

# Úvod ke cvičením

## Mikrobiologie

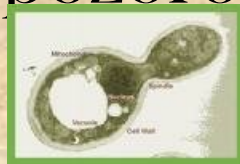
Podzim 2011



"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
- Barvení a pozorování pouzder a spor
- Kvasinky
- Bakterie a jejich citlivost na antibiotika
- Základní biochemické testy

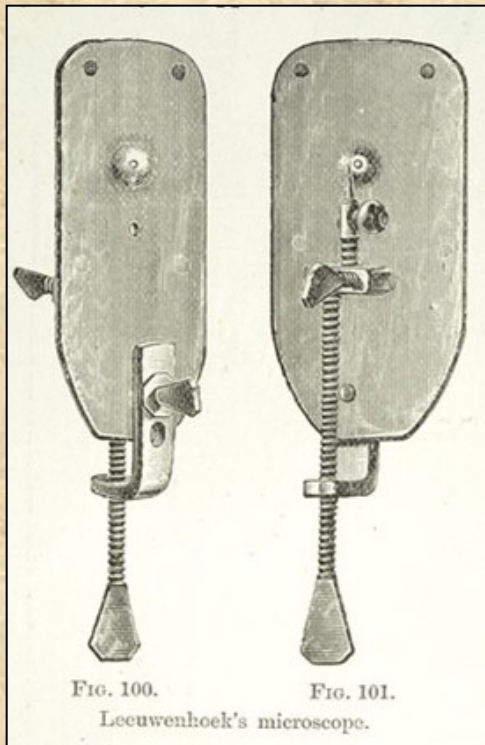




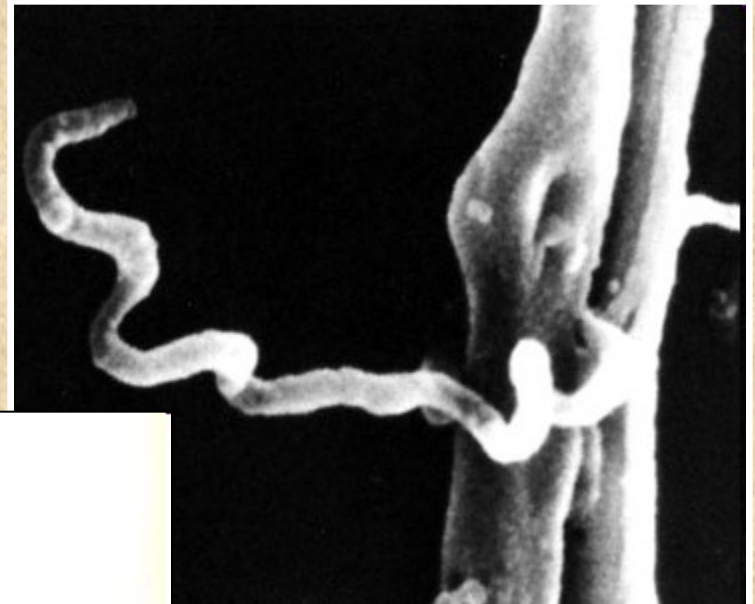
# Cytologie a morfologie bakterií



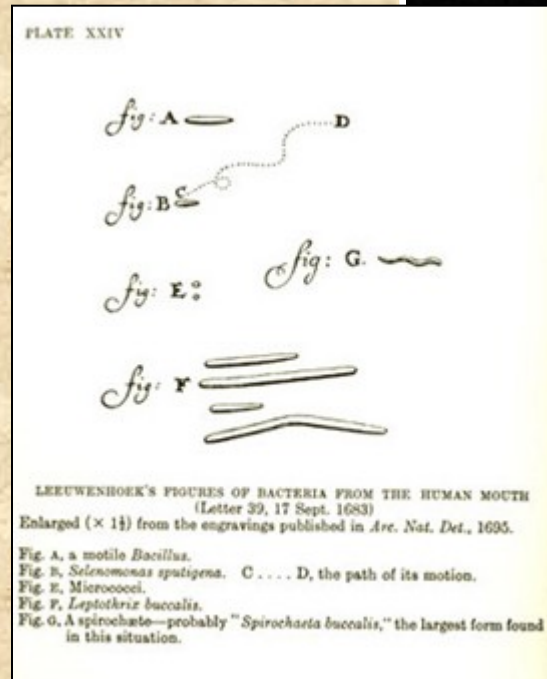
Janssenovi Z 9 x



Anthony van Leeuwenhoek  
Z 50 - 275 x



SEM *Treponema pallidum*  
útočící na membránu  
savčí buňky



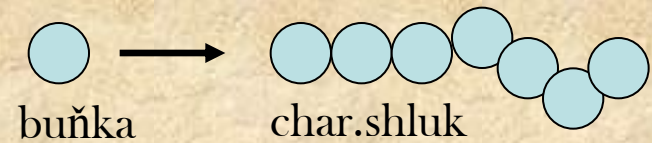
Anthony van Leeuwenhoek  
První nákresy bakterií  
(z ústní dutiny člověka)



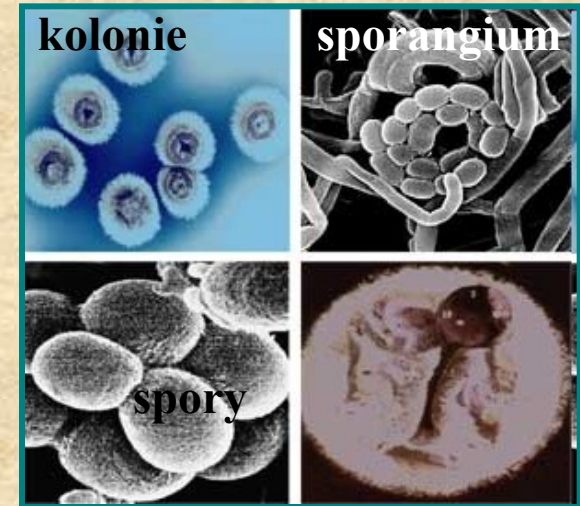




# Morfologie



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



Většinou druhově charakteristické  
= identifikační znak

Pozor na: fázi růstového cyklu!

