

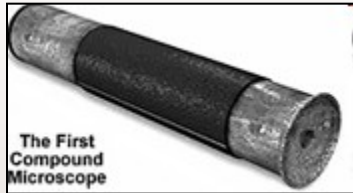
Úvod ke cvičením Mikrobiologie

Podzim 2009

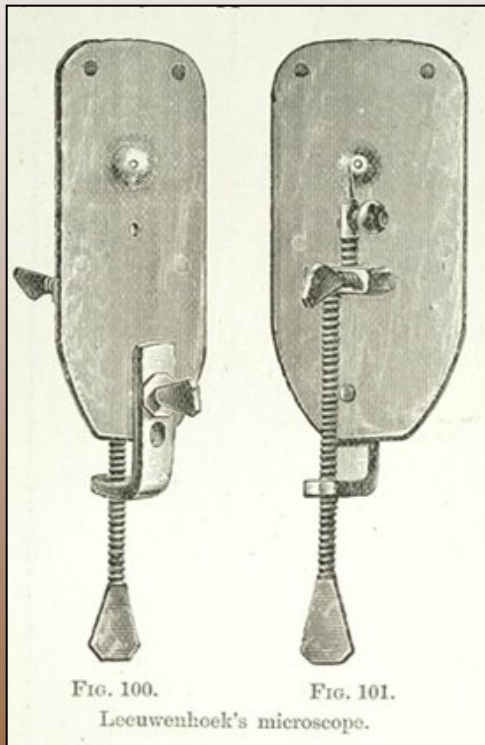


"The role of the infinitely small in nature is infinitely large"
Louis Pasteur

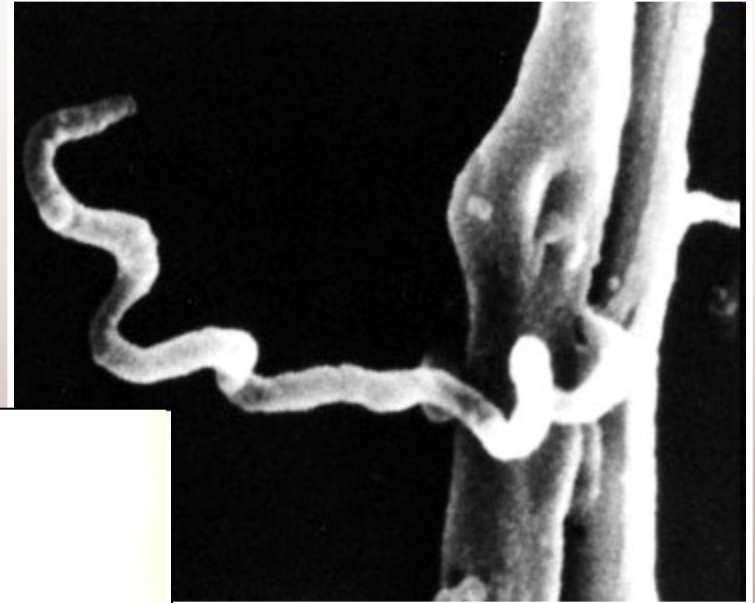
Cytologie a morfologie bakterií



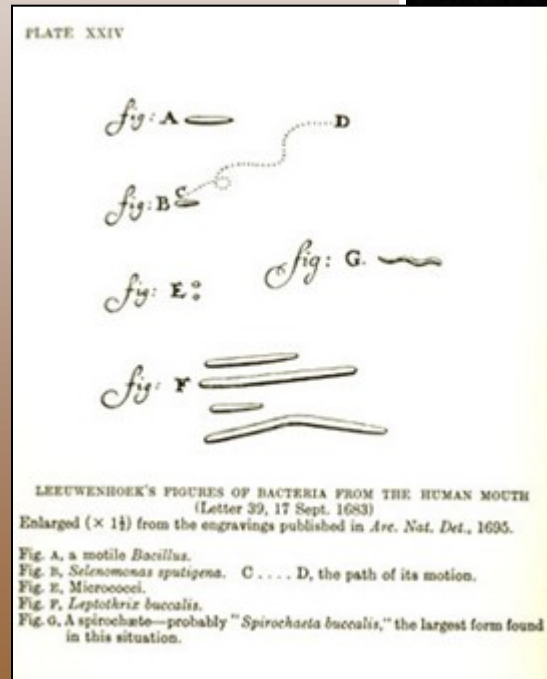
Janssenovi Z 9 x



Anthony van Leeuwenhoek
Z 50 - 275 x



Treponema pallidum
útočící na membránu
savčí buňky



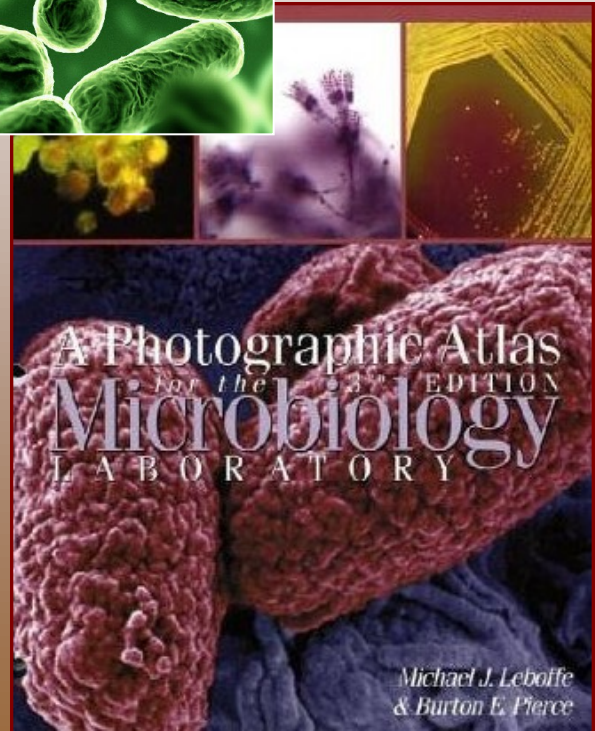
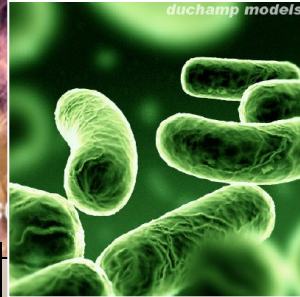
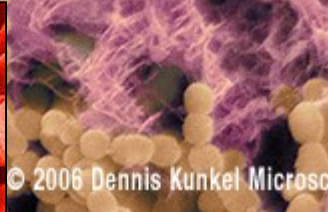
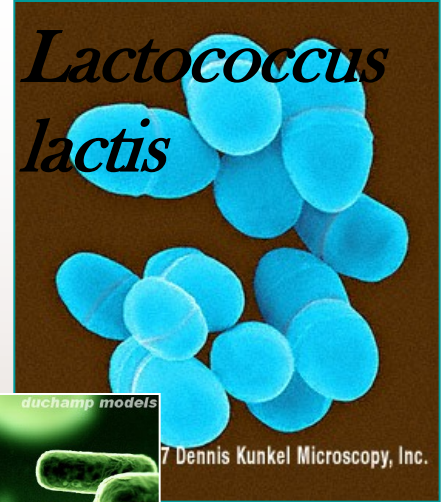
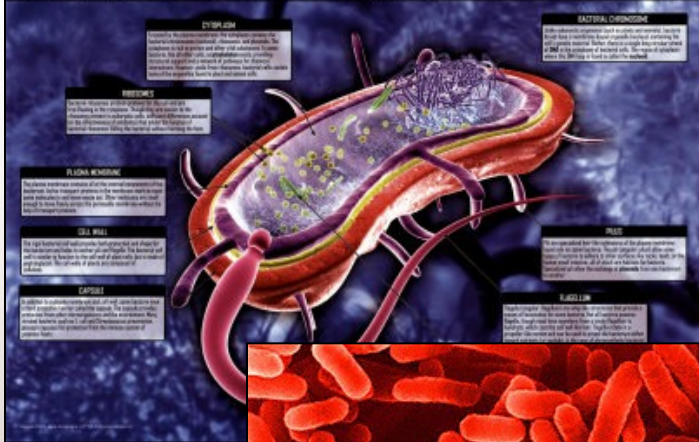
Anthony van Leeuwenhoek
První nákresy bakterií
(z ústní dutiny člověka)

