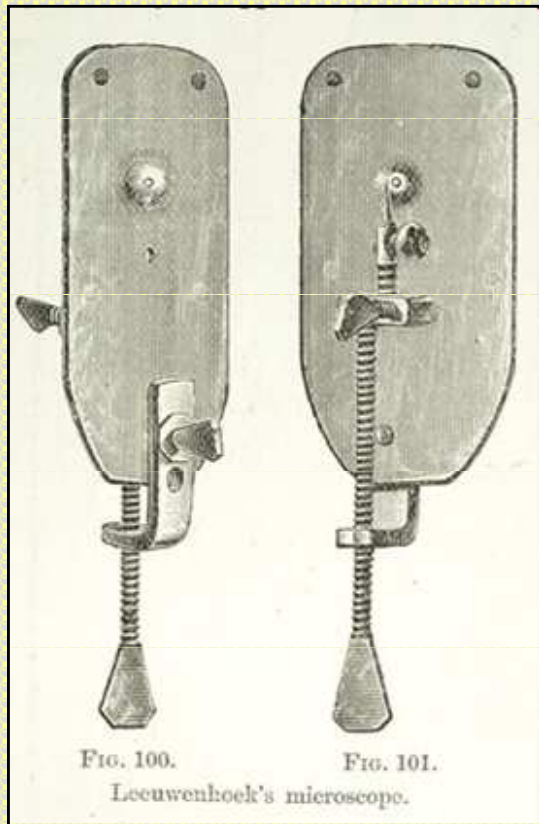


Cytologie a morfologie bakterií



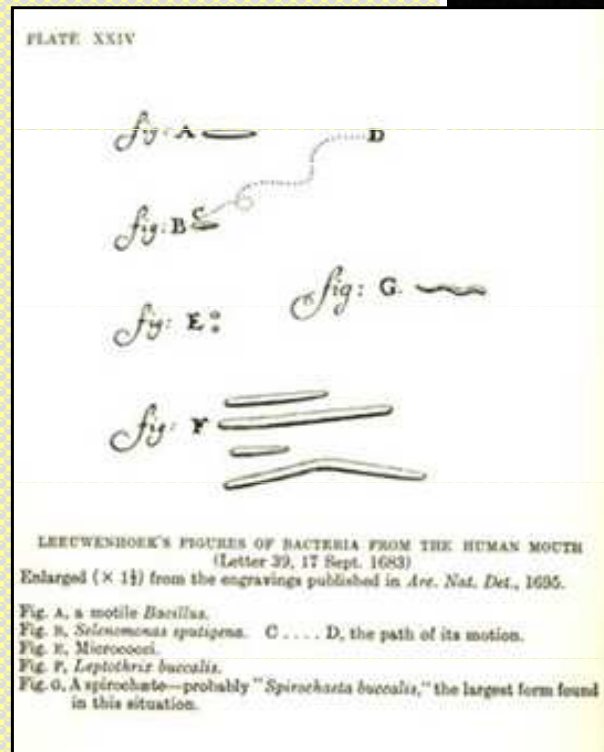
Janssenovi Z 9 x, ~ 1595



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

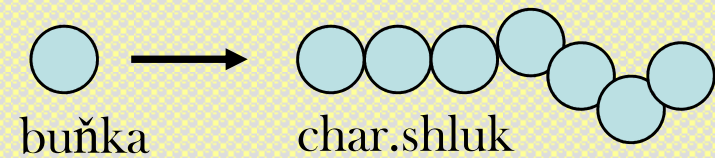


SEM *Treponema pallidum*
útočící na membránu
savčí buňky

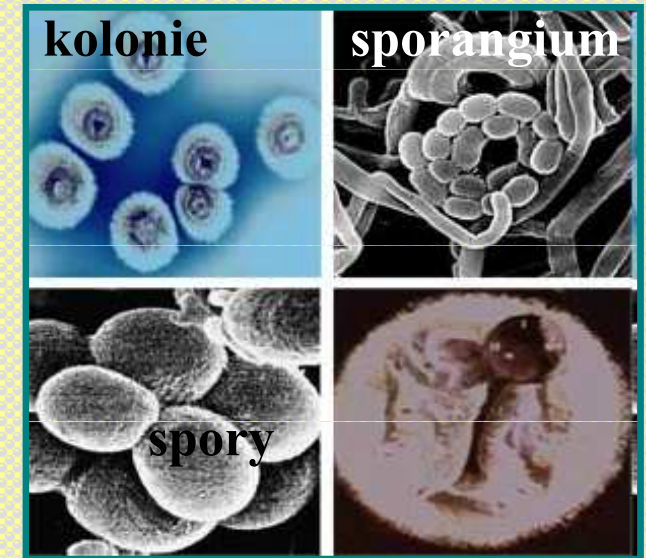


Anthony van Leeuwenhoek
První nákresy bakterií
(z ústní dutiny člověka)

Morfologie



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



Většinou druhově charakteristické
= identifikační znak

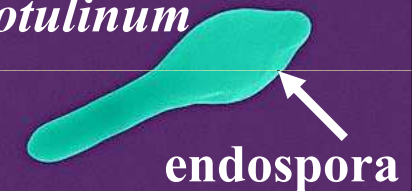
Pozor na: fázi růstového cyklu!

endospory vyklenující buňku

stáří kultury

pleomorfní buňky

*Clostridium
botulinum*



Morfologie pleomorfních buněk.

Další potíže:

Jsou barvitelné Gramem?

Haemophilus - ano

Bez b.s.

Mykobakteria, mykoplazmata - nikoli

Mykolové kys

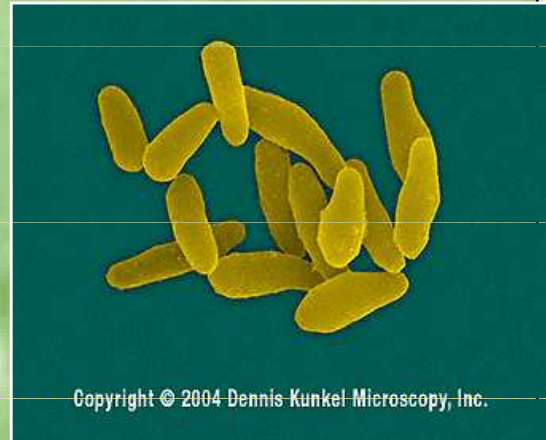
Pleomorfní buňky

M. tuberculosis



Mycobacterium avium-intracellulare

Acidorezistentní barvení buněk histologického řezu lymfatické uzliny



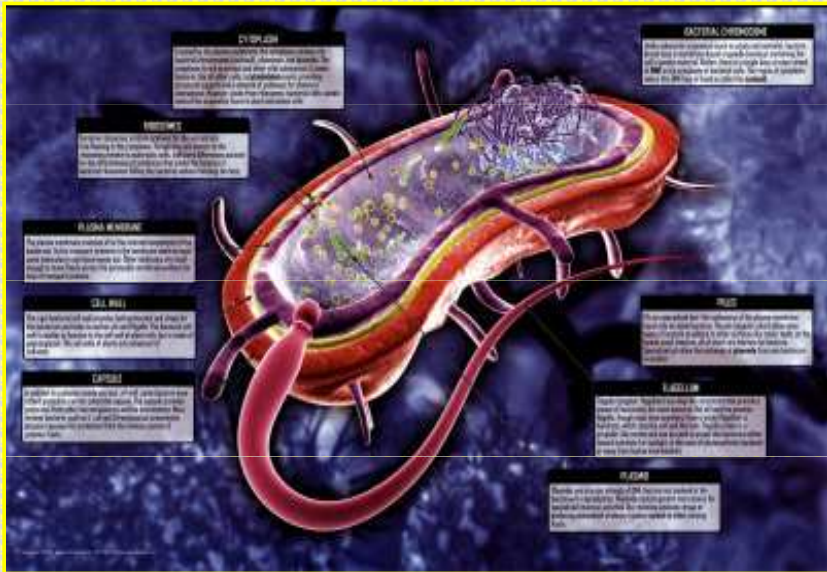
Copyright © 2004 Dennis Kunkel Microscopy, Inc.

