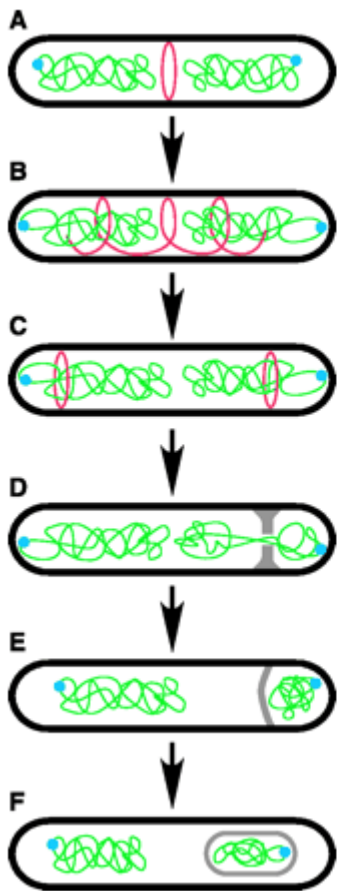
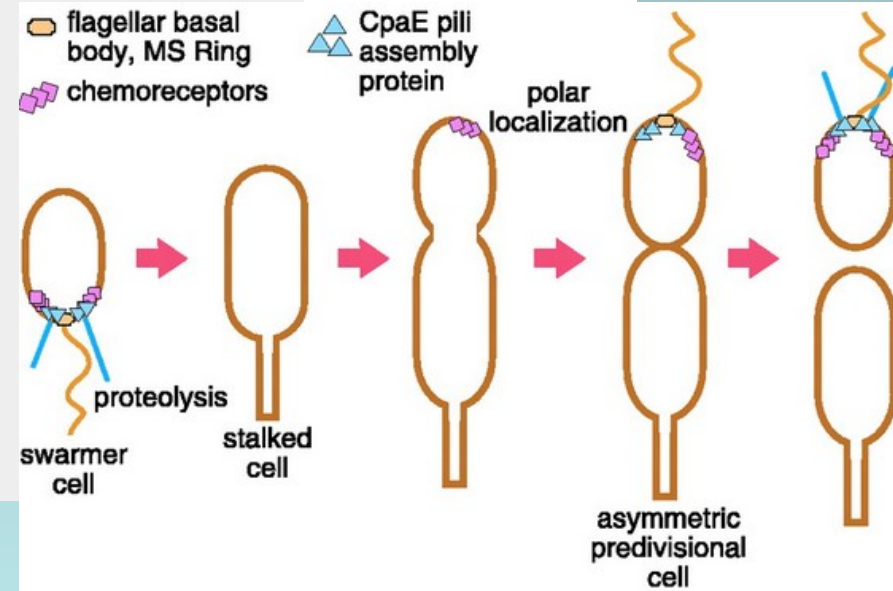


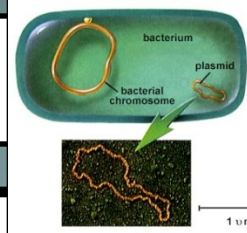
Figure 4.

Polarization during sporulation. (A to C) The origin regions (blue) of the two chromosomes (green) localize to extreme opposite poles while the medial Z ring (red) is redeployed into two polar rings via a helical intermediate. (D) One of the polar Z rings is converted into a polar septum (gray), creating forespore and mother cell compartments and trapping the origin-proximal region of a chromosome in the forespore. The remainder of the chromosome is pumped across the septum. (E and F) The septal membranes migrate around the forespore, engulfing it within the mother cell.

Shapiro; 2002



Zvláštnosti prokaryotické buňky



- **živý, otevřený systém** schopný **regulace a autoreprodukce**
- **jádro** neodděleno od CPL membránou, větš. kruhová (i lineární) DNA, bez intronů
- **haploidní buňky** (1 alela)
- bez buněčných organel, jediná membrána je **cytoplasmatická**
- **ribosomy** se liší od ribosomů eukaryotních buněk – menší, volně v CPL
16S rRNA (malá podjednotka), 5S rRNA a 23S rRNA (velká p.)

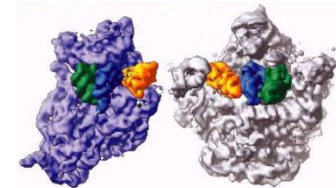
translace začíná N-formylmethioninem

specifické struktury a vlastnosti bakt. buňky:

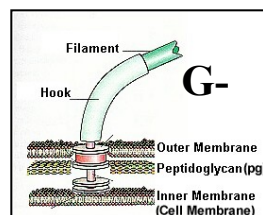
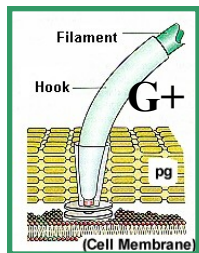
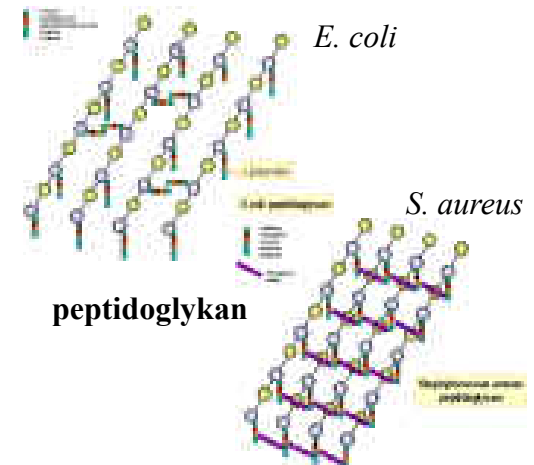
peptidoglykan (až na mykoplasmata)

steroly v membránách zcela výjimečně

bičík – globul. bílk. flagelin, pohyb rotací



bakteriální ribozom



Bacteria vs. Archaea !!



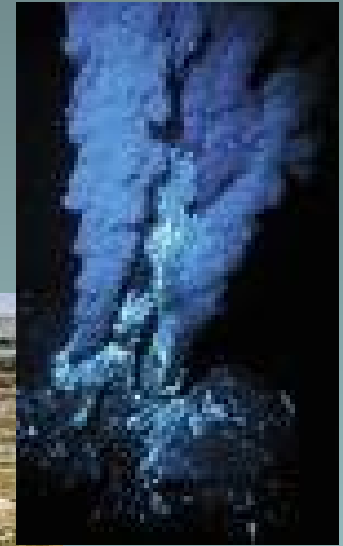
Archea – extrémní podmínky:

strukturní shody
ale rozdílné chemické složení

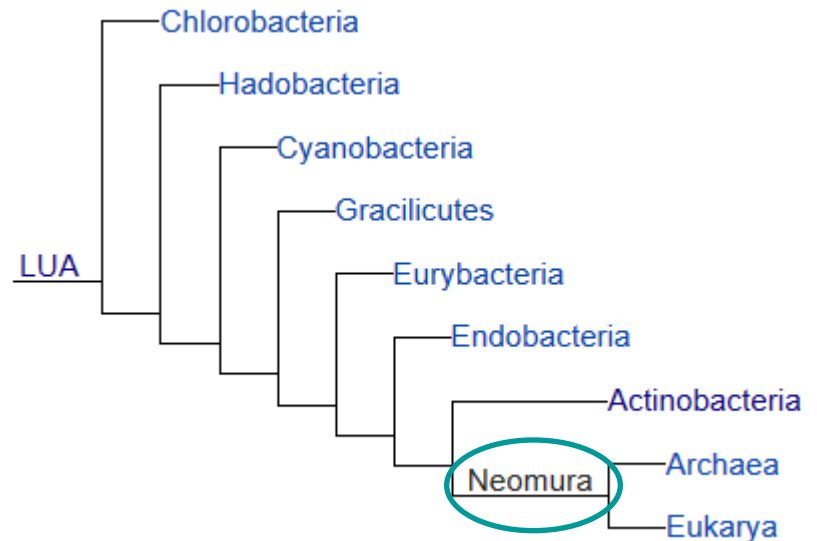
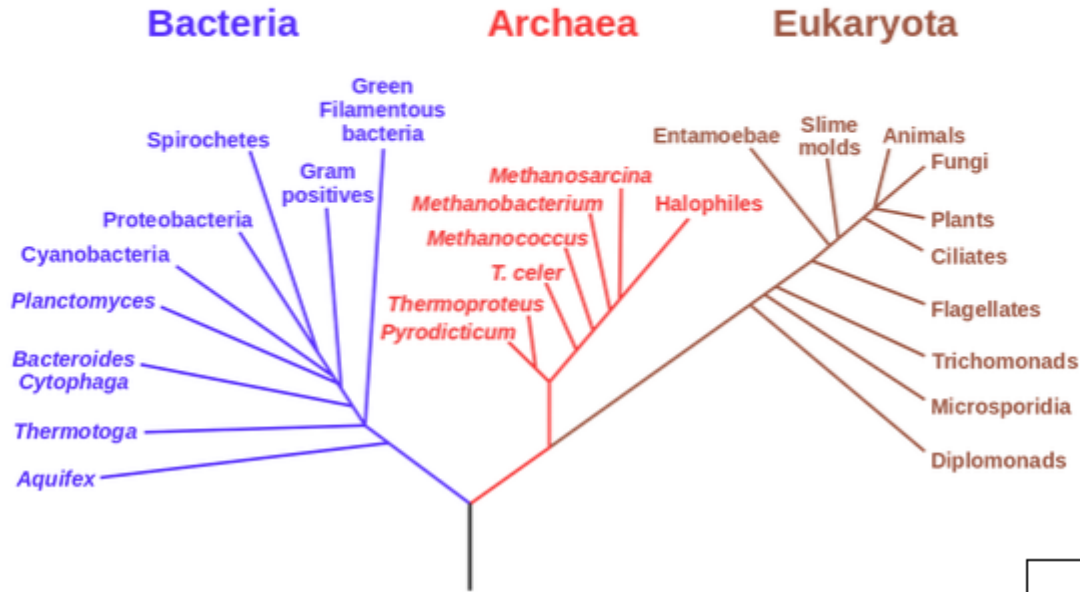
- ---- rozdílná citlivost na ATB

• **PSEUDOPEPTIDOGLYKAN**

- CM – 1 vrstevná
- tRNA archeí podobná eukaryotické



Phylogenetic Tree of Life



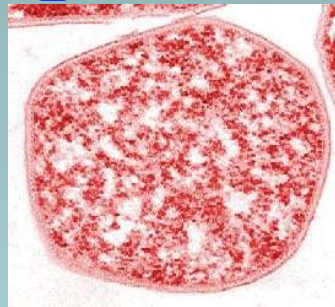
Cytoplazmatická membrána archeí

Sulfolipidy, glykolipidy, nepolární isoprenoidní lipidy, fosfolipidy, větvené lipidy, mnoho proteinů v membráně

FOSFOLIPID:

- (1) chiralita glycerolu (L-glycerol; dáno enzymy)
- (2) etherové vazby - glyceroldiether, tetraether = jiné chem.vlastnosti fosfolipidů
- (3) řetízky isoprenoidů namísto MK
- (4) větvení isoprenoidu

