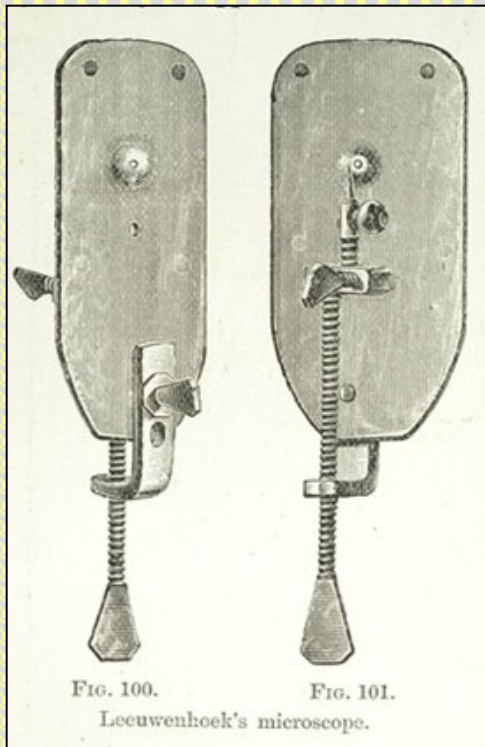


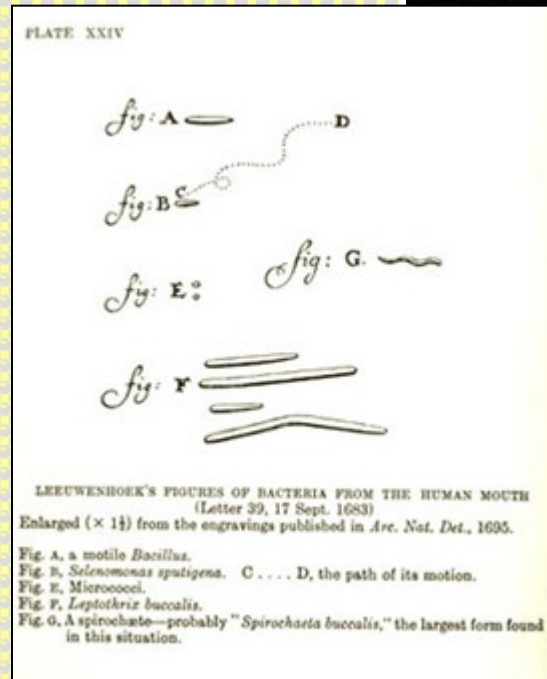
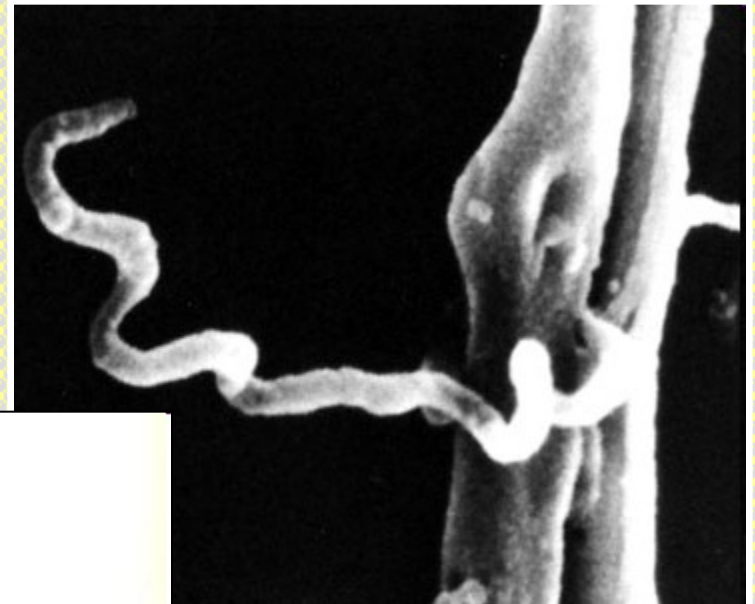
Cytologie a morfologie bakterií



Janssenovi Z 9 x, ~ 1595



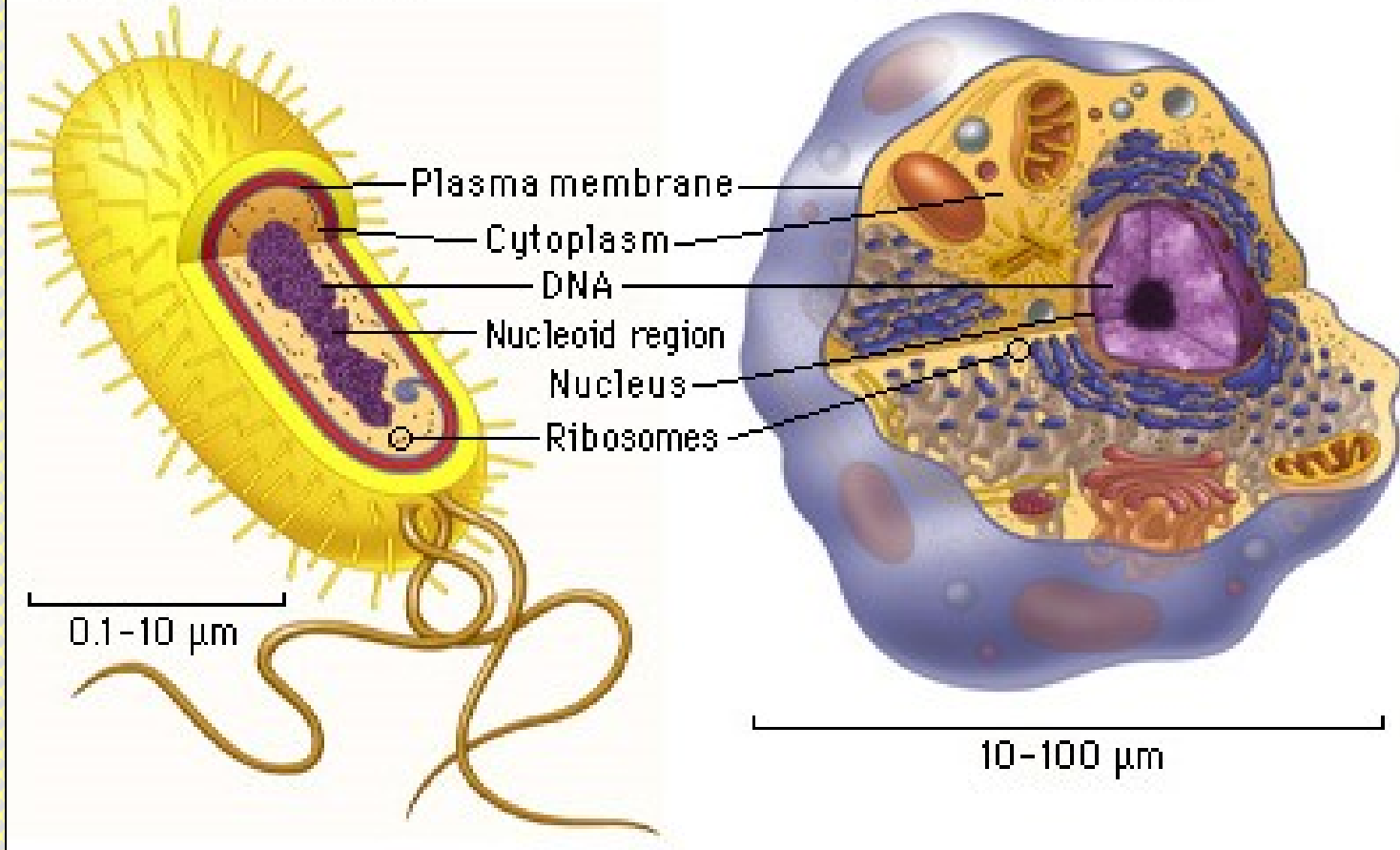
Anthony van Leeuwenhoek
Z 50 - 275 x, 17.stol



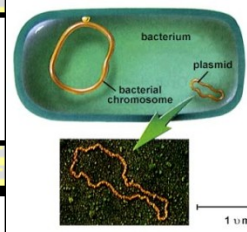
Anthony van Leeuwenhoek
První nákresy bakterií
(z ústní dutiny člověka)

Prokaryotic cell

Eukaryotic cell



Zvláštnosti prokaryotické buňky

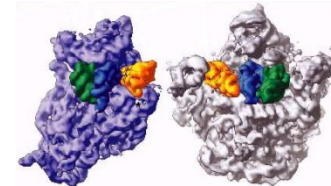


- **živý, otevřený systém** schopný **regulace a autoreprodukce**
- **jádro** neodděleno od CPL membránou, větš. kruhová (i lineární) DNA
- **haploidní buňky** (1 alela) množící se nepohlavně
- bez buněčných organel, jediná membrána je **cytoplasmatická**
- **ribosomy** se liší od ribosomů eukaryotních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

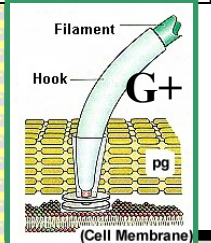
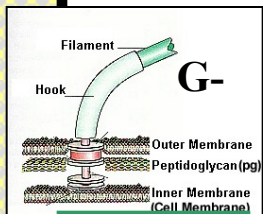
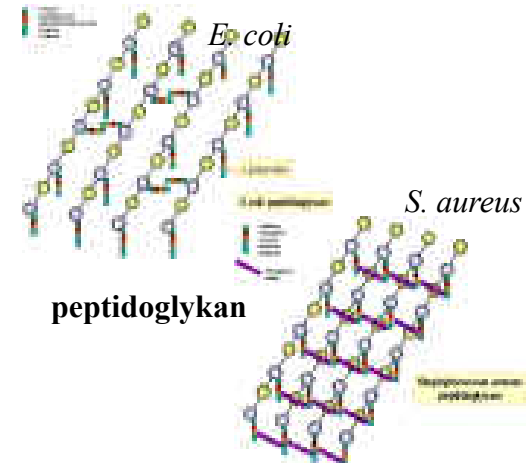
steroly v membránách zcela výjimečně

bičík – globul. bílk. flagelin, pohyb rotací

anaerobiosa, schopnost vázat N

tvorba kyseliny **PHB** (zásob.l.)

pokud **fotosyntéza** - anoxigenní



Cytologie bakteriální buňky

- Struktury a jejich konformace závisí
na buněčném stadiu!
 - parazitě, patogeni – vstup do hostitel.b.
(př: remodelace proteinů listerií)
 - změna struktur při buněčném dělení
 - Mikroskopie – nutno zvolí vhodný typ dle sledované struktury
 - př: EM – 3 typy – mesozomy, nukleoid, cytoskelet
 - dehydratace, pokovování – agregace nukleoidu
- artefakty →

Cytoplazma

– difúze nebo řízené reakce?

