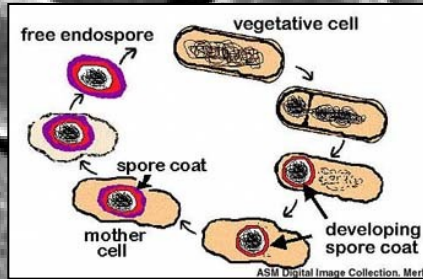
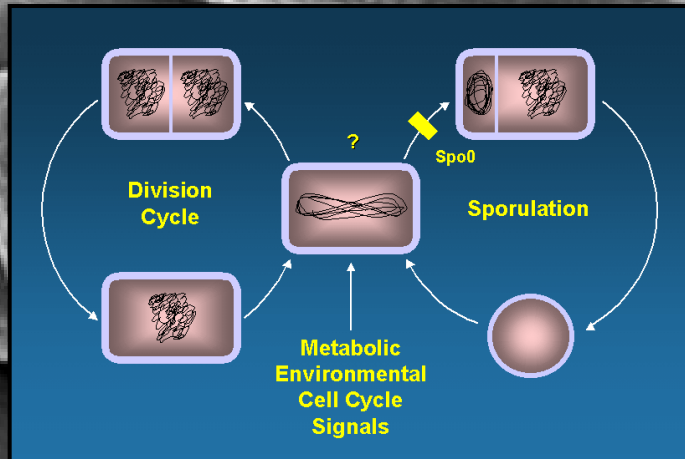
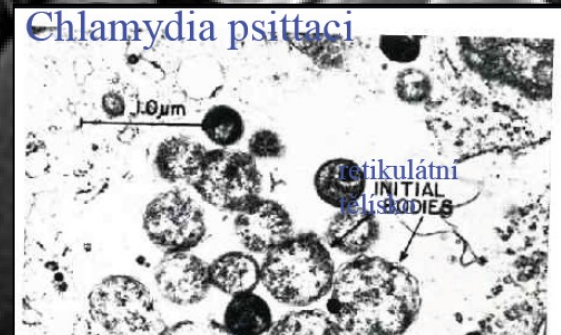


Růstové cykly bakterií

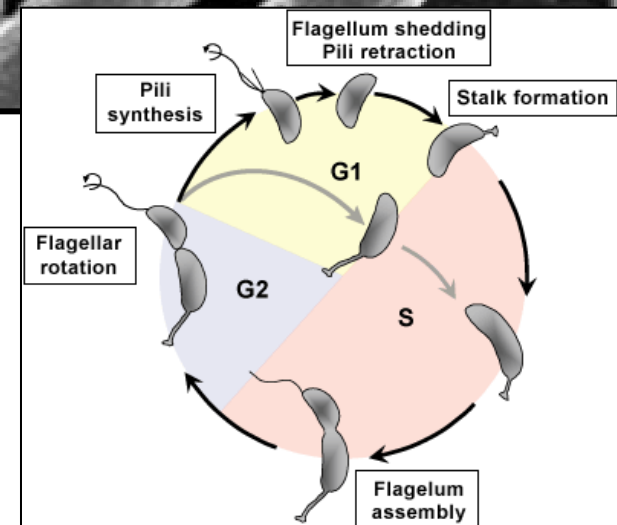


Tvorba spory



Růstové cykly bakterií

- jednoduché – střídají se 2 stádia
- ◆ rostoucí a klidové
- ◆ přisedlé a volné
- ◆ infekční a reprodukční
- komplexní s více než 2 vývojovými stádii
- ◆ myxobakterie
- růstové cykly vedoucí ke vzniku diferencovaných populací
- ◆ sinice - *Anabaena*



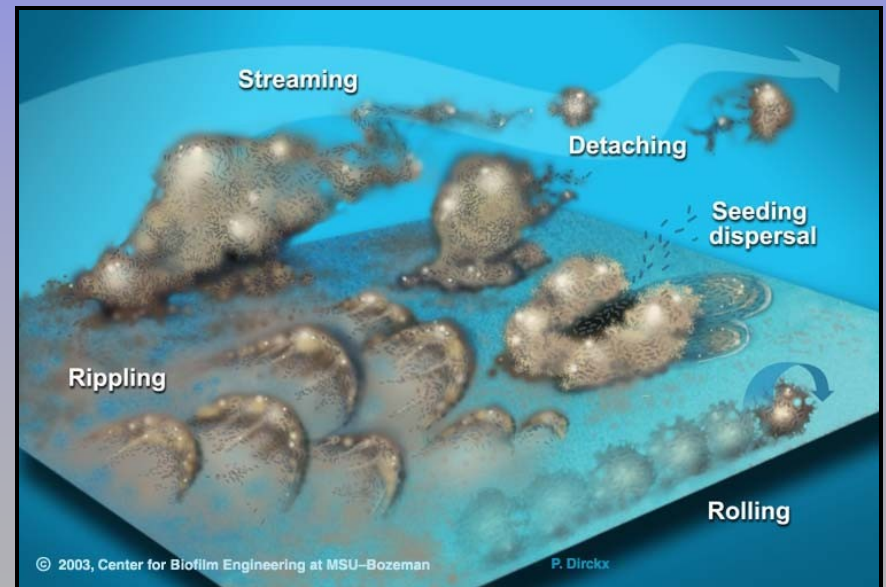
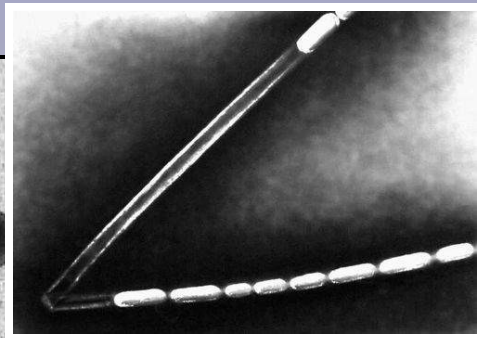
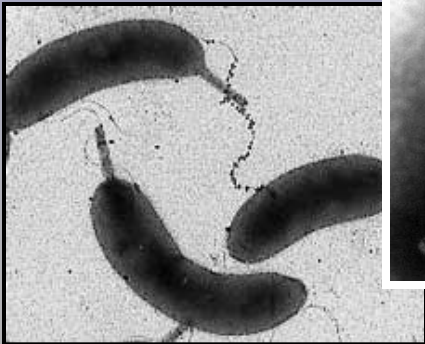
Buněčný cyklus
*Caulobacter
crescentus*

Růstové cykly bakterií II. Střídání přisedlé a volné (plovoucí) formy života u prokaryot

Caulobacter crescentus

Sphaerotilus natans

Biofilm



Biofilm

Detachment of clusters

Biofilm streamers

Heterogeneity

Seeding dispersal

Mature biofilm

Aggregate migration

Attachment

Single cells

Early structure

© 2003, Center for Biofilm Engineering at MSU-Bozeman

Biofilms Impact . . .

Cooling Water



Food Processing



Teeth



Oil Recovery



Ship Hulls



Drinking Water



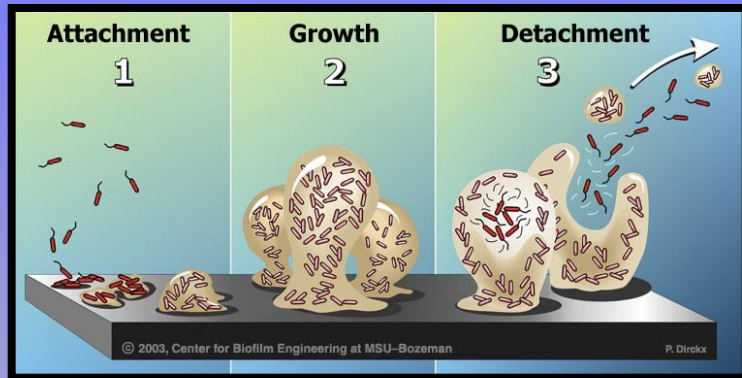
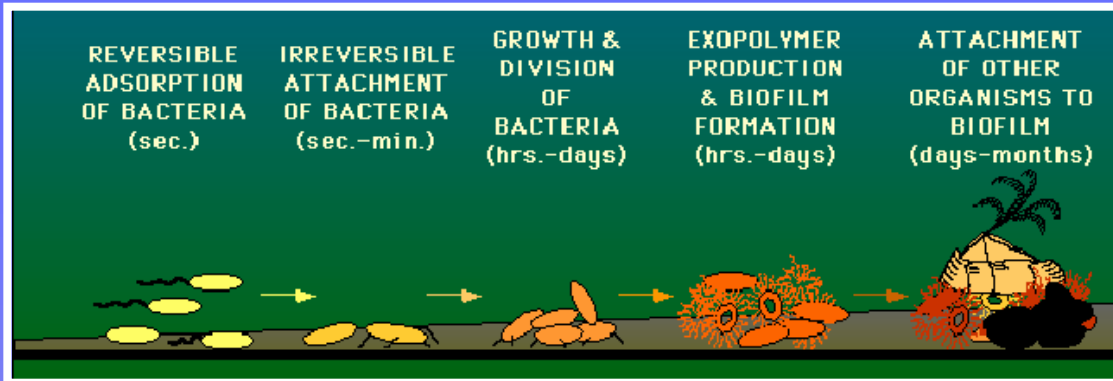
Paper Manufacturing