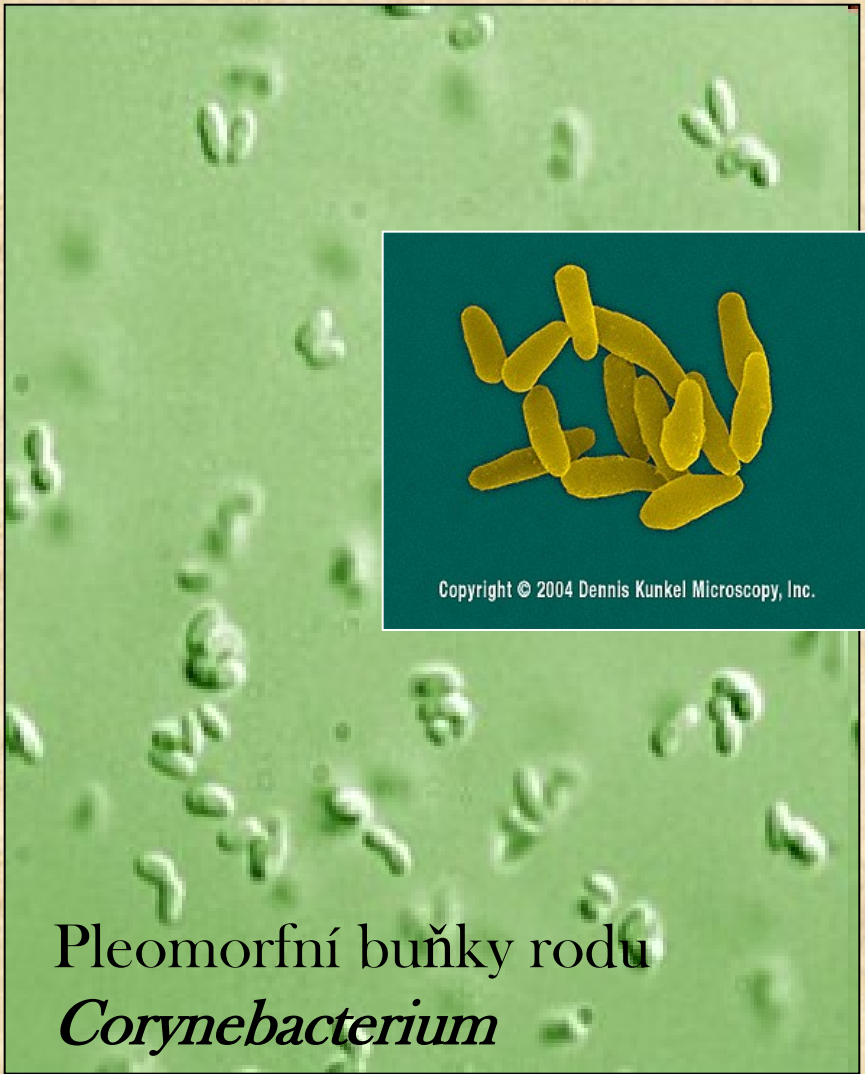
endospory vyklenující buňku

stáří kultury

pleomorfní buňky

*Clostridium  
botulinum*





Copyright © 2004 Dennis Kunkel Microscopy, Inc.

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:

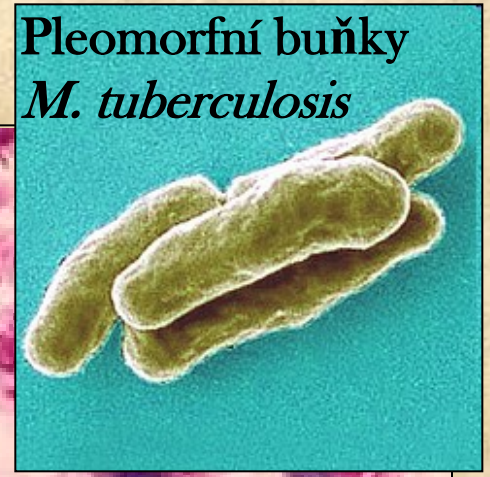
Jsou barvitelné Gramem?

*Haemophilus* - ano

Bez b.s.

Mykobakteria, mykoplazmata - nikoli

Mykologové kys



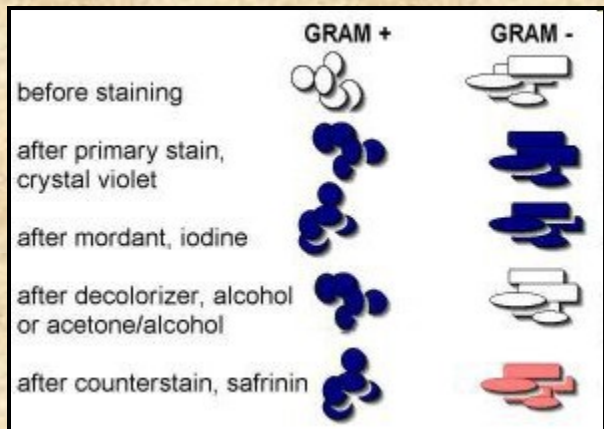
Pleomorfní buňky *M. tuberculosis*



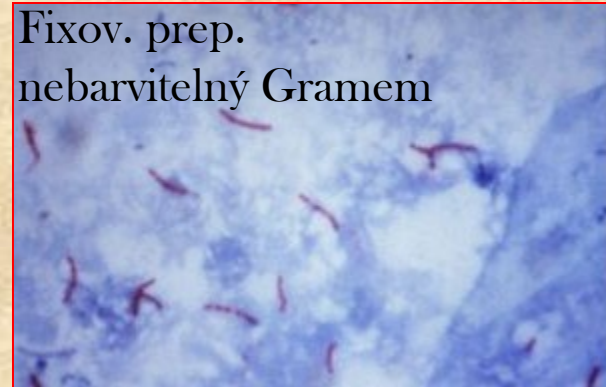
*Mycobacterium avium-intracellulare*

Acidorezistentní barvení buněk histologického řezu lymfatické uzliny





Je neznámý vzorek vůbec barvitelný Gramem? Není gramlabilní?

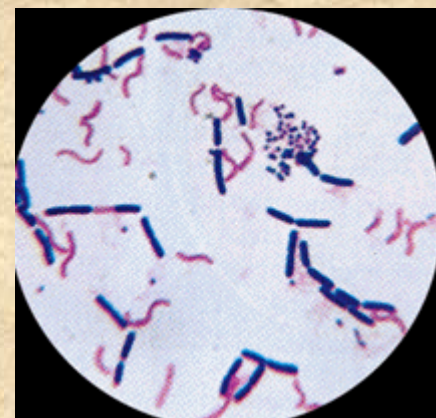


Fixov. prep. nebarvitelný Gramem  
*Mycobacterium tuberculosis*  
Zeihl-Neelsonovo barvení (červeně)



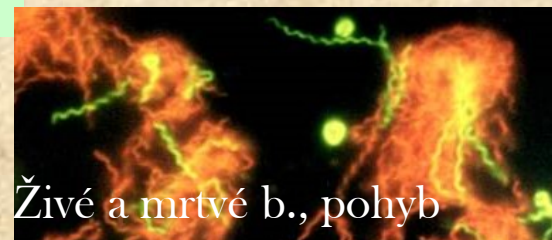
S barevným filtrem

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



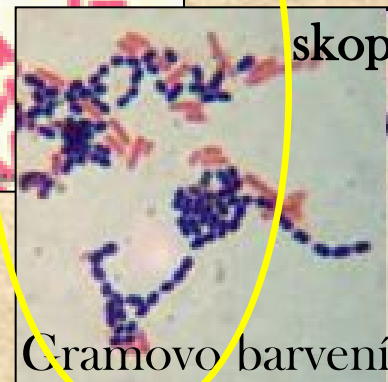
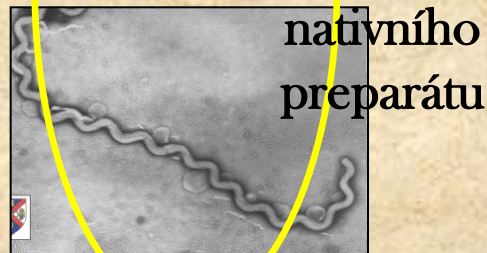
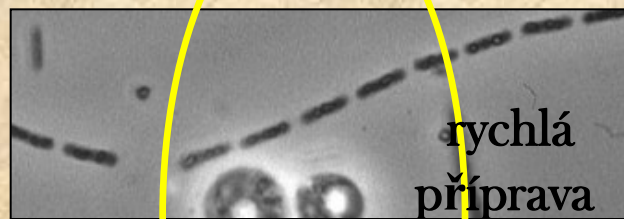
Živé a mrtvé b., pohyb