- Přeplněná ale organizovaná

př: 72 000 ribozomů v exponenc. fázi – specif. interakce s RNA

- Polarizovaná

polarita buňky dána - aktinovými centry

- umístěním CM receptorů

polarita zabezpečuje pohyb b., vstup do hostitele, adhezi b.

(receptory, pilli větš. na pólech buňky)

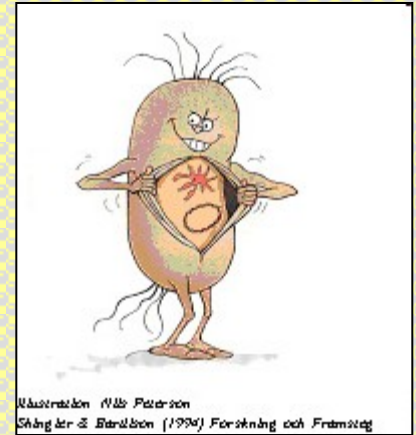
Cytologie - 1) buněčné struktury

jejich vztah k fyziologii a taxonomii

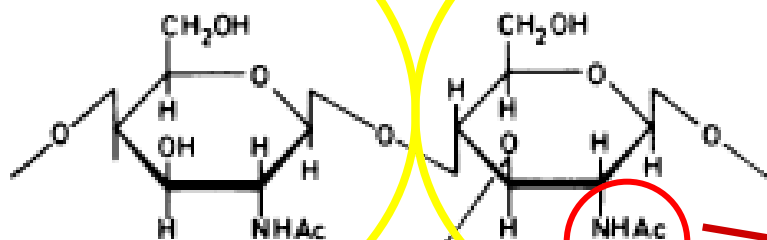
- metody výzkumu

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!!



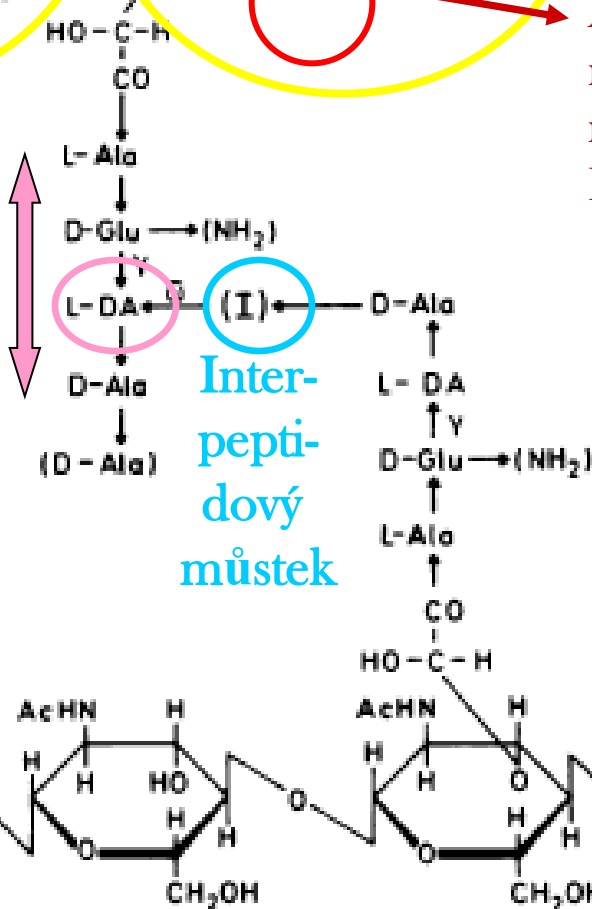
Peptidoglykan = uniformní disacharid
 N-acetylglukózámin + N-acetylmuramová



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



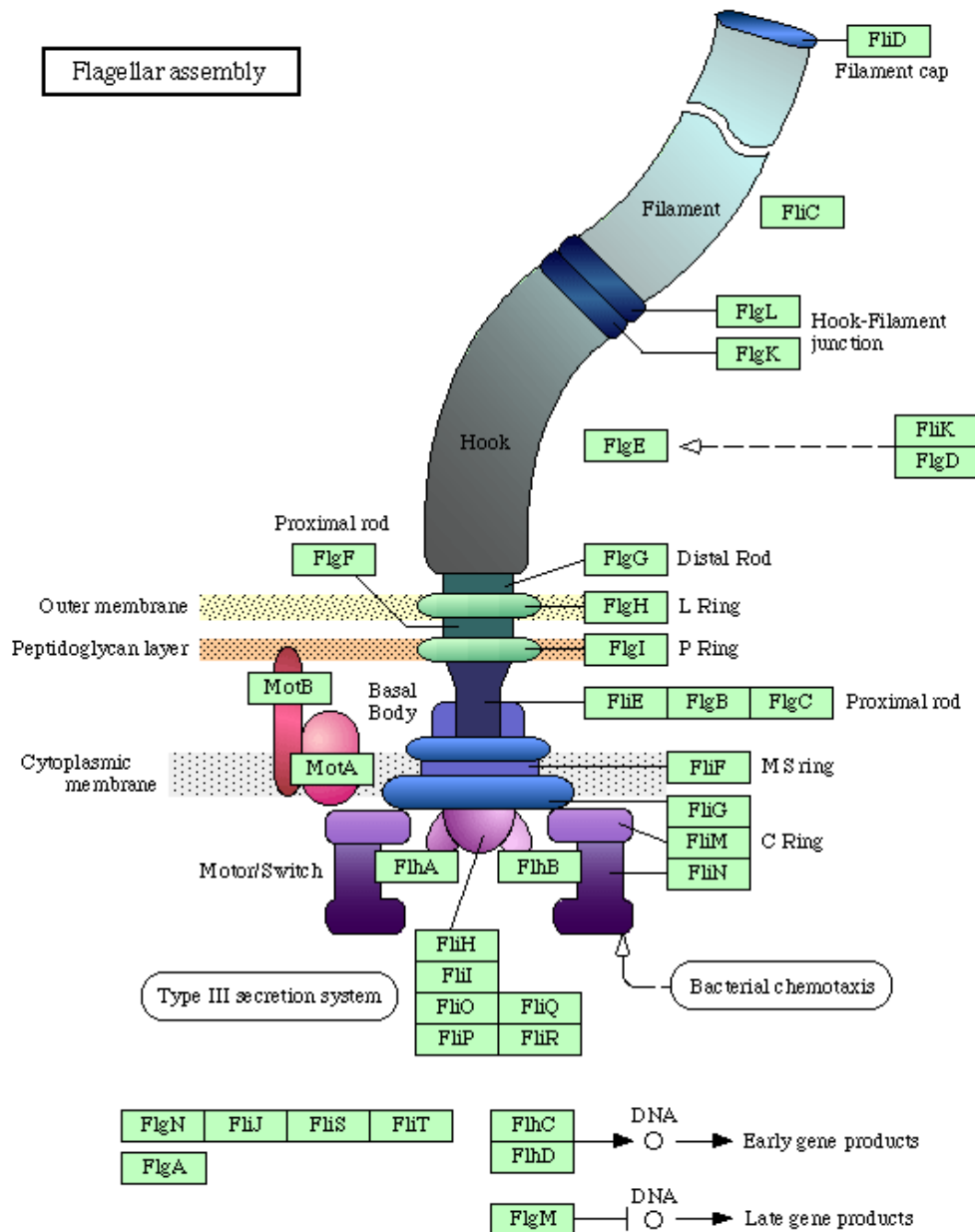
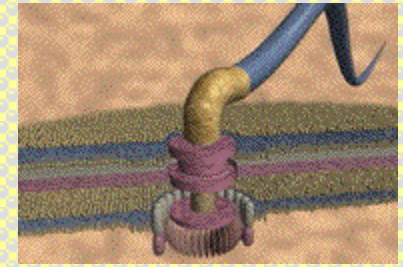
CHEMOTAXONOMIE:

Aminkokyselinové složení tetrapeptidu a můstku!!