Nepřítomnost sterolů

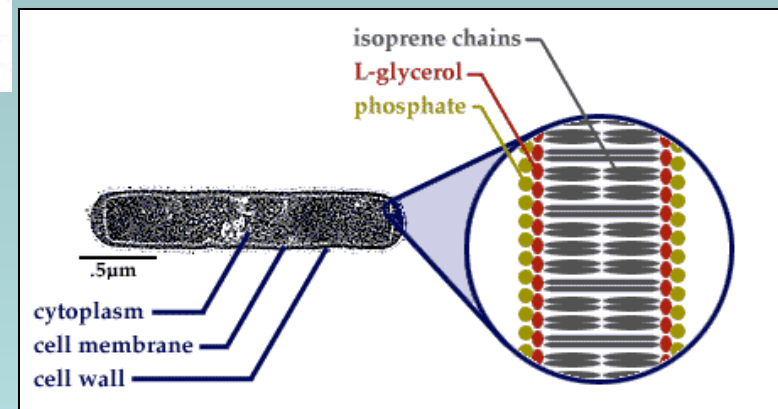
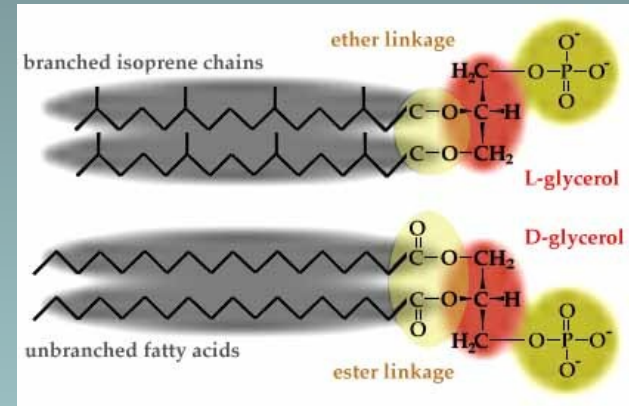


Často jednovrstevná

glycerolové jednotky na obou koncích MK tvoří 1vrstvu

Lepší přizpůsobení extrémům

– monolayer rezistentnější k narušení teplem

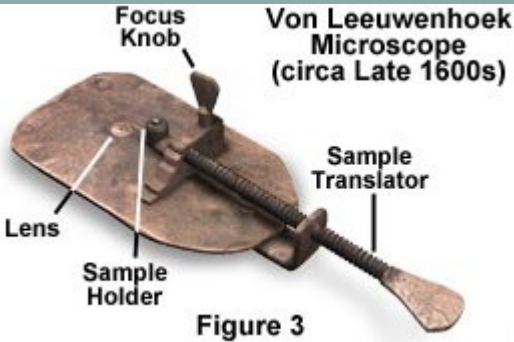


II. Volba správného typu mikroskopie pro pozorování cytologických a morfologických znaků

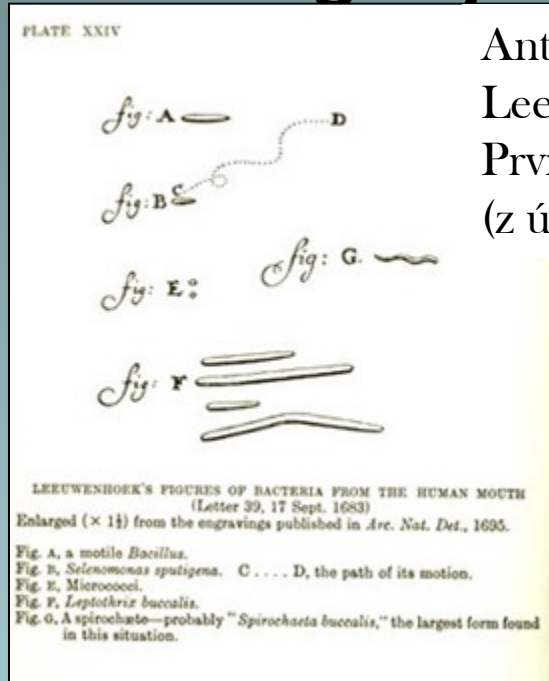


The First Compound Microscope

Janssenovi Z 9 x, ~1595

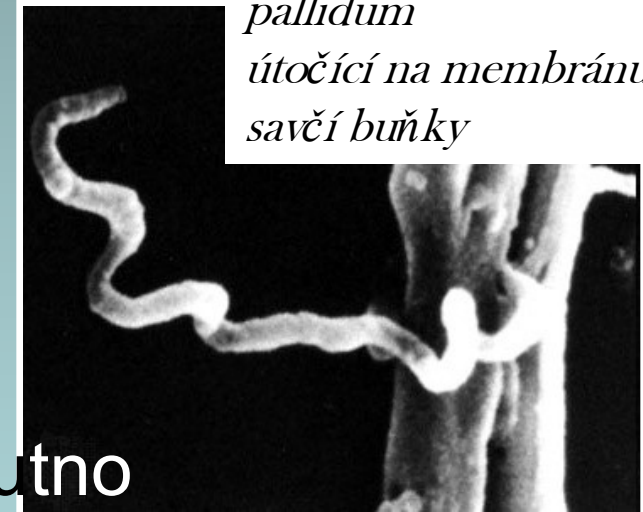


Anthony van Leeuwenhoek
Z 50 - 275 x, 17.stol



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

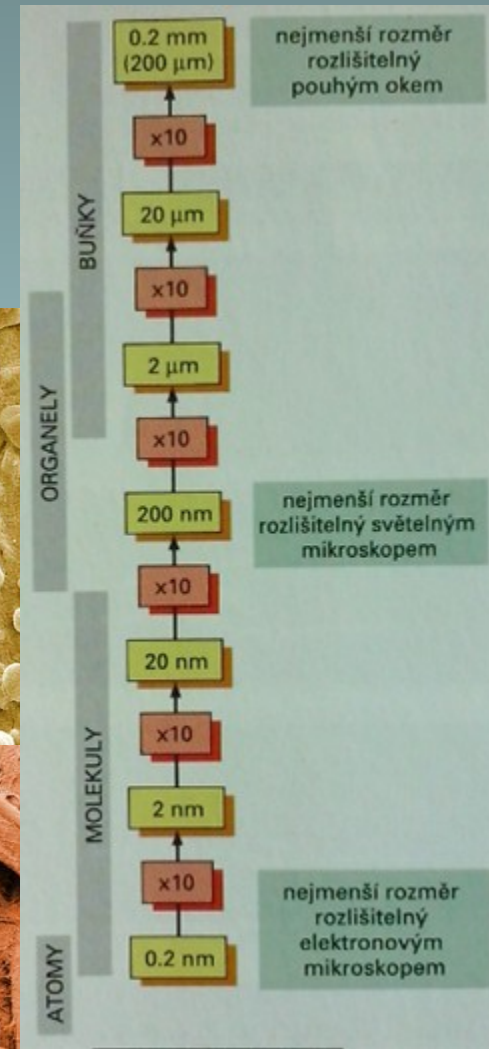
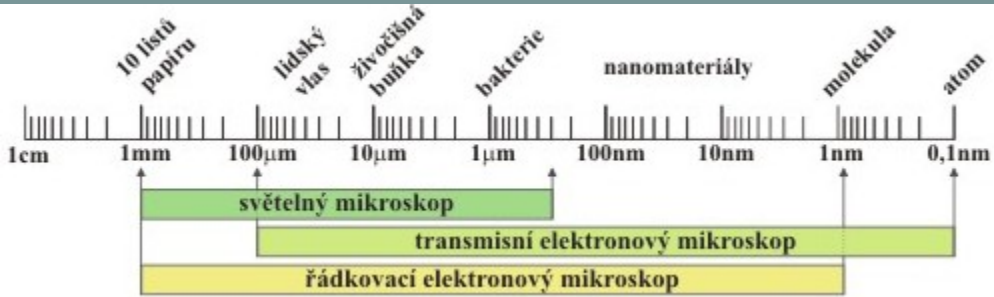
SEM *Treponema pallidum*
útočící na membránu
savčí buňky



Mikroskopie – nutno zvolit vhodný typ techniky dle sledované struktury



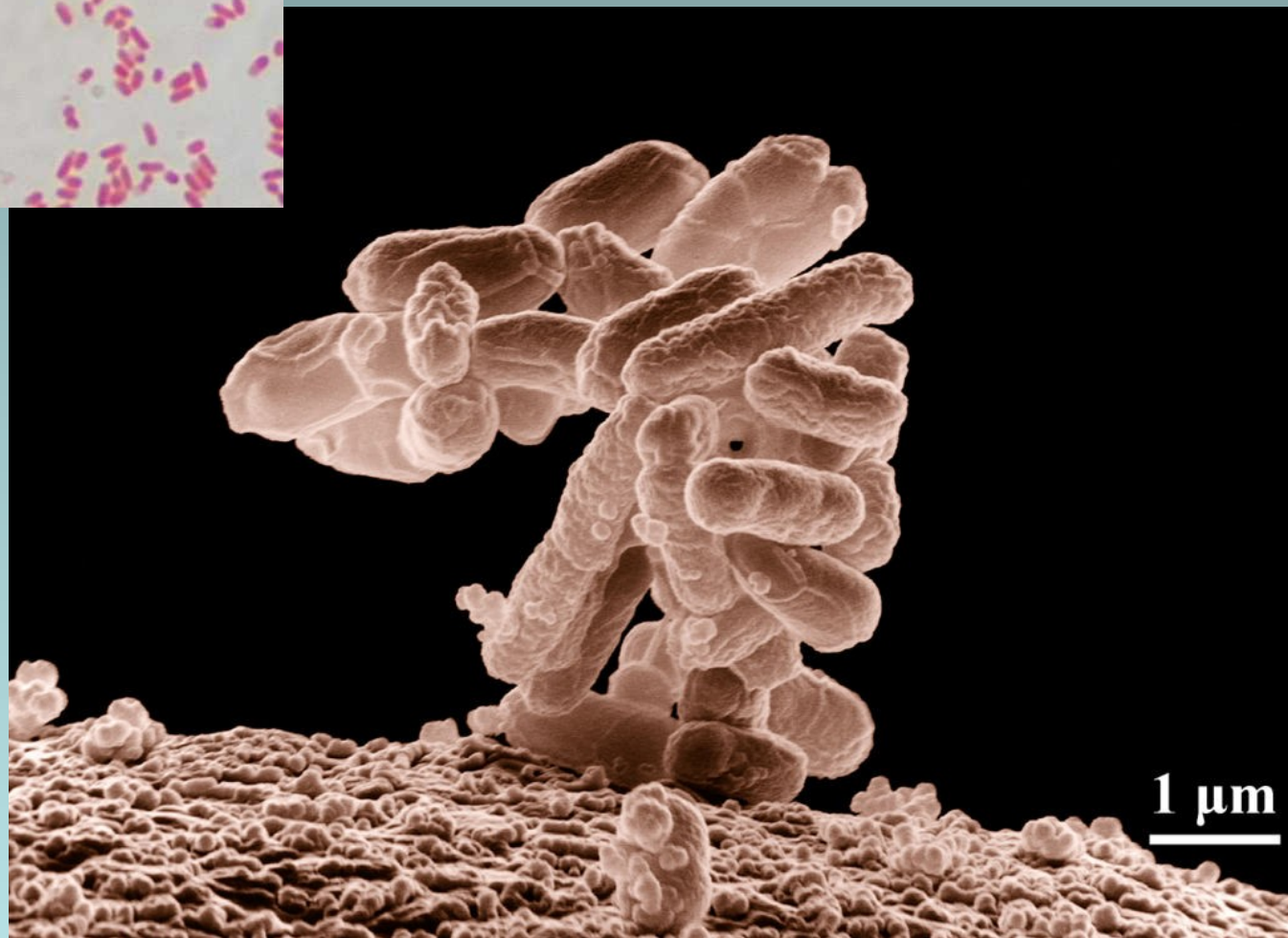
Světelný mikroskop (1000x) vs. Elektronový (100 000x)