# 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

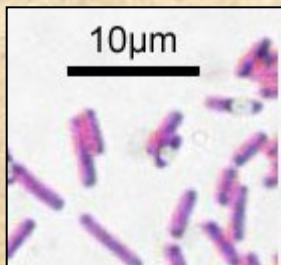
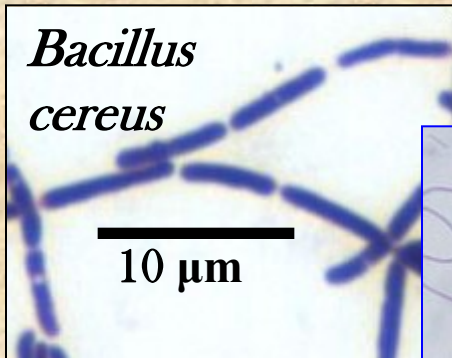
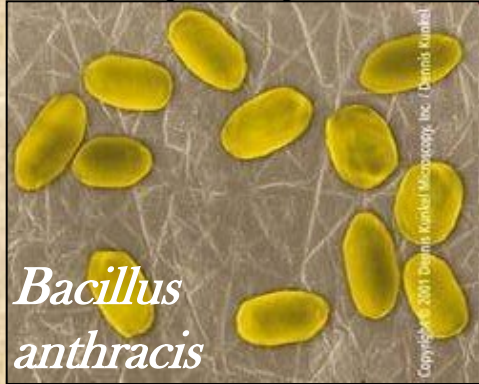
barvené struktury - pomáhají identifikaci (PHB, síra)

typ buněčné stěny - Gramovo a acidorezistentní b.



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

- Př: tyčky bacilů

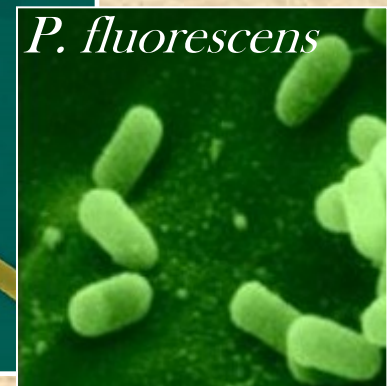
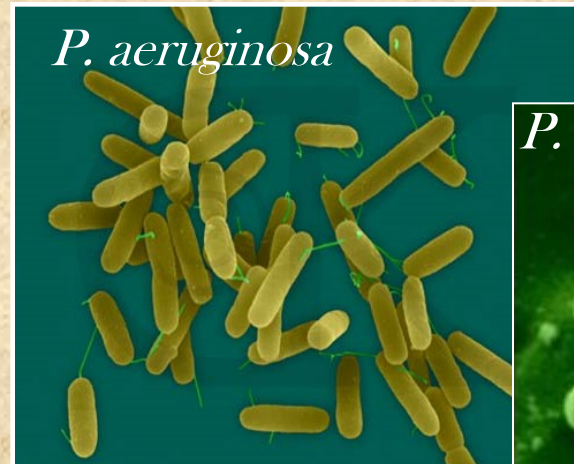


*Bacillus subtilis*

- *Haemophilus*



- *Pseudomonas*



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

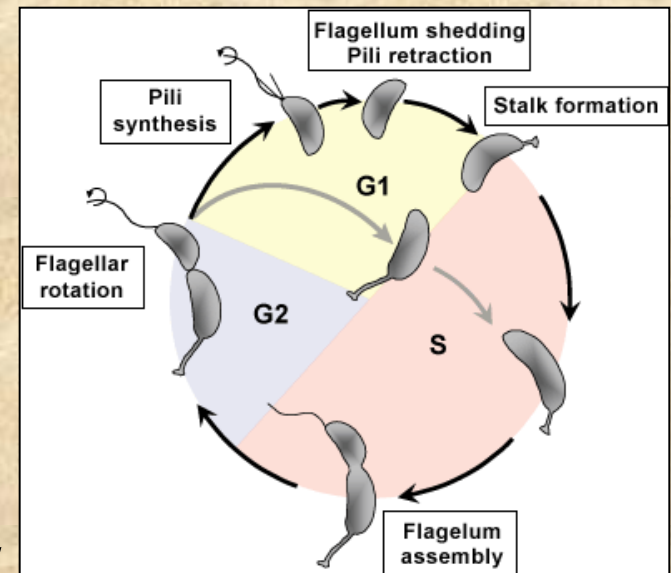
1) Prochází tento druh růstovými cykly?

- v každém z nich má pak buňka jinou morfologii!