Pleomorfní buňky rodu
Corynebacterium

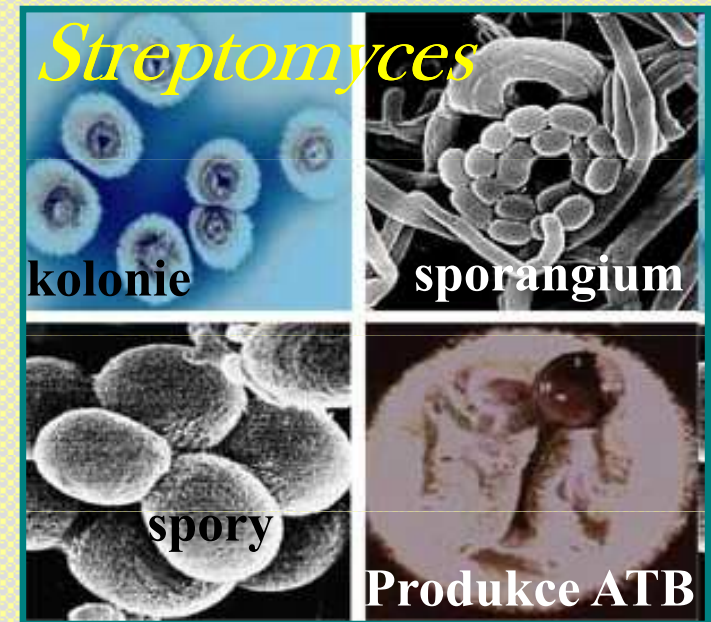
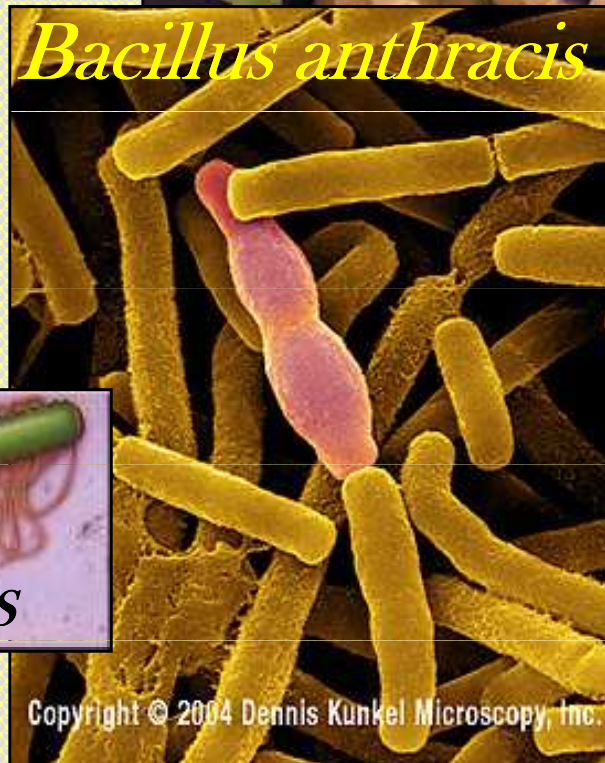
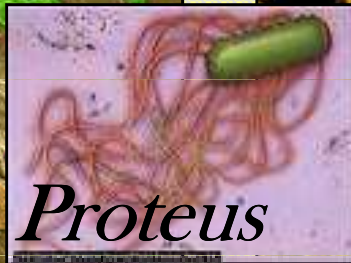
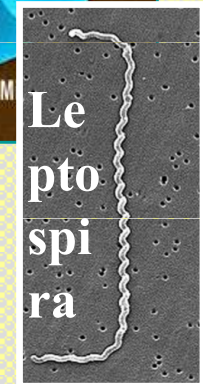
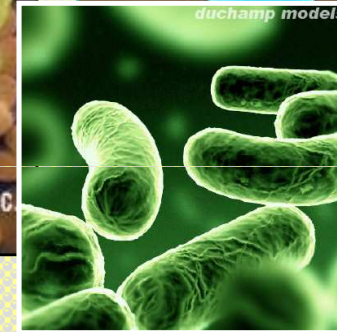
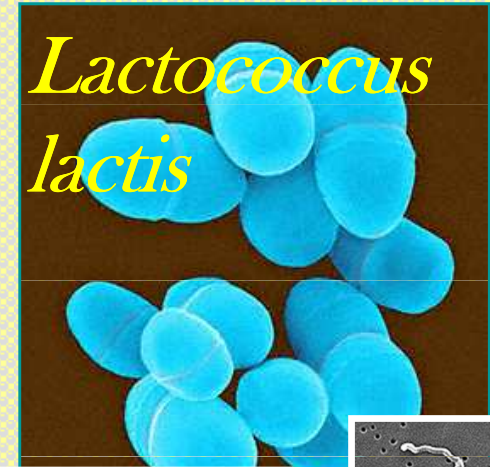
Acidorezistentní buňky:

Odmítají Gramovo barvení

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



Struktury G- buňky

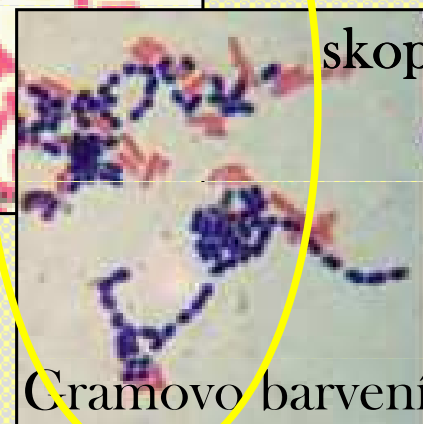
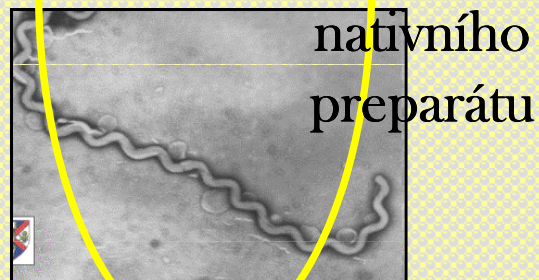
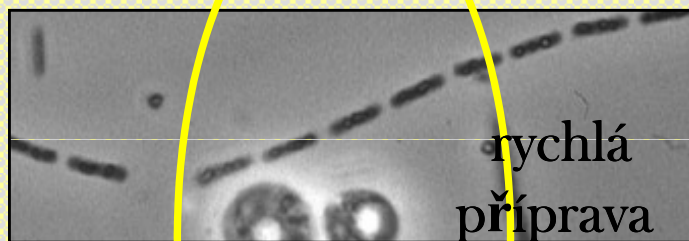


Morfologie buňky

- **PREPARÁT**

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

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



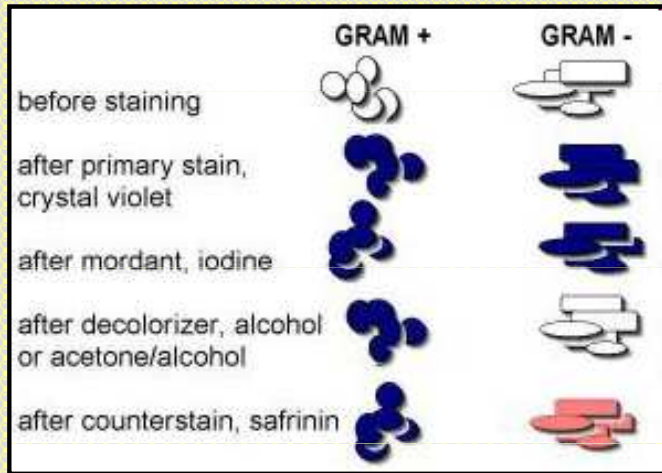
Světelná
Fázový kontrast
Fluorescenční
Elektronová...

světelná
mikro-
skopie

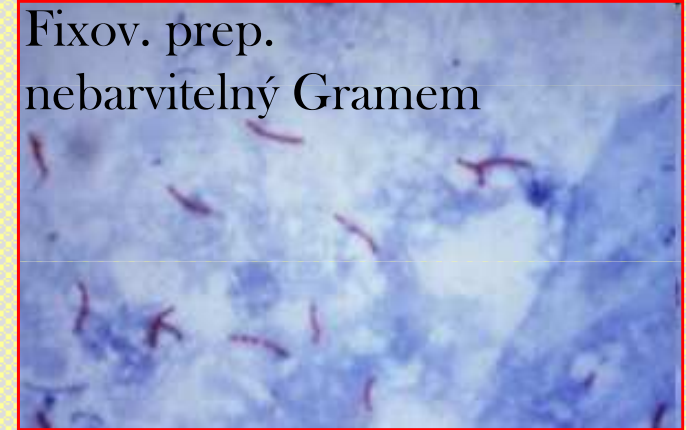
pohyb buňky - fázový kontrast, fluorescence

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

typ buněčné stěny - Gramovo a acidorezistentní b.



Je neznámý vzorek vůbec barvitelný Gramem?
Není gramlabilní?



Fixov. prep. nebarvitelný Gramem

Mycobacterium tuberculosis
Zeihl-Neelsonovo barvení (červeně)



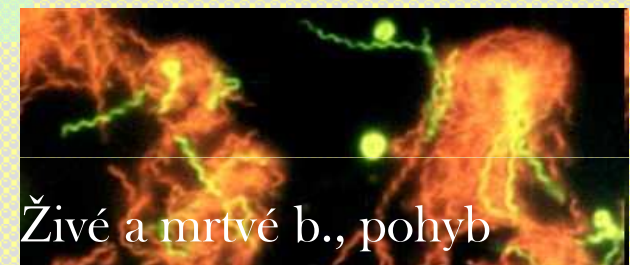
S barevným filtrem

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



Fixov. prep. - tvar a typ b.