Světelný mikroskop - Jasné pole



Jasné pole,
1000x

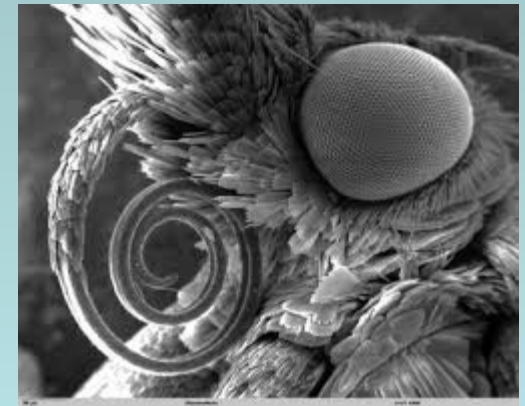
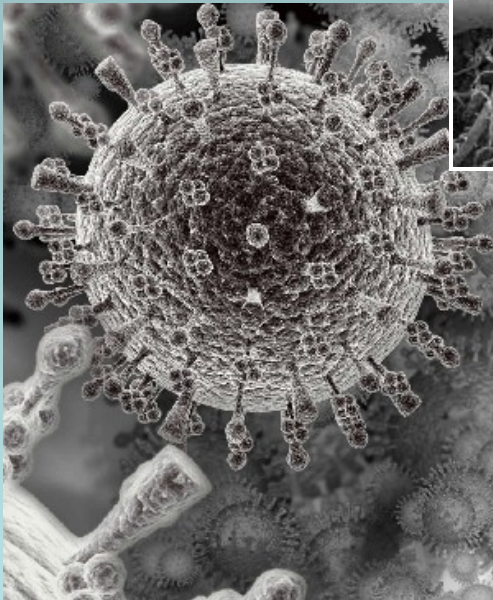


Rastrovací
elektronová
mikroskopie

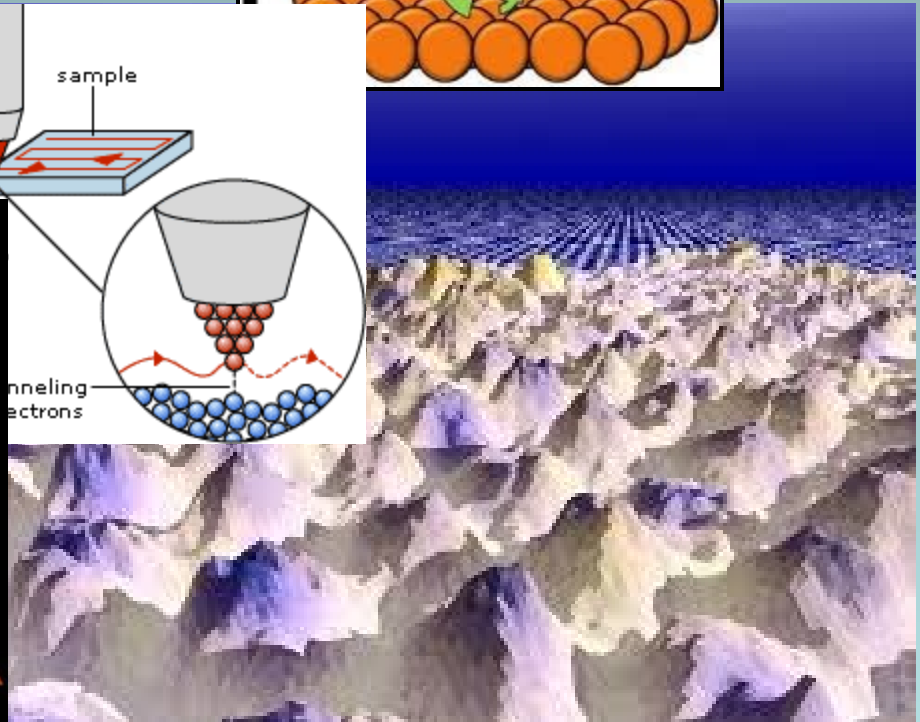
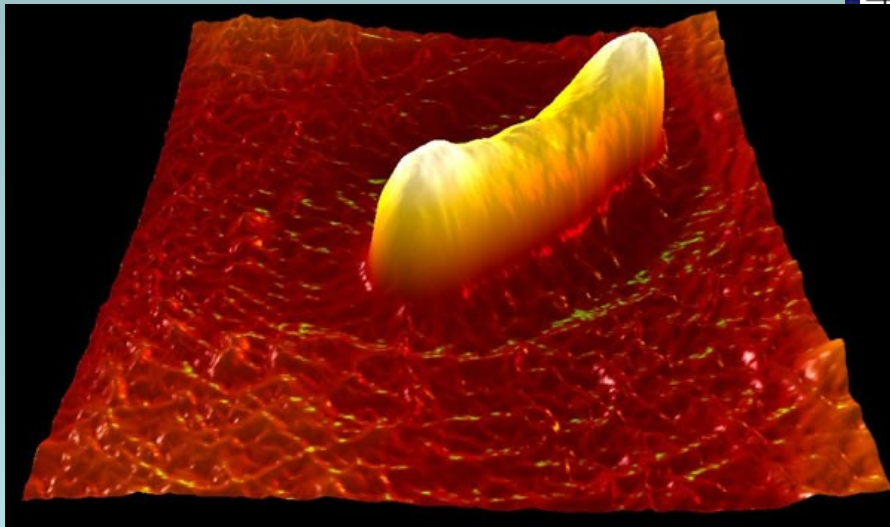
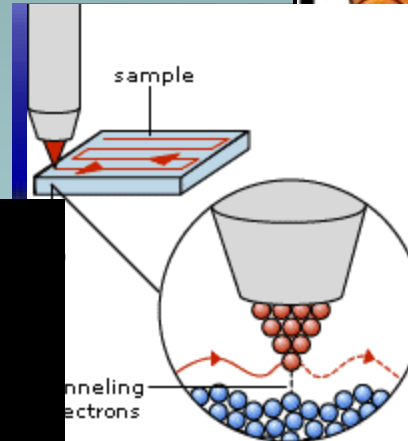
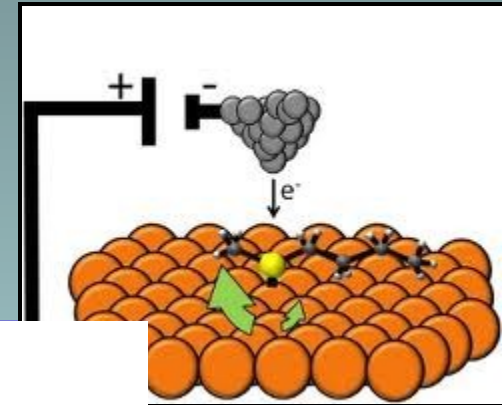
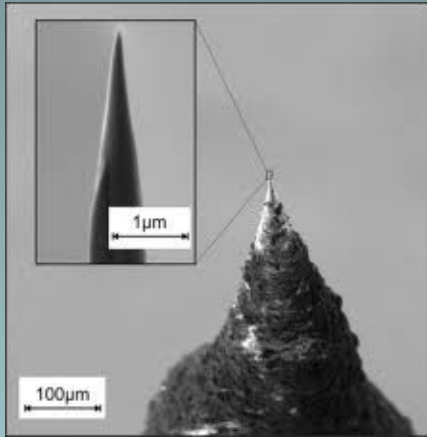
Rastrovací elektronová mikroskopie

(skenovací, řádkovací, Scanning Electron Microscope - SEM)

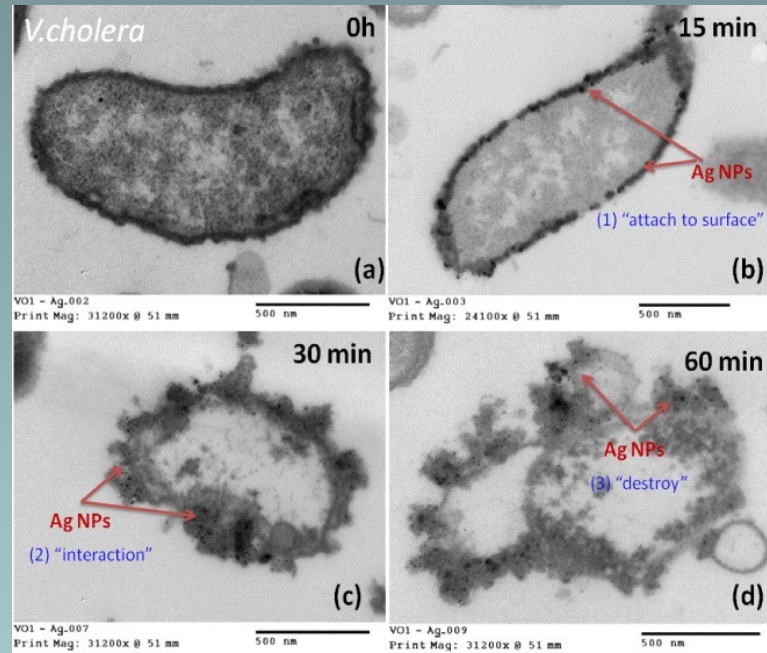
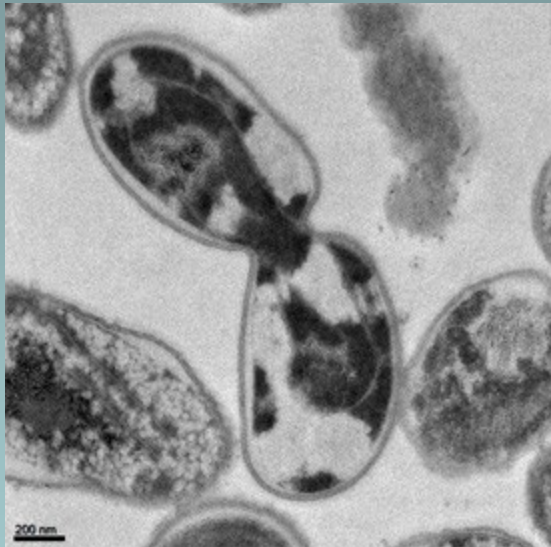
Popularita SEM pramení z možnosti získat obrázky povrchů širokého spektra objektů



Skenovací tunelová elektronová mikroskopie (scanning tunneling electron microscopy, STM)



Transmisní elektronový mikroskop (TEM)



Metoda umožňuje pozorovat **detaily buňky a virových částic**. Ke kontrastnímu znázornění zvýraznění struktur se používá **negativní barvení** solemi těžkých kovů, které **nepropuštějí elektrony** například **uranyl acetát, molybdenan amonný**.

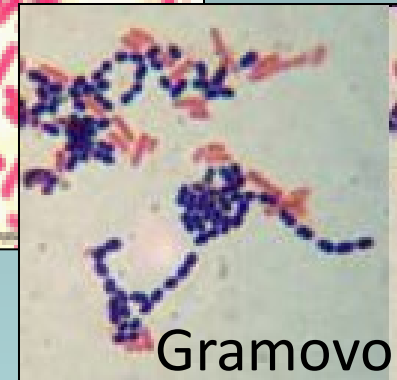
Cytologie a morfologie buňky

- **PREPARÁT** pro světelnou mikroskopii
 - co chceme vidět? – podle toho příprava preparátu
 - tvar buňky** – fázový kontrast, barvený fixovaný prep.

a struktur



barvení buněk a
spor za horka



Gramovo barvení

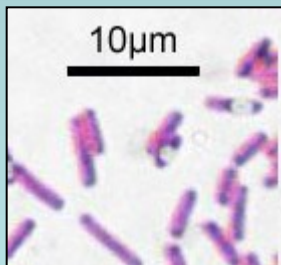
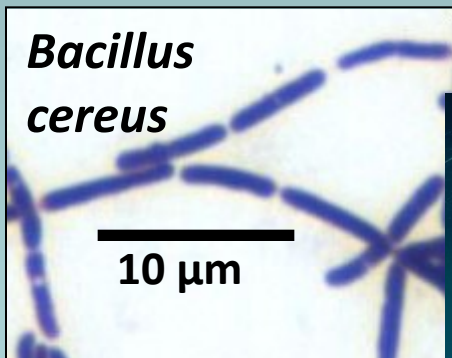
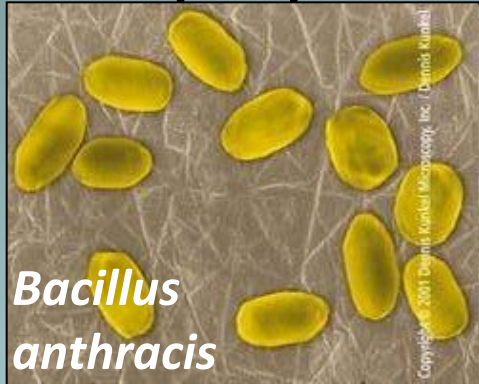
pohyb buňky – fázový kontrast, fluorescence

barvené struktury – pomáhají identifikaci (PHB, síra..)