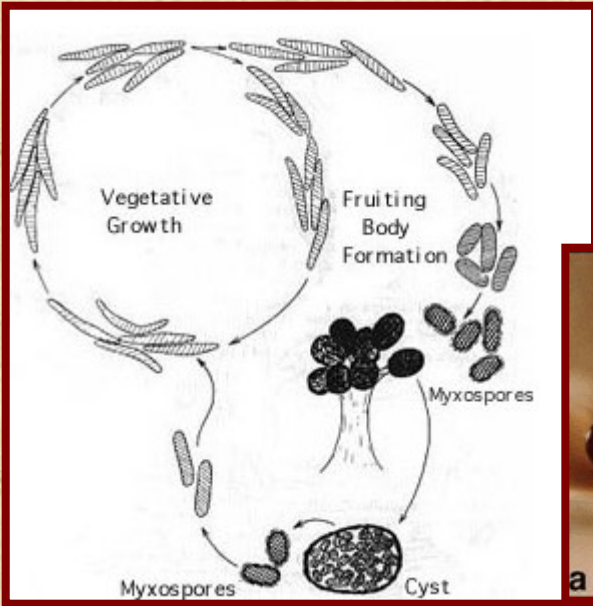
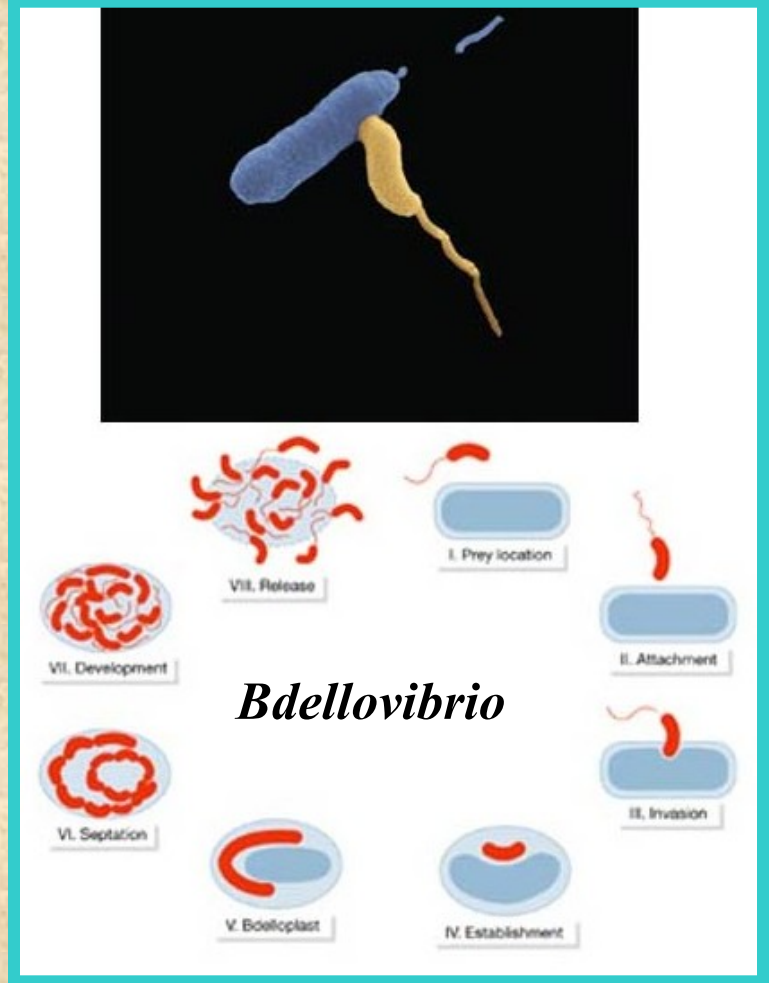
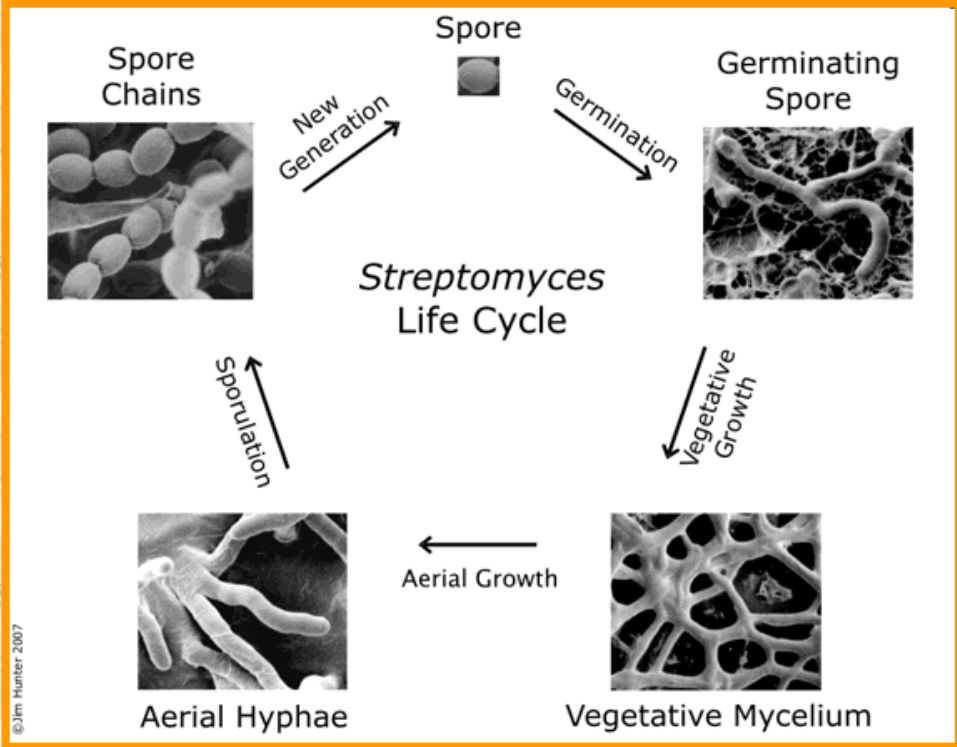
Př: *Chlamydia* *Bdellovibrio*, *Streptomyces*, *Caulobacter*, myxobakterie....

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

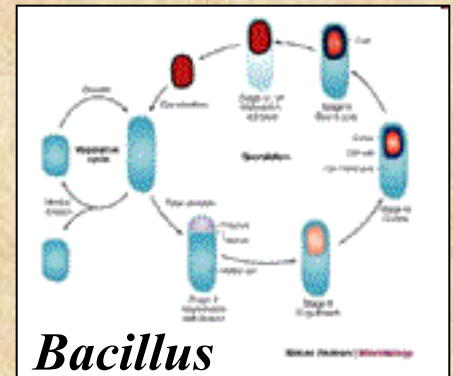
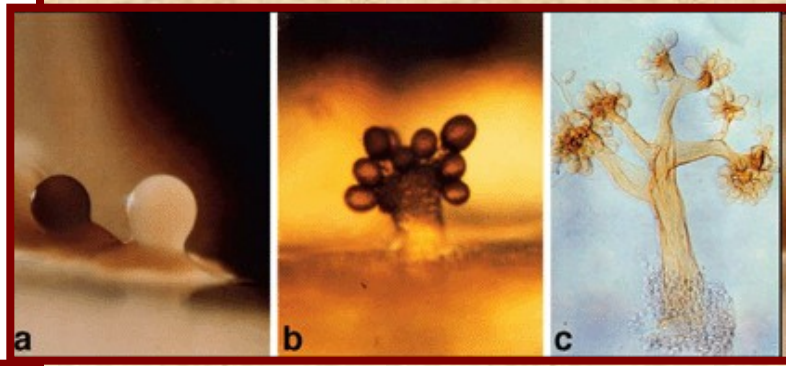
Buněčný cyklus  
*Caulobacter crescentus*