Sylabus cvičení

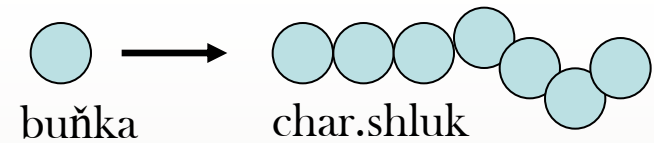
- Příprava a sterilizace živných medií
- Očkování a uchovávání mikroorganismů
- Makroskopické a mikroskopické pozorování
- Počítání životaschopných bakterií - sporulace
- Izolace půdních mikroorganismů
- Mikrobiologický rozbor vody
- Barvení a pozorování pouzder a spor
- Kvasinky
- Bakterie a jejich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



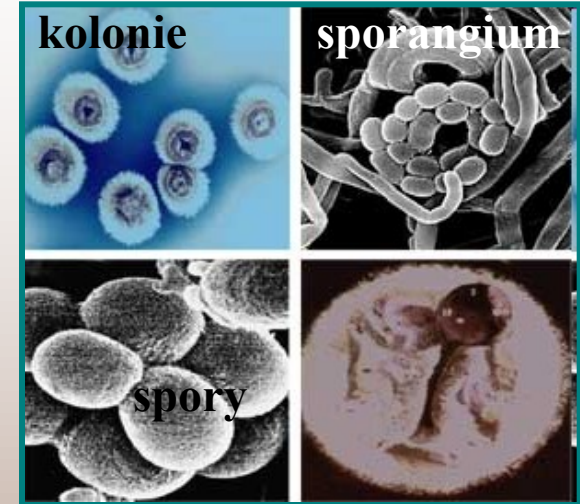
BACTERIA CELL



Morfologie



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



Většinou druhově charakteristické
= identifikační znak

Pozor na: fázi růstového cyklu!

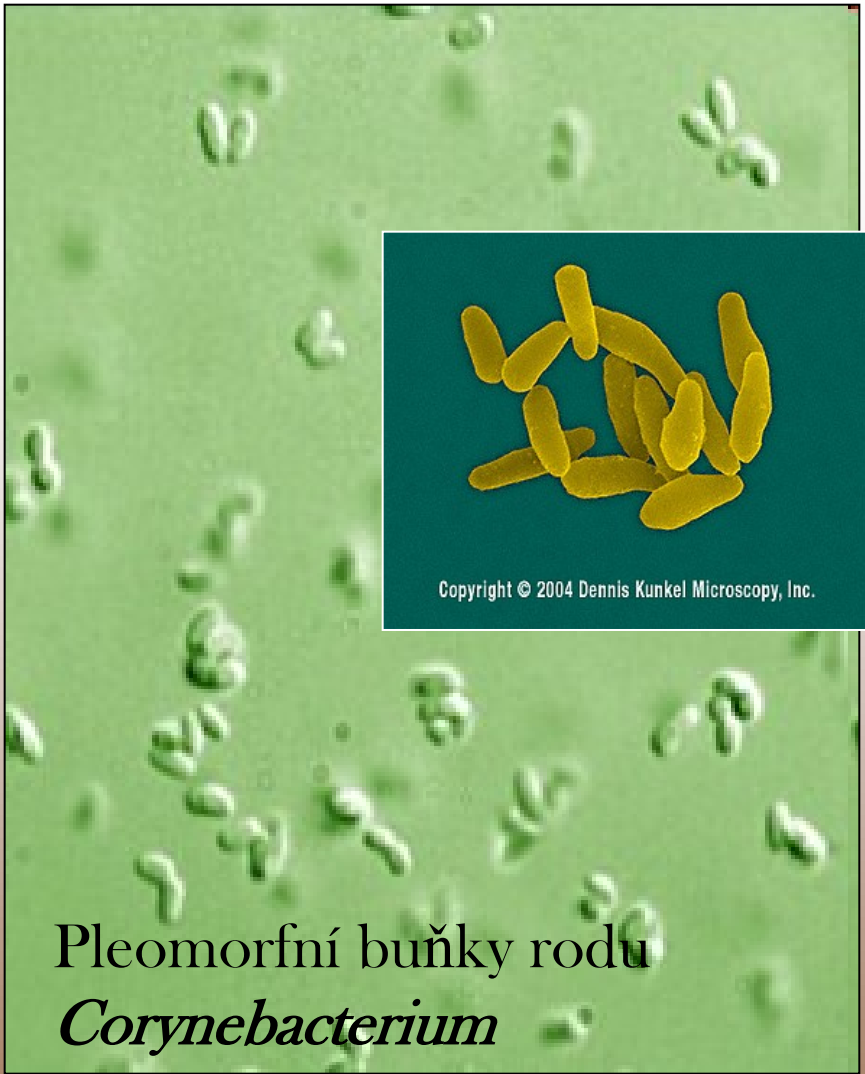
endospory vyklenující buňku

stáří kultury

pleomorfní buňky

*Clostridium
botulinum*





Copyright © 2004 Dennis Kunkel Microscopy, Inc.

Morfologie pleomorfních buněk.

Další potíže:

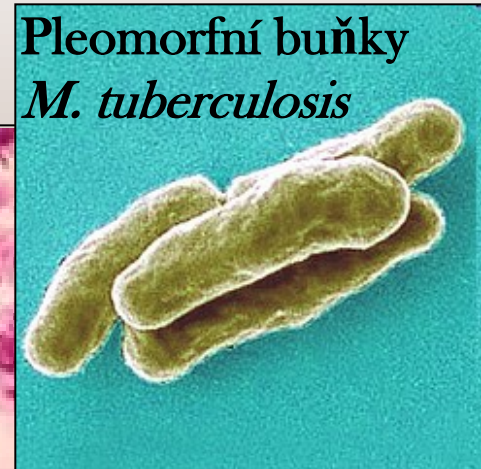
Jsou barvitelné Gramem?