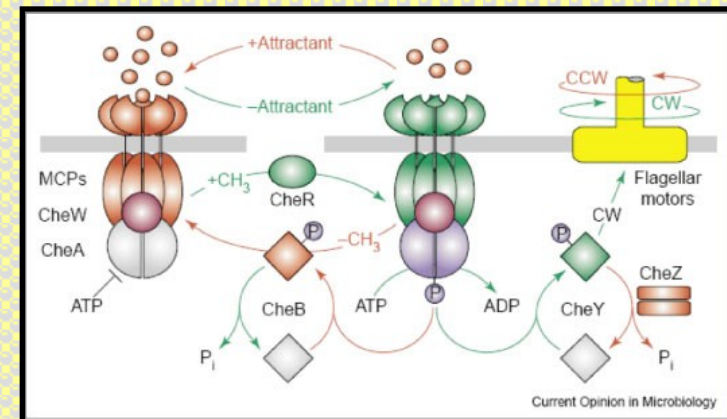
Micrococcaceae – až druhově charakteristická struktura můstku

Streptomycety: 3 pozice unikátní L-amino DAP kyselina

Stěna spory: jiné a unikátní složení peptidoglykanu!



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

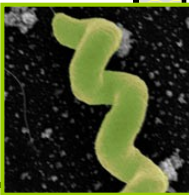
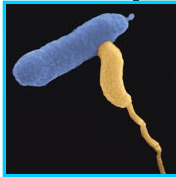


Velikost a tvary bakteriální buňky

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, lancetovité
- diplokoky, streptokoky, tetrády,
sarciny, stafylokoky

Tyčinky – rovné, zakřivené, větvcí se,
palisády pleomorfní

Kokobacily

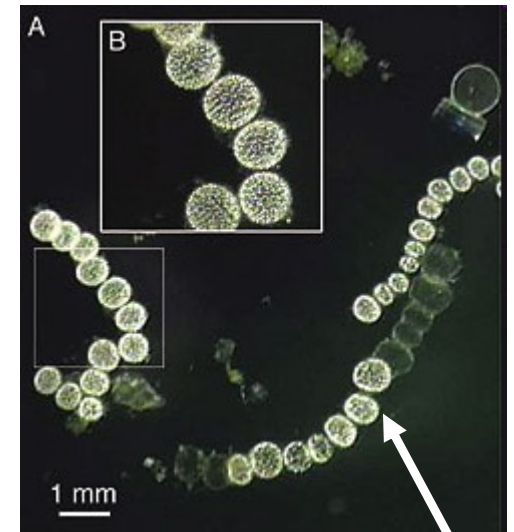
Pupeny

Prostéky

Spirily

Hvězdice

Mycelia



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

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

Bacterial Morphology

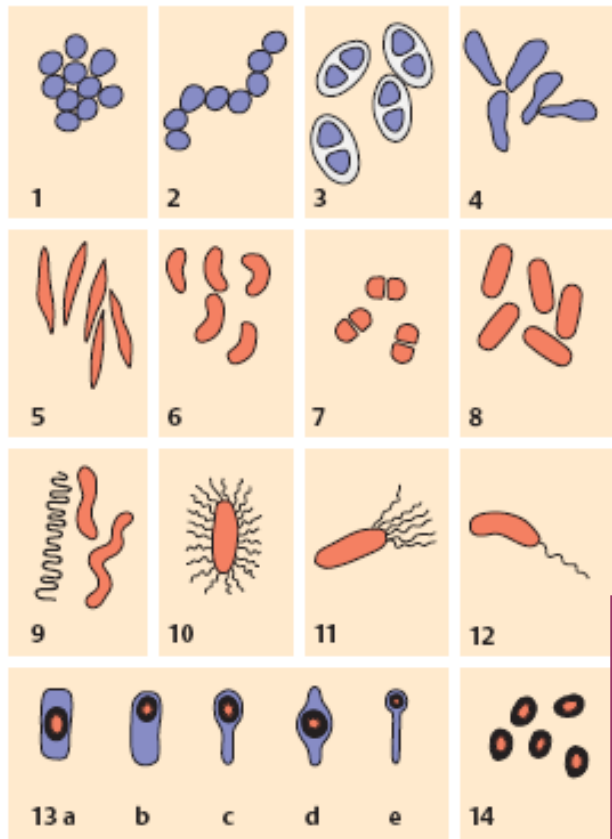
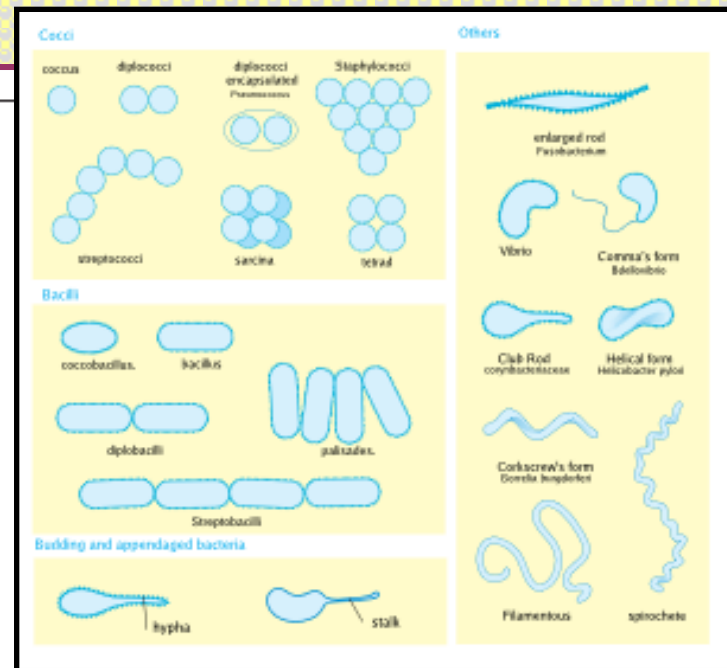
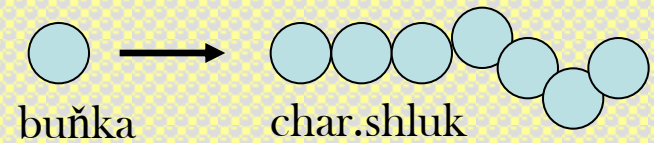


Fig. 3.1

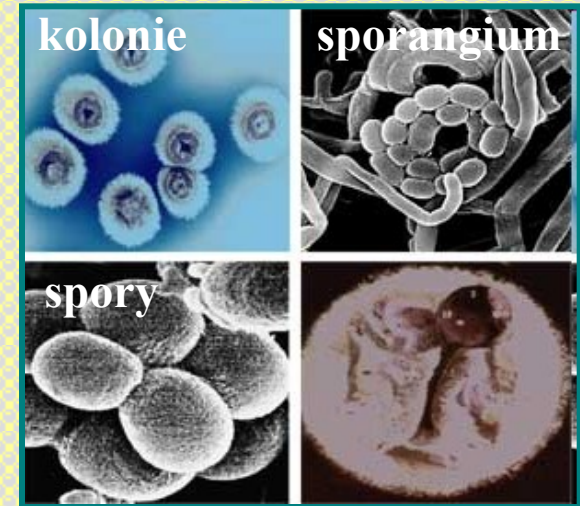


1. Gram-positive cocci in grape-like clusters (staphylococci)
2. Gram-positive cocci in chains (streptococci)
3. Gram-positive cocci with capsules (pneumococci)
4. Gram-positive, club-shaped, pleomorphic rods (corynebacteria)
5. Gram-negative rods with pointed ends (fusobacteria)
6. Gram-negative curved 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 racquet")
 - 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

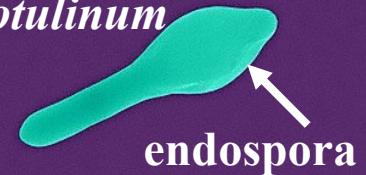
Pozor na: fázi růstového cyklu!

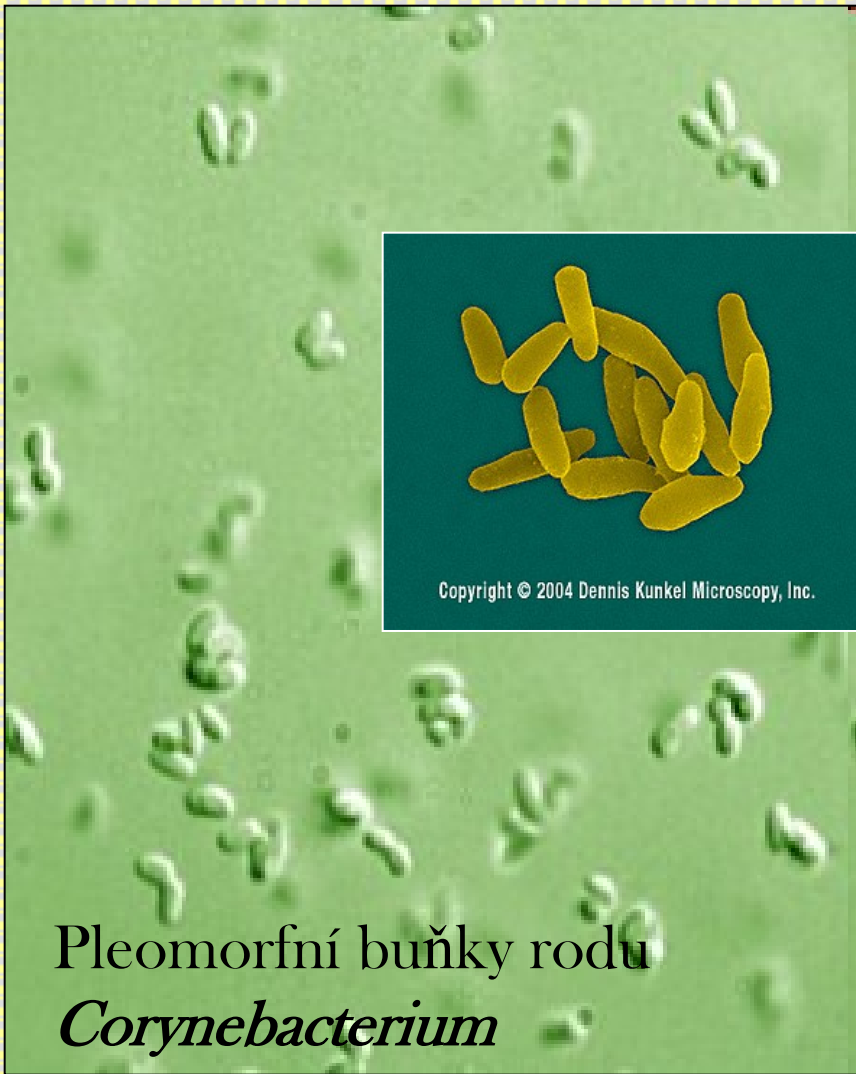
endospory vyklenující buňku

stáří kultury

pleomorfní buňky

*Clostridium
botulinum*





Acidorezistentní buňky:

Odmítají Gramovo barvení

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

Morfologie pleomorfních buněk.