Medical Implants

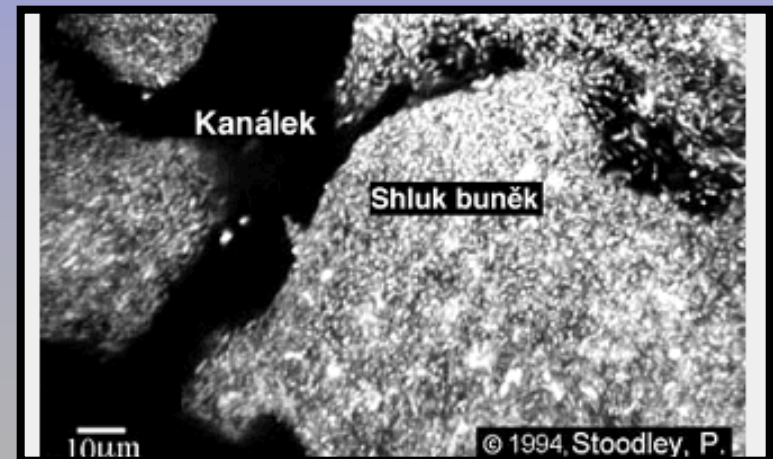
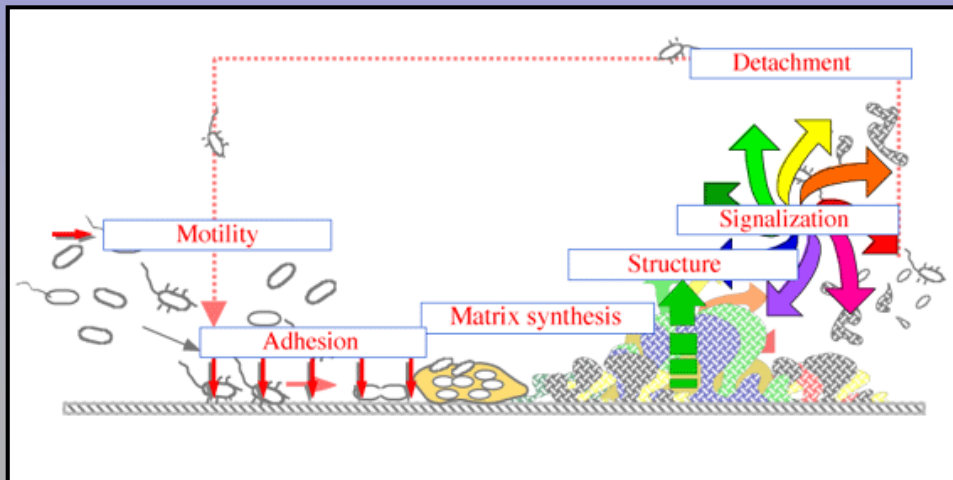
© Center for Biofilm Engineering at MSU-Bozeman

Vodní prostředí + pevné povrchy

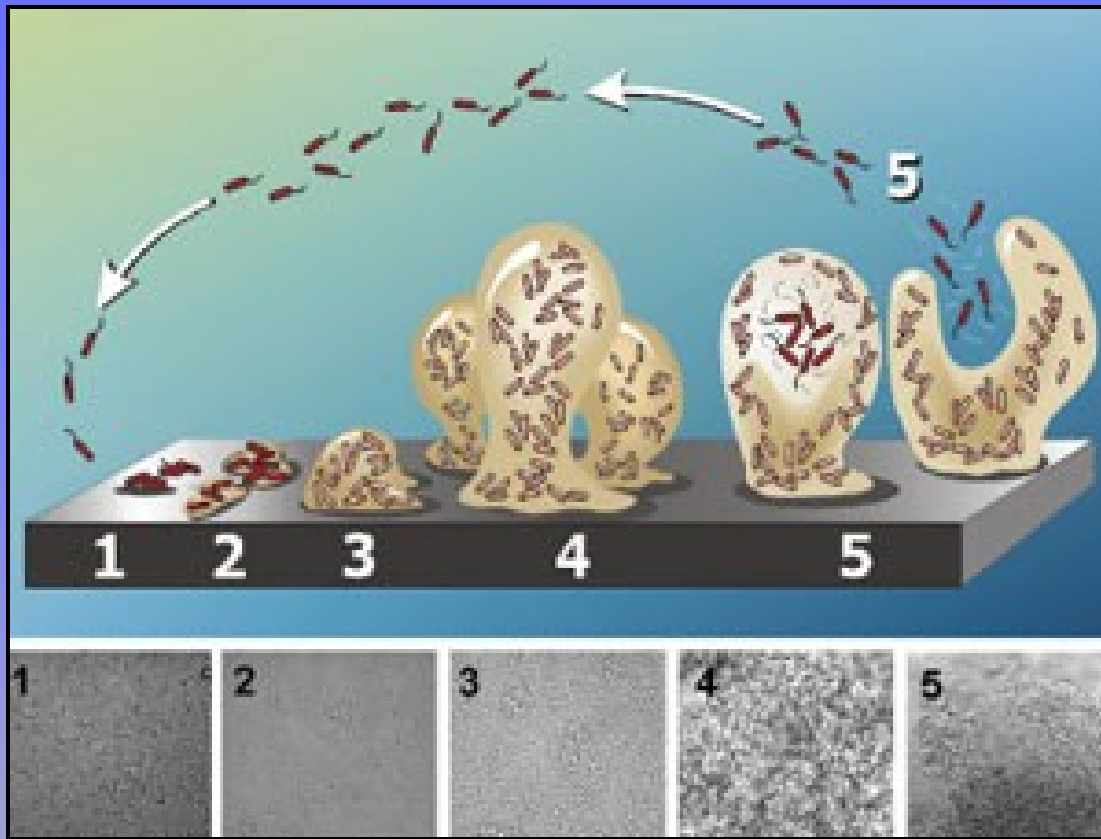


společenství buněk usazených v glykokalyx, přichycených k povrchu nebo okolním buňkám, se změněným fenotypem růstu a jinou transkripcí genů

přirozené prostředí, průmysl, těla živočichů, bioengineering, klinický materiál...



- Charakterizace **mikrobiální fyziologie**:
 - studovány planktonní buňky nebo buňky biofilmu? – v přírodě existence většiny bakterií ve formě biofilmu, planktonní buňky se vyskytují jen ve fázích přechodu do biofilmu budoucího
- **Studie biofilmu**: Sbírkové kmeny? Z prostředí?
- Jaké **vlastnosti** musí mít bakteriální povlak, aby byl za biofilm označen?
 - nově proti původní definici:
 - „struktury a závoje vznikající i bez přítomnosti pevné podložky...“
 - (surface-attached) a planktonní (free-floating)



Složky biofilmu:
 Bakteriální buňky a jiné organismy uvnitř hřibovitých shluků propojených kanálky a póry.

Biofilm jednoho bakteriálního druhu má jednodušší stavbu než společenství více druhů

Biofilm / mikrokolonie:

husté mikrobiální populace vyvinuté z **volně plovoucích** (planktonických) buněk usazených na **vhodném povrchu** v **matrix z polysacharidů** formujících „hřibovité“ útvary s dutinkami, kanálky a stopkami. Je zodpovědný za 65% onemocnění západního světa.

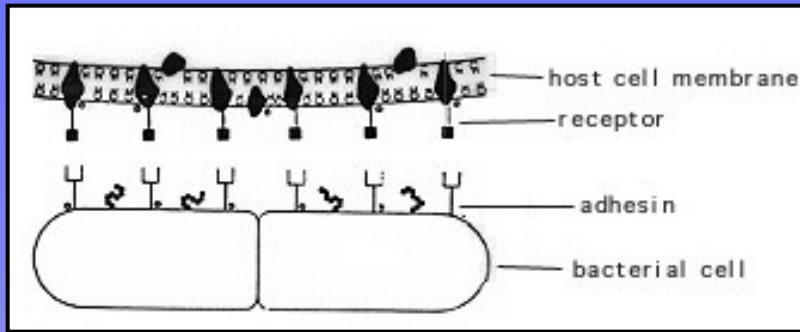
Studium – větš. u G-

- počalo u polysacharidové glykokalyx
- mikroskopie:
 - světelný mikroskop: obtížné
 - elektronový: nepracuje se živými buňkami
 - **konfokální**: dovoluje prohlížet plochy ve zvolené hloubce, z řezů pak skládána struktura; **časoběrná metoda**: možno získat záznam dění v biofilmu
 - řádkovací elektronoptická technika...