Haemophilus - ano

Bez b.s.

Mykobakteria, mykoplazmata - nikoli

Mykolové kys



Pleomorfní buňky
M. tuberculosis



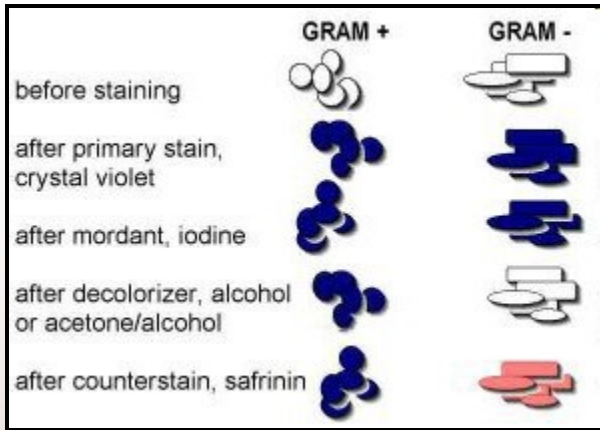
Mycobacterium avium-intracellulare

Acidorezistentní buňky:

Odmítají Gramovo barvení

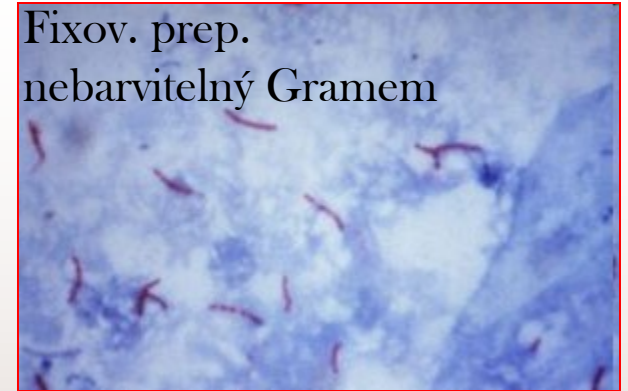
Odmítají se po nabarvení odbarvit ethanolem i kyselinou. Př: *Corynebacterium*, *Nocardia*...

Acidorezistentní barvení buněk histologického řezu lymfatické uzliny



Je neznámý vzorek vůbec barvitelný Gramem?
Není gramlabilní?

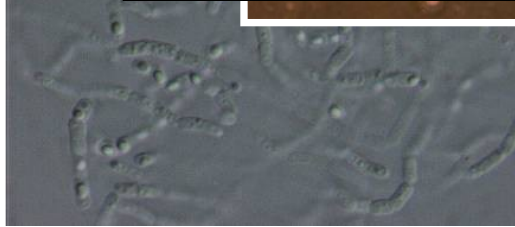
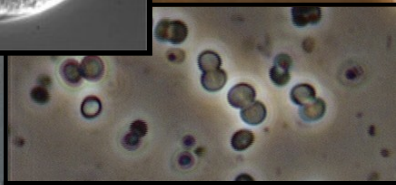
Fixov. prep.
nebarvitelný Gramem



Mycobacterium tuberculosis
Zeihl-Neelsonovo barvení (červeně)



S barevným filtrem

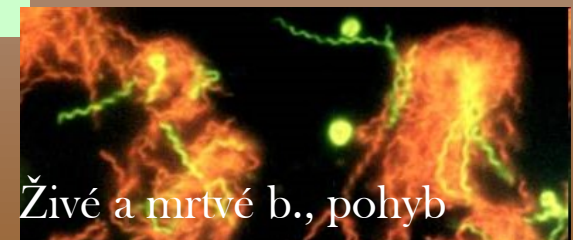


C1
mikroskopie?
Typ preparátu
Typ mikroskopie
(typ b. stěny,
průkaz struktur,
růstového cyklu)



Fixov. prep. - tvar a typ b.

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



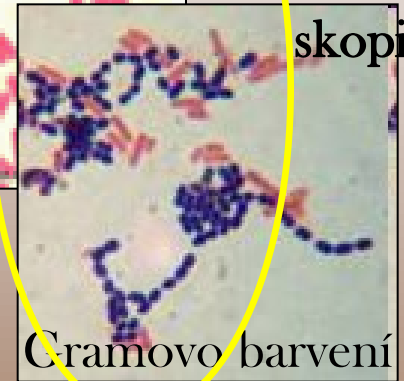
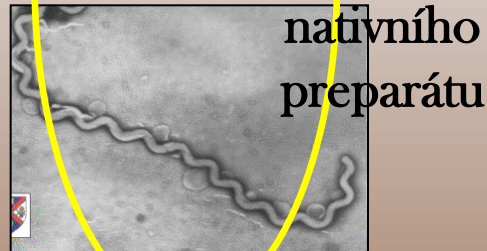
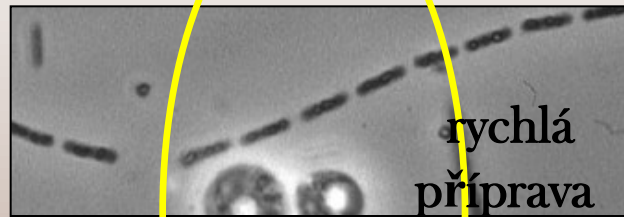
Živé a mrtvé b., pohyb

Morfologie buňky

• PREPARÁT

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

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



Světelná
Fázový kontrast
Fluorescenční
Elektronová...

světelná
mikro-
skopie

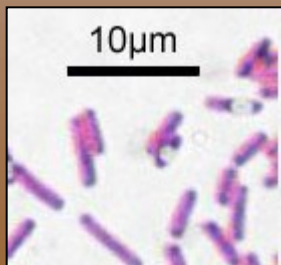
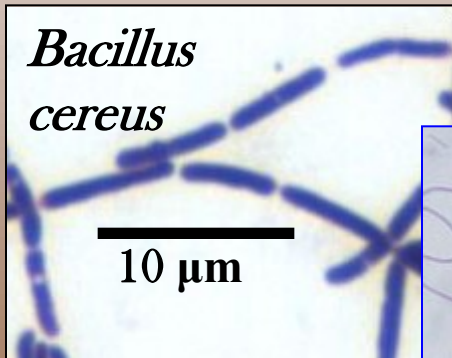
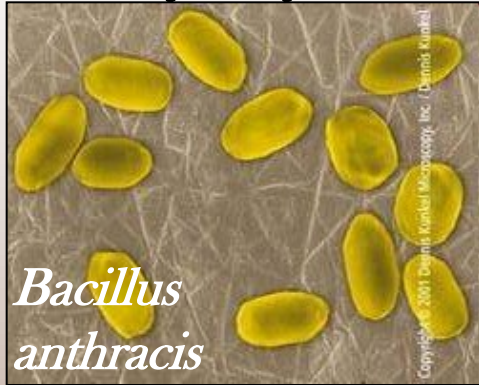
pohyb buňky - fázový kontrast, fluorescence