Další potíže:

Jsou barvitelné Gramem?

Haemophilus - ano

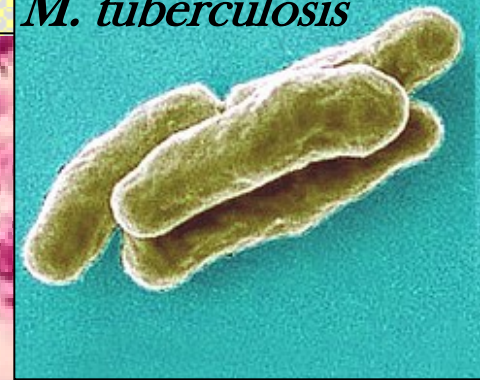
Bez b.s.

Mykobakteria, mykoplazmata - nikoli

Mykolové kys

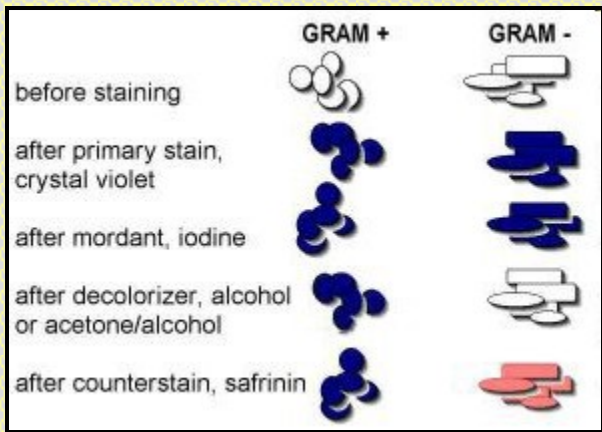
Pleomorfní buňky

M. tuberculosis

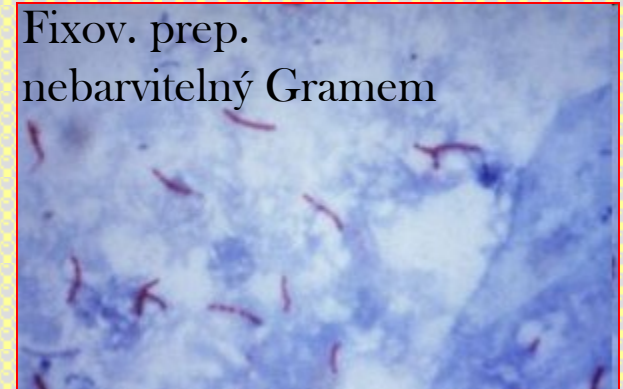


Mycobacterium avium-intracellulare

Acidorezistentní barvení buněk histologického řezu lymfatické uzliny



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

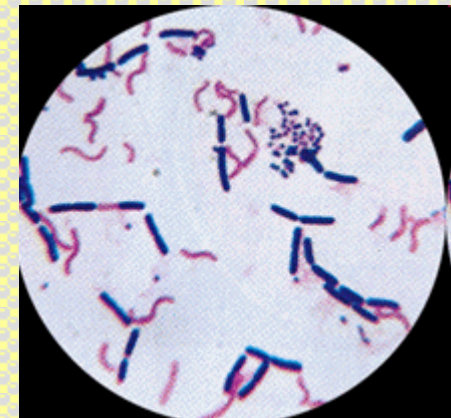


Fixov. prep. nebarvitelný Gramem
Mycobacterium tuberculosis
Zeihl-Neelsonovo barvení (červeně)



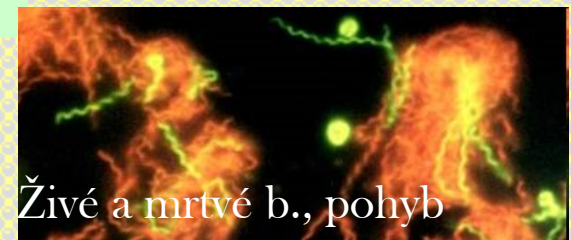
S barevným filtrem

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

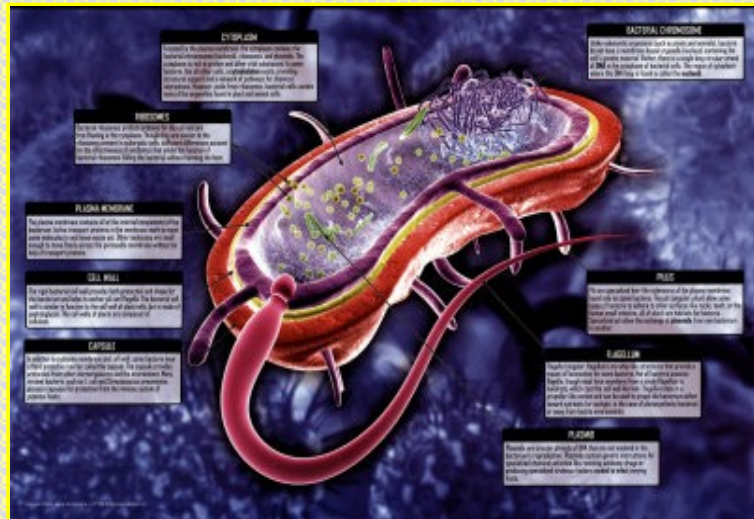


Fixov. prep. - tvar a typ b.

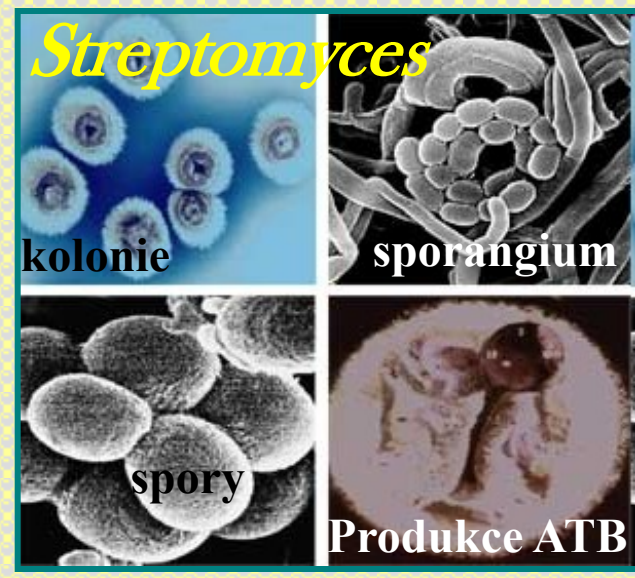
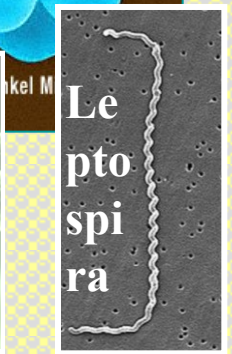
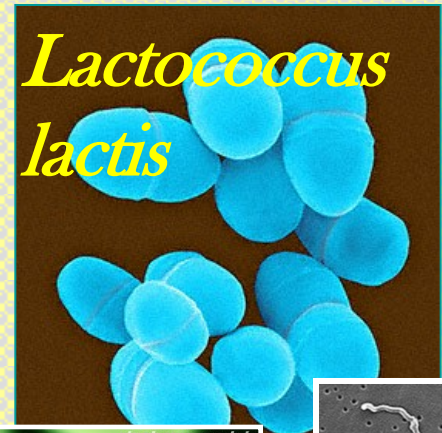
Živý (nativní) preparát bez fixace - vidíme nedeformovaný tvar buňky, spory, morfologii seskupení buněk, pohyb buněk



Živé a mrtvé b., pohyb



Struktury G- buňky

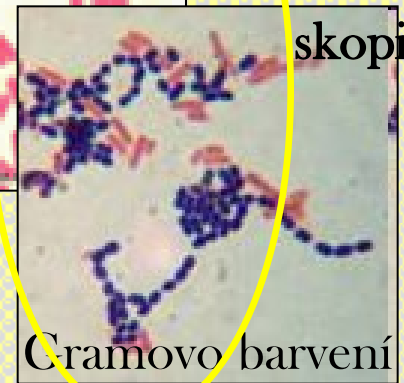
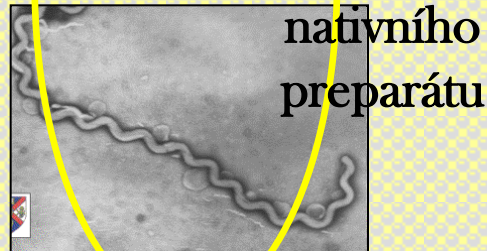
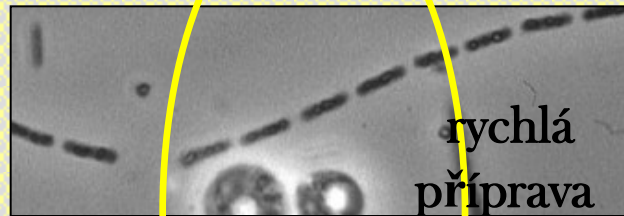