Biofilm =
společenství buněk
v čase!!

Studium složení – lokalizace? Společenství?

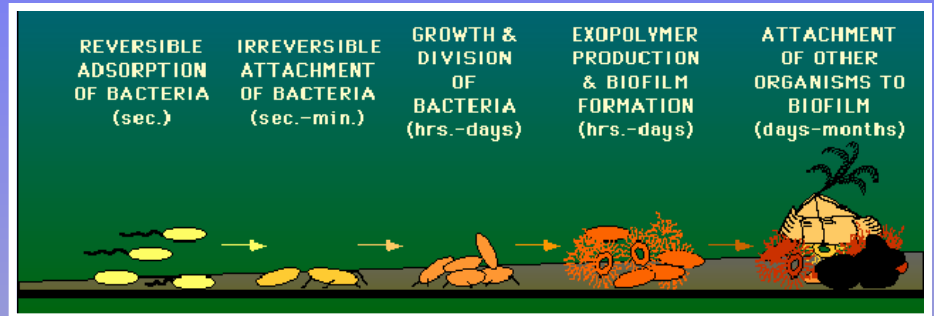
Jak biofilm vzniká..



Volně pohyblivé buňky, hlavně při **hladovění**, se za pomoci **adhezínů** (**GP** nebo **PS**) přichytávají na povrchy

Hned po přilnutí se změní jejich **fenotyp** a začnou produkovat velké množství PS, formuje se

lešení, mikrokolonie a kanálky. Časem se na **impuls** (z buněk detekujících hustotu populace vychází signál quorum sensing – důsledek konkurence a neúnosnosti velikosti společenství) buňky odlučují a kolonizují povrch.



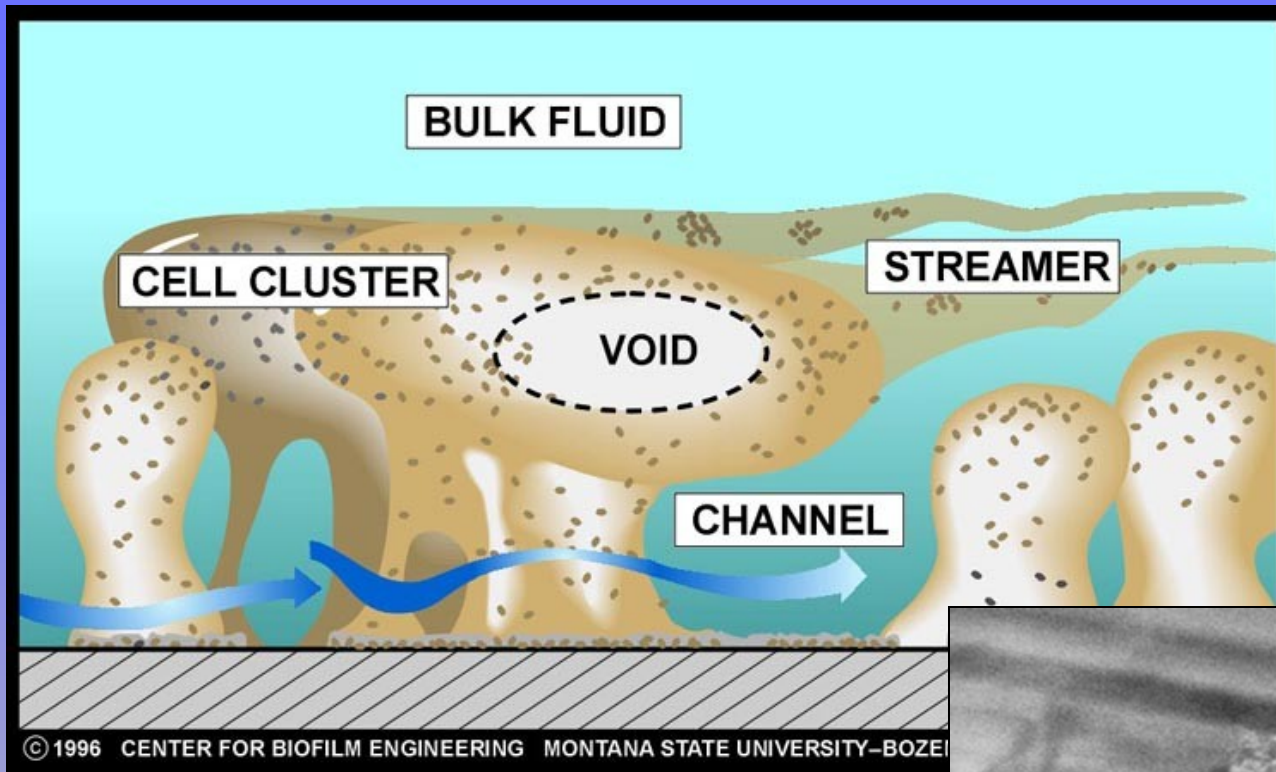
Tloušťka – několik až stovky μm , dle dostupnosti **živin** a **počtu** druhů.

Koexistence aerobů a anaerobů.



V různých vrstvách různý náboj, což pomáhá transportu živin.

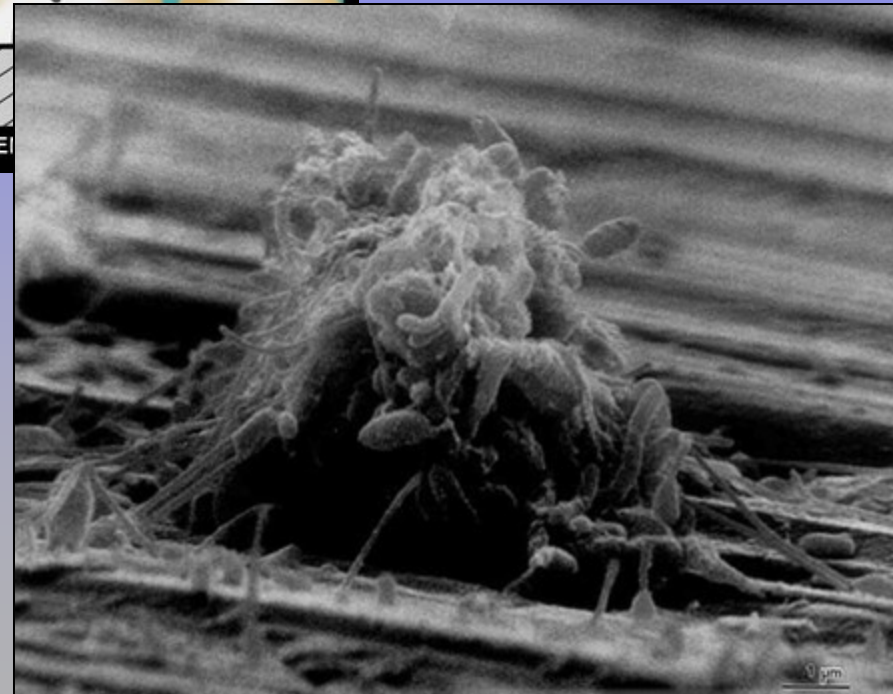
Jednodruhový – př: aerob *P. aeruginosa* – mnohem tenčí biofilm než vícedruhový.



Biofilm je elastický,
povrch se v proudu
kapaliny vlní.

V silnějším proudu
se posunuje po
podložce.

Při dostatku živin se
povrch biofilmu vyrovnává.
Lze měřit hydrodynamiku průtoku
v kanálcích;
v 1/2 hloubky je průtok 5x pomalejší.