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

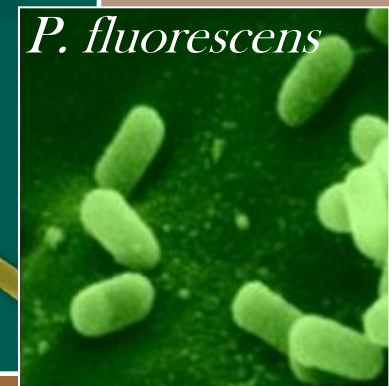
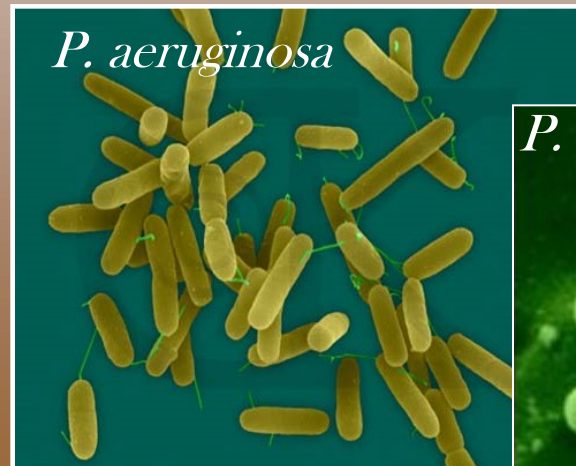


Bacillus subtilis

- *Haemophilus*



- *Pseudomonas*



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

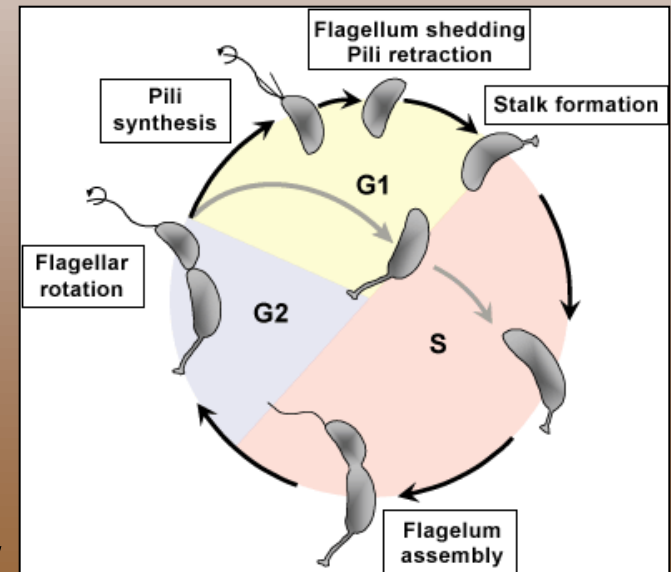
1) Prochází tento druh růstovými cykly?

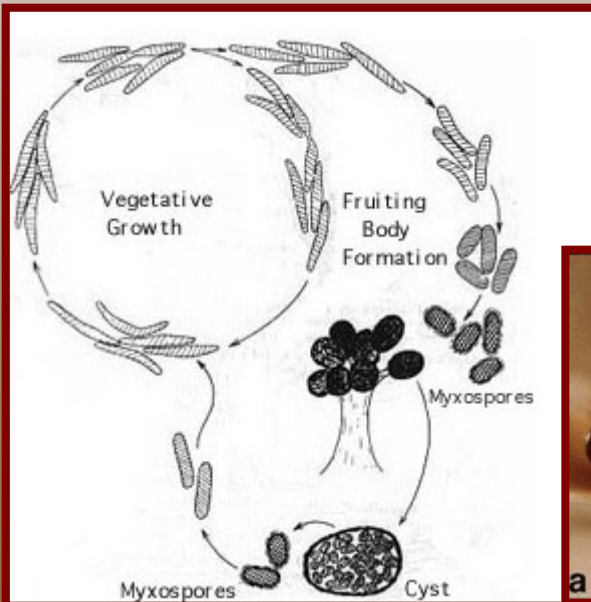
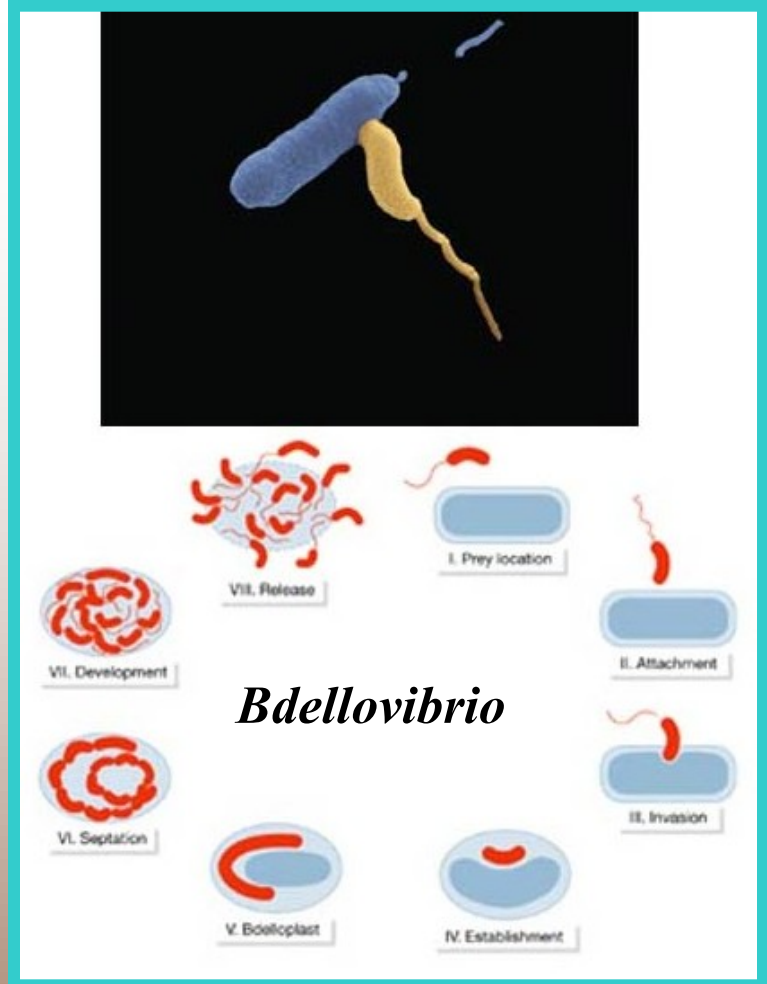
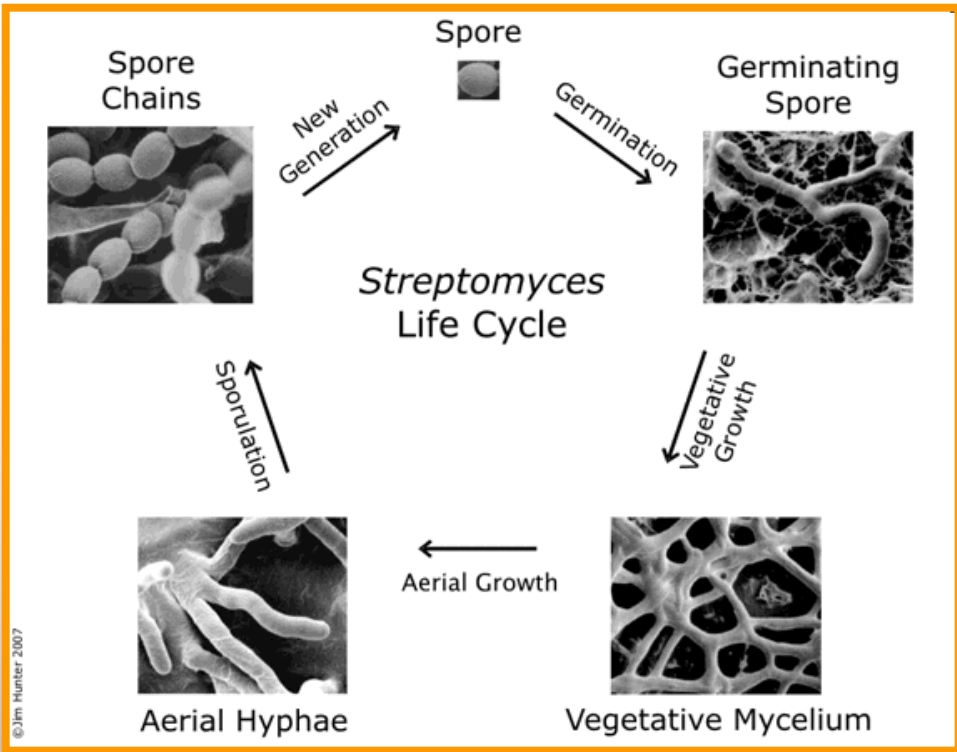
- v každém z nich má pak buňka jinou morfologii!