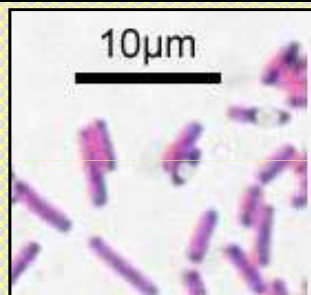
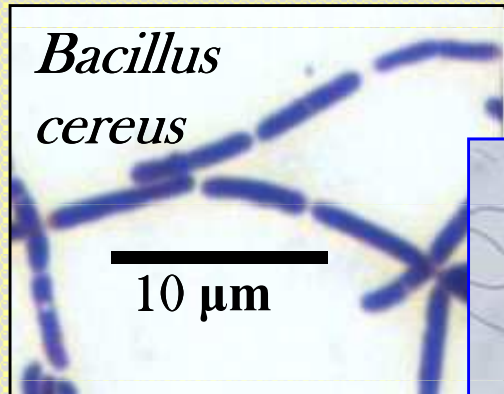
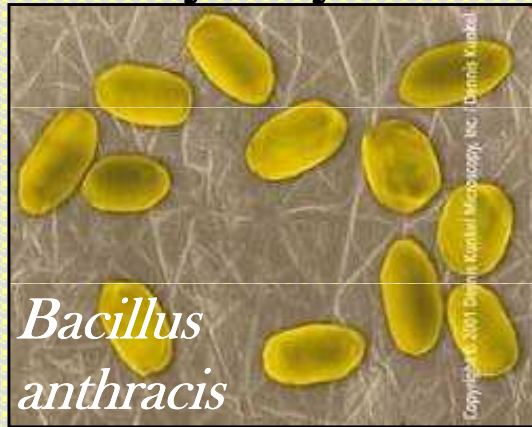
Živý (nativní) preparát bez fixace - vidíme nedeformovaný tvar buňky, spory, morfologii seskupení buněk, pohyb buněk



Živé a mrtvé b., pohyb

U jednoho bakteriálního rodu různý vzhled char. tvaru buňky!

- Př: tyčky bacilů

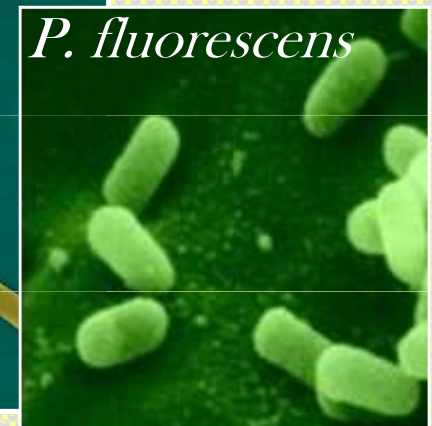
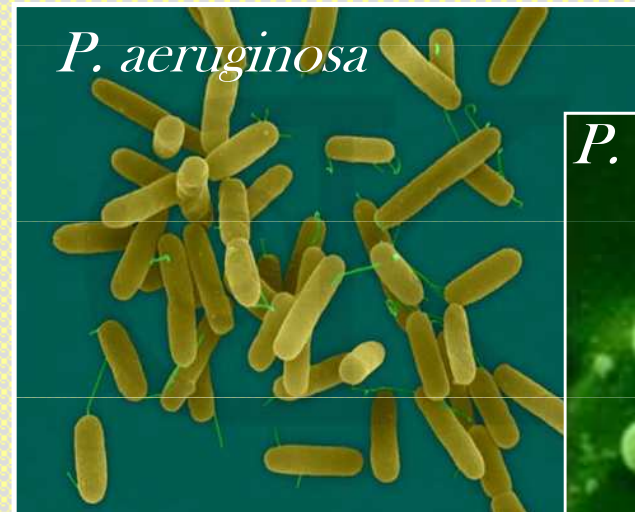


Bacillus subtilis

- *Haemophilus*



- *Pseudomonas*



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

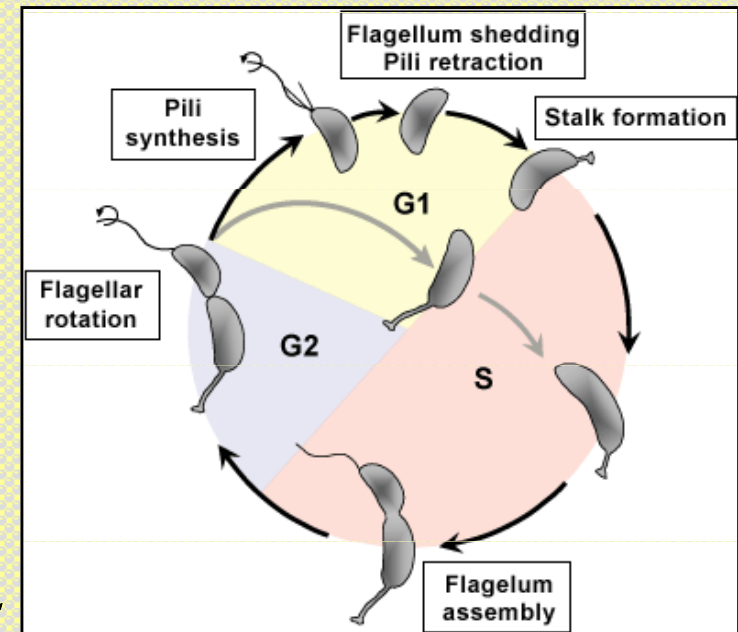
1) Prochází tento druh růstovými cykly?

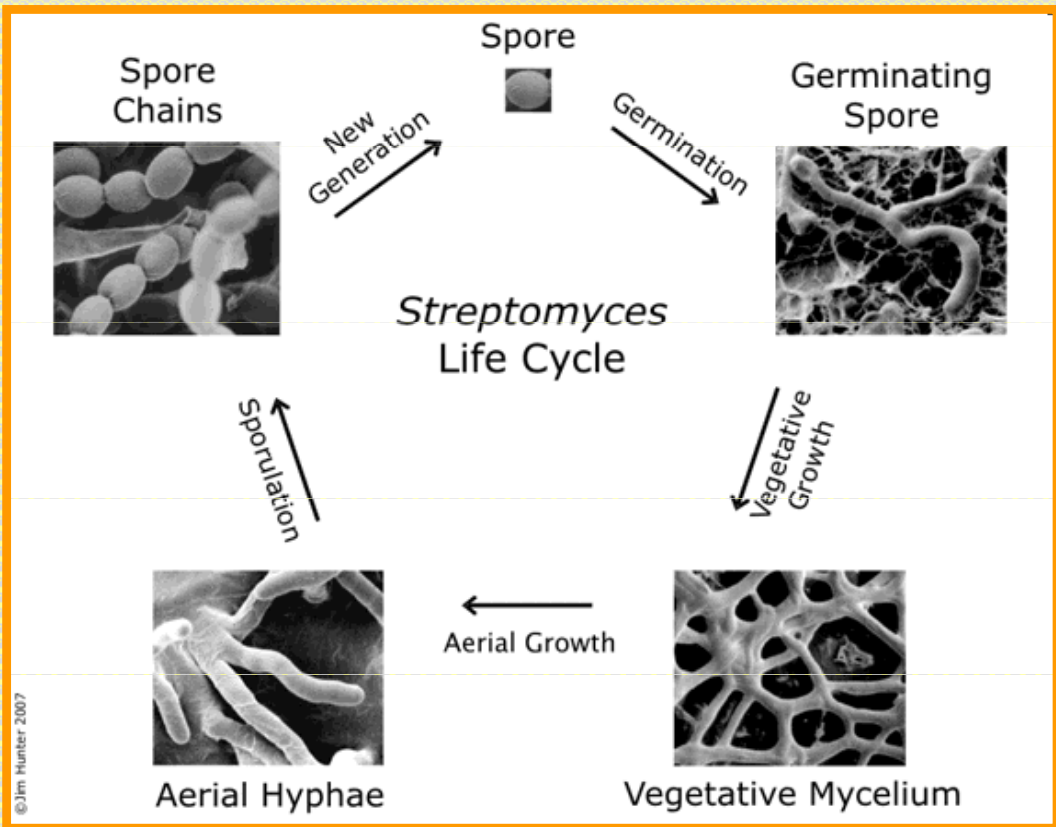
- v každém z nich má pak buňka jinou morfologii!