Morfologie buňky

• 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

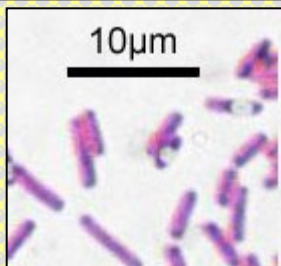
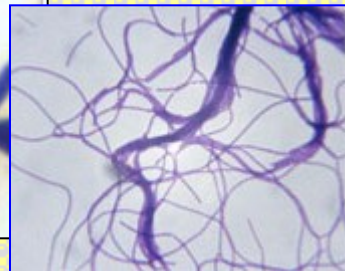
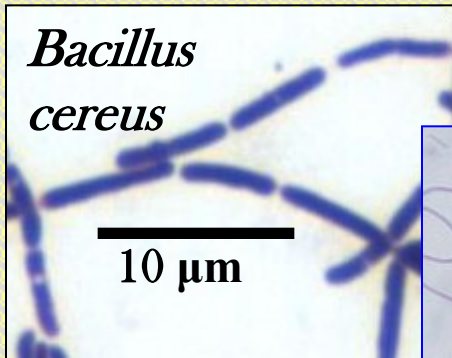
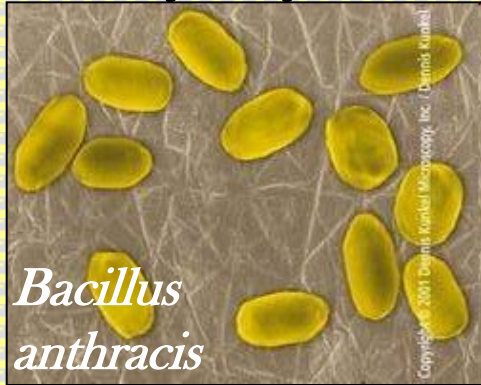
pohyb buňky - fázový kontrast, fluorescence

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

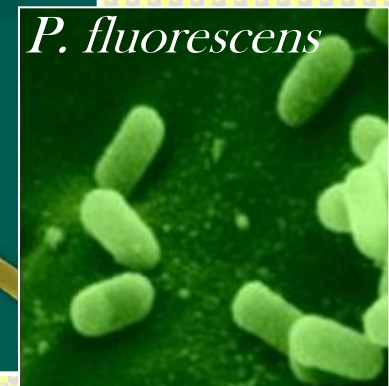
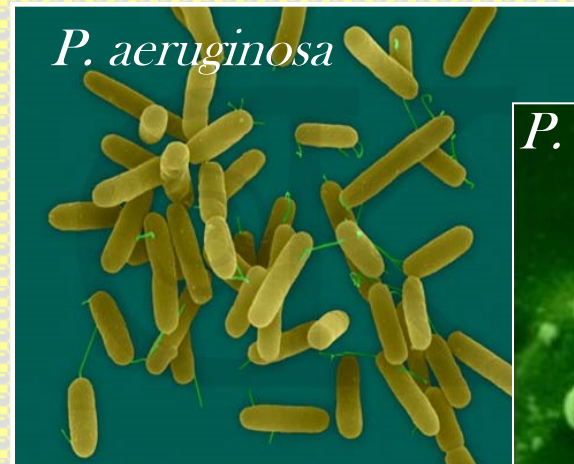


Bacillus subtilis

- *Haemophilus*



- *Pseudomonas*



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

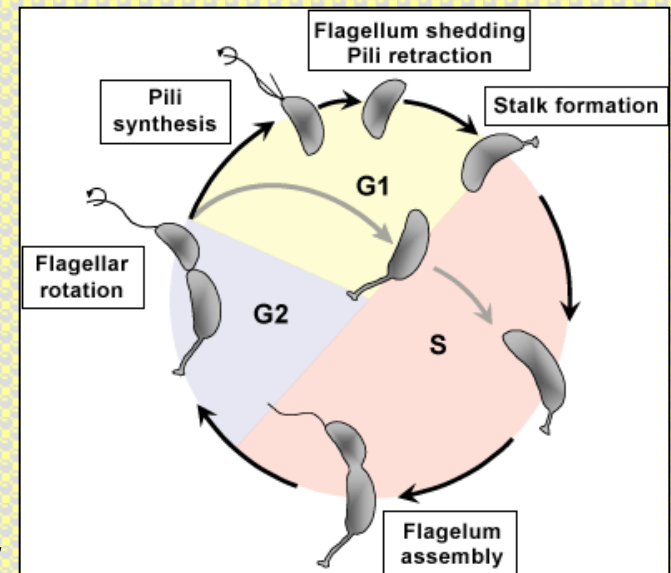
1) Prochází sledovaný druh růstovým cyklem?

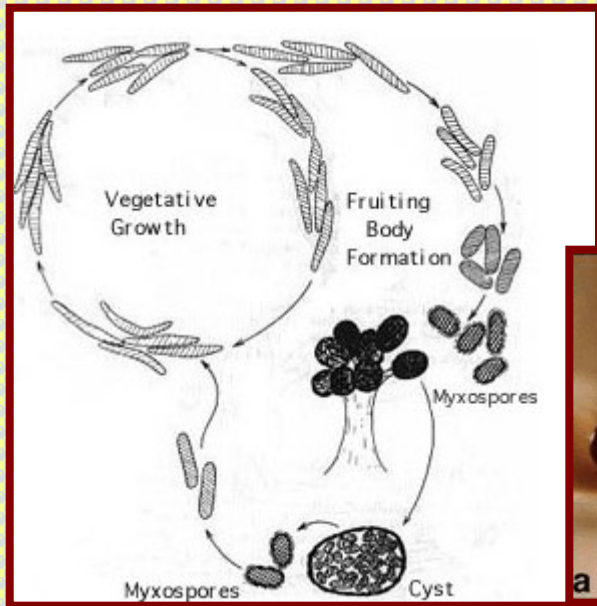
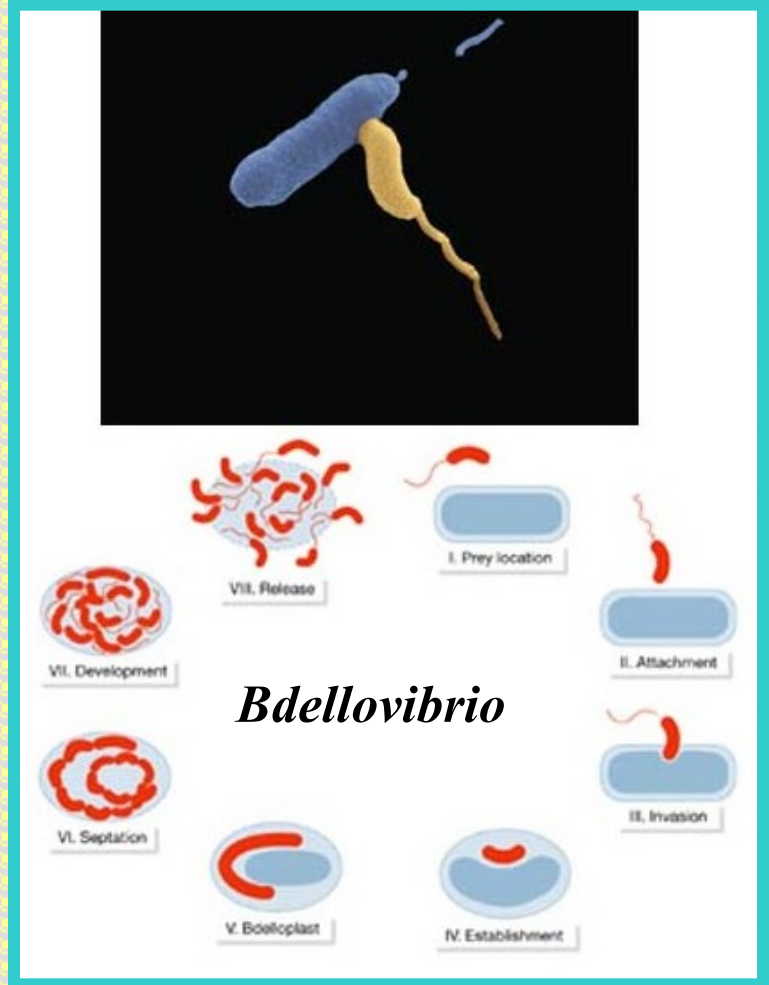
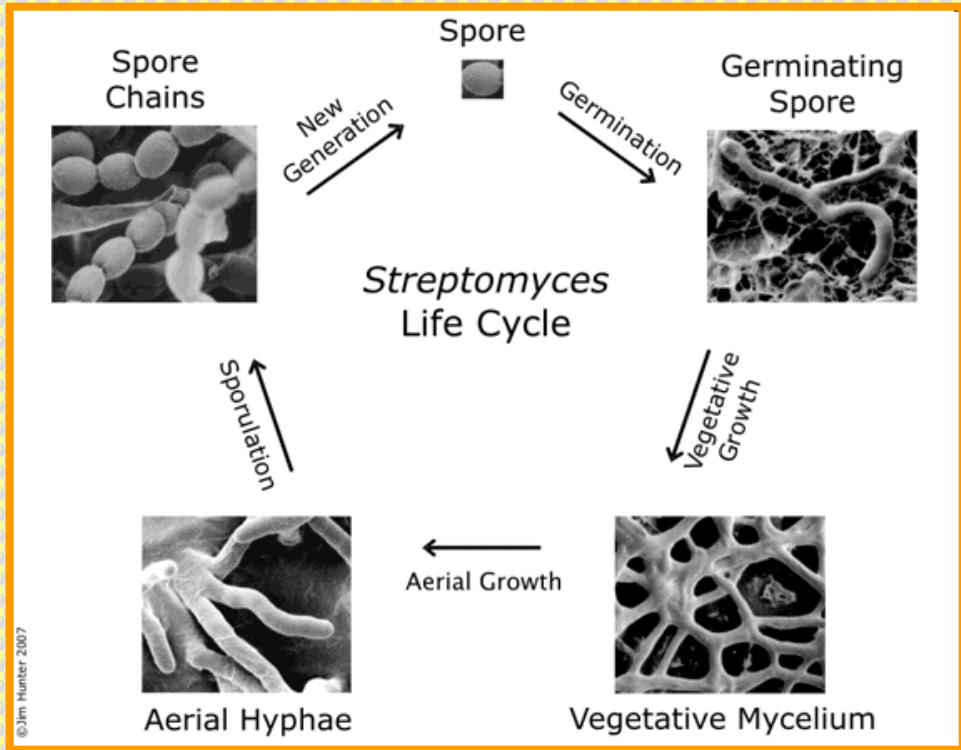
- v každém z nich má pak buňka jinou morfologii!