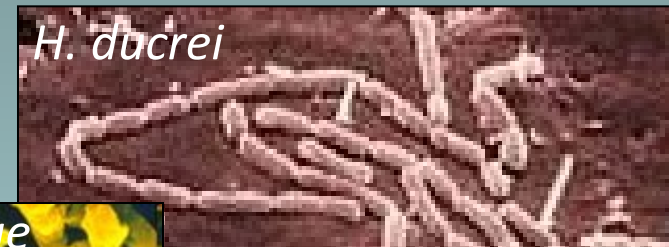
typ buněčné stěny – Gramovo a acidorezistentní b.

U jednoho bakteriálního rodu různý vzhled char. tvaru buňky!

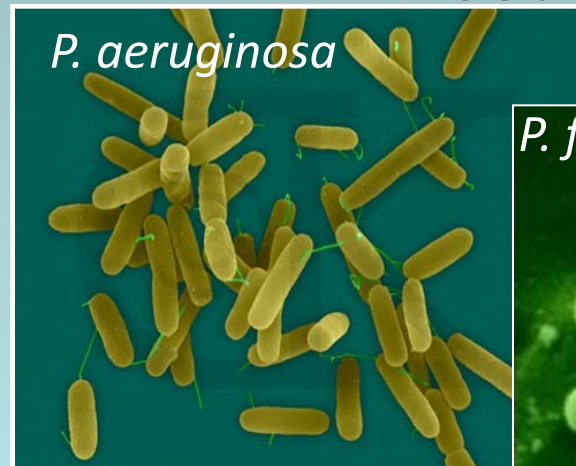
- Př: tyčky bacilů



- *Haemophilus*



- *Pseudomonas*



Velikost a tvary bakteriální buňky

velký poměr povrch/objem – velká plocha kontaktu buňky s prostředím

• Velikost bakt b. v μm

<i>Chlamydia</i>	0,3 x 0,3
<i>Bdellovibrio</i>	0,8 x 0,3
<i>Rickettsia</i>	1 x 0,3
<i>S. aureus</i>	0,8-1 x 0,8-1
<i>E. coli</i>	2-3 x 0,4-0,6
<i>B. subtilis</i>	1,8-4,8 x 0,9-1,1
<i>Streptomyces</i>	vlákno x 0,7-1,6
<i>Chromatium</i>	25 x 10
Spirochety	500



• Tvary bakt. buňky

Koky - sférické, oploštělé, lancetovitě

- diplokoky, streptokoky, tetrády, sarciny, stafylokoky

Tyčinky – rovné, zakřivené, větvcí se, palisády pleomorfní

Kokobacily

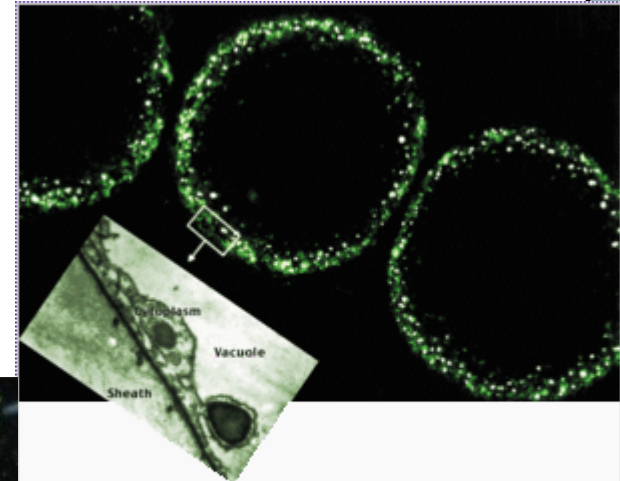
Pupeny

Prostéky

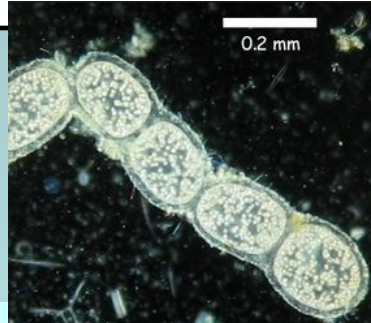
Spirily

Hvězdice

Mycelia



Cell from a string of *Thiomargarita namibiensis*. The inset demonstrates the outer cell wall, the thin layer of cytoplasm lining it, and the large liquid vacuole within the cell. Image from Woods Hole Oceanographic Institution. [↗](#)



Nejmenší (např. někteří příslušníci rodu *Mycoplasma*) měří 100 až 200 nm

750 μm - největší známá prokaryotní buňka, objevená r.1999: *Thiomargarita namibiensis*

Bacterial Morphology

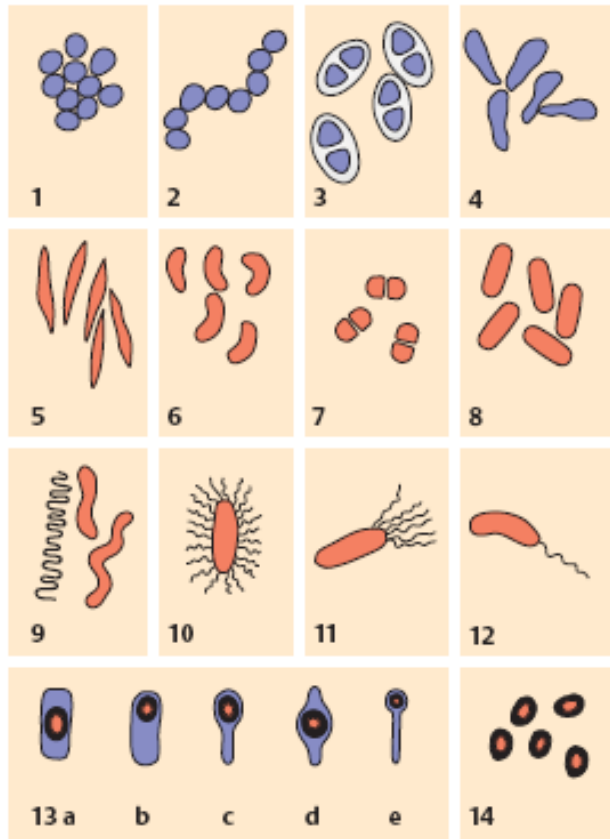
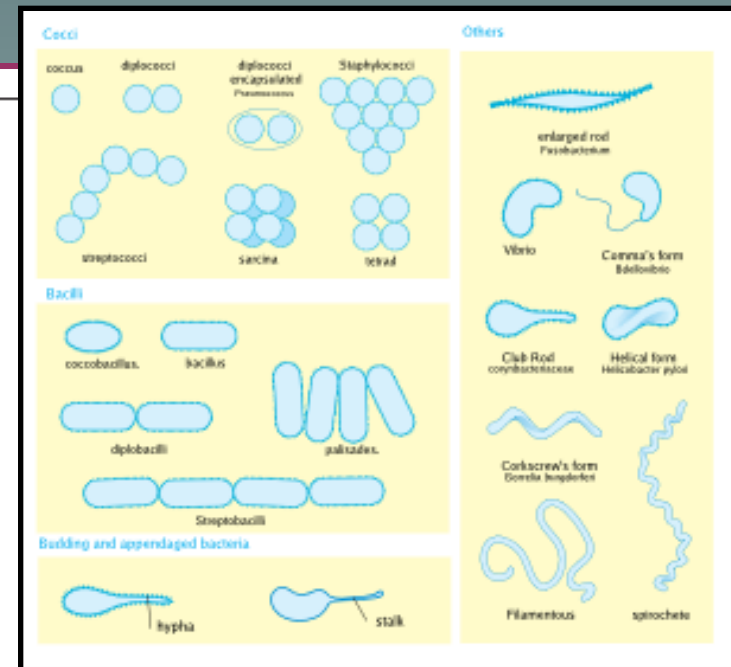
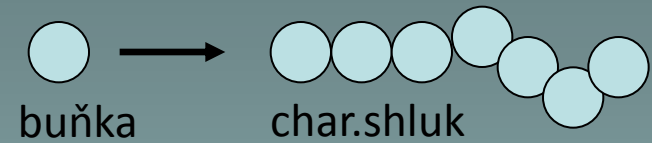


Fig. 3.1

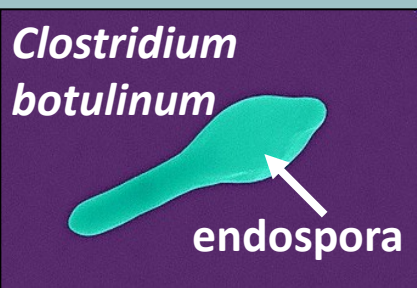
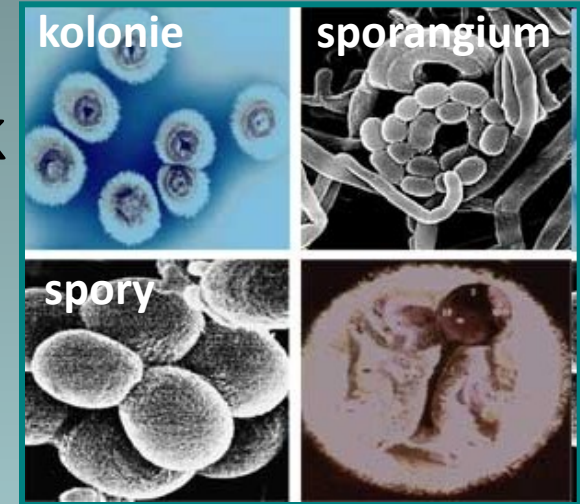


1. Gram-positive cocci in grape-like clusters (staphylococci)
2. Gram-positive cocci in chains (streptococci)
3. Gram-positive cocci with capsules (pneumococci)
4. Gram-positive, club-shaped, pleomorphic rods (corynebacteria)
5. Gram-negative rods with pointed ends (fusobacteria)
6. Gram-negative curved rods (here comma-shaped vibrios)
7. Gram-negative diplococci, adjacent sides flattened (neisseria)
8. Gram-negative straight rods with rounded ends (coli bacteria)
9. Spiral rods (spirilla) and Gram-negative curved rods (*Helicobacter*)
10. Peritrichous flagellation
11. Lophotrichous flagellation
12. Monotrichous flagellation
13. Formation of endospores (sporulation) in cells of the genera *Bacillus* and *Clostridium* (spore stain)
 - a) Central spore, vegetative cell shows no swelling
 - b) Terminal spore, vegetative cell shows no swelling
 - c) Terminal spore ("tennis racket")
 - d) Central spore, vegetative cell shows swelling
 - e) Terminal spore ("drumstick")
14. Free spores (spore stain)