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

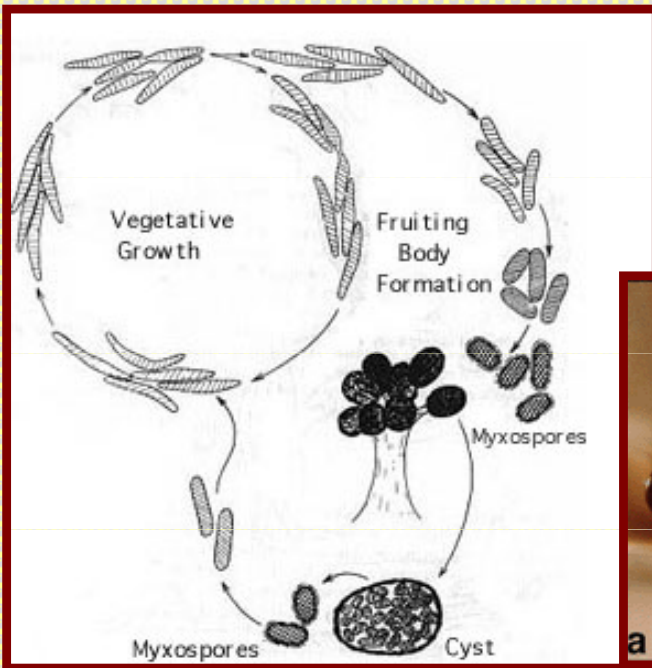
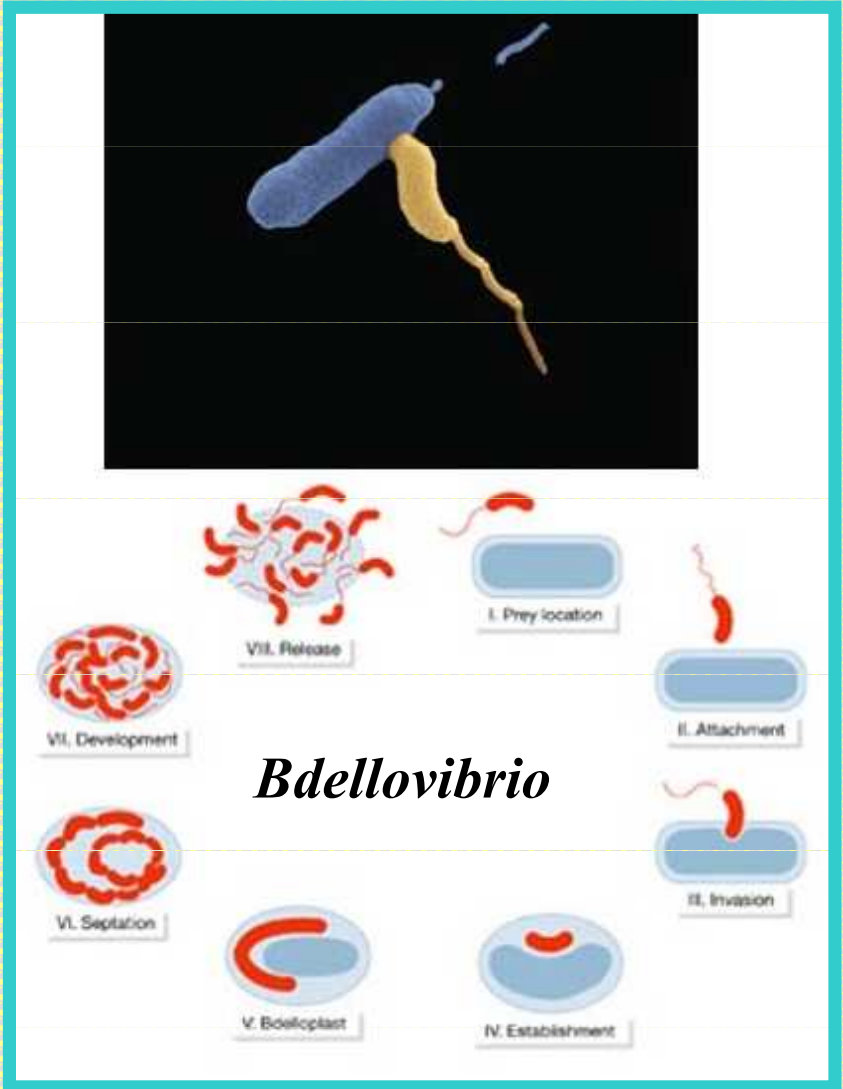
Mění se nejen vzhled buňky, ale buňka v cyklech prochází typickou změnou vnitřních struktur.

Buněčný cyklus
Caulobacter crescentus

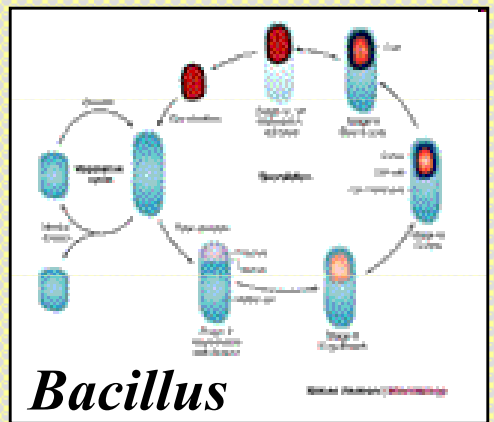
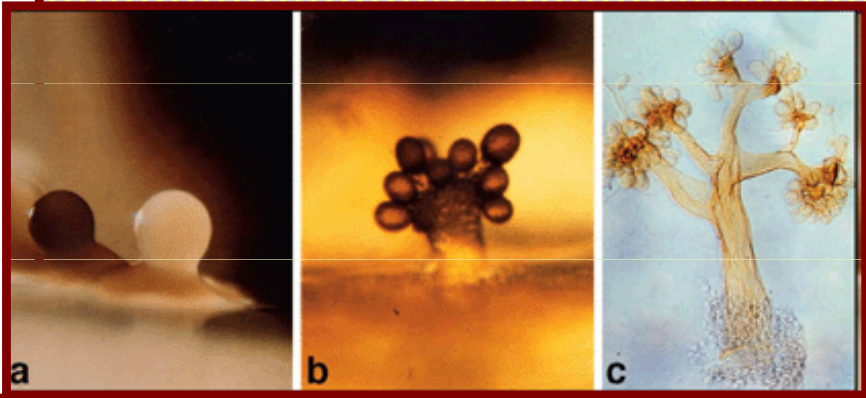