Vlastnosti a změny buněk při vzniku biofilmu

- **Přilnutí:**

- **spouští** se řada genů
- uplatňují se **bičíky** – při dotyku nárůst jejich syntézy
 - v hotovém biofilmu mizí
- u G- bakterií **fimbrie** (=pili) - 1 μm dlouhé; stovky
- některé salmonely a *E. coli*
 - zvl. typ fimbrií z neobvyklé bílkoviny **amyloidu**: *curli*
(význam v patogenezi i při studiu patogeneze u Alzheimerovy choroby – model tvorby amyloidu)

Zkumavka: stac. kultivace: plovoucí *E. coli*, bez usazování na skle

Nádoba s přítokem živin: vzniká povlak s odlišnými buňkami – mutací změněna jediná AMK v regulační bílkovině genu pro *curli*

Vznik biofilmu – přizpůsobení přisedlému způsobu života:

Mechanismy adheze: **adhesiny, fimbrie – curli, glykokalyx**

Reverzibilní – van der Waalsovy síly – slabé vazby buňka-povrch

Irreverzibilní – chemická vazba (kovalentní, vodíková)

- přítomnost extracelulárních polymerů

Změna fenotypu - ustává syntéza bičíků, mukózní látky

***Ps. aeruginosa* – alginát**

Spouštěcí podněty:

- Osmotický tlak
- Snížený obsah kyslíku
- Rostoucí hustota poulace - **quorum sensing – malé mlk.**

pro maturaci biofilmu a virulenci

např: acyl-homoserin lakton (G-), malé peptidy (G+)

- **Po přichycení změna vlastností:**

- **zprvu** na úrovni **regulace** genů (díky změně vnějších podmínek –
 - jiné osmotické poměry, rozdílná distribuce kyslíku, rozdílná hustota populace)
 - 1/3 bílkovin se produkuje v rozdílném poměru k bílkovinám planktonických buněk
 - více tvořeny bílkoviny **1) pórů, 2) transportní**
3) syntetizující mimobuněčnou hmotu

Změna bílkovinného
profilu populace

- **Po přichycení nutno
vytvořit matici**

- z polysacharidu
- př: *P. aeruginosa*
- PS alginát, již 15 minut
po přisednutí

Experiment:

***Pseudomonas aeruginosa* – alginát**

- označení genu pro syntézu alginátu
β-galaktozidázovým operonem - *indikační gen*
→ současně se syntézou alginátu se syntetizuje
i β-galaktozidáza → štěpení laktosy v půdě →
barevný indikátor → změna barvy
- Hyperprodukce β-galaktozidázy = hyperprodukce
alginátu

**Závěr: Při tvorbě biofilmu nadprodukce
alginátu se zvýšenou rychlostí**

Početná populace....

Streaming

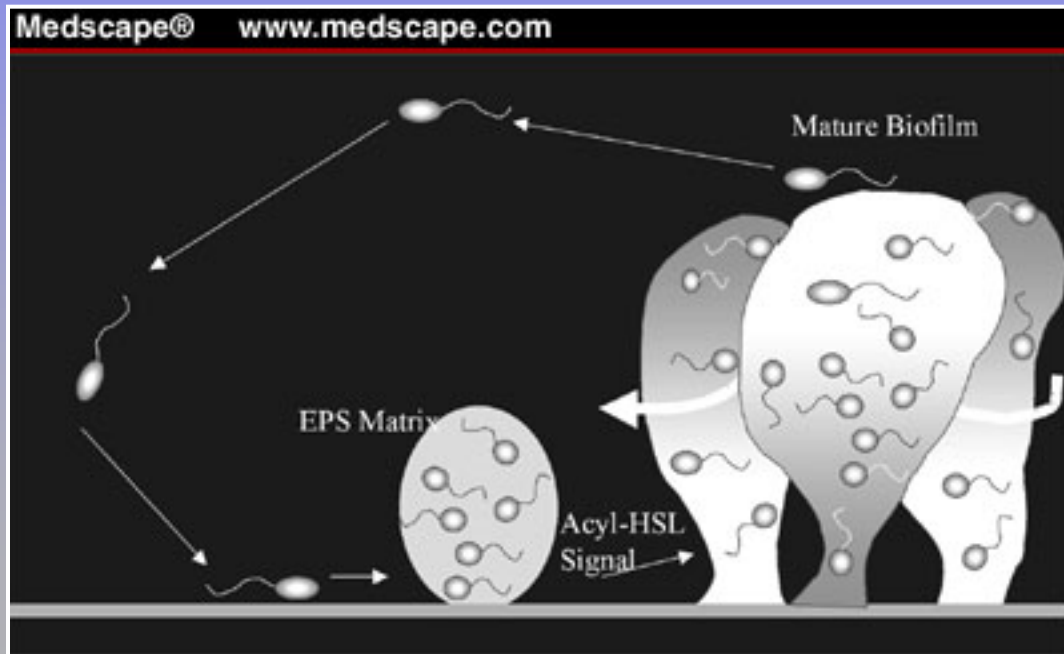
- **Signály**
 - **G+** - peptidy – řídí dělení buněk (= hustotu populace), tvorbu matrice (velmi trvanlivé; na povrchu i po odstranění biofilmu!)
„quorum sensing“ – několik desítek genů tvořících signály
 - vznik bílkovin mnoha fcí – regulace, virulence (toxiny, enzymy)
- **Přenos genů**
 - až 1000x úspěšněji než u buněk planktonických
- **Fenotyp buněk**
 - rytmicky se mění
 - po odplavení si zachovávají urč. dobu vlatnosti jako v biofilmu (R)
- **Odplavení**
 - aktivace genu pro syntézu enzymu štěpícího matrici

Značná část experimentů prováděna s kulturami:

Pseudomonas aeruginosa

formování biofilmu sestává z **pěti kroků**, během nichž
exprese více jak **800 proteinů**

(tedy víc jak polovina proteomu tohoto druhu)
je šest i vícenásobně zvýšená.



.. tento výzkum
vysvětluje i
patogenezi
některých
onemocnění

Pseudomonas aeruginosa

fáze vzniku biofilmu

Reversibilní přilnutí (attachment): buňky se **přechodně** fixují k substrátu a **povrchem indukovaná** genová exprese ústí do tvorby **proteinového profilu** zřetelně odlišného od planktonních buněk



Ireverzibilní přilnutí: u buněk dochází k reorientaci, shlukování, ztrátě pohyblivosti a aktivaci regulonu **quorum sensing**



Maturace I: buněčné shluky jsou silnější a je aktivován rhl quorum sensing system



Maturace II: buněčné shluky dosahují maximální tloušťky s proteinovým profilem odlišným od planktonních buněk



Disperze: změna struktury shluků, **formování pórů a kanálků**. Přítomnost pohyblivých i nepohyblivých buněk.

Nový objev mikrobiologů v USA: nejen pevné povrchy, ale i v bujonu ve zkumavce po delší kultivaci, dříve než buňky klesnou ke dnu...

S. epidermidis, Ps. aeruginosa

- **Sít'ovina** z polymeru - **hexagonální stěny kanálků**, 150nm tlusté, ukrývají buňky
- Kanálky vznikají z **plochých struktur**, které se tvoří v **pravidelných periodických vzdálenostech**
- Na periferii tvoří buňky kompaktní **závoje**, které vlají v proudu kapaliny a tlumí stříhové síly tekutého prostředí
- Funkce sít'oviny: lešení, asi i přenos signálu a ukazatel směru posunu buněk
- Popsány i struktury **vlákének** spojujících jednotlivá místa sít'ky
- **Zatím nezodpovězené otázky: jakto, že buňky zaujímají seskupení destičky a ne amorfní kapky?**
- **Jak to, že se řadí v pravidelných intervalech?**
- **Co bakterie zastaví po dosažení 150ti nm tloušťky stěny?**

Quorum – sensing

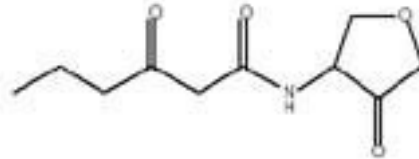
Signalizace mezi buňkami podmíněná jejich koncentrací. Jedná se o integraci signálů z prostředí, kde bakterie žijí. Tyto signály jsou předávány buněčnými transdukčními mechanismy.

- Mnoho druhů bakterií používá quorum sensing ke koordinaci své genové exprese v závislosti na místní hustotě populace .
- Podobně činí některé sociální druhy hmyzu, kde používají quorum sensing ke kolektivním rozhodnutím, např. kde vybudovat hnízdo.

Quorum – sensing - regulace luminiscence u *Vibrio fischeri*

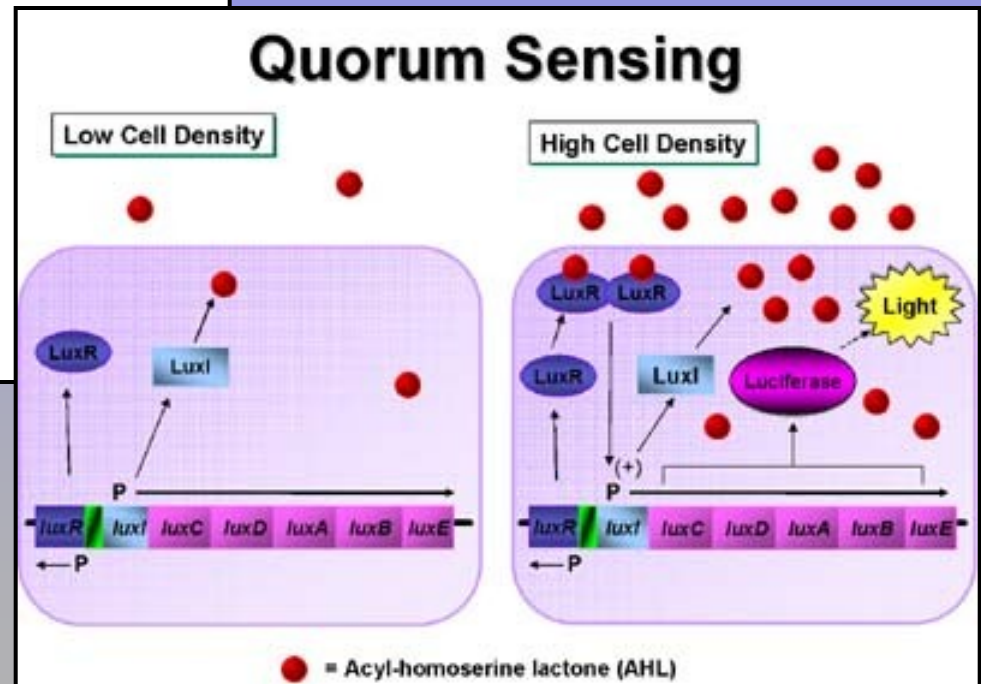


Quorum sensing was first discovered in the 1970s in the marine luminescent bacterium *Vibrio fischeri*, a facultative symbiont of marine animals (such as *Euprymna scolopes*)



3-Oxohexanoyl homoserine lactone (3OC6HSL or VAI) is the acyl-homoserine lactone (AHL) produced by LuxI and recognized by LuxR in *Vibrio fischeri*

Luminiscenční bakterie neemitují světlo, jsou-li v planktonním stavu. Výdej světla je energeticky náročný.