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

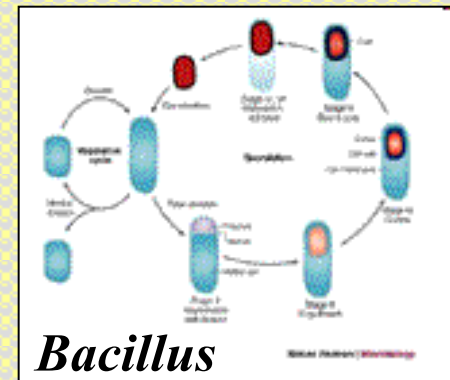
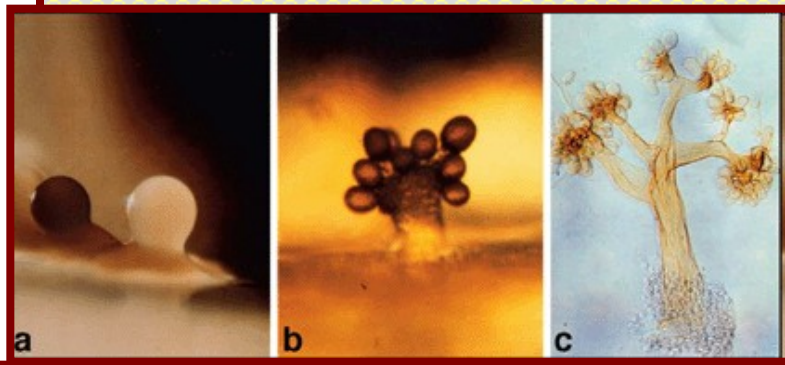
Mění se nejen vzhled buňky, ale buňka v cyklech prochází typickou změnou vnitřních struktur.

Buněčný cyklus
Caulobacter crescentus

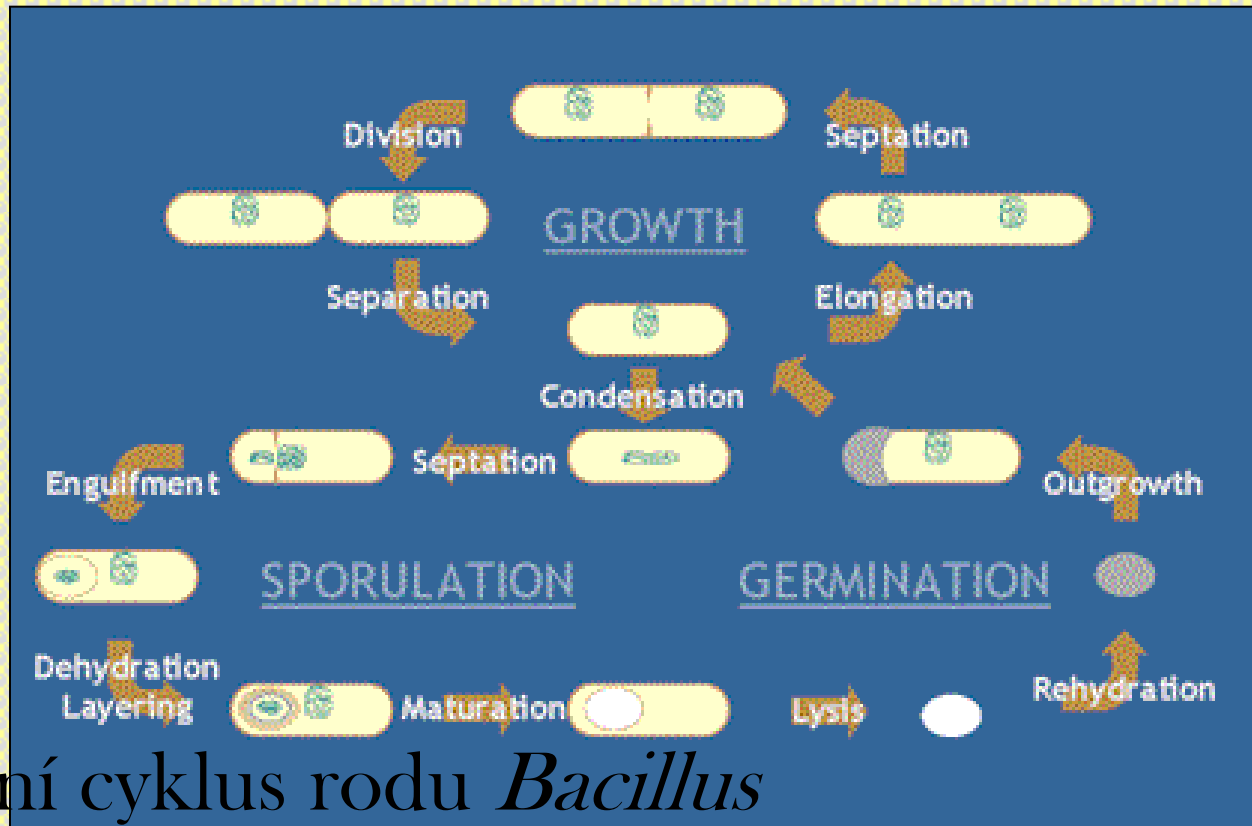




Myxobakterie



Morfologie buňky vprostřed buněčného cyklu



Životní cyklus rodu *Bacillus*

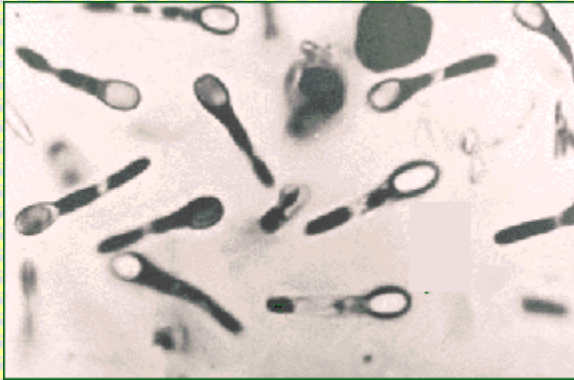
- u některých jeho druhů i u jiných rodů navíc různá barvitelnost

Gramem při různém stáří buněk - až gramlabilní

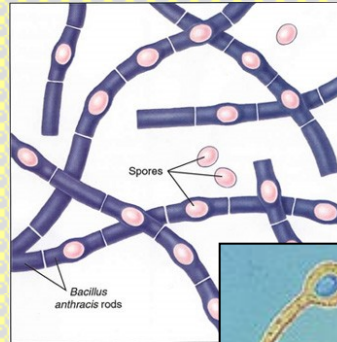
→ při popisu preparátu nutno uvažovat stáří buněk!

2) Vytváří posuzovaný druh endospory?

- v preparátu pak mohou měnit tvar buněk!