© Jim Hunter 2007

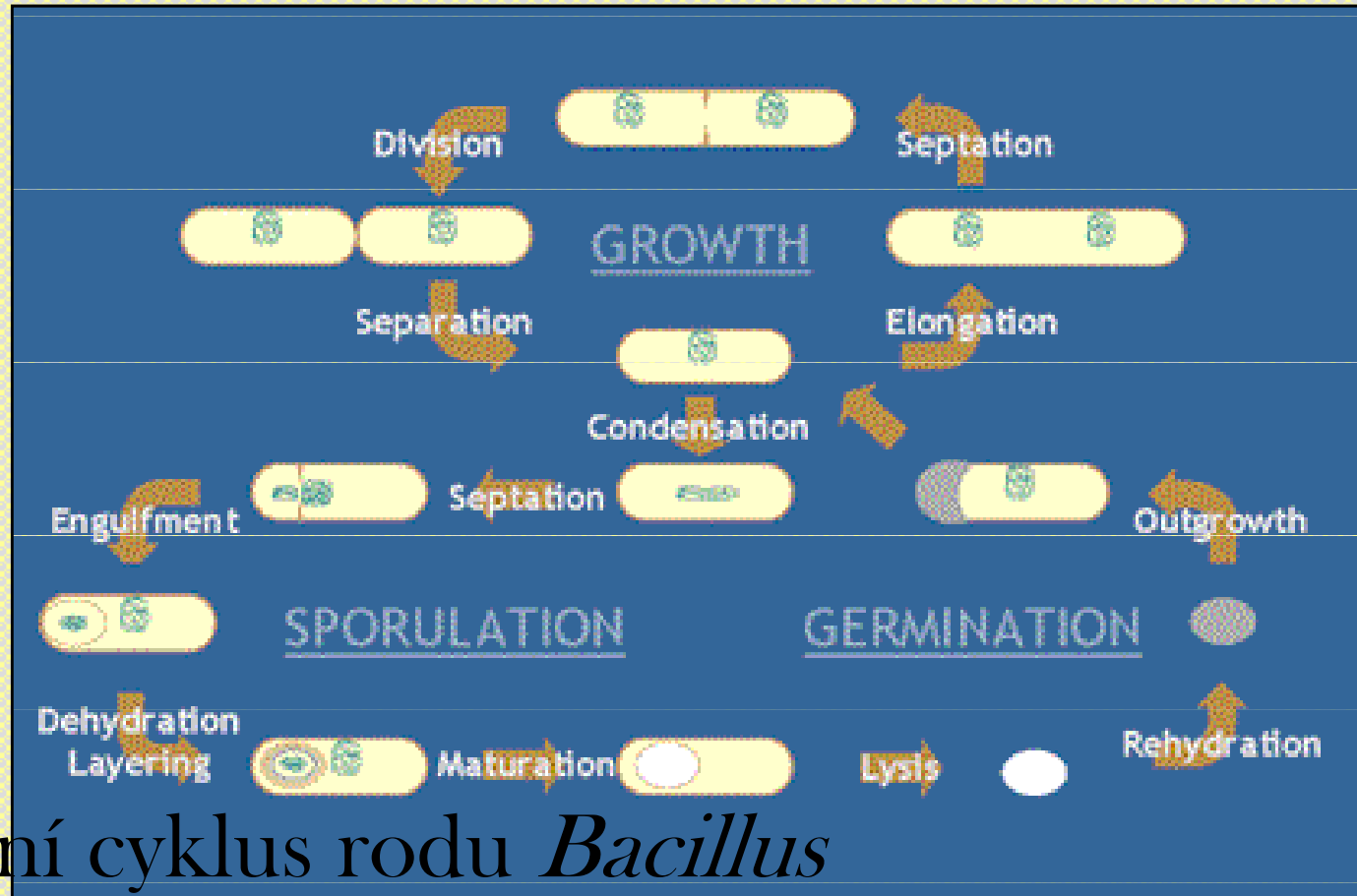


Myxobakterie



Bacillus

Morfologie buňky vprostřed buněčného cyklu



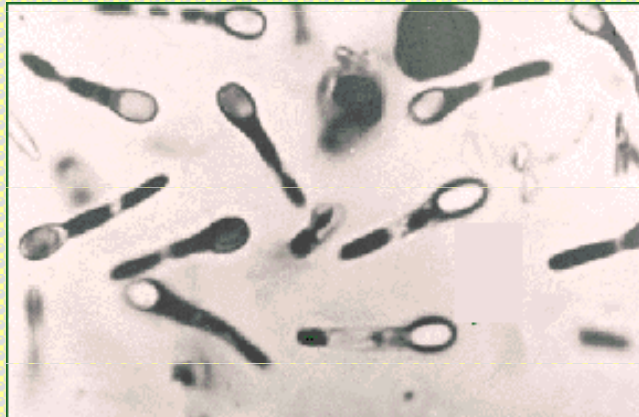
Životní cyklus rodu *Bacillus*

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

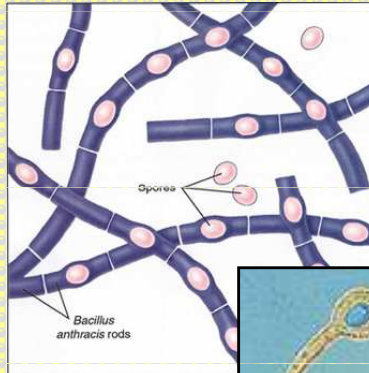
→ při popisu preparátu nutno uvažovat stáří buněk!

2) Vytváří posuzovaný druh endospory?

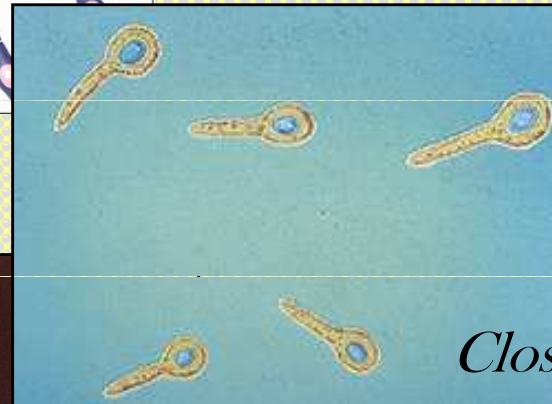
- v preparátu pak mohou měnit tvar buněk!



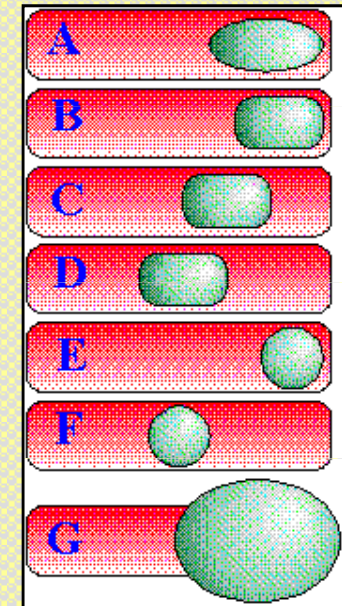
Clostridium difficile



Bacillus anthracis



Clostridium tetani



„Voják umírající na tetanus“

Sir Charles Bell

lukovité prohnutí zad (opisthotonus)

křečovitý výraz

Originál je k vidění:

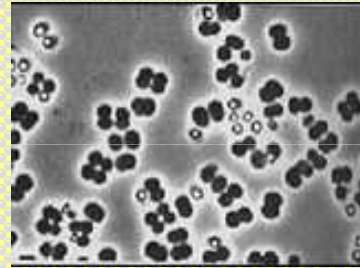
Royal College of Surgeons
of Edinburgh, Scotland.

Endospory vs. exospory

- G+ bakterie - endospory

termorezistentní

Bacillus, Clostridium, Sporosarcina,
Sporolactobacillus, Thermoactinomyces

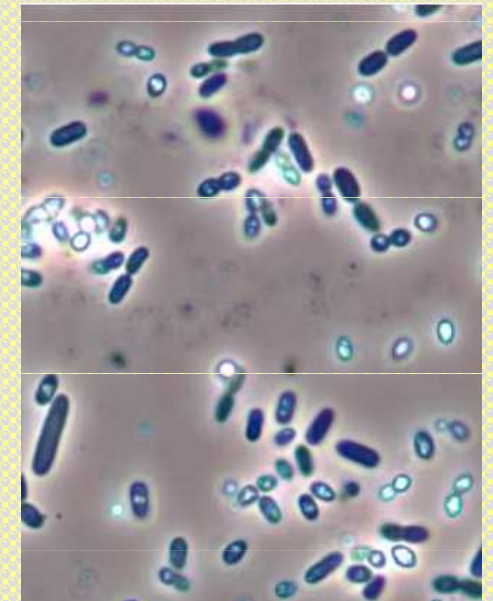


Sporosarcina - balíčky 8 buněk
fázový kontrast

- G- bakterie - exospory

Méně rezistentní, odolné zejm. vůči vysychání

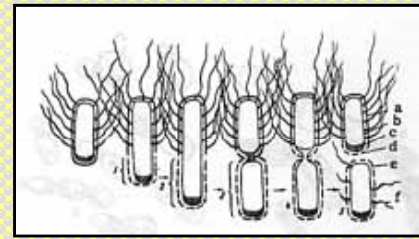
Azotobacter, Methylosinus



Azotobacter

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

- Konidie: Actinobacteria

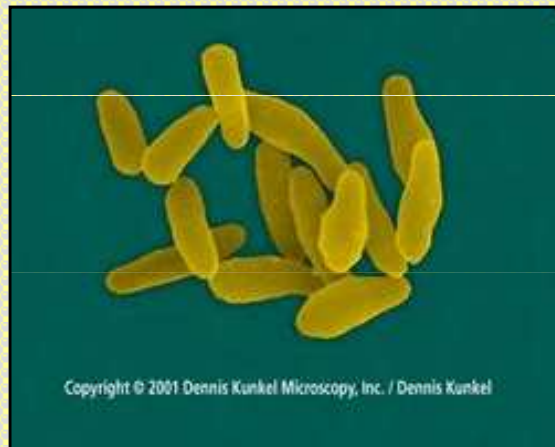


3) Stárnutím mění buňky tvar

4) Závislost tvaru buňky na vnějším prostředí

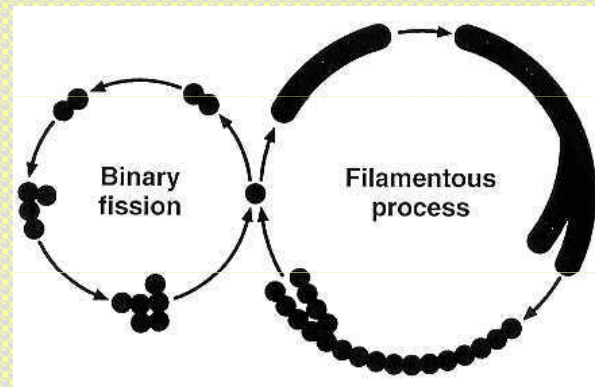
- živiny, tlak, osmolarita...

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



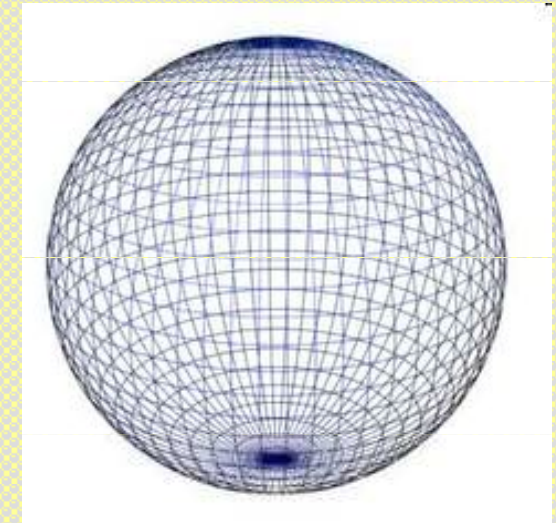
Corynebacterium

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



Co je možno vyčíst z tvaru buňky

- tvar buňky napovídá o metabolické aktivitě (kokovité buňky vykazují max. metabol. aktivitu neboť mají největší povrch ku objemu b.)