Morfologie

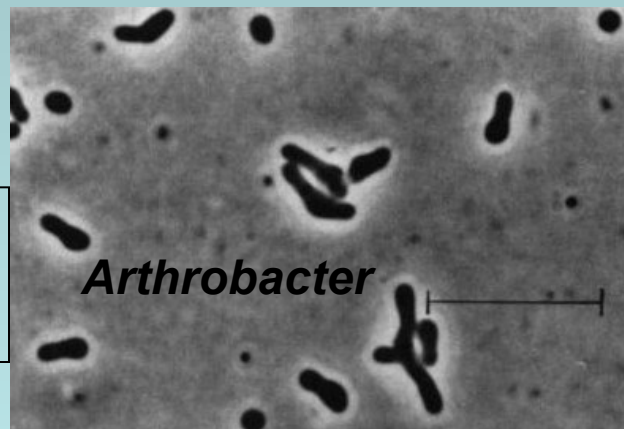


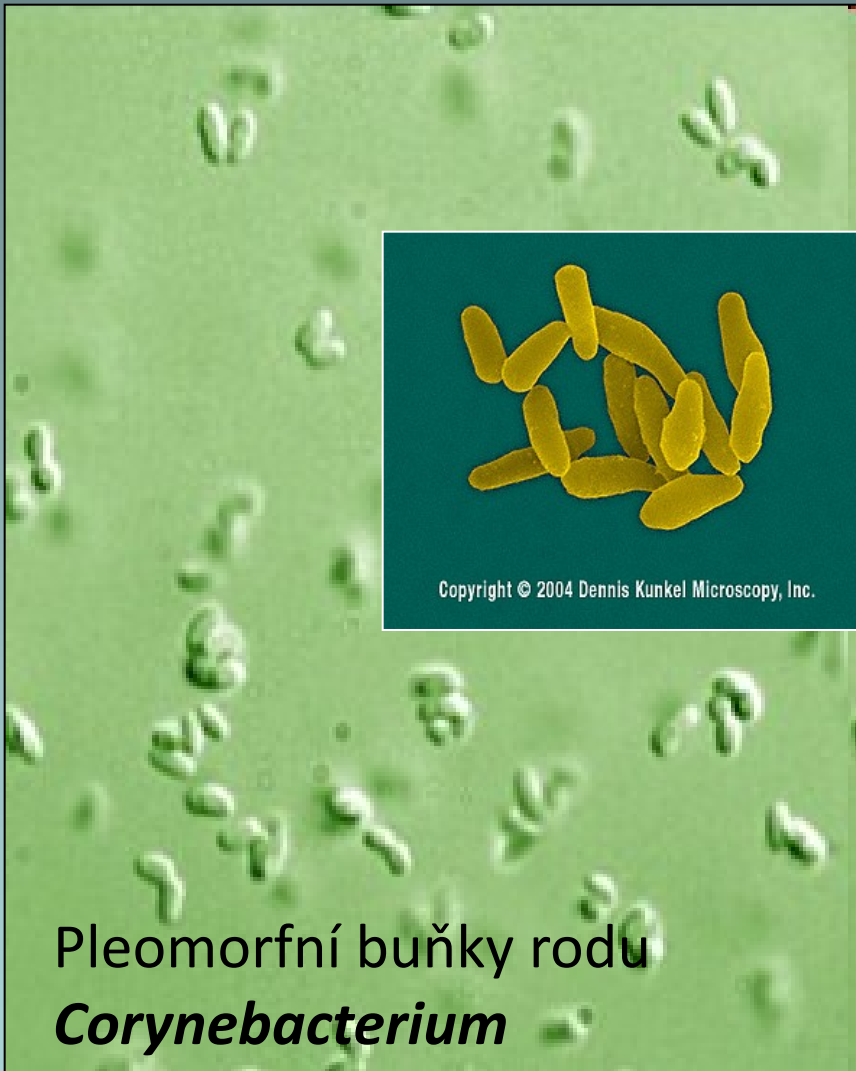
- Buňky
- Charakteristických shluků buněk
- Buněčných útvarů (spory, konidie, sporangia, pouzdra..)
- Bakteriální kolonie



Většinou druhově charakteristické
= identifikační znak

Pozor na: stáří kultury a
pleomorfní buňky





Pleomorfní buňky rodu
Corynebacterium

Acidorezistentní buňky:

Odmítají Gramovo barvení

Odmítají se po nabarvení odbarvit
ethanolem

i kyselinou. Příklad: *Nocardia*...

Morfologie pleomorfních buněk.

Další potíže:

Jsou barvitelné Gramem?

Haemophilus – ano

Bez b.s.

Mykobakteria, mykoplazmata - nikoli

Mykologické kys

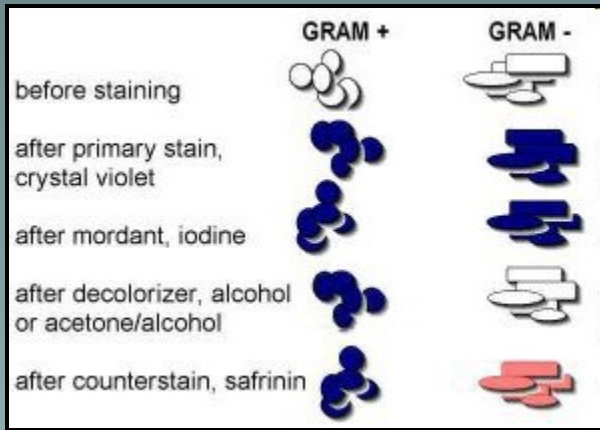
Pleomorfní buňky
M. tuberculosis



Mycobacterium avium-intracellulare

Acidorezistentní barvení buněk

histologického řezu lymfatické uzliny



Je neznámý vzorek vůbec barvitelný Gramem? Není gramlabilní? Fáze tyčka – kok?



Fixov. prep. nebarvitelný Gramem
Mycobacterium tuberculosis
Zeihl-Neelsonovo barvení (červeně)

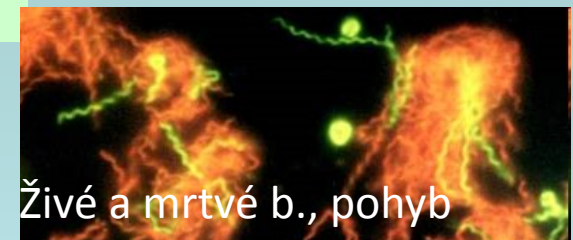


Cíl mikroskopie? Typ preparátu Typ mikroskopie (typ b. stěny, průkaz struktur, růstového cyklu)

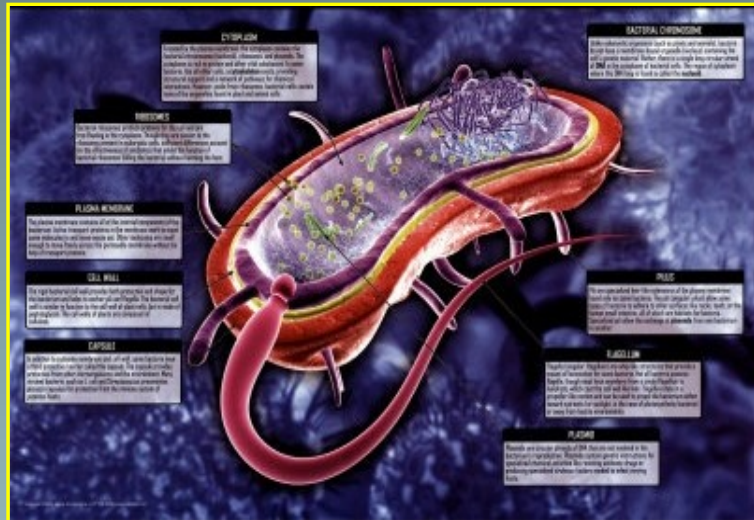


Fixov. prep. – tvar a typ b.

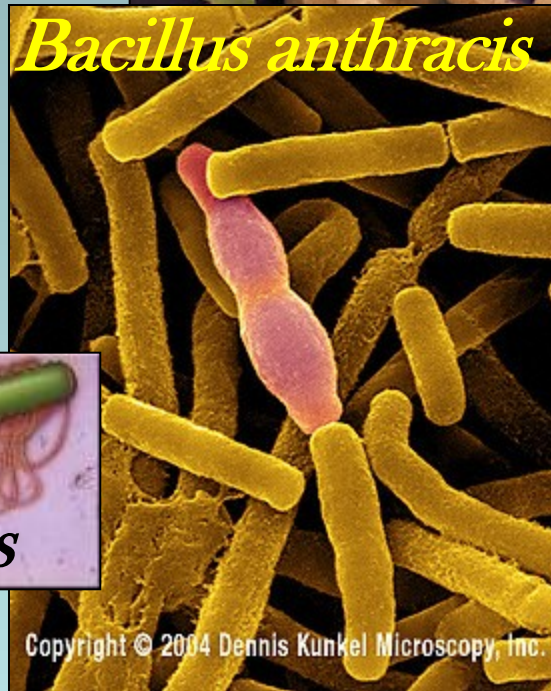
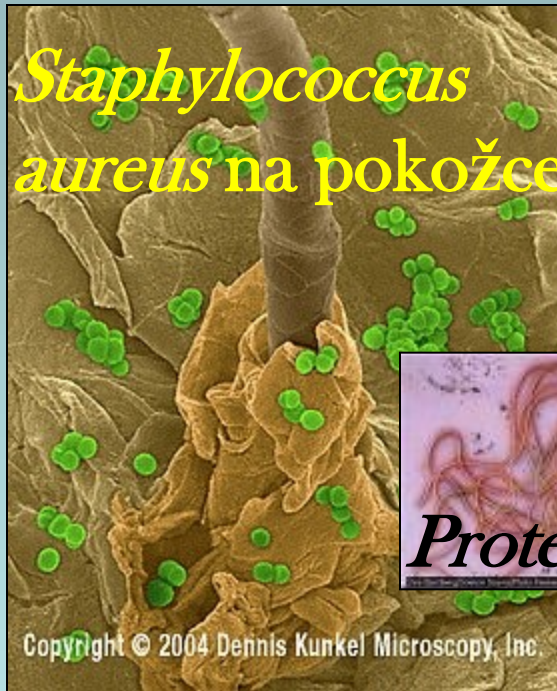
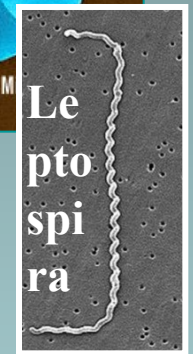
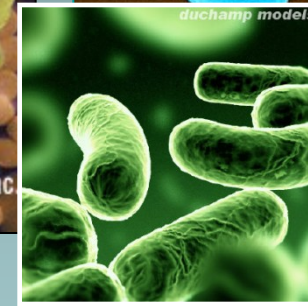
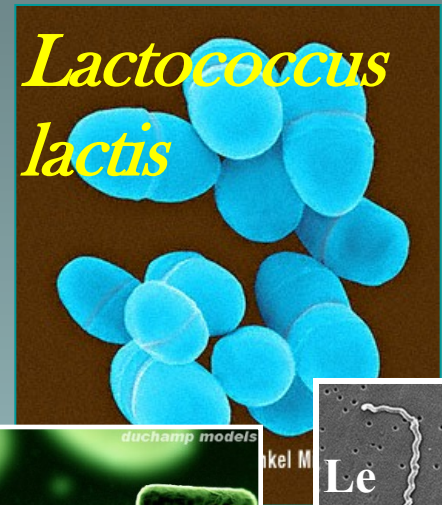
Živý (nativní) preparát bez fixace – vidíme nedeformovaný tvar buňky, spory, morfologii seskupení buněk, pohyb buněk



Živé a mrtvé b., pohyb



Struktury G- buňky



III.