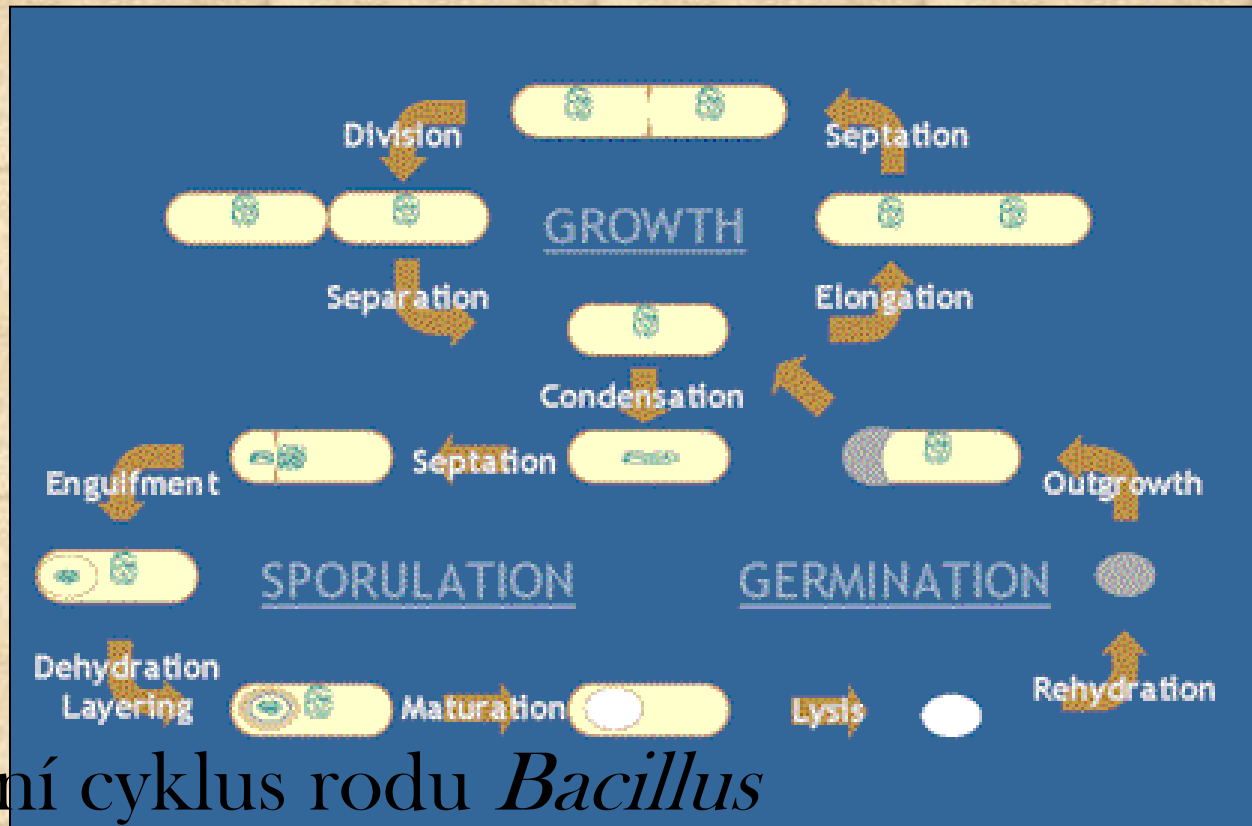




**Myxobakterie**



# Morfologie buňky vprostřed buněčného cyklu



## Životní cyklus rodu *Bacillus*

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

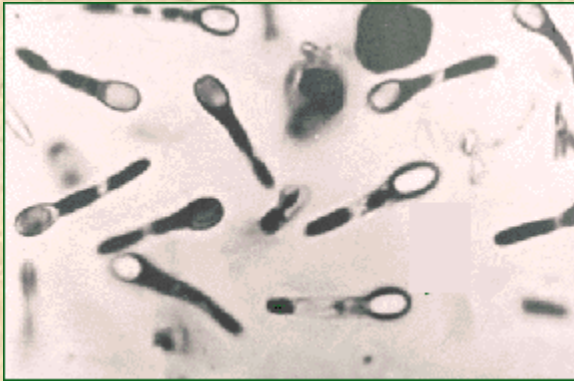
Gramem při různém stáří buněk - až gramlabilní

→ při popisu preparátu nutno uvažovat stáří buněk!

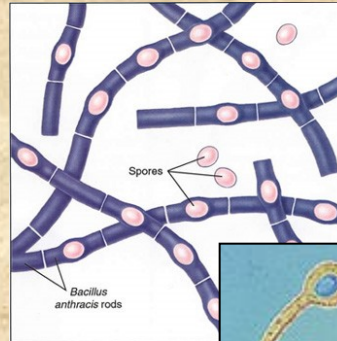


## 2) Vytváří posuzovaný druh endospory?

- v preparátu pak mohou měnit tvar buněk!



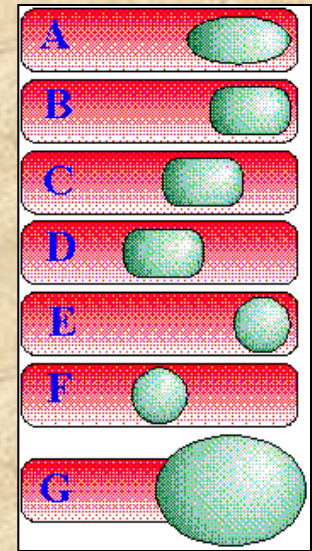
*Clostridium difficile*



*Bacillus anthracis*



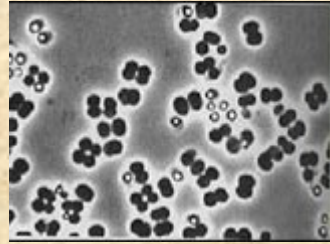
*Clostridium tetani*



„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

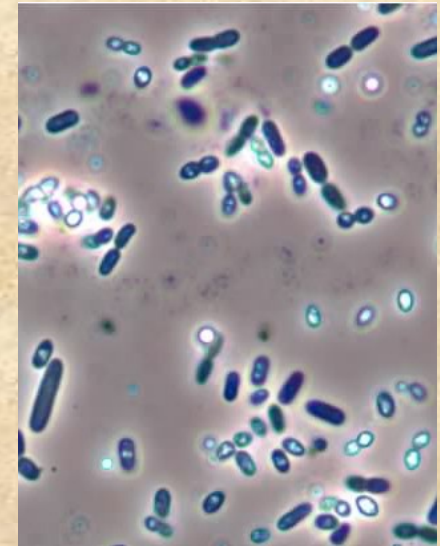
termorezistentní

*Bacillus, Clostridium, Sporosarcina,  
Sporolactobacillus, Thermoactinomyces*

- G- bakterie - exospory

Méně rezistentní, odolné zejm. vůči vysychání

*Azotobacter, Methylosinus*



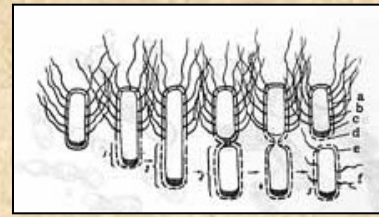
*Azotobacter*

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

- Konidie: Actinobacteria



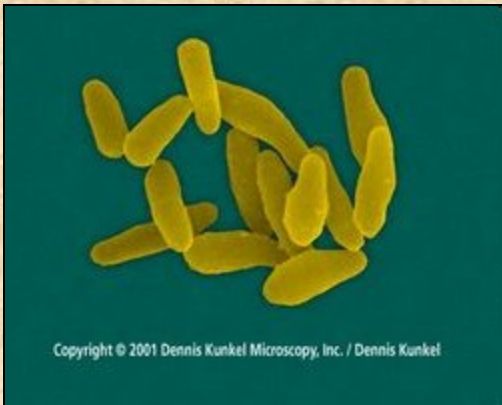
3) Stárnutím mění buňky tvar



4) Závislost tvaru buňky na vnějším prostředí

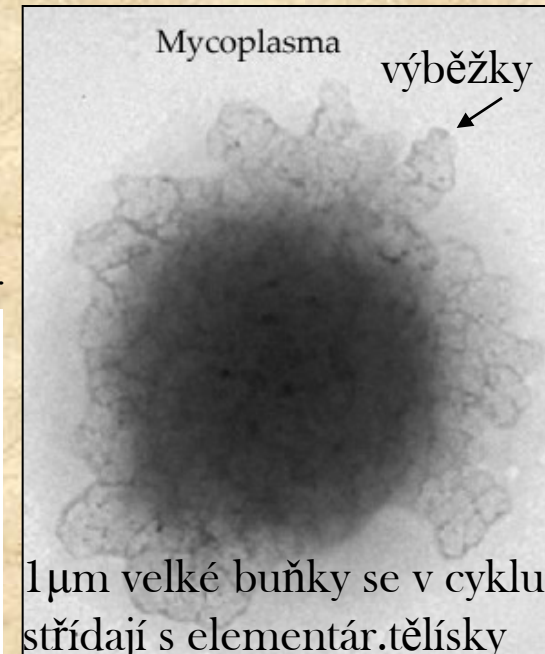
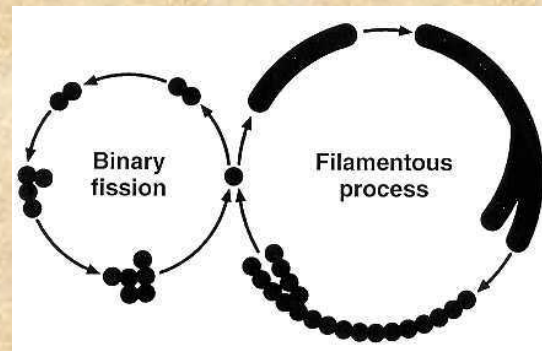
- živiny, tlak, osmolarita...