Quorum sensing u *Vibrio fischeri*

Výzkum quorum sensing regulovaném AHL začal až pozdních 60 letech. Mořská bioluminescentní bakterie *Vibrio fischeri* rostla v tekutých kulturách a bylo zjištěno, že kultury produkují světlo pouze když byl nárůst vysoký. Původní vysvětlení spočívalo v předpokladu, že medium obsahuje inhibitor luminescence, který je odstraněn po dostatečném nárůstu. Tento předpoklad byl učiněn na základě faktu, kdy bylo prokázáno, že růst v mediu je upraven tak („conditioned“ to jest ve kterém už jednou byly bakterie kultivovány), že luminescence byla indukovaná již při nízkých densitách buněk.

Později bylo prokázáno, že luminescence byla iniciována nikoli odnětím nějakého inhibitoru ale způsobena akumulací molekuly aktivátoru neboli „autoinducer“. Tato molekula je tvořena bakterií (autoinduktor) a aktivuje luminescenci po dosažení určité koncentrace.

N-(3-oxohexanoyl)-homoserine laktone (3-oxo-C6-HSL)

- Bakterie jsou schopné vycítit (to sense) svou densitu monitorováním koncentrace autoinduktoru. Tento mechanismus uvědomování si buněčné density byl označen jako quorum sensing (QS). Molekula tvořená *Vibrio fischeri* byla poprvé izolovaná a charakterizovaná v roce 1981 - a struktura byla identifikovaná jako N-(3-oxohexanoyl)-homoserine lakton (3-oxo-C6-HSL). Analýza genů účastných v QS u *V. fischeri* byla poprvé provedena Engebrecht et al (1983). Tento objev vedl k navržení základního modelu pro quorum sensing u *V. fischeri*, který je nyní vzorem pro ostatní podobné quorum sensing systémy

N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserin lakton OHHL

- Po mnoho let od objevu AHL- QS regulace panoval názor, že tato regulace je omezená na mořské bakterie jako *V. fischeri* a *V. harveyi*. Výzkum syntézy antibiotik prováděný v Nottinghamu a Warwicku vedl k objevu, že QS je daleko více rozšířen, než se původně předpokládalo.
- V roce 1992 bylo prokázáno, že malá molekula OHHL je odpovědná za regulaci syntézy beta-laktamového antibiotika: 1-karbapen-2-em-3-karboxylová kyselina, které je tvořeno půdní bakterií patogenní pro rostliny *Erwinia carotovora*.

OHHL , produkovaný u *V. fisheri* účinkem LuxI proteinu – regulační faktor supernatanty kultur: *Pseudomonas aeruginosa*

Serratia marcescens, *Erwinia herbicola*, *Citrobacter freundii*

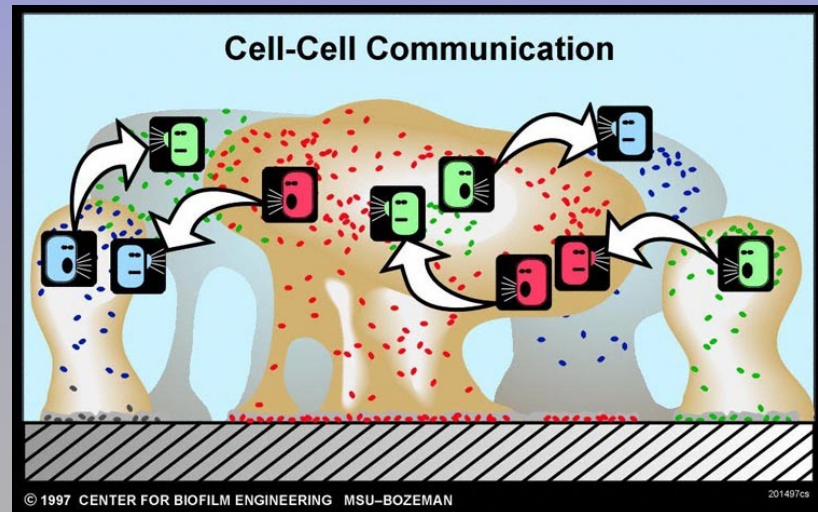
Enterobacter agglomerans, *Proteus mirabilis*

Všechny studované kmeny produkovaly podobnou molekulu.

Lux typ regulace není unikátní pro bioluminiscenci *V. fisheri* (*Photobacterium fisheri*). Gen LasR, regulující elastasu u *P. aeruginosa* je homologem k LuxR. Podobně SdiA je aktivátorem transkripce souboru genů řídících buněčný cyklus u *E.coli*.

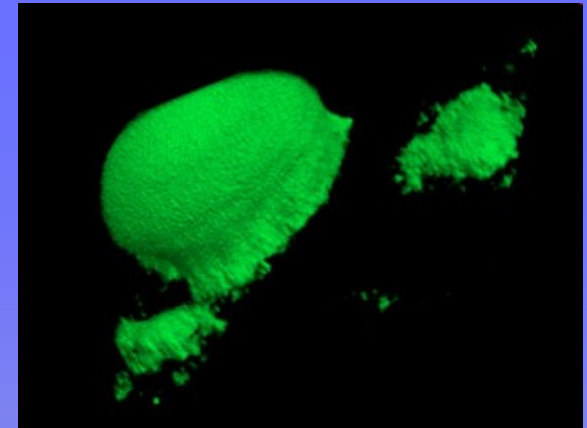
Quorum - sensing

- Soustava **malých organických molekul**, které jsou buňkou tvořeny v závislosti na koncentraci jich samotných v prostředí
- Buňka tak reaguje na **hustotu populace**
- Kaskáda reakcí po vazbě na receptor spouští syntézu sekundárních metabolitů a komunikaci v rámci bakt. společenstva
- **Vnitrodruhová organizace komunity**



- http://biomikro.vscht.cz/vyuka/bm/Quorum_sensing.pdf

***P. aeruginosa*:**
acyl-homoserin lakton
(LasI/LasR and RhII/RhIR) systém



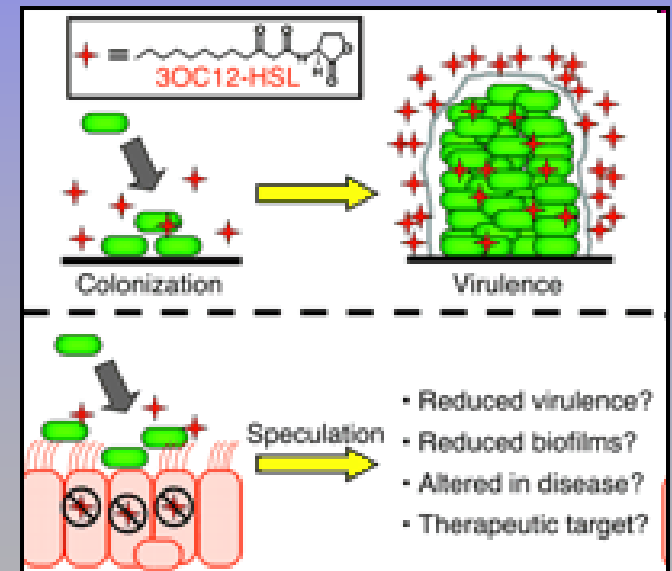
3D rekonstrukce dozrávání biofilmu
Pseudomonas aeruginosa

- Monitorování **hustoty populace**
- Specifické receptory a **syntetázy (Lux I)**
- Různé LuxI produkují různé formy ASHL
- Liší se v **R1 a R2** pozicích postranního řetězce
- Koncentrace ASHL v buňce dána koncentrací těchto molekul v prostředí
- Význam pro **ekologii buněk ale i virulenci**