Buněčná stadia

Cytologické a morfologické proměny

Struktury a jejich konformace závisí.....

při dělení buňky



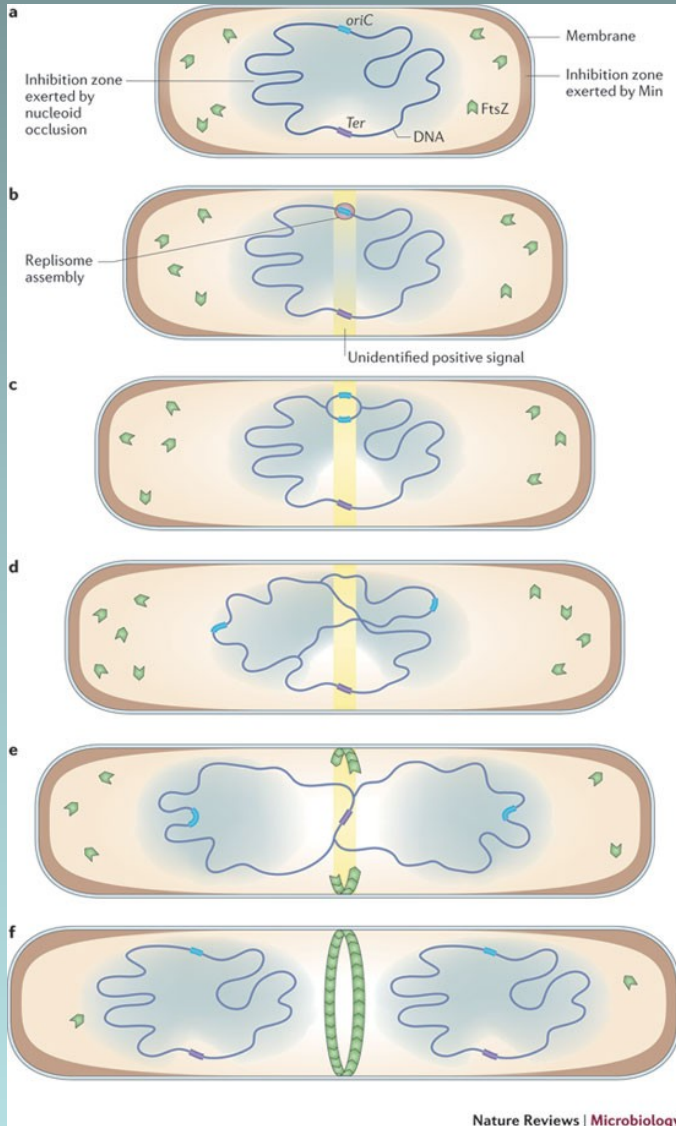
vstup parazitické, patogenní fáze do buňky

(př: remodelace proteinů listerií)

Od jakých procesů se odvíjí cytologie a morfologie bakteriálních buněk?

**Prosté binární dělení
anebo
přítomnost růstových cyklů?**

Binární dělení bakteriálních buněk



- Funkce bakteriálního cytoskeletu (přepážka, pohyb struktur)
- Ori C
- Zdvojení genetické informace

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

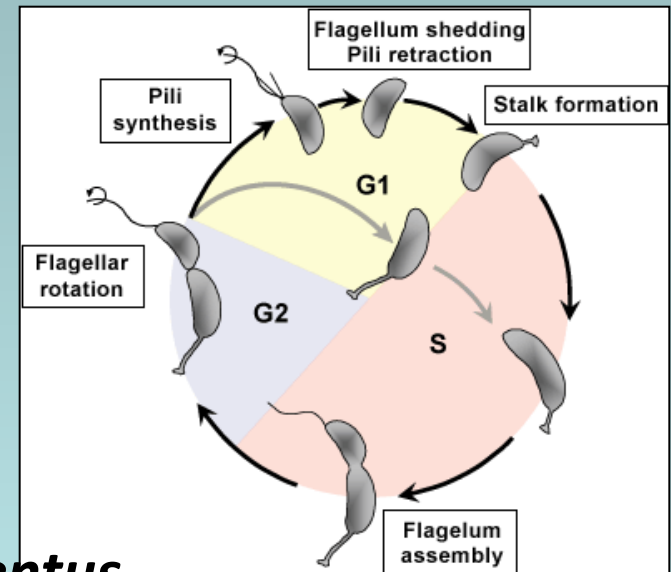
1) Prochází sledovaný druh růstovým cyklem?

- v každém z nich má pak buňka jinou cytologii a morfologii

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

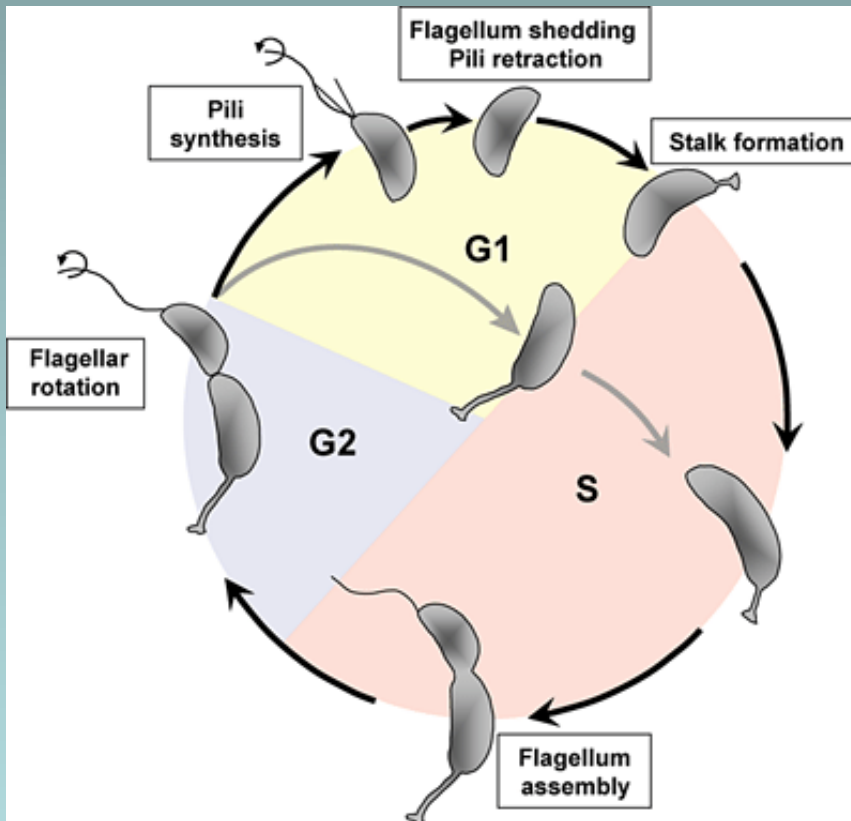
Mění se nejen vzhled buňky, ale buňka v cyklech prochází typickou změnou vnitřních struktur.

Buněčný cyklus
Caulobacter crescentus

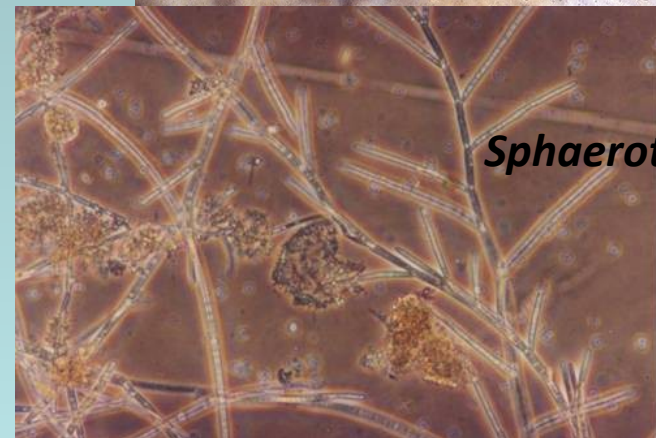


Jiné životní cykly než binární dělení

Střídání přisedlého a volného stadia



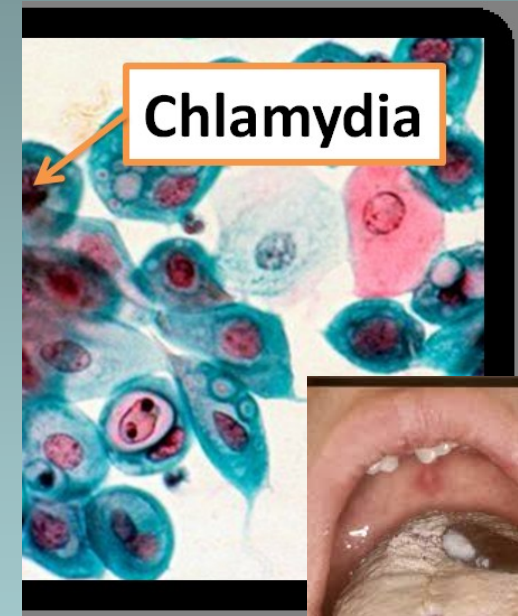
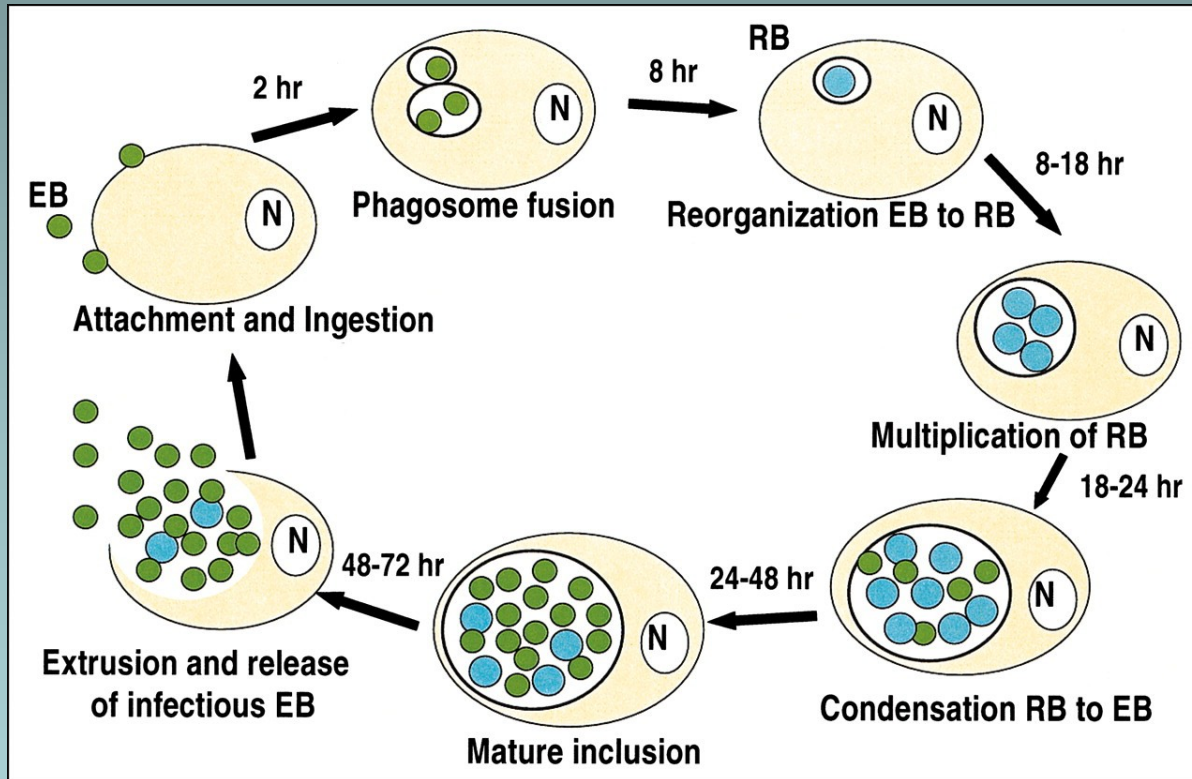
Caulobacter