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

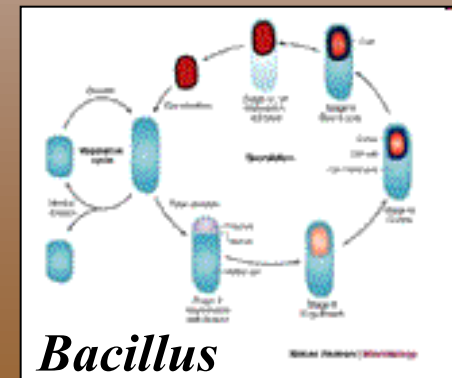
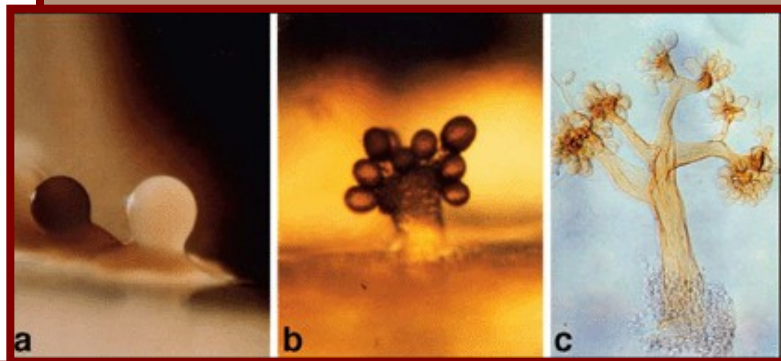
Mění se nejen vzhled buňky,
ale buňka v cyklech prochází
typickou změnou vnitřních
struktur.

Buněčný cyklus
Caulobacter crescentus

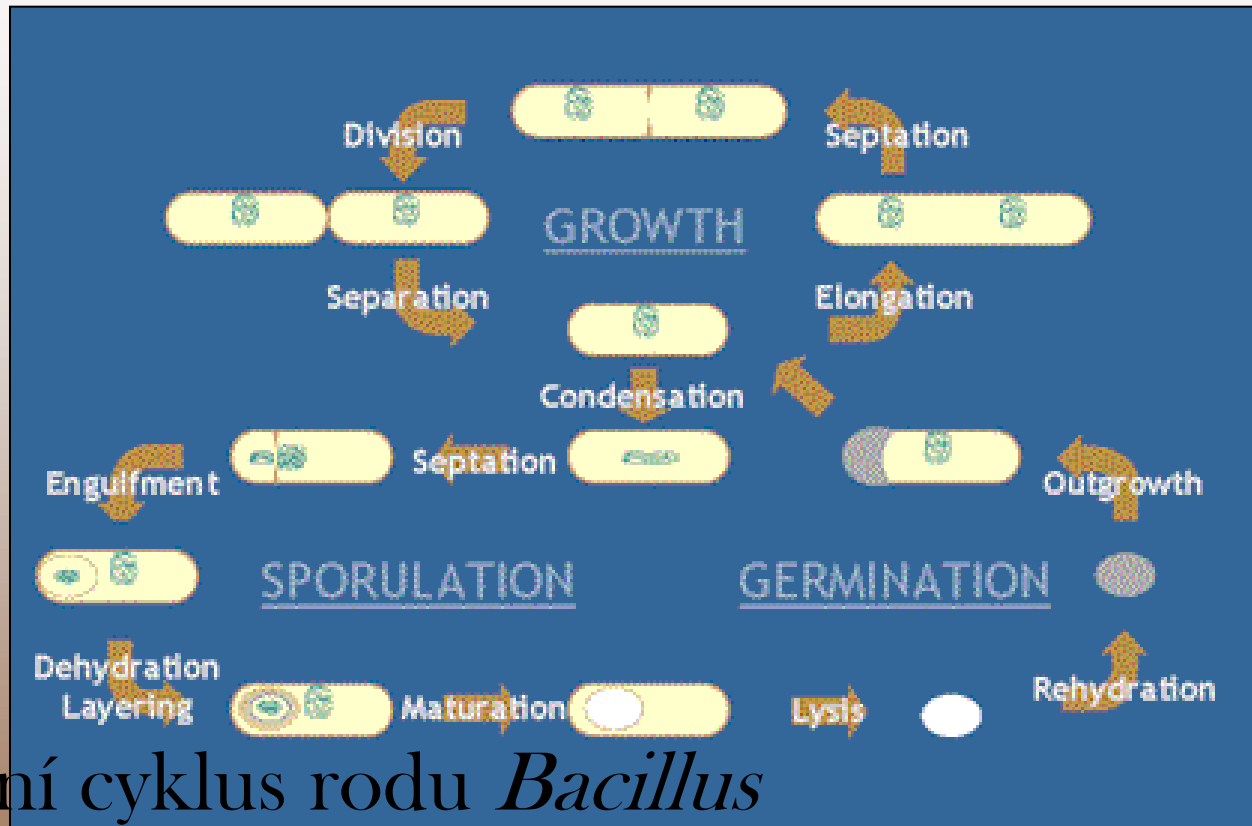




Myxobakterie



Morfologie buňky vprostřed buněčného cyklu



Životní cyklus rodu *Bacillus*

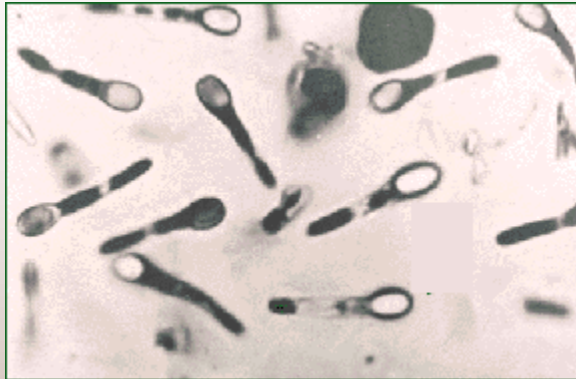
- u některých jeho druhů i u jiných rodů navíc různá barvitelnost