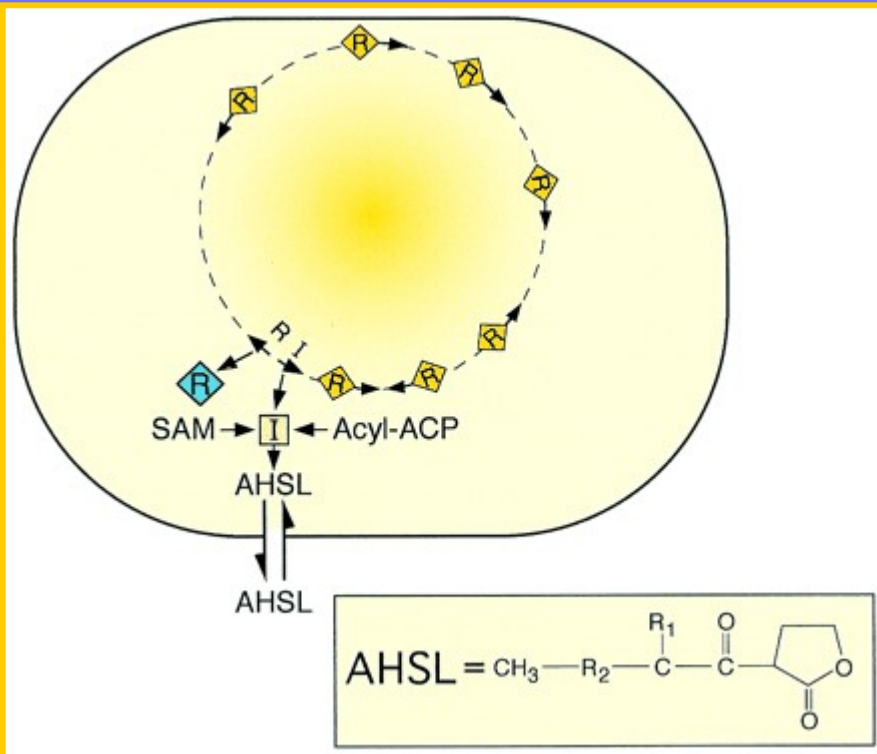
!!! Ekonomie buňky: produkce extracelulárních signálů až nad určitou hustotou populace !!!

- Načasování rozmístění faktorů virulence v hostiteli je kritický bod – patogen se může hromadit bez vykazování faktorů virulence

- Více než 4% z téměř 6 000 genů *P. aeruginosa* regulováno pomocí quorum - sensing



Acyl-homoserin lakton (AHSL) quorum-sensing cyklus



Parsek, Matthew R. and Greenberg, E. Peter (2000)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 8789-8793

- I = acyl-HSL syntetáza (LuxI homolog)
- LuxR konformace

AHSL

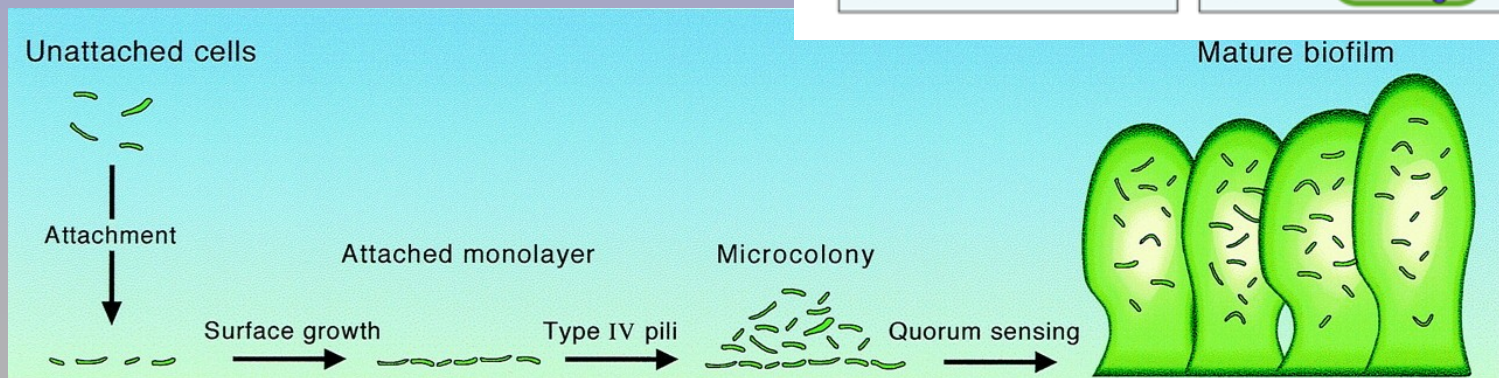
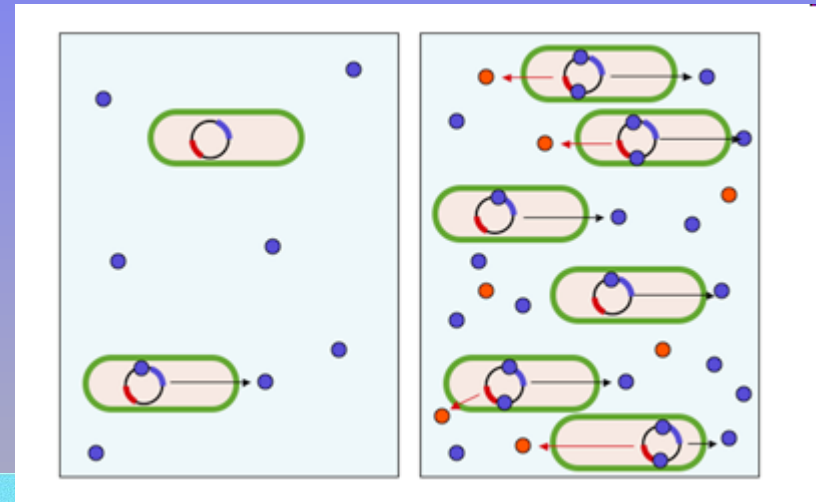
R_1 : H, OH, O

R_2 : $(\text{CH}_2)_{2-14}$

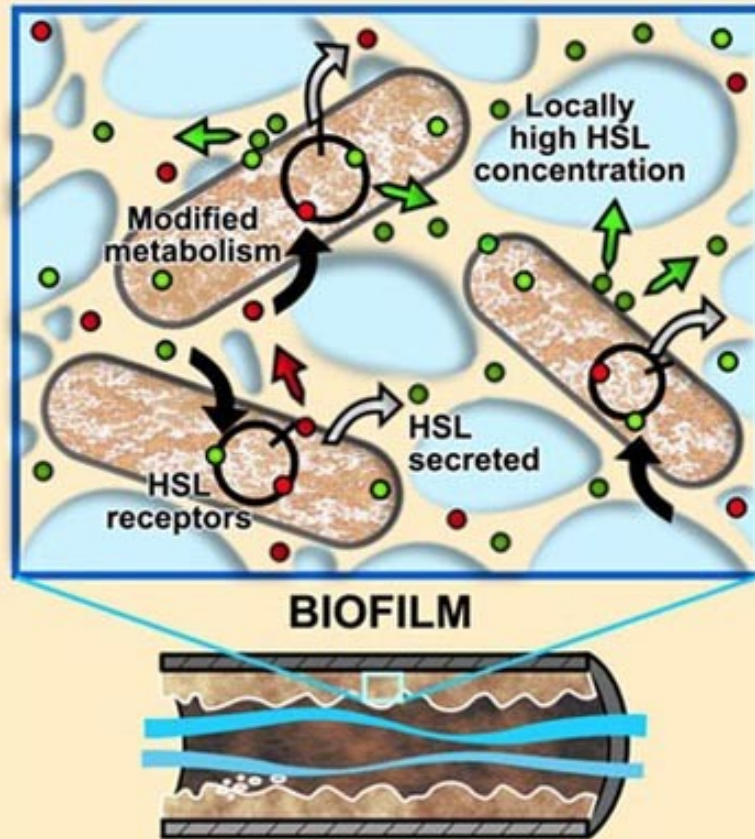
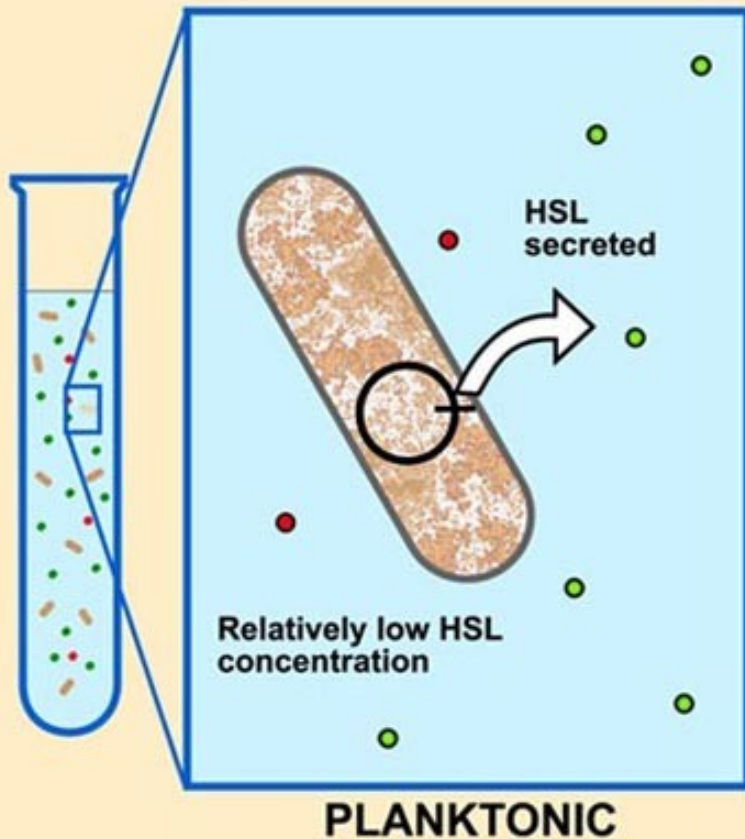
$(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH}_2)$