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



*Corynebacterium*

Pleomorfní mykoplazmata:  
nejmenší bakteriální  
buňky (0,2 - 0,3  $\mu\text{m}$ );  
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)



# 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<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> 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<sup>-</sup>, 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:

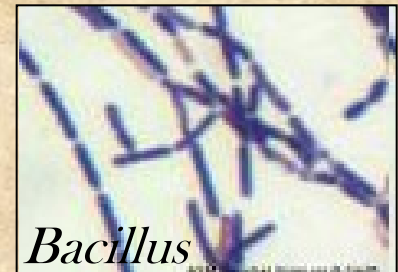
# Morfologie charakteristických shluků buněk

- typické shluky napomáhají identifikaci

řetízky koků: *Streptococcus*



řetízky bacilů: *Bacillus*

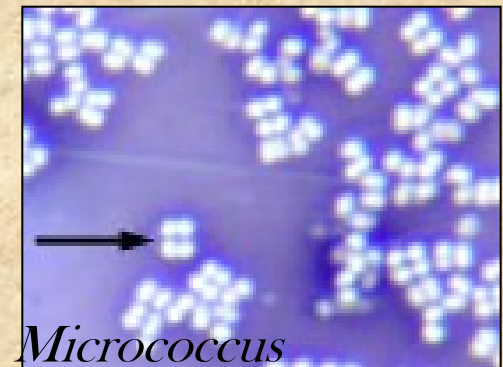


palisády: *Corynebacterium*

tetrády koků: *Micrococcus*

balíčky = sarciny *Sarcina*

hrozníčky: *Staphylococcus*





# Morfologie bakt. kolonií

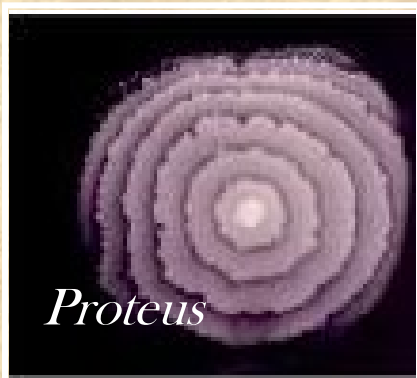
- potřeba zvážit typ media, ne kterém kolonie hodnotíme!  
kultivace - zda vůbec kultivovatelné?? - sledování typu kolonií

Př: sledování morfologie kolonií

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

S-, R- a M-formy

sledování pohybu terasovitě kolonie (Př: *Proteus*)