Gramem při různém stáří buněk - až gramlabilní

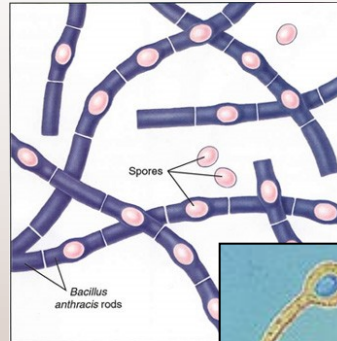
→ při popisu preparátu nutno uvažovat stáří buněk!

2) Vytváří posuzovaný druh endospory?

- v preparátu pak mohou měnit tvar buněk!



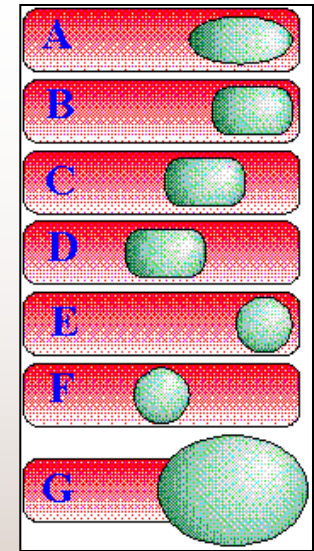
Clostridium difficile



Bacillus anthracis



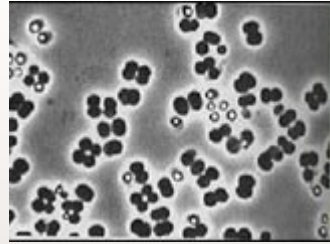
Clostridium tetani



„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

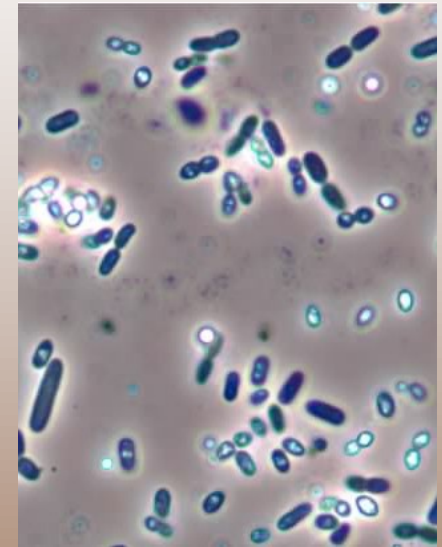
termorezistentní

*Bacillus, Clostridium, Sporosarcina,
Sporolactobacillus, Thermoactinomyces*

- G- bakterie - exospory

Méně rezistentní, odolné zejm. vůči vysychání

Azotobacter, Methylosinus

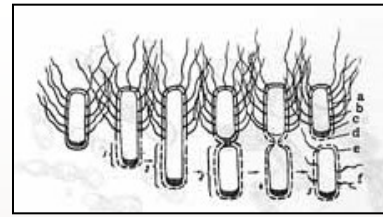


Azotobacter

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

- Konidie: Actinobacteria

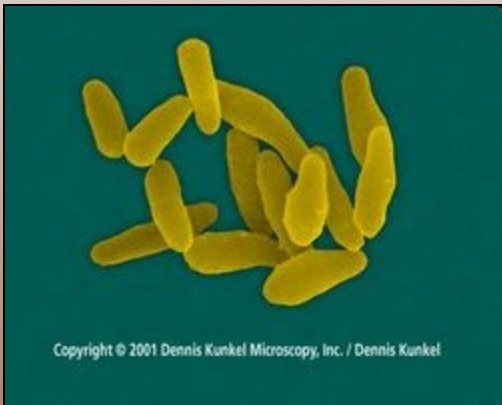
3) Stárnutím mění buňky tvar



4) Závislost tvaru buňky na vnějším prostředí

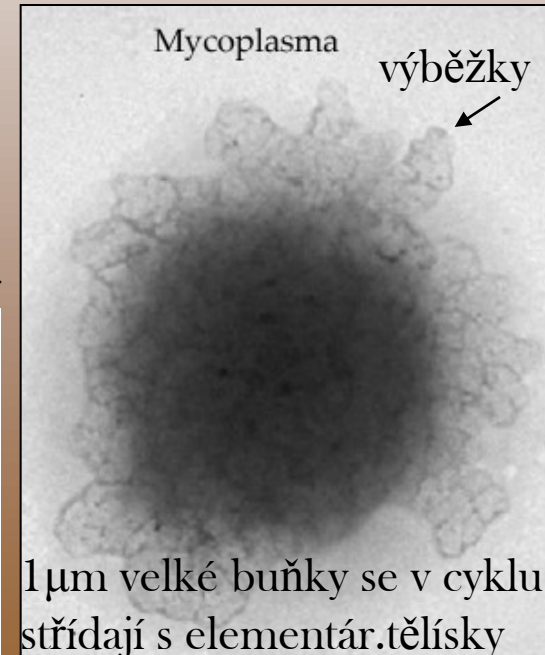
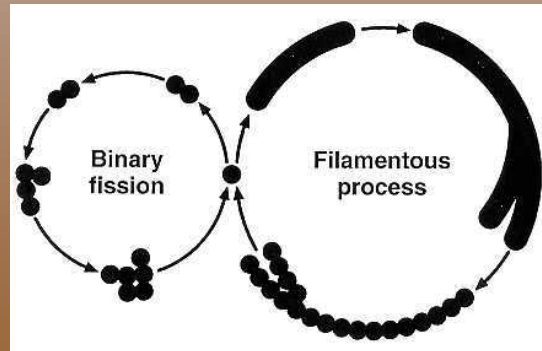
- živiny, tlak, osmolarita...