- fáze růstového cyklu
-

Morfologie charakteristických shluků buněk

- typické shluky napomáhají identifikaci

řetízky koků: *Streptococcus*

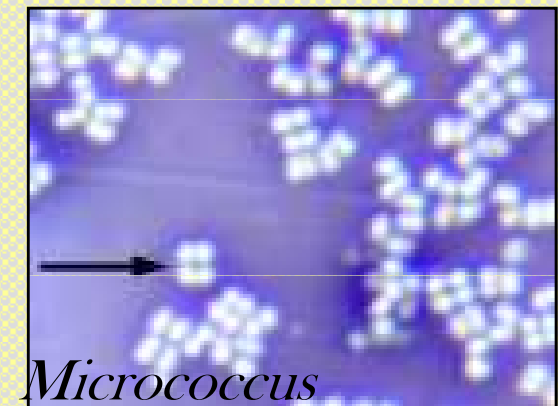
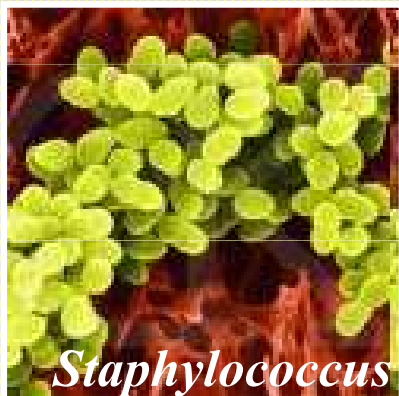
řetízky bacilů: *Bacillus*

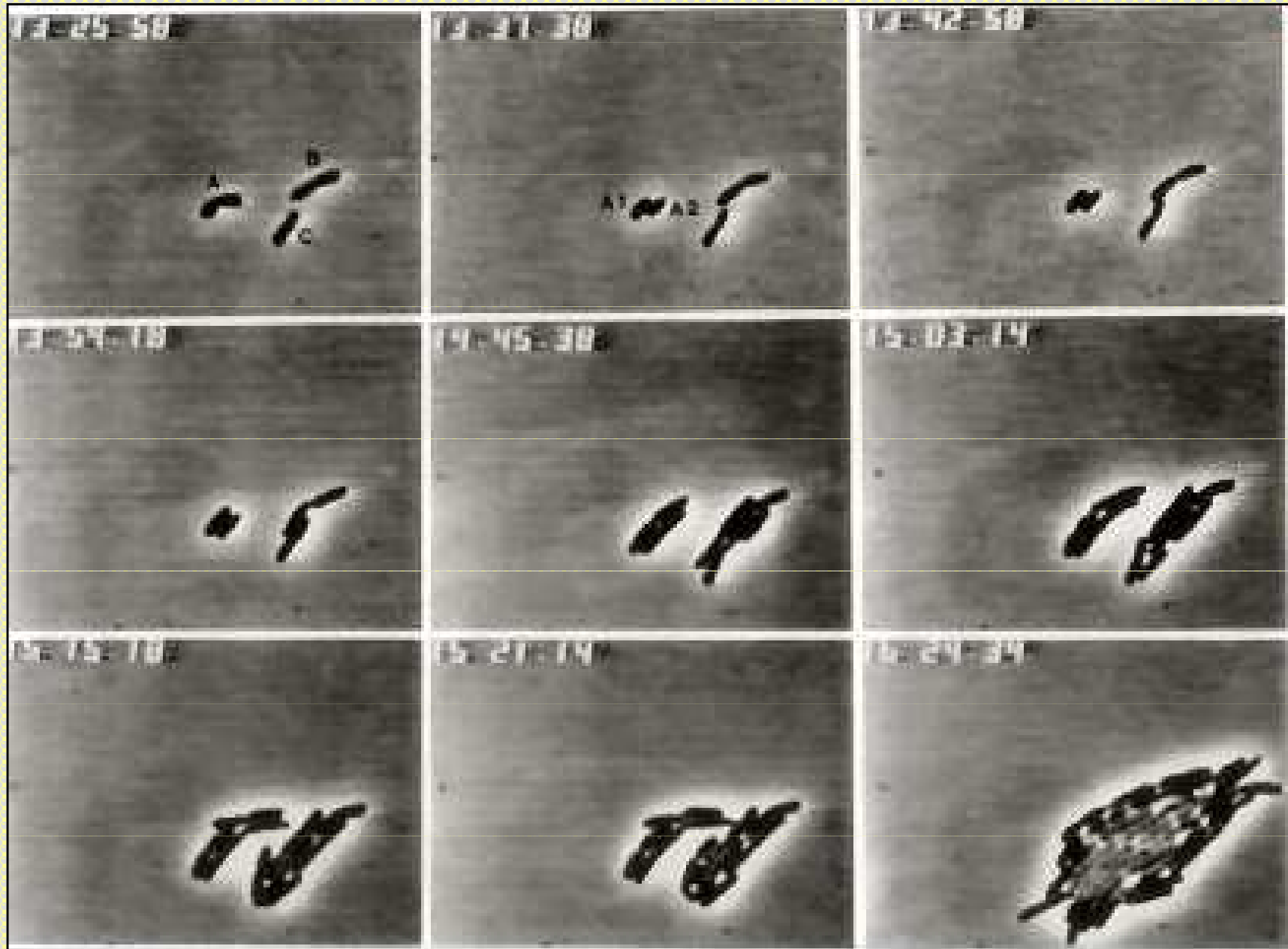
palisády: *Corynebacterium*

tetrády koků: *Micrococcus*

balíčky = sarciny *Sarcina*

hrozníčky: *Staphylococcus*





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

Morfologie bakt. kolonií

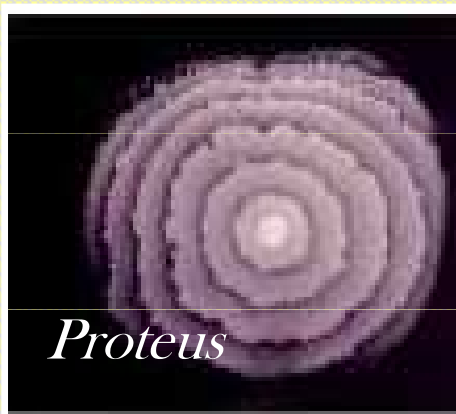
- potřeba zvážit typ media, ne kterém kolonie hodnotíme!
kultivace - zda vůbec kultivovatelné?? - sledování typu kolonií

Př: sledování morfologie kolonií

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

S-, R- a M-formy

sledování pohybu terasovité kolonie (Př: *Proteus*)