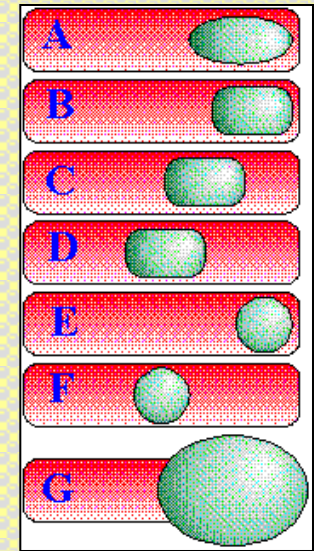
Clostridium difficile



Bacillus anthracis



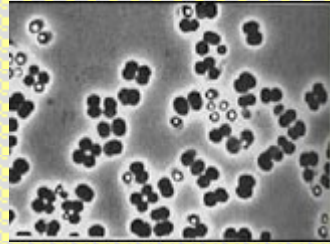
Clostridium tetani



„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

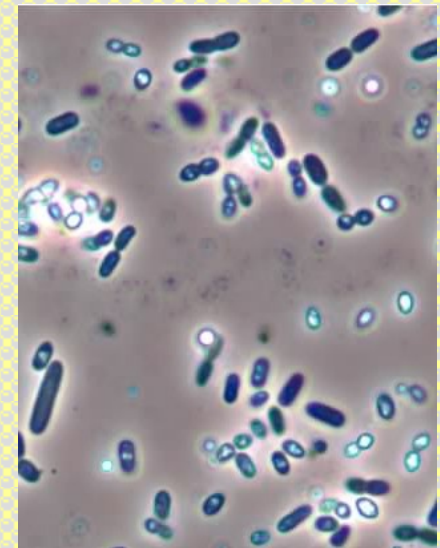
termorezistentní

*Bacillus, Clostridium, Sporosarcina,
Sporolactobacillus, Thermoactinomyces*

- G- bakterie - exospory

Méně rezistentní, odolné zejm. vůči vysychání

Azotobacter, Methylosinus

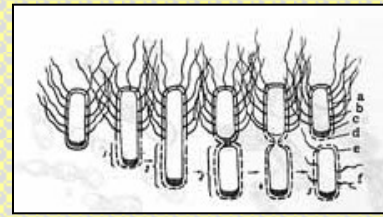


Azotobacter

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

- Konidie: Actinobacteria

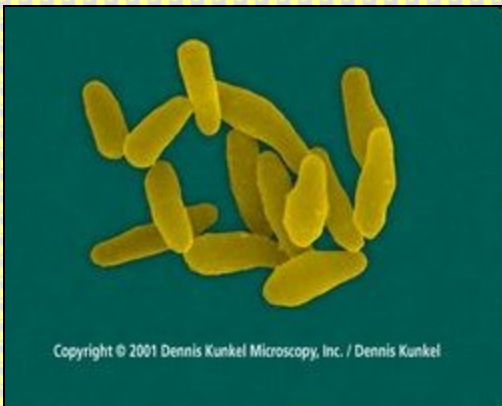
3) Stárnutím mění buňky tvar



4) Závislost tvaru buňky na vnějším prostředí

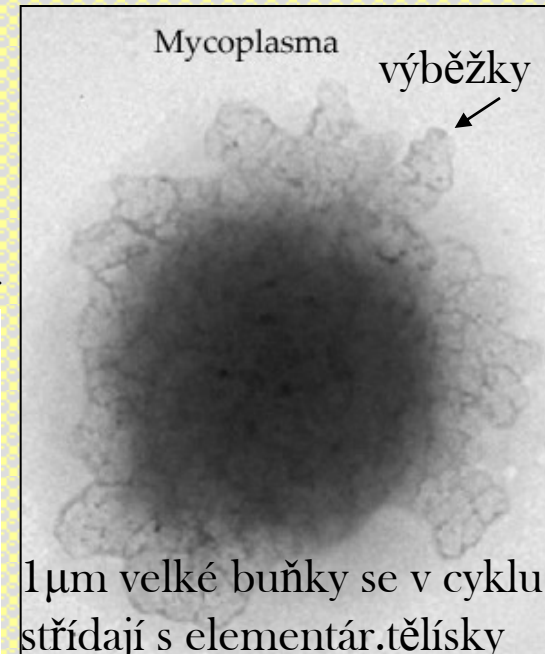
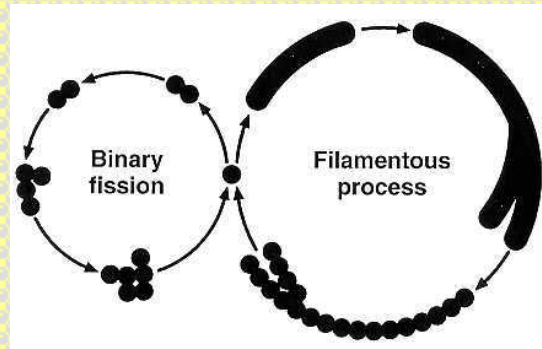
- živiny, tlak, osmolarita...

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



Corynebacterium

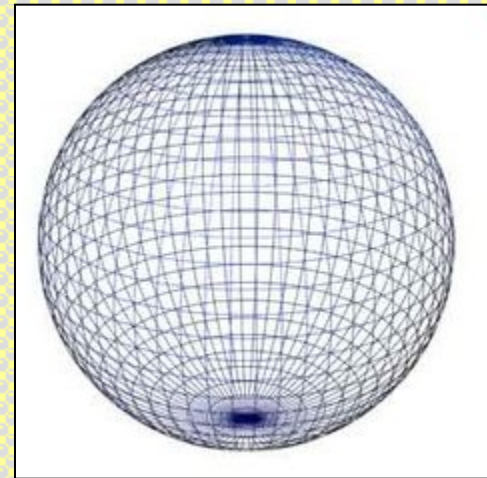
Pleomorfní mykoplazmata:
nejmenší bakteriální
buňky (0,2 - 0,3 μm);
bez buněčné stěny! Poté:
Nepůsobí betalaktamy
Osmoticky stabilní v host.b.



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

Co je možno vyčíst z tvaru buňky

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



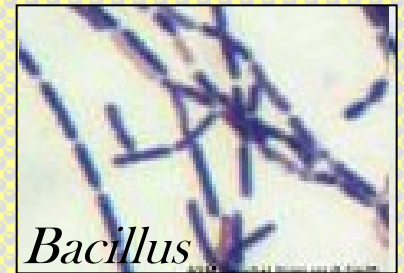
Morfologie charakteristických shluků buněk

- typické shluky napomáhají identifikaci

řetízky koků: *Streptococcus*



řetízky bacilů: *Bacillus*

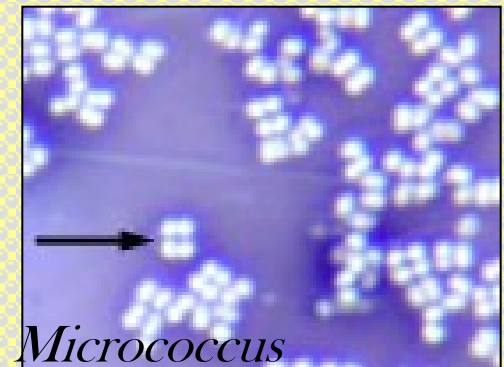
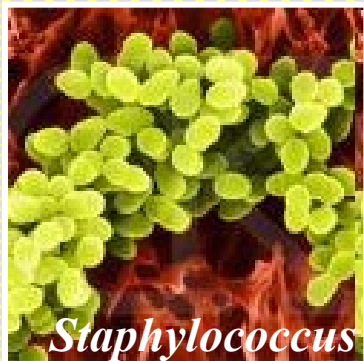