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



Corynebacterium

Pleomorfní mykoplazmata:
nejmenší bakteriální
buňky (0,2 - 0,3 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*

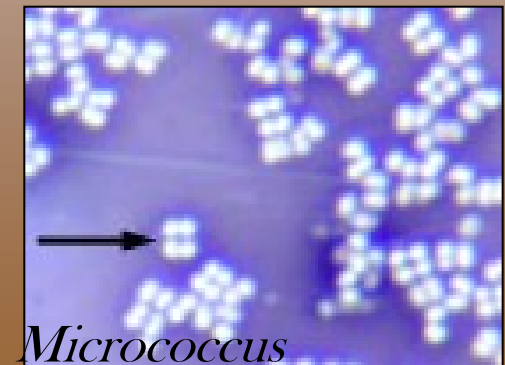
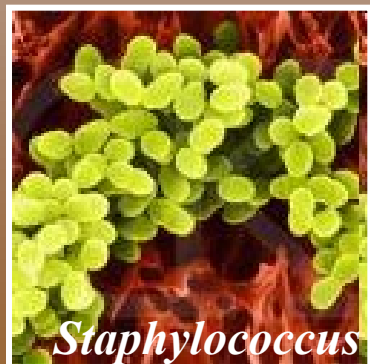


palisády: *Corynebacterium*

tetrády koků: *Micrococcus*

balíčky = sarciny *Sarcina*

hrozníčky: *Staphylococcus*



Morfologie bakt. kolonií

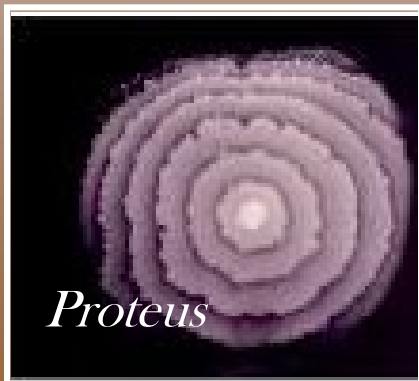
- potřeba zvážit typ media, ne kterém kolonie hodnotíme!
kultivace - zda vůbec kultivovatelné?? - sledování typu kolonií

Př: sledování morfologie kolonií

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

S-, R- a M-formy

sledování pohybu terasovitě kolonie (Př: *Proteus*)

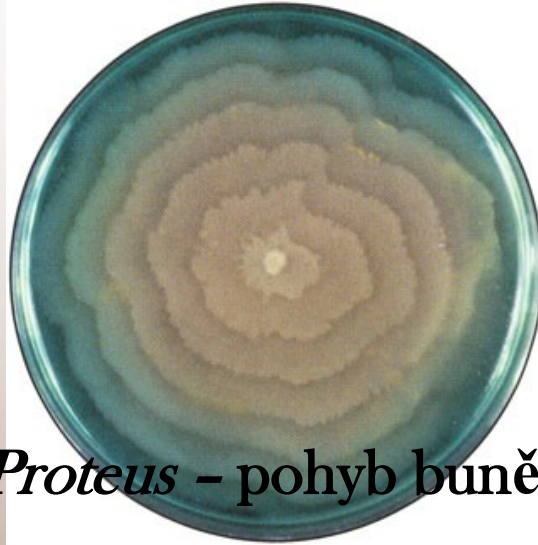


Morfologie bakteriálních kolonií

I. na základních půdách



Nocardia



Proteus – pohyb buněk



Bacillus mycooides

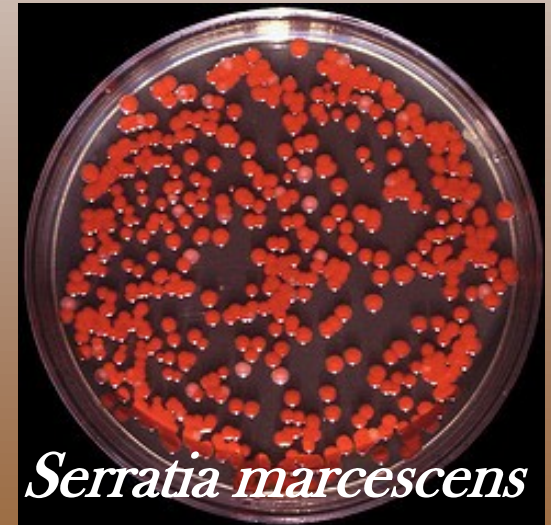
SIN



Streptomyces



Streptomyces



Serratia marcescens

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

Bakteriální kolonie na
II. diagnost. půdách



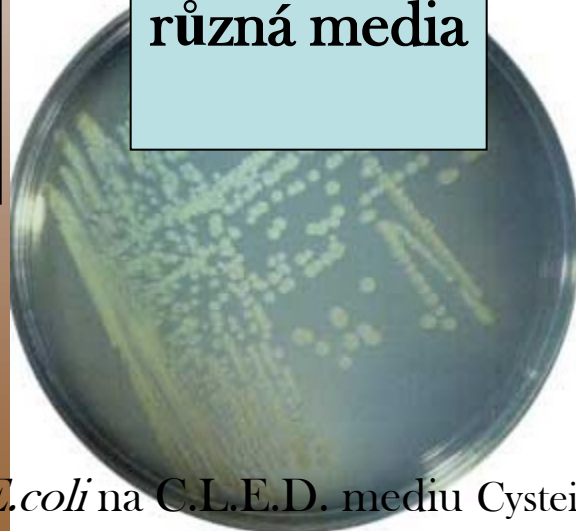
E.coli na krevním agaru



Jeden druh
bakterie
různá media



E.coli na MacConkey agaru



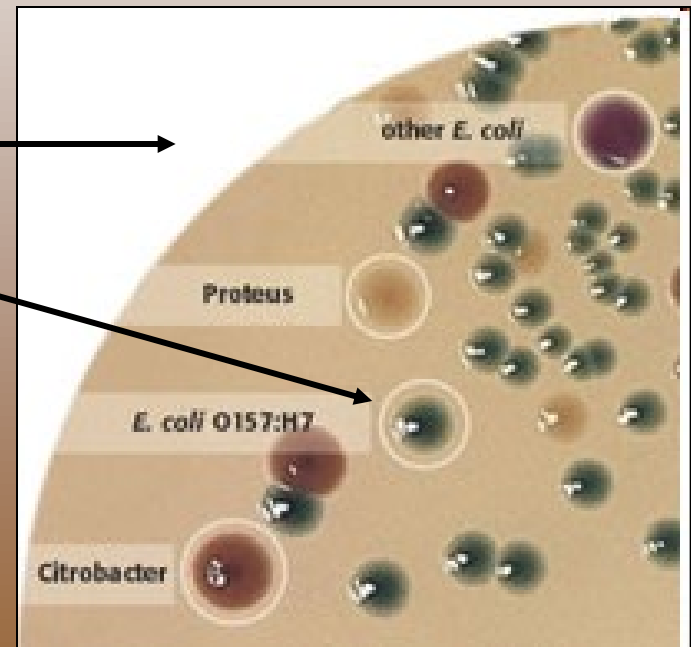
E.coli na C.L.E.D. mediu Cysteine Lactose Electrolyte Deficient Agar