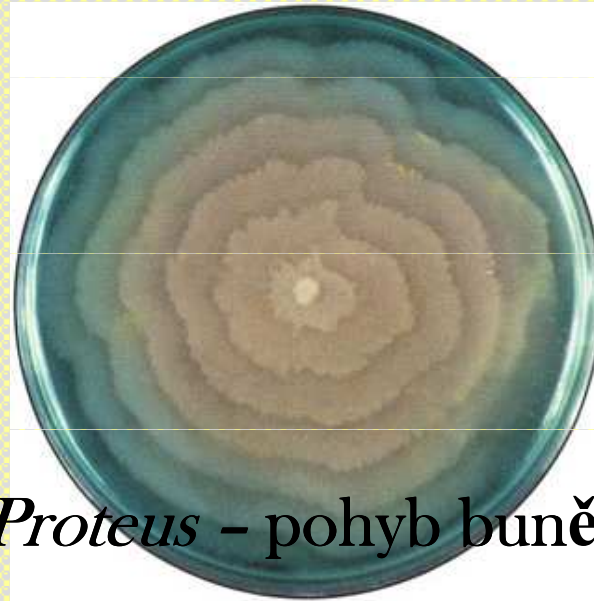


Morfologie bakteriálních kolonií

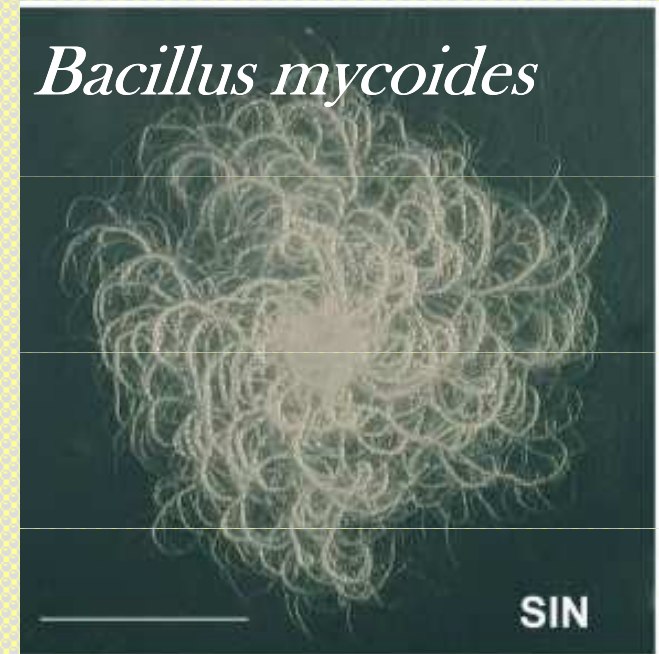
I. na základních půdách



Nocardia

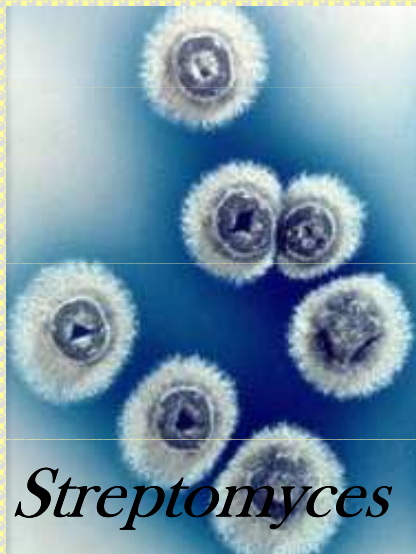


Proteus - pohyb buněk



Bacillus mycooides

SIN



Streptomyces



Streptomyces



Serratia marcescens

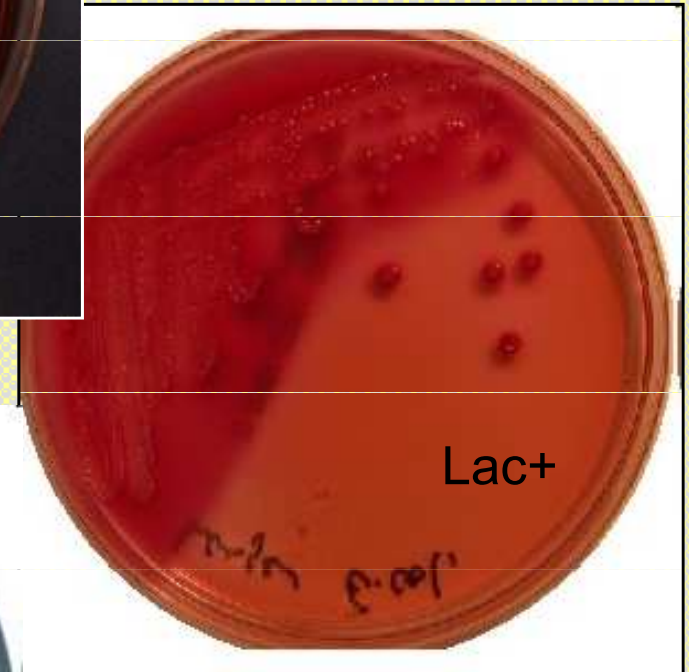
Bakteriální kolonie na
II. diagnost. půdách



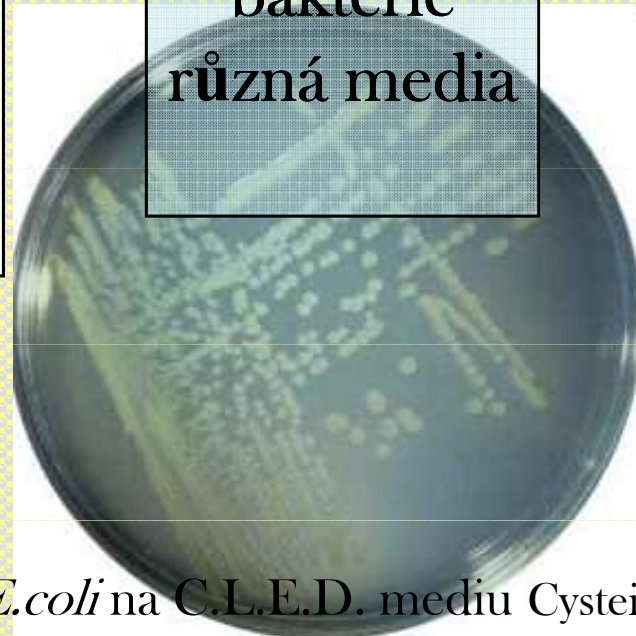
E.coli na krevním agaru



Jeden druh
bakterie
různá media



E.coli na MacConkey agaru



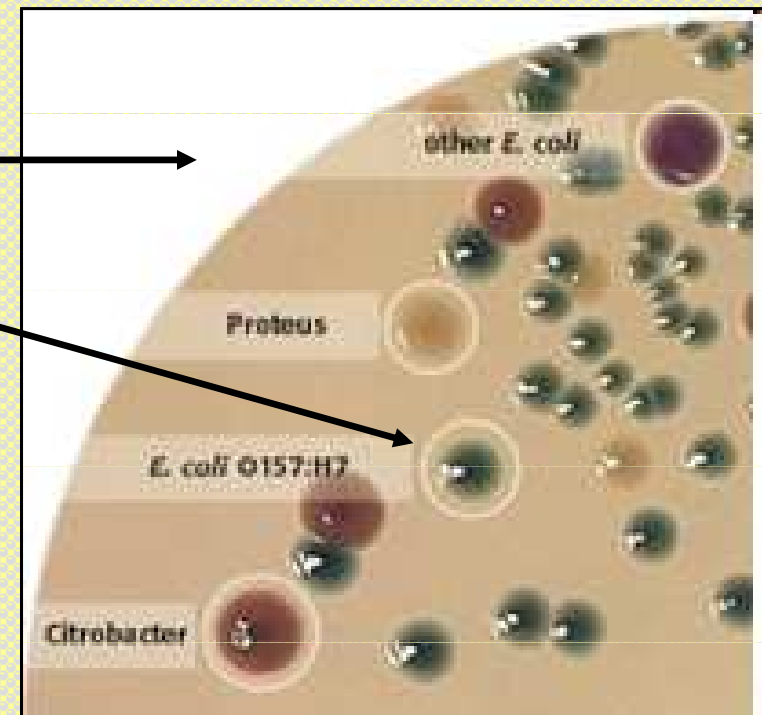
E.coli na C.L.E.D. mediu Cysteine Lactose Electrolyte Deficient Agar

Bakteriální kolonie na III. selektivních půdách

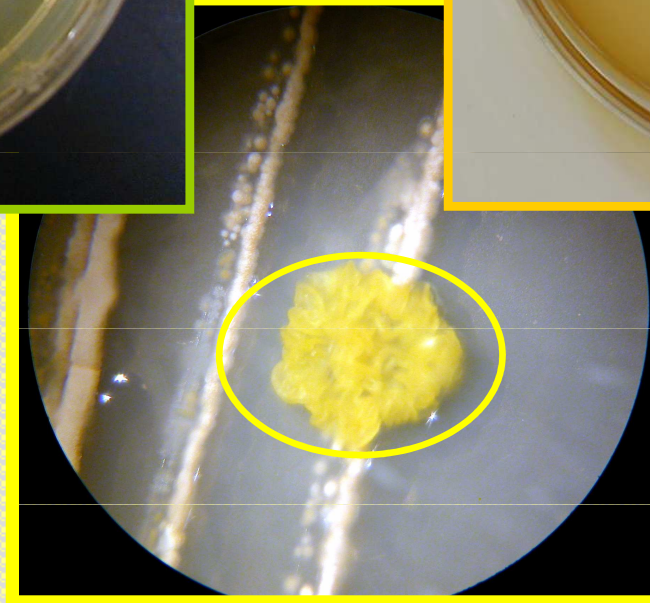


O157:H7 ID Agar

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
- 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, jiné proteiny
- - genet materiál: porovnání molekul.biol.pochodů, regulací!!
- - 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

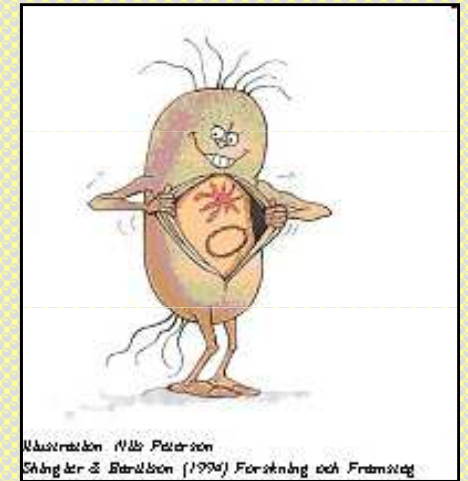
- Buněčné povrchy

- bílkovina, sacharid
- imunita makroorganismu
- výhody v prostředí (S-layer, pouzdra, slizy, biofilm)

- **CYTOSOL**

Cytologie – 1) buněčné struktury

jejich vztah k fyziologii

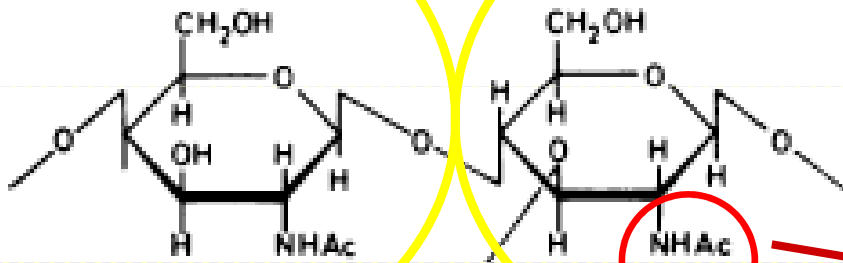


- metody výzkumu

PŘÍKLADY:

- Složky peptidoglykanu (AMK, cukry) napomáhají při taxonomických studiích
 - složení PG, barvitelnost b. stěny, serologie, fagotypizace
- Výskyt typ.inkluzí – pomoc při identifikaci
- Bičík – vztah mezi strukturou a mechanismem otáčení, který je různý u různých druhů!!