- Žluté diamanty v kruhu: LuxR homology aktivované HSL signálem – jeho difuze do a ven z b.
- Šipky: *qsc* genes.
- Substrát pro HSL syntázu je acetylovaný acyl-karyl protein (Acyl-ACP) a S-adenosylmethionine (SAM).

- Nízká hustota populace produkuje určitou kvantitu ASHL molekul
- Různé transkripční faktory *gsc* genů jednotlivých cyklů jsou aktivovány různými formami ASHL po dosažení jejich určité koncentrace
- Kaskáda reakcí pro spuštění produkce sekundárních metabolitů: HCN, pyocyanin

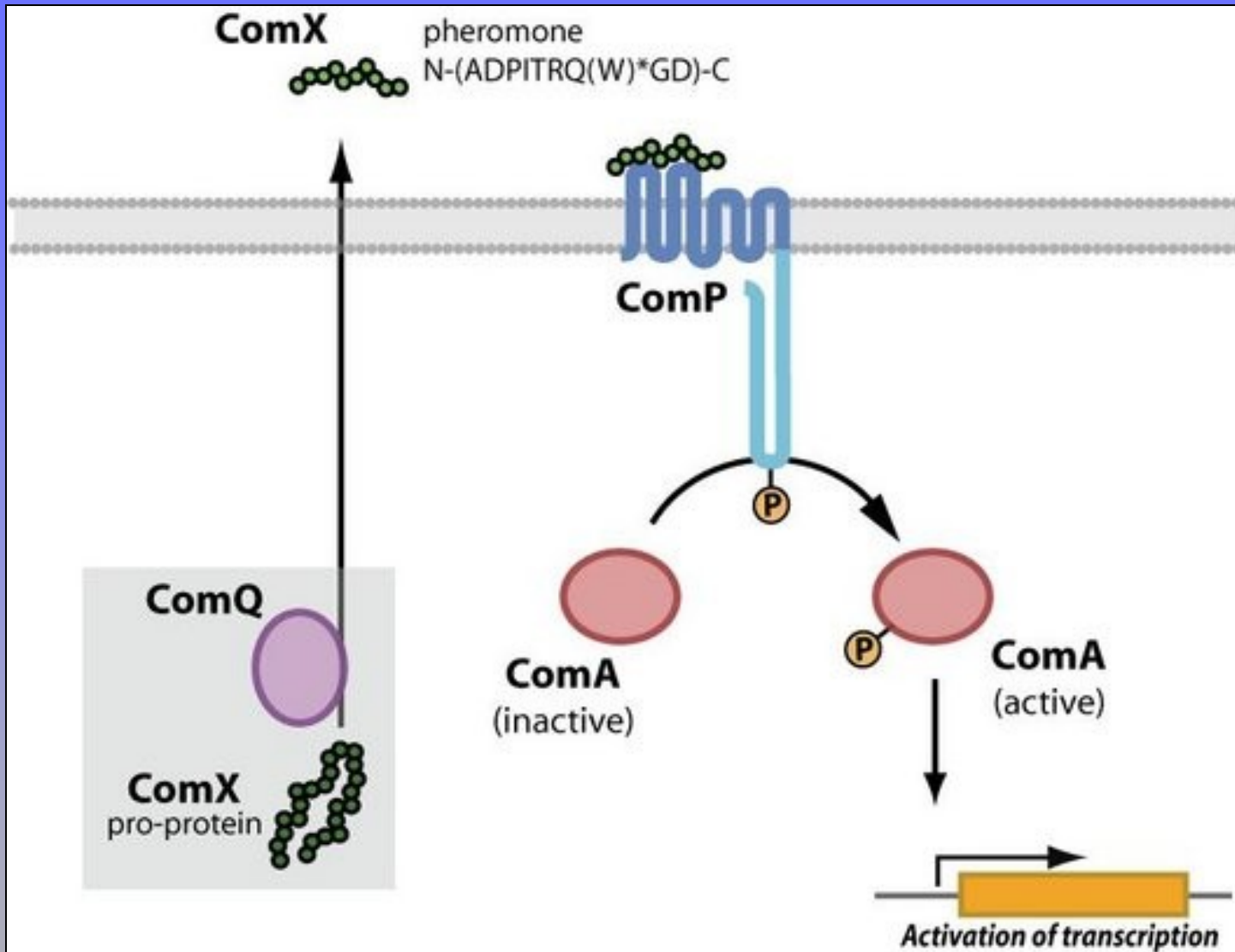


Quorum Sensing

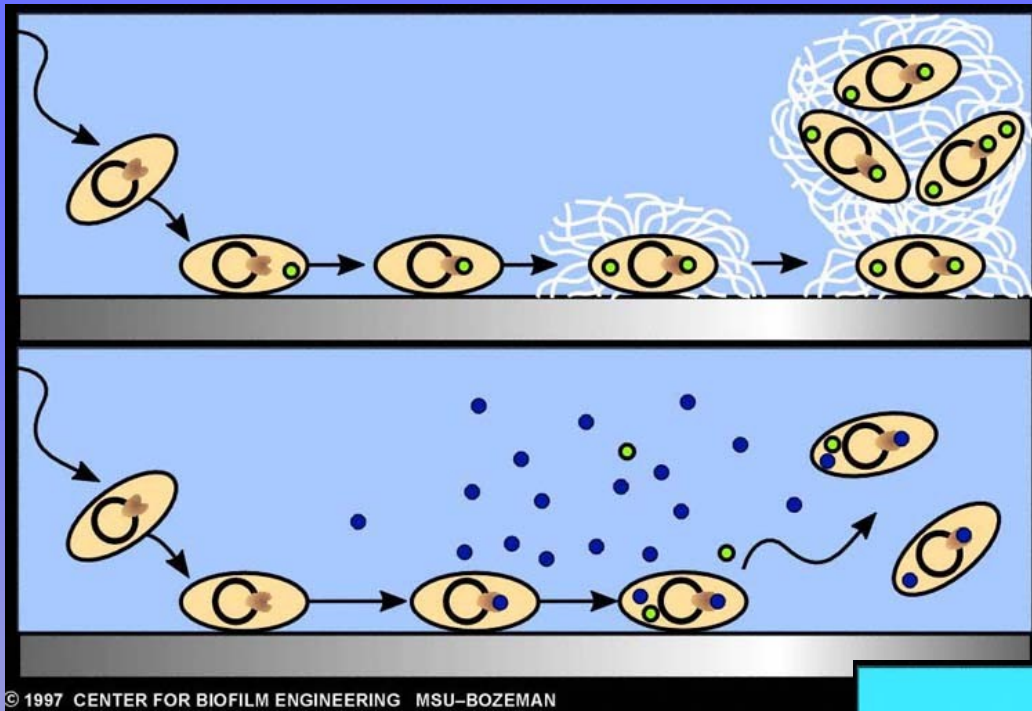


© 2004 CENTER FOR BIOFILM ENGINEERING MSU-BOZEMAN

- Acyl-homoserin lakton (G- bakterie) = autoinduktor (červený) a metabol.produkt od urč.koncentrace AHL (zelený)