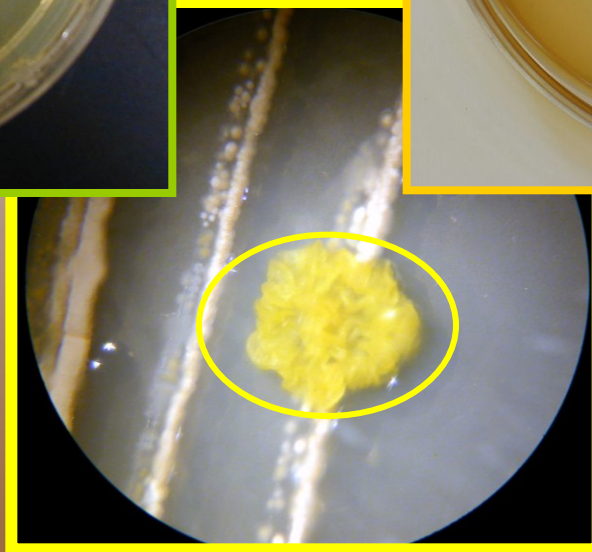
Bakteriální kolonie na III. selektivních půdách

O157:H7 ID Agar

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



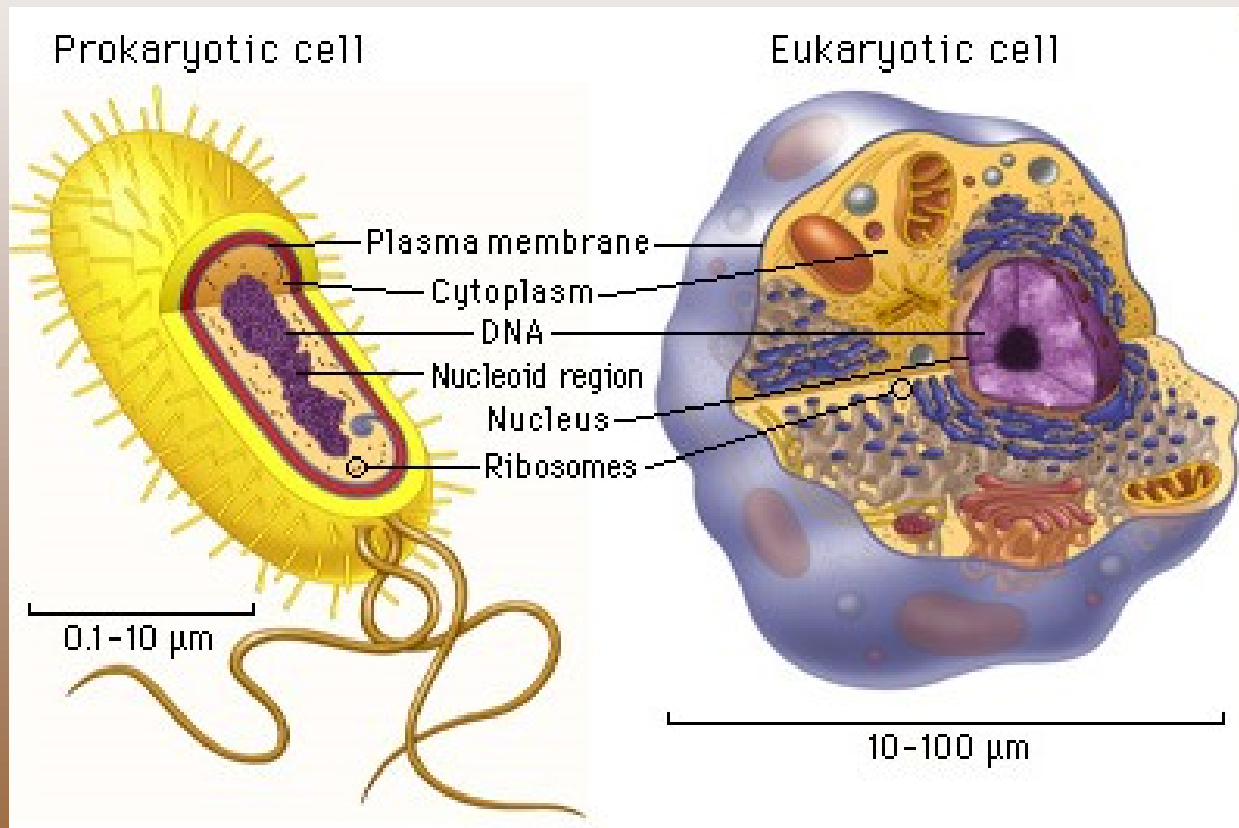
Kontaminace na misce!



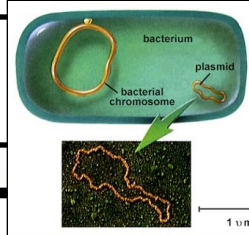
Cytologie

BAKTERIÁLNÍ BUŇKA x vs. eukaryotní

- nutno porovnat pro pochopení fyziologie



Zvláštnosti prokaryotické buňky

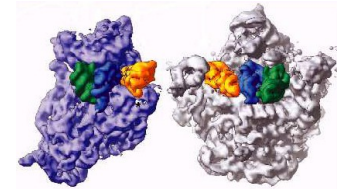


- živý, otevřený systém schopný regulace a autoreprodukce
- jádro neodděleno od CPL membránou, větš. kruhová (i lineární) DNA
- haploidní buňky (1 alela) množící se nepohlavně
- bez buněčných organel, jediná membrána je cytoplasmatická
- ribosomy se liší od ribosomů eukaryotních buněk - menší, volně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

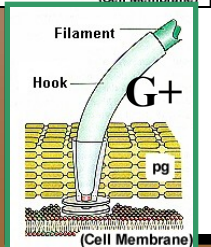
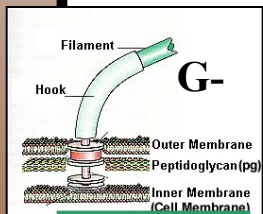
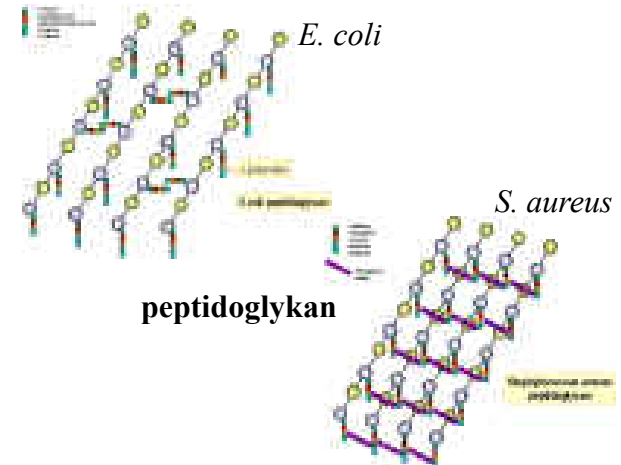
steroly v membránách zcela výjimečně

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* CC7
- *Aeromonas hydrophila* ssp. *hydrophila* CC5

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

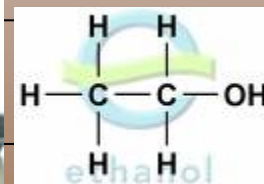
!!



:



případně



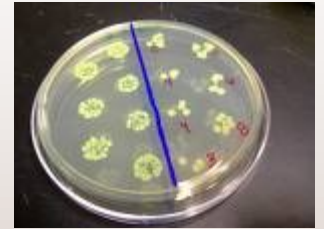
ethanol

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