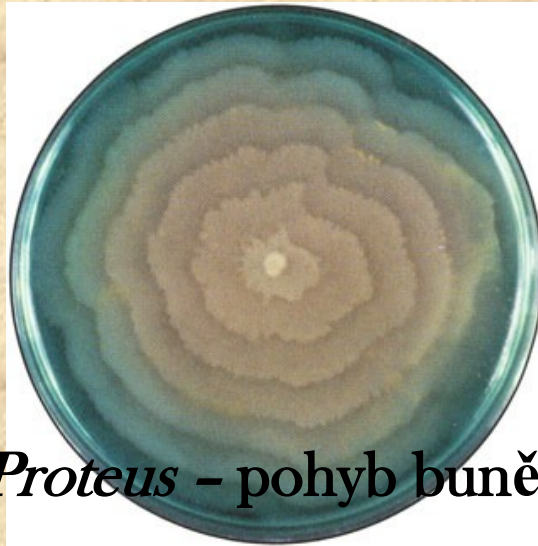


# Morfologie bakteriálních kolonií

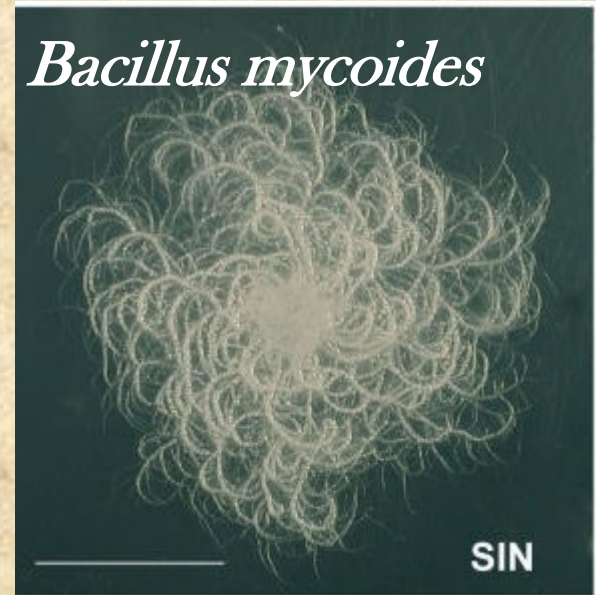
## I. na základních půdách



*Nocardia*



*Proteus* – pohyb buněk



*Bacillus mycooides*



*Streptomyces*



*Streptomyces*

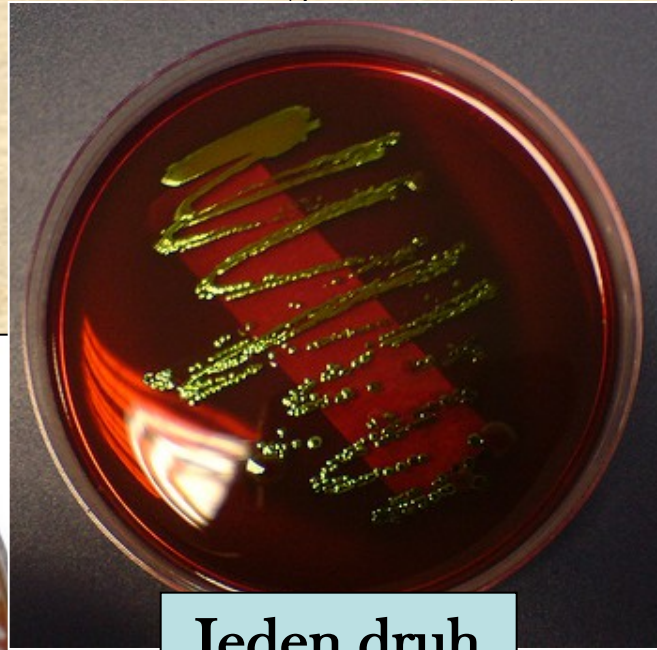


*Serratia marcescens*



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

Bakteriální kolonie na  
II. diagnost. půdách



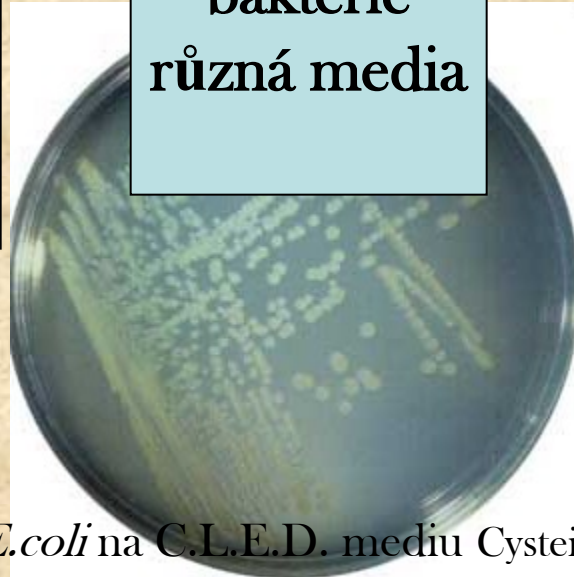
Jeden druh  
bakterie  
různá media



*E.coli* na krevním agaru



*E.coli* na MacConkey agaru



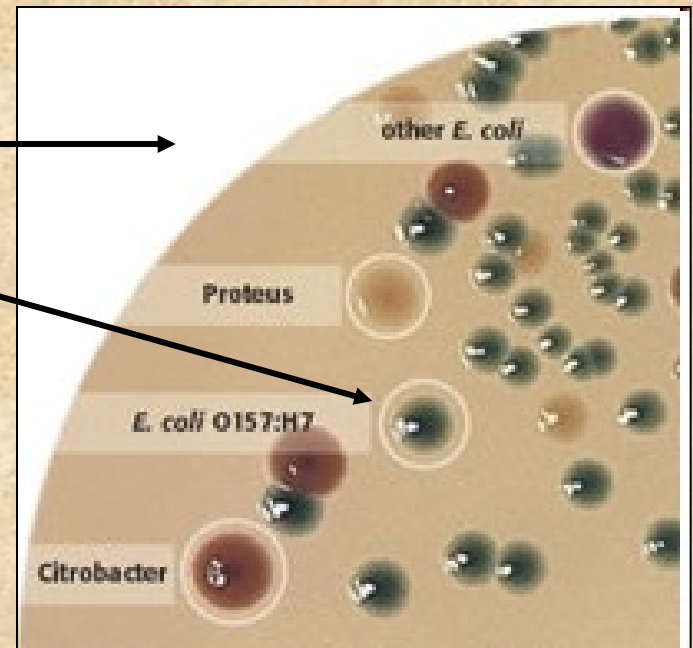
*E.coli* na C.L.E.D. mediu Cysteine Lactose Electrolyte Deficient Agar



## Bakteriální kolonie na III. selektivních půdách

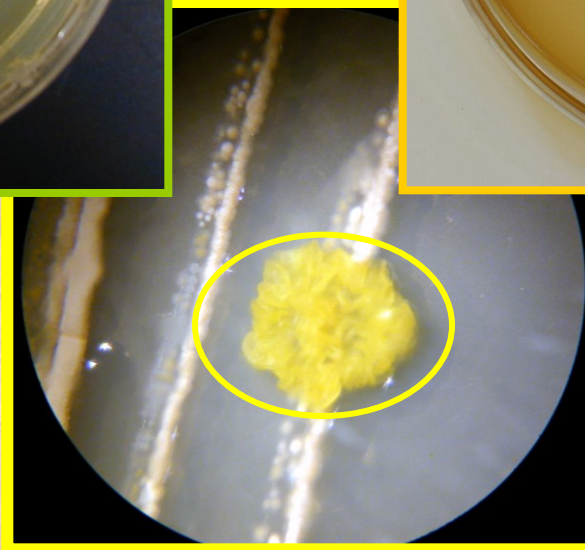
**O157:H7 ID Agar**

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





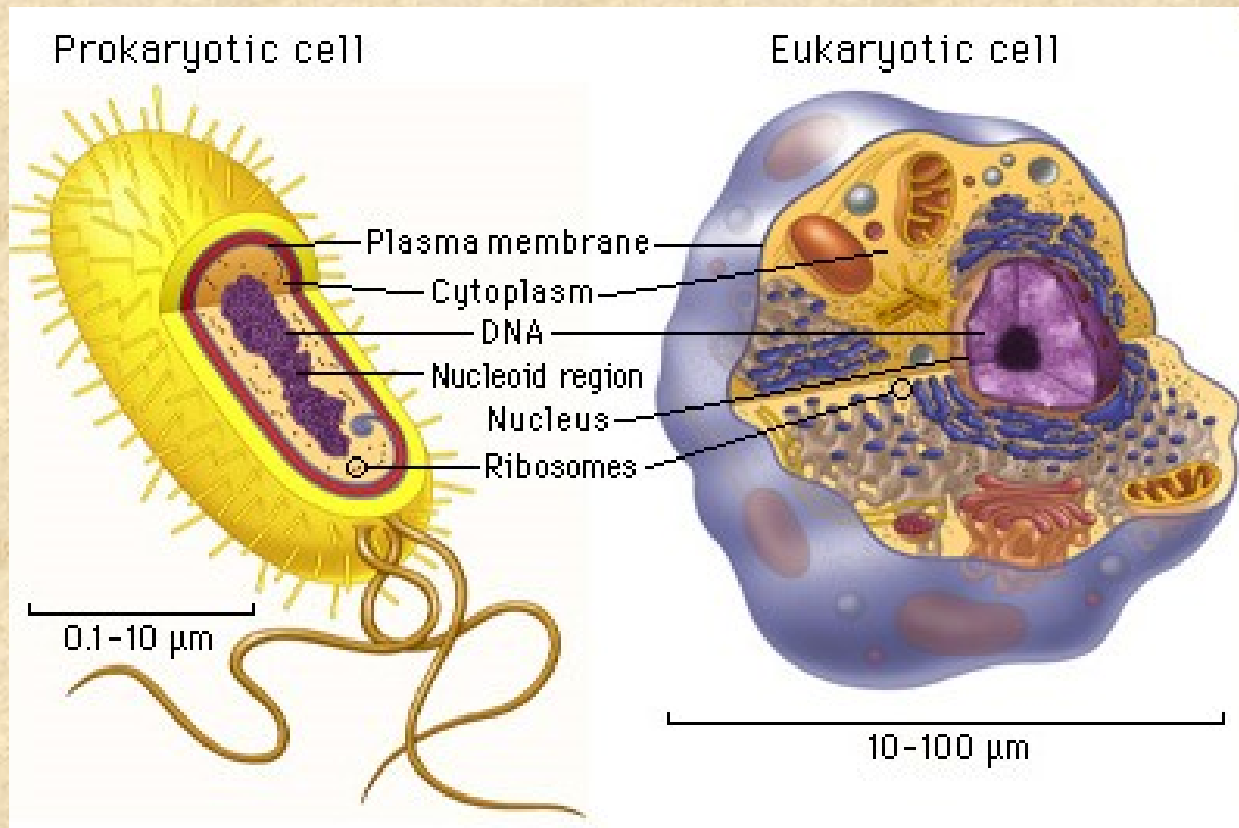
# Kontaminace na misce!