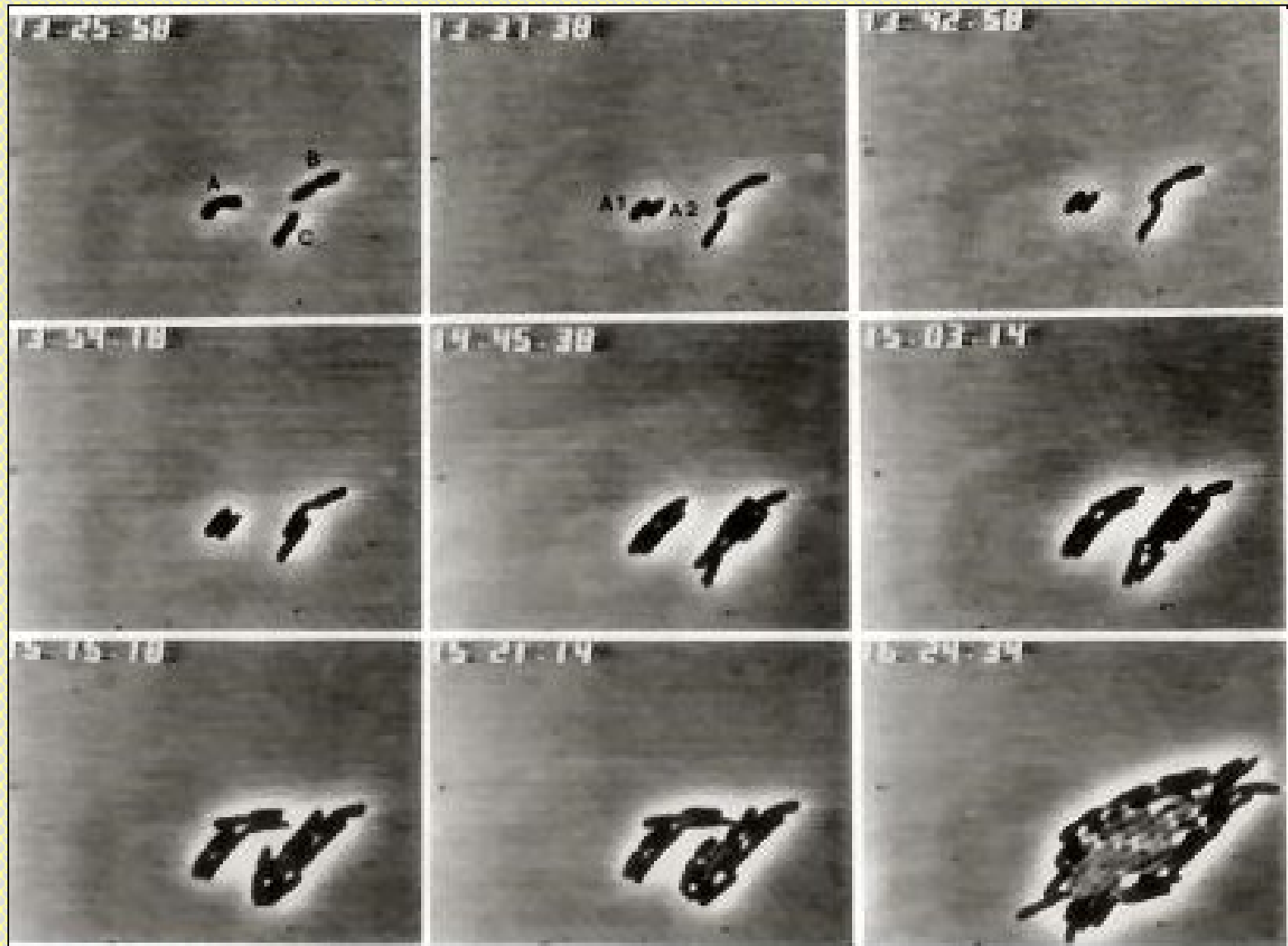
palisády: *Corynebacterium*

tetrády koků: *Micrococcus*

balíčky = sarciny *Sarcina*

hrozníčky: *Staphylococcus*





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

Morfologie bakt. kolonií

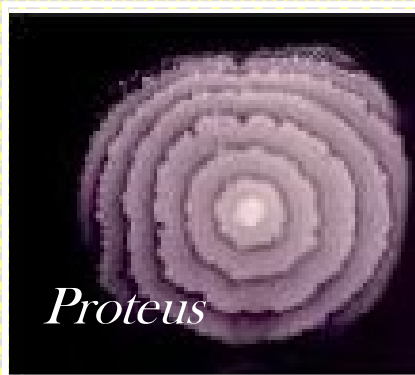
- potřeba zvážit typ media, ne kterém kolonie hodnotíme!
kultivace - zda vůbec kultivovatelné?? - sledování typu kolonií

Př: sledování morfologie kolonií

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

S-, R- a M-formy

sledování pohybu terasovité kolonie (Př: *Proteus*)

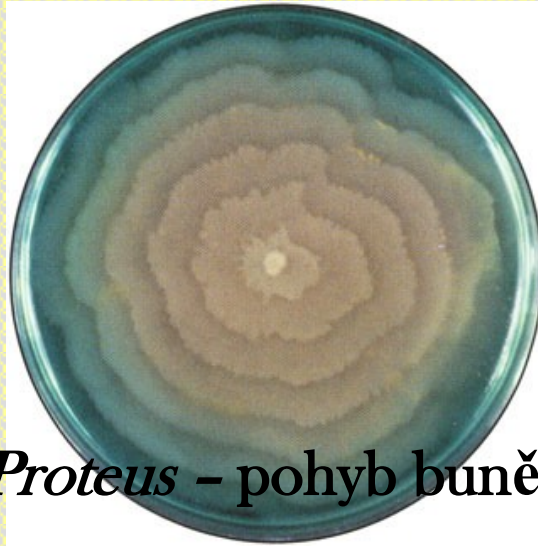


Morfologie bakteriálních kolonií

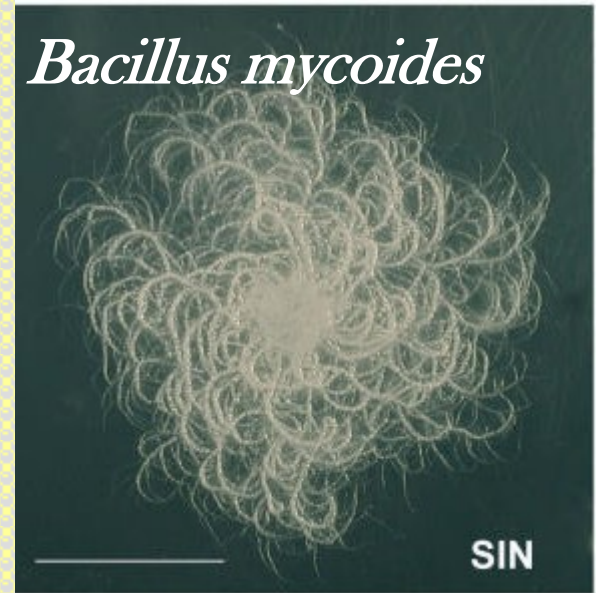
I. na základních půdách



Nocardia



Proteus – pohyb buněk



Bacillus mycooides

SIN



Streptomyces



Streptomyces



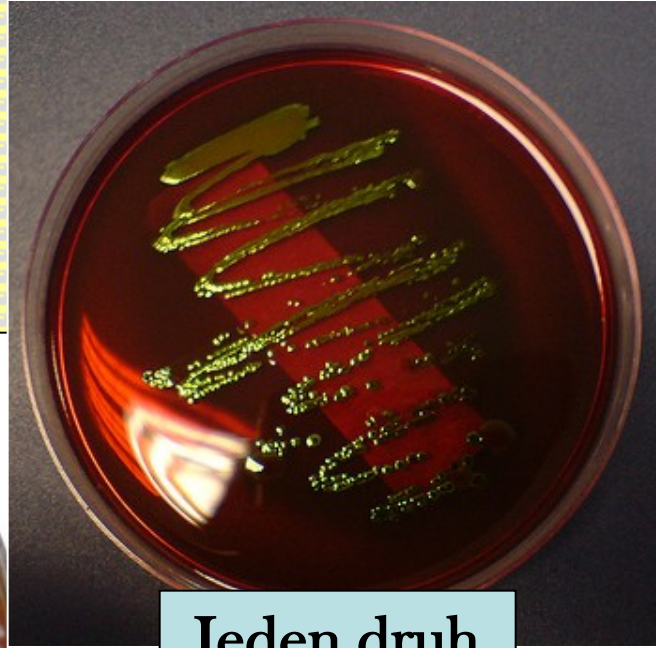
Serratia marcescens

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

Bakteriální kolonie na
II. diagnost. půdách



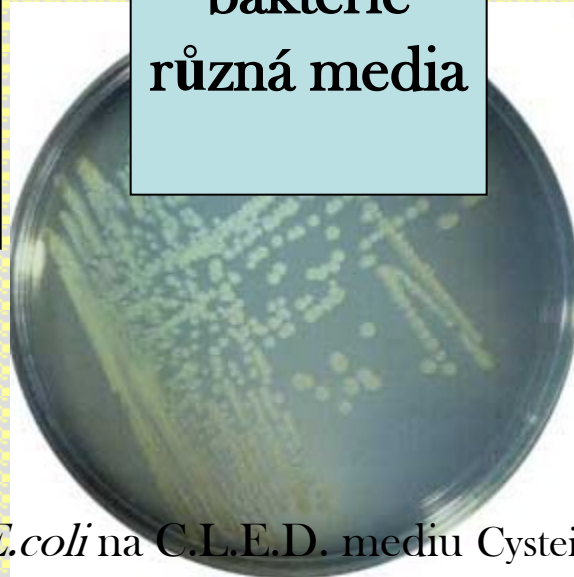
E.coli na krevním agaru



Jeden druh
bakterie
různá media



E.coli na MacConkey agaru



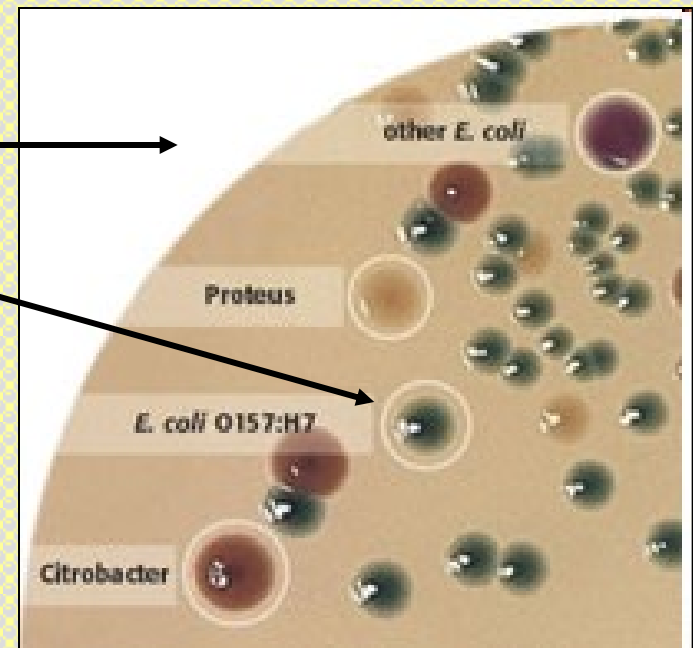
E.coli na C.L.E.D. mediu Cysteine Lactose Electrolyte Deficient Agar



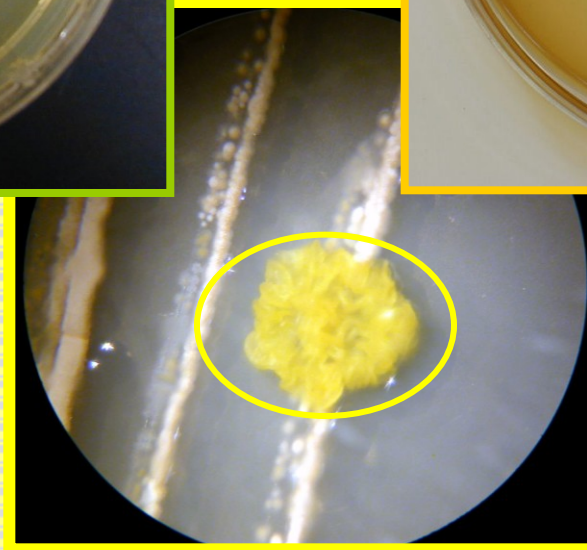
Bakteriální kolonie na III. selektivních půdách

O157:H7 ID Agar

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



Kontaminace na misce!



Děkuji za pozornost 😊

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..



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