Sphaerotilus

Jiné životní cykly než binární dělení

Střídání infekčního a reprodukčního stadia

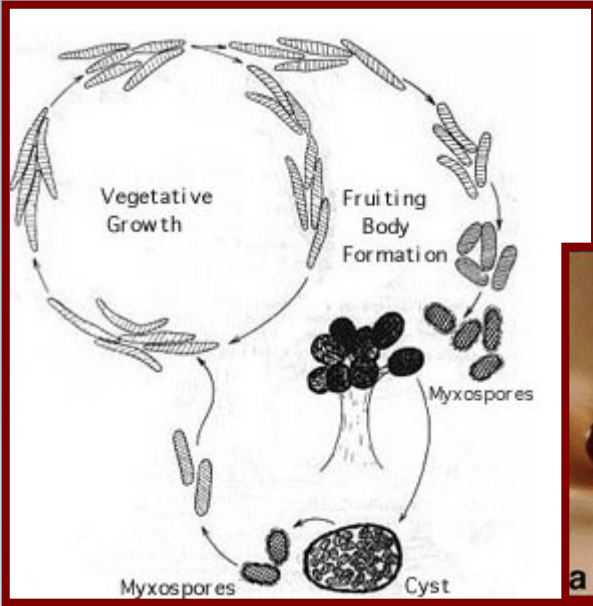
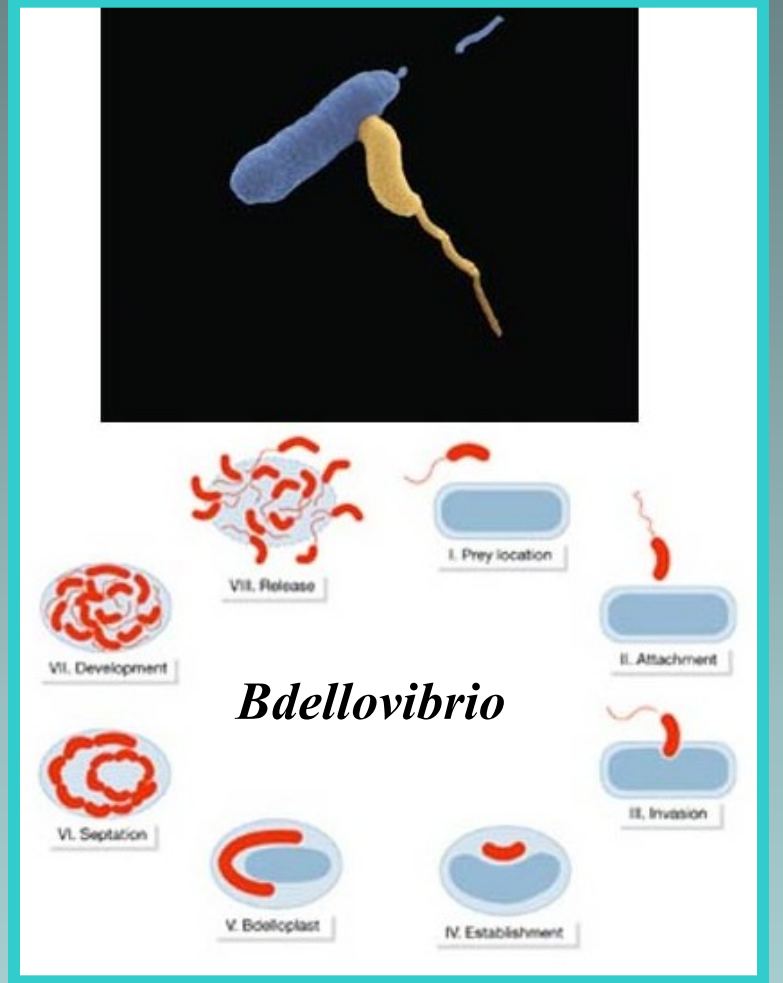
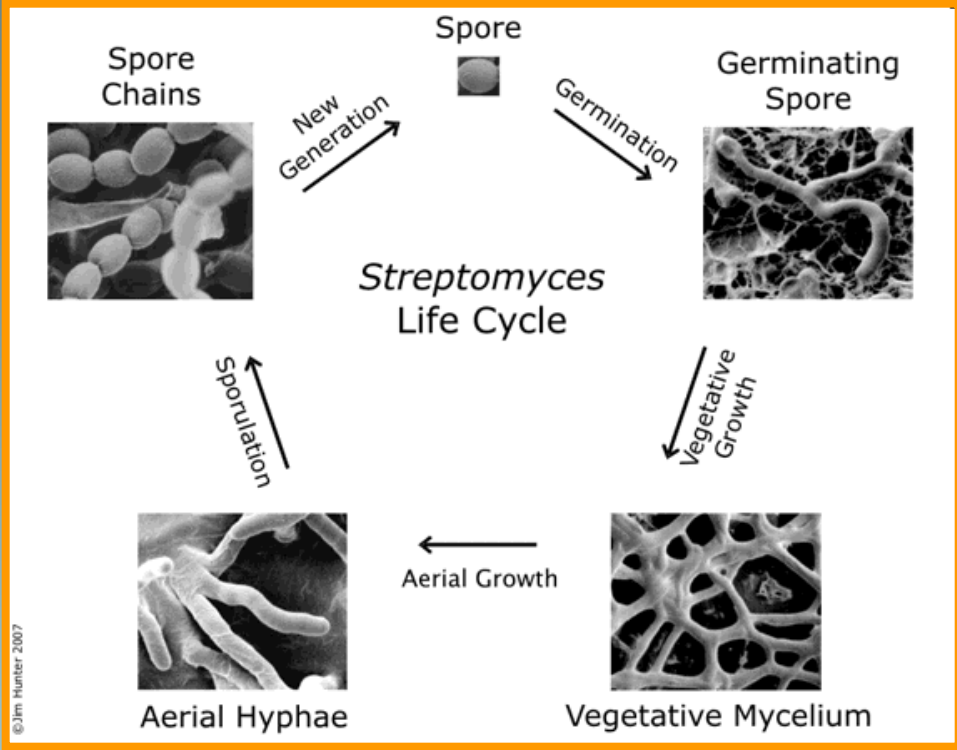


CHLAMYDIA (Reiter's conjunctivitis)

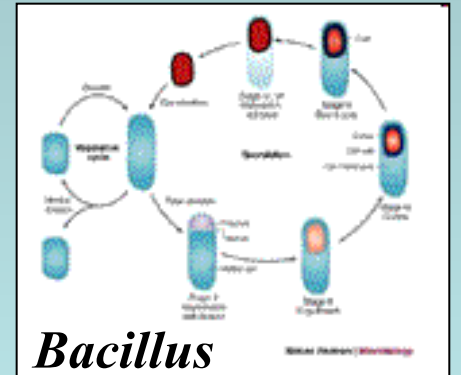
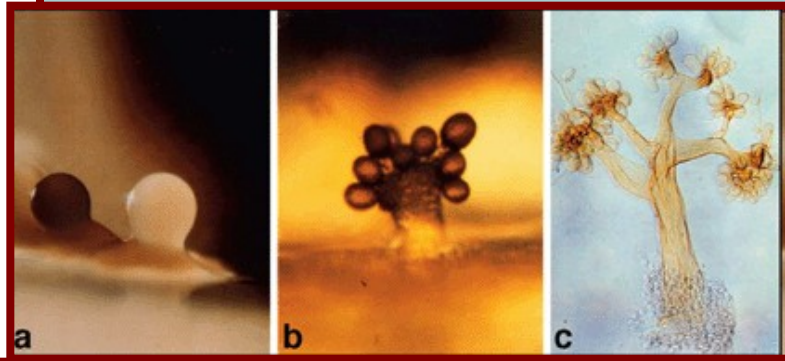


Chlamydial complication
Reiter's conjunctivitis

Chlamydie – **retikulární** a **elementární** tělíčka



Myxobakterie

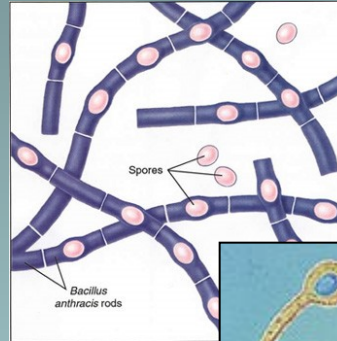


2) Vytváří posuzovaný druh endospory?

- v preparátu pak mohou měnit tvar buněk!



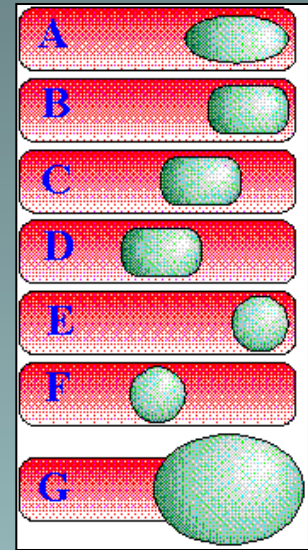
Clostridium difficile



Bacillus anthracis



Clostridium tetani



„Voják umírající na tetanus“

Sir Charles Bell

lukovité prohnutí zad (opisthotonus)

křečovitý výraz

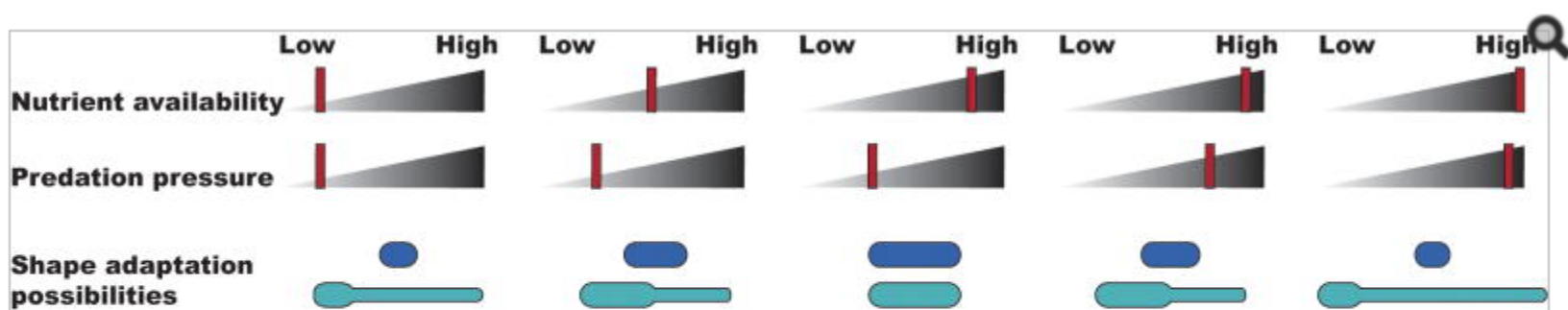
Originál je k vidění:

Royal College of Surgeons
of Edinburgh, Scotland.

3) Stárnutím mění buňky tvar

4) Závislost tvaru buňky na vnějším prostředí

- živiny, tlak, osmolarita...



Example of simple shape adaptations triggered by selective pressures. The upper two rows of “slider bars” represent: 1) the quantity of available nutrients (from Low to High), and 2) the numbers of nearby predators (from Low to High). As these two environmental conditions change, bacteria may respond with morphological adaptations, two of which are illustrated beneath the sliders. As described in the text, one cell (dark blue) elongates or becomes smaller, while the other (light blue) modifies the length of its prostheca. Intermediate conditions may evoke intermediate responses.

Curr Opin Microbiol. Author manuscript; available in PMC 2008 Dec 1.

Published in final edited form as:

[Curr Opin Microbiol. 2007 Dec; 10\(6\): 596–600.](#)

Published online 2007 Nov 5. doi: [10.1016/j.mib.2007.09.009](#)

Bacterial morphology: Why have different shapes?