# Cytologie

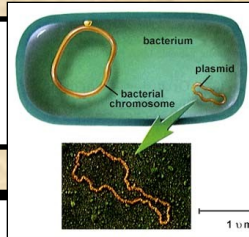
## BAKTERIÁLNÍ BUŇKA x vs. eukaryotní

- nutno porovnat pro pochopení fyziologie





# Zvláštnosti prokaryotické buňky

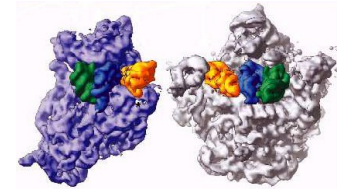


- živý, otevřený systém schopný regulace a autoreprodukce
- jádro neodděleno od CPL membránou, větš. kruhová (i lineární) DNA
- haploidní buňky (1 alela) množící se nepohlavně
- bez buněčných organel, jediná membrána je cytoplasmatická
- ribosomy se liší od ribosomů eukaryotních buněk - menší, volně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

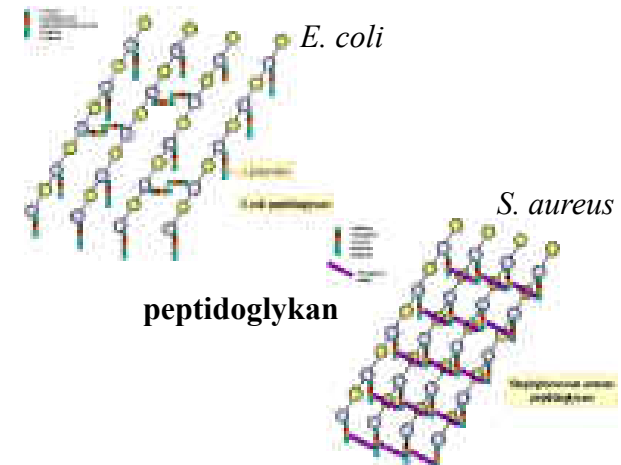
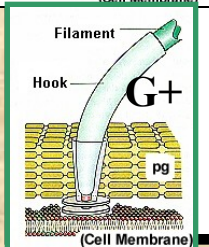
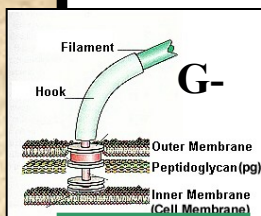
steroly v membránách zcela výjimečně

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

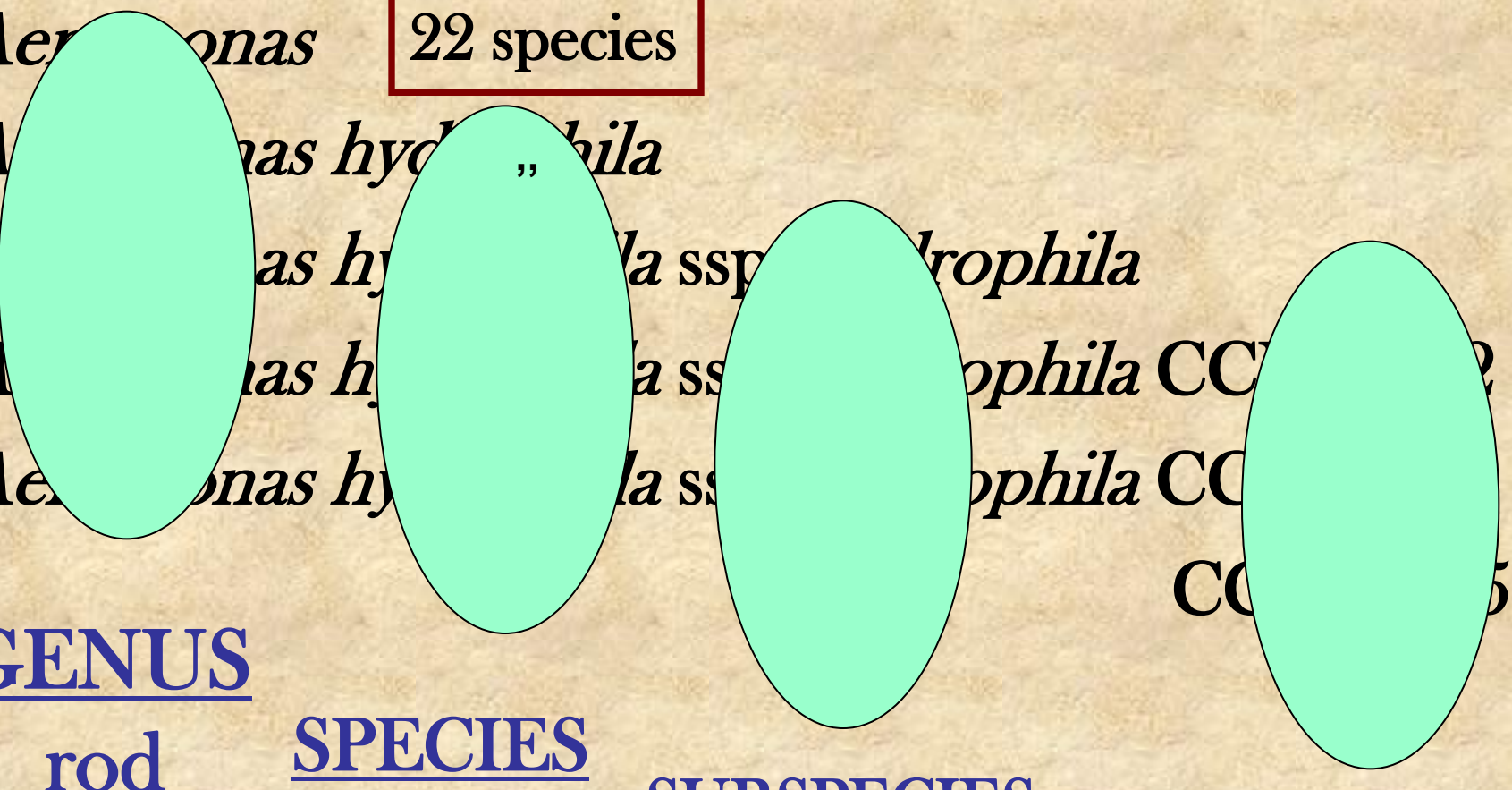
**anaerobiosa**, schopnost vázat N

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
- 
- A diagram illustrating the taxonomic classification of the genus
- Aeromonas*
- . It features a list of taxonomic levels on the left, each associated with a green oval. From left to right, the ovals represent: the Genus (
- Aeromonas*
- ), the Species (
- Aeromonas hydrophila*
- ), the Subspecies (
- Aeromonas hydrophila*
- ssp.
- hydrophila*
- ), and the Strain (CC7 and CC5). A vertical arrow on the far right points downwards, indicating the increasing level of specificity in classification.



# 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

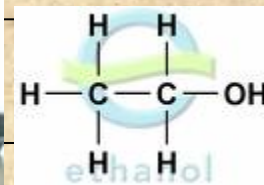
!!



:



případně



ethanol

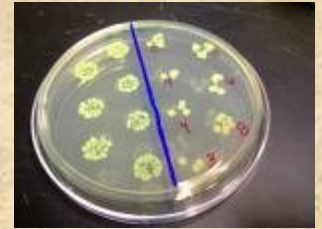
Kahan zapnutý jen po dobu práce s ním



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