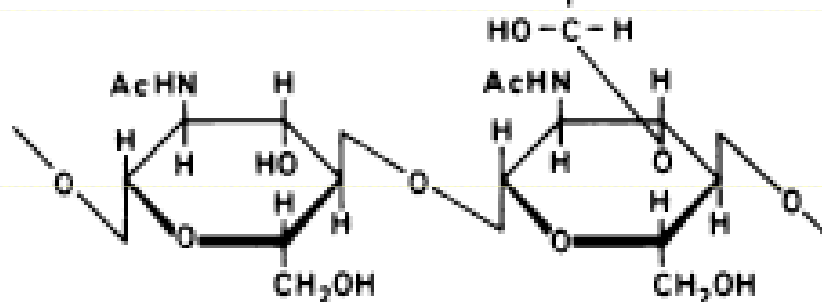
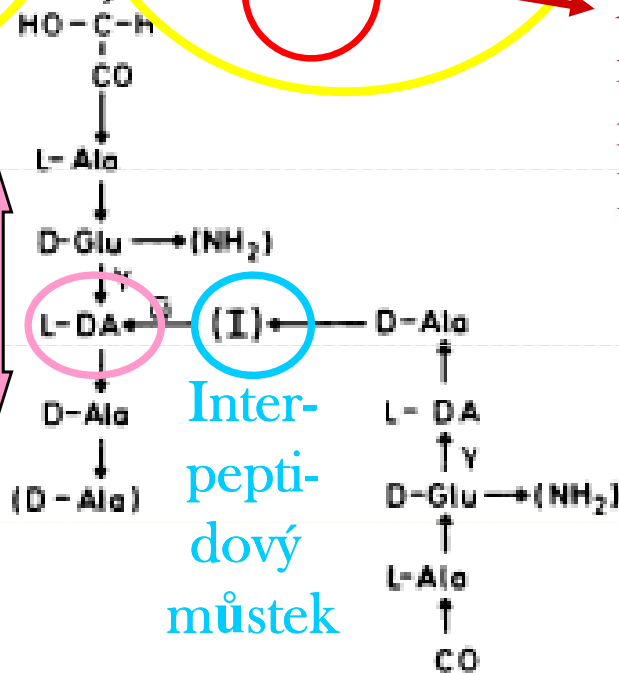
Peptidoglykan = uniformní disacharid
 N-acetylglukózámin + N-acetylmuramová



Vztah mezi tvarem buňky a počtem disacharidových jednotek v peptidoglykanu (10 - 65)

Acidorezistentní mykobakteria, nokardie..
 nebarvitelné Gramem:
 N-glykolylmuramová

Tetrapeptid L- a D-AMK
 Spojení: rozdíl v pozici 3



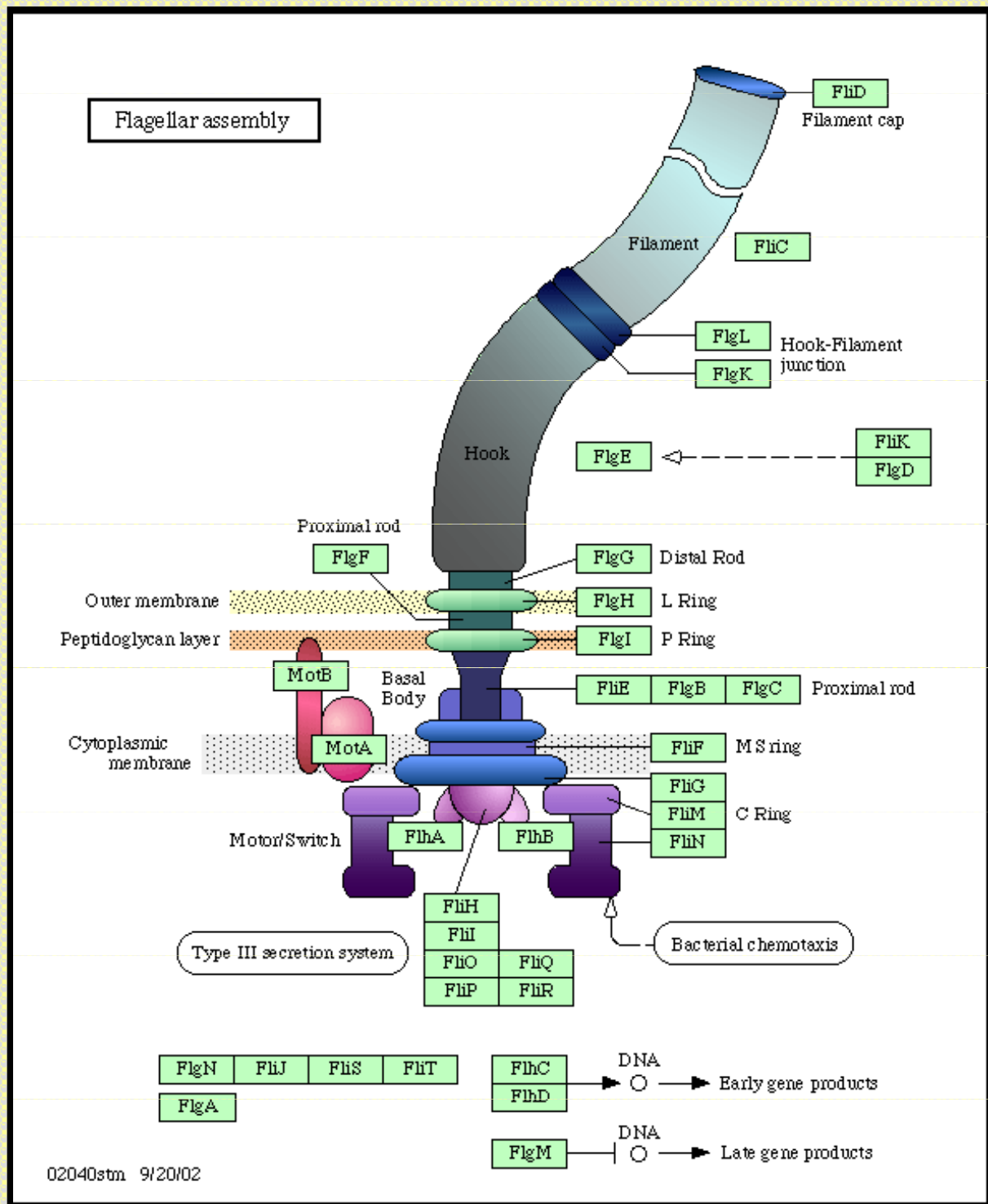
CHEMOTAXONOMIE:

Aminkokyselinové složení tetrapeptidu a můstku!!

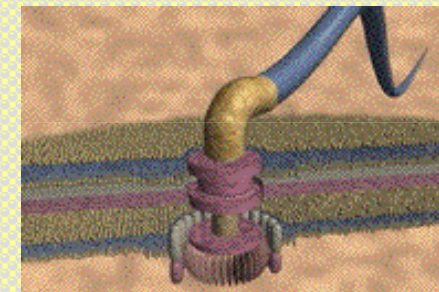
Micrococcaceae - až druhově charakteristická struktura můstku

Streptomycety: 3 pozice unikátní L-amino DAP kyselina

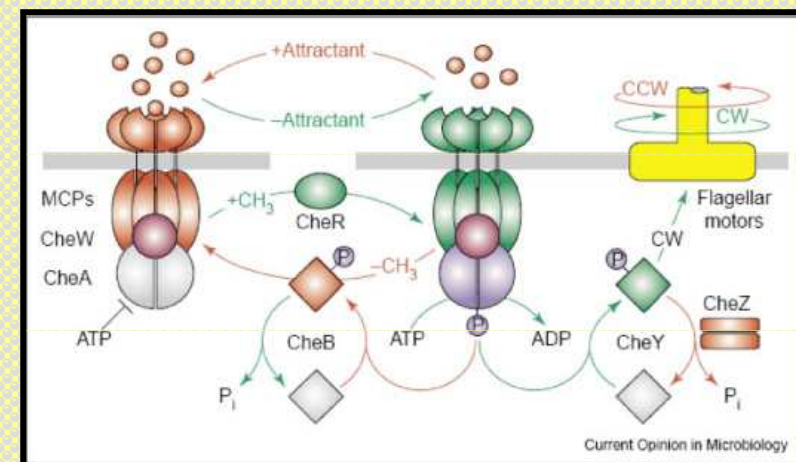
Stěna spory: jiné a unikátní složení peptidoglykanu!



UKÁZKA_2



- rotace bičičku kolem vlastní osy - pouze u prokaryot
- poháněn proton motive force (pmf) - pohyb protonů přes CM
- Regulace pomocí MCP systému = proteiny



Cytologie a morfologie buněk
v průběhu buněčného cyklu,
ve fázích růstového cyklu,
při dělení a
smrti buňky

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 – žíhání kličky v plameni kahanu..



Kahan zapnutý jen po dobu práce s ním

Popisování misek: zespodu,
svrchu - dle metody!!



Nevylévat nic do odpadu - stůl: odpadní nádoby

Prosíme neodnášet kultury!

O náplni cvičení se informovat předem
Viz Studijní materiály - příprava



Nejistota
- ptát se
ptát se ptát se!