[Kevin D. Young](#)

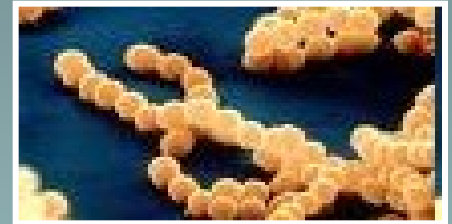
5) pleomorfní buňky – př. rody

Mycobacterium, *Corynebacterium*,
Haemophilus, *Mycoplasma*

Morfologie charakteristických shluků buněk

- typické shluky napomáhají identifikaci

řetízky koků: *Streptococcus*



Streptococcus

řetízky bacilů: *Bacillus*



Bacillus

palisády: *Corynebacterium*

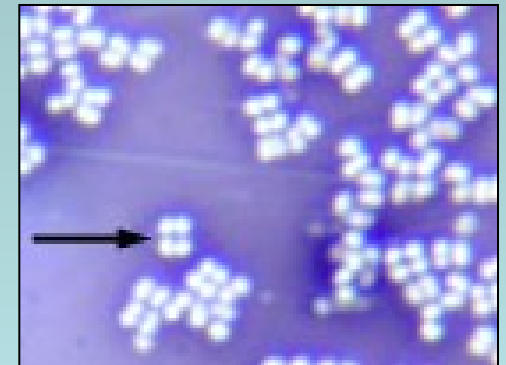
tetrády koků: *Micrococcus*

balíčky = sarciny *Sarcina* hrozníčky:

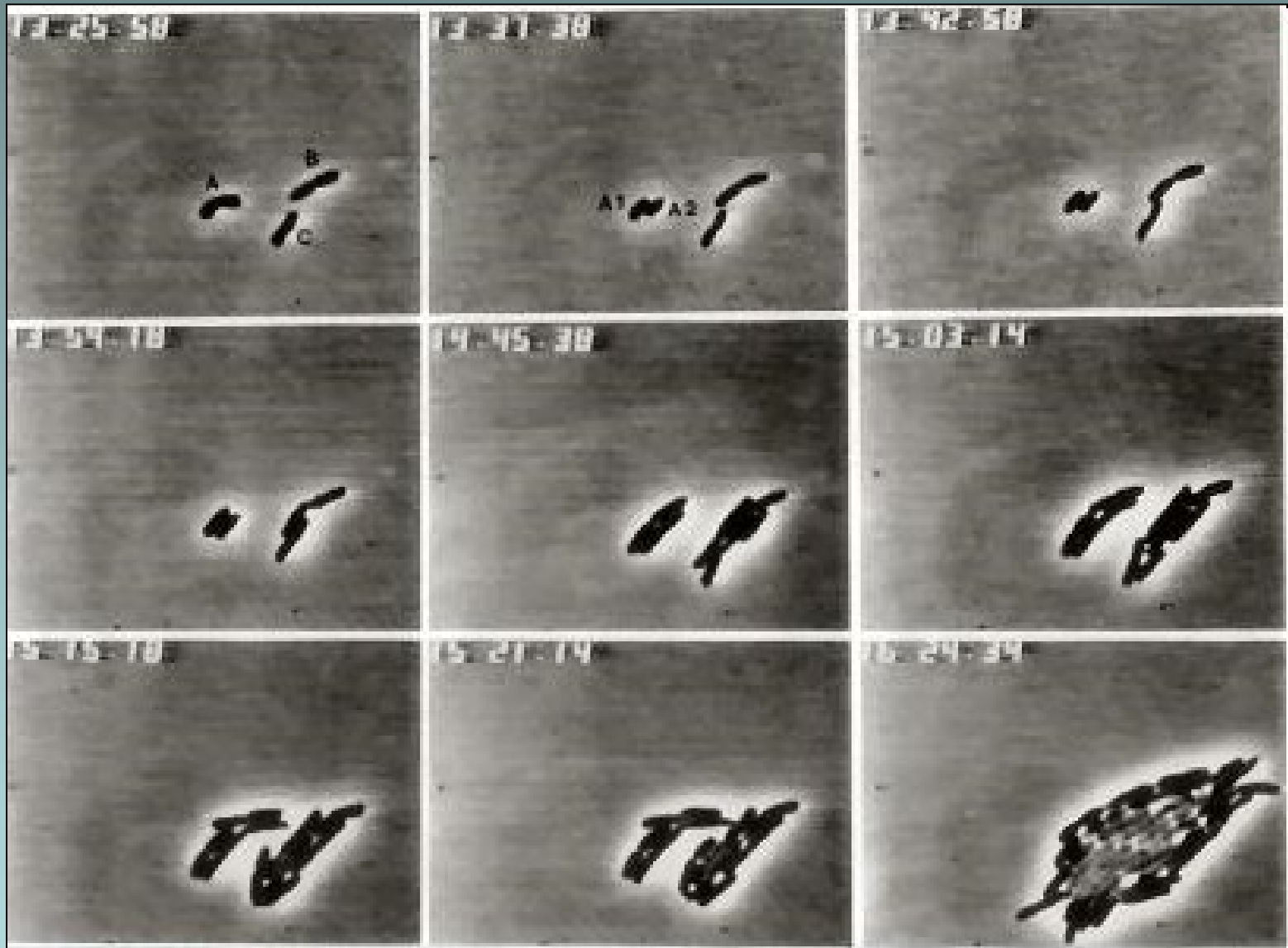
Staphylococcus



Staphylococcus



Micrococcus



Mikrokolonie *E. coli* vznikající ze tří mateřských buněk (na agaru)
- charakteristický vzhled vznikajících útvarů dělicích se buněk u růz. rodů....

Morfologie bakt. kolonií

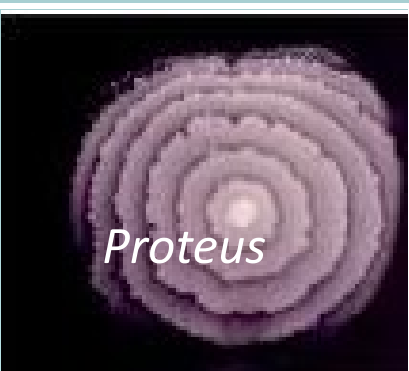
- potřeba zvážit typ media, na kterém kolonie hodnotíme!
kultivace - zda vůbec kultivovatelné?? - sledování typu kolonií
- stáří kultury

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*)

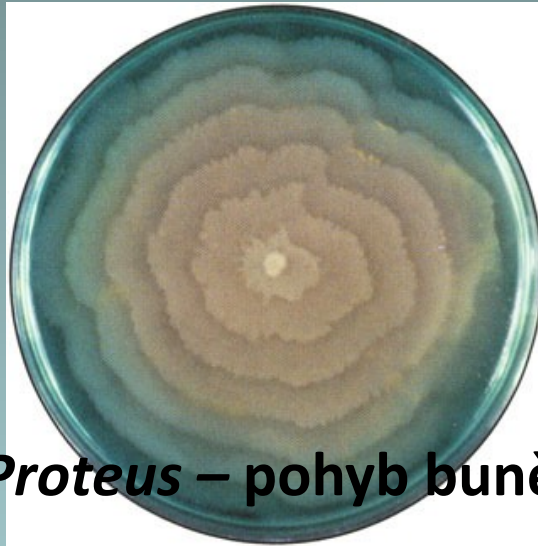


Morfologie bakteriálních kolonií

I. na základních půdách



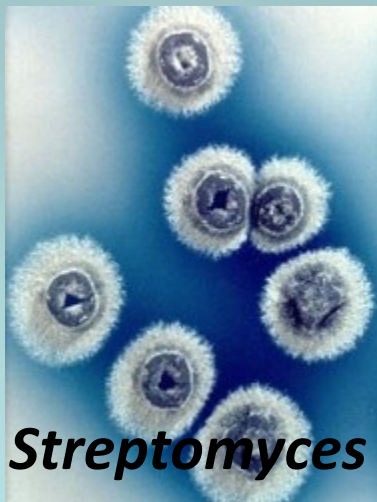
Nocardia



Proteus – pohyb buněk



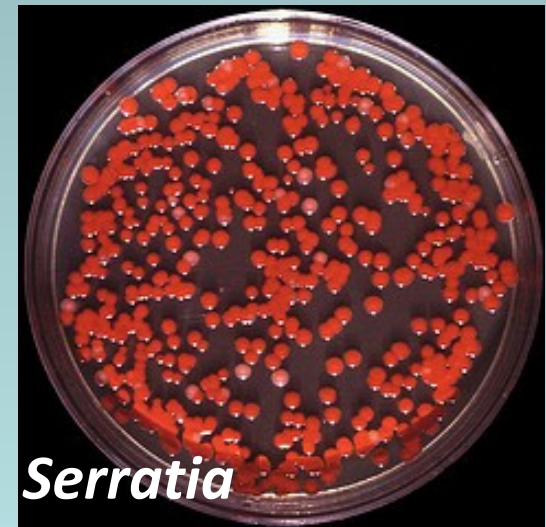
Bacillus mycooides



Streptomyces



Streptomyces



Serratia marcescens

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

Bakteriální kolonie na
II. diagnost. půdách



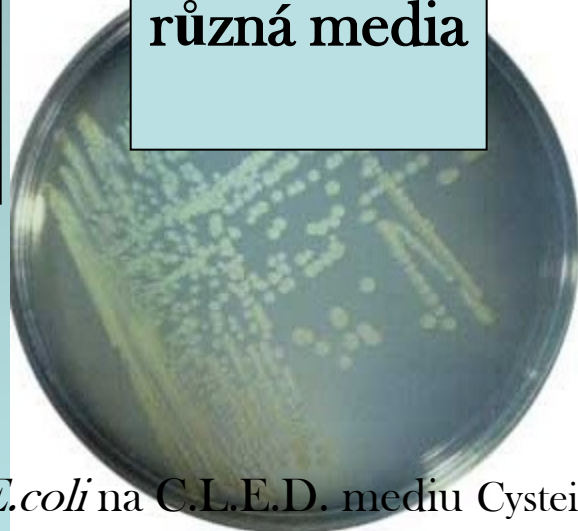
Jeden druh
bakterie
různá media



E.coli na krevním agaru

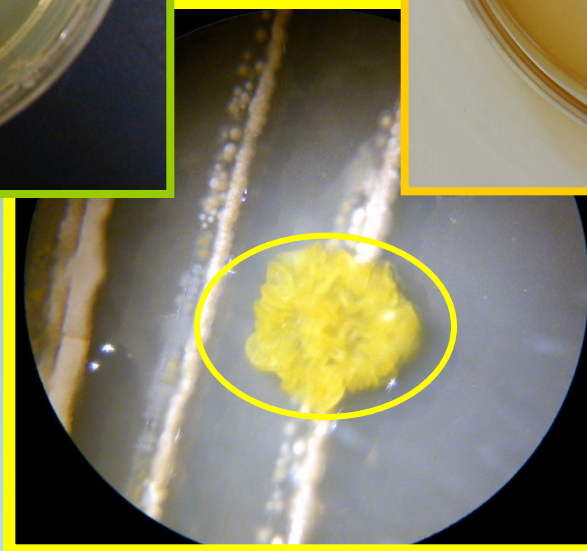


E.coli na MacConkey agaru



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

Kontaminace na misce!



Sylabus cvičení

- 24.9. – úvod, práce s programem Nis – Elements, rozdělení do pracovních skupin
- 1.10. – ukázka elektronové mikroskopie
- 8. a 15.10 – Gramovo barvení, negativní barvení, nativní preparát
- 22. a 29.10. – struktury buňky
- 5. a 12.11. – pohyb buněk
- 19. a 26.11. – acidorezistentní barvení
- 3. a 10.12. – zaočkování sklíčkových kultur; fluorescence
- v týdnu 14. – 18. 12. pozorování sklíčkových kultur

Bezpečnost a zásady práce

Plášť, přezůvky, skříňky, jídlo, pití

MO - Biohazard group 0

Stoly - před a po práci **Incidur, ethanol**



Po vstupu do laboratoře či před zahájením práce prosím o mytí rukou;
test účinnosti mytí rukou



Mytí rukou před návštěvou toalety!!!

MO - Biohazard group 0

Misky s bakteriálními kmeny otvírat co nejméně
a po práci správně zavřít

Nemluvit při očkování mikroorganismů

Sterilní práce - žihání kličky v plameni kahanu..

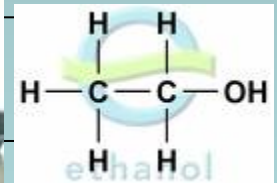
!!



:



případně



ethanol

Kahan zapnutý jen po dobu práce s ním

Popisování misek: zespodu,
svrchu - dle metody!!



Nevylévat nic do odpadu - stůl: odpadní nádobky

Prosíme neodnášet kultury!

O náplni cvičení se informovat předem
Viz Studijní materiály - příprava