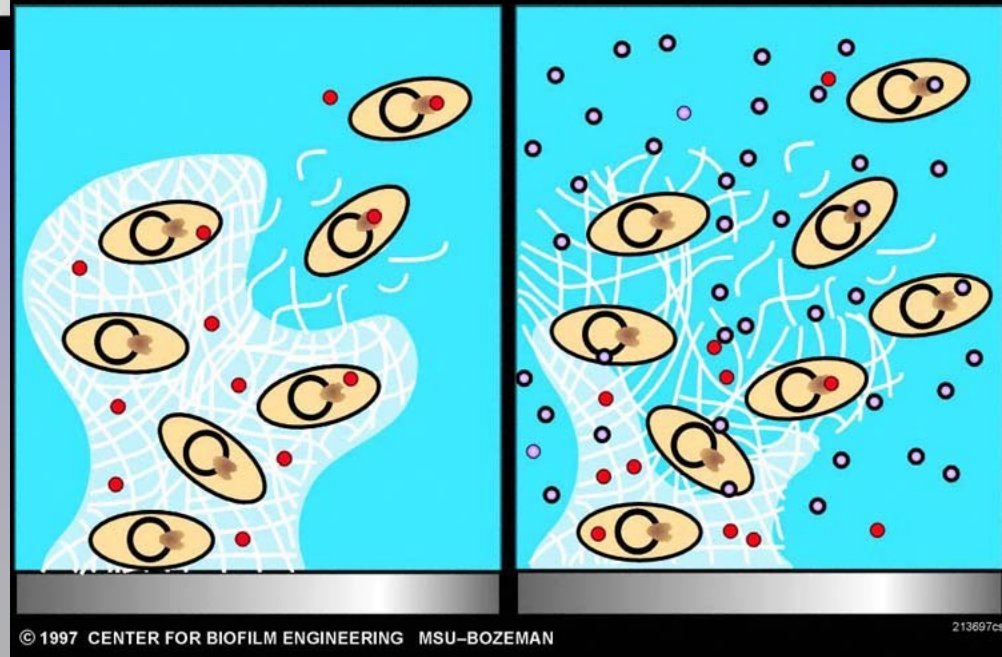
Quorum response in gram-positive bacteria.



© 1997 CENTER FOR BIOFILM ENGINEERING MSU-BOZEMAN

Kontrola procesu tvorby biofilmu

Zvýšení uvolňování
buněk ze zralého
biofilmu



© 1997 CENTER FOR BIOFILM ENGINEERING MSU-BOZEMAN

213697cs

Zvláštnosti biofilmu

Přenos genů mezi buňkami až 1 000x větší

Vyšší rezistence k ATB a dezinfekci (H₂O₂, chlor)

- omezená difúze
- sorpce ATB
- klidový stav, hladovění
- změna genotypu:

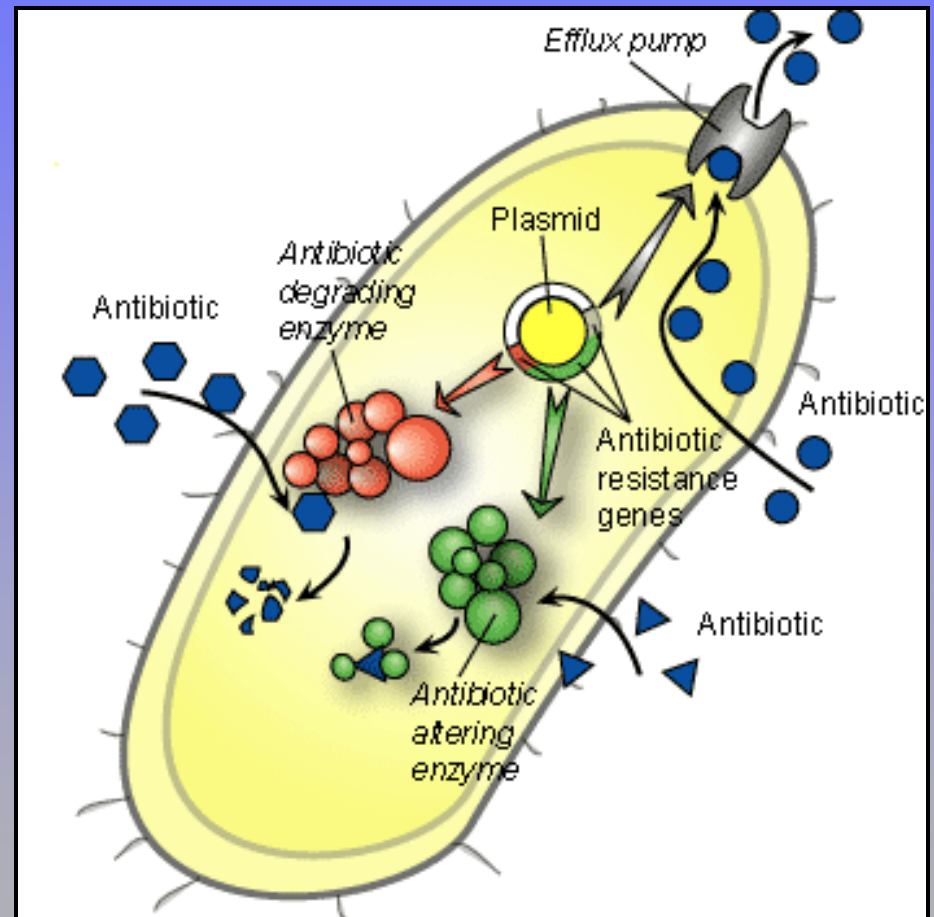
geny *mar*

– *multiple ATB resistance*

- efflux systém
- enzymatická degradace
- modifikace cílových mlk

Speciální sigma faktory

Signální mechanismy



Biofilm v lidském těle

výhoda biofilmu

– perzistence a R k ATB

pH při rozkladu zásobních cukrů
poškozuje sklovinu zubu
- silně redukující prostředí v kapsách
pod dásní – proliferace anaerobů

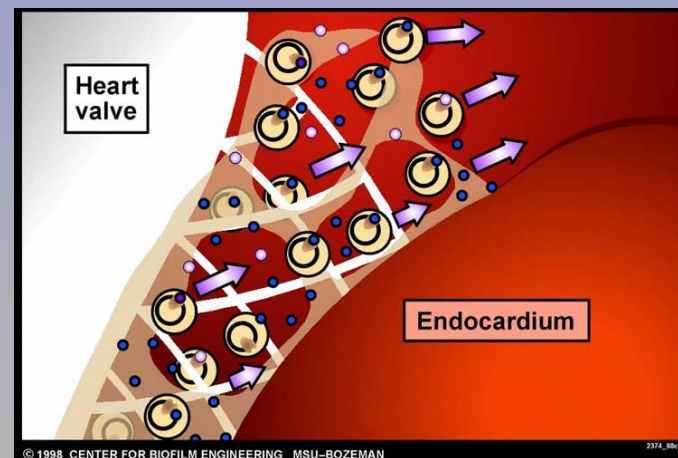
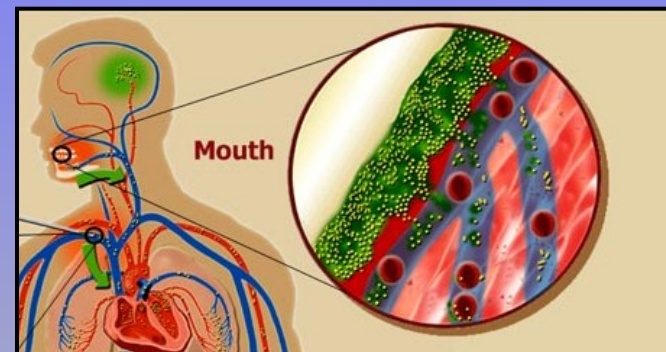
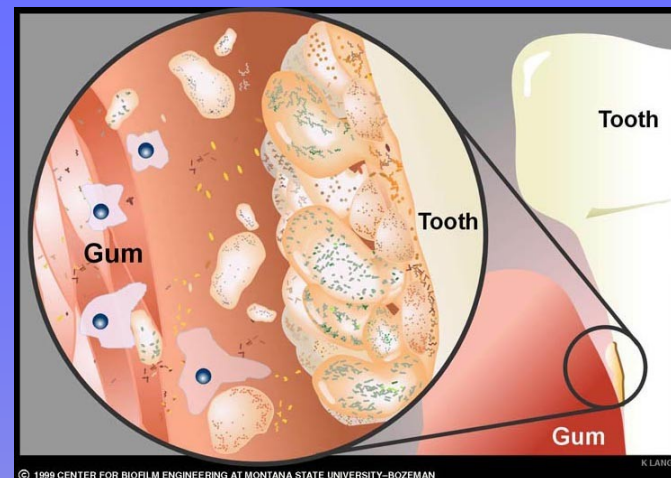
Zubní povlak

- A. van Leewenhoek
- periodontitida

Střevní sliznice

Infekce

- sliznice nebo uvnitř tkáně;
- endokarditida
 - trvalý biofilm na chlopních
(hl. strepto- a stafylokoky;
nebezpečí z krvácivých dásní..)
- rány; bércové vředy; spáleniny



Chronické infekce

– dýchací cesty

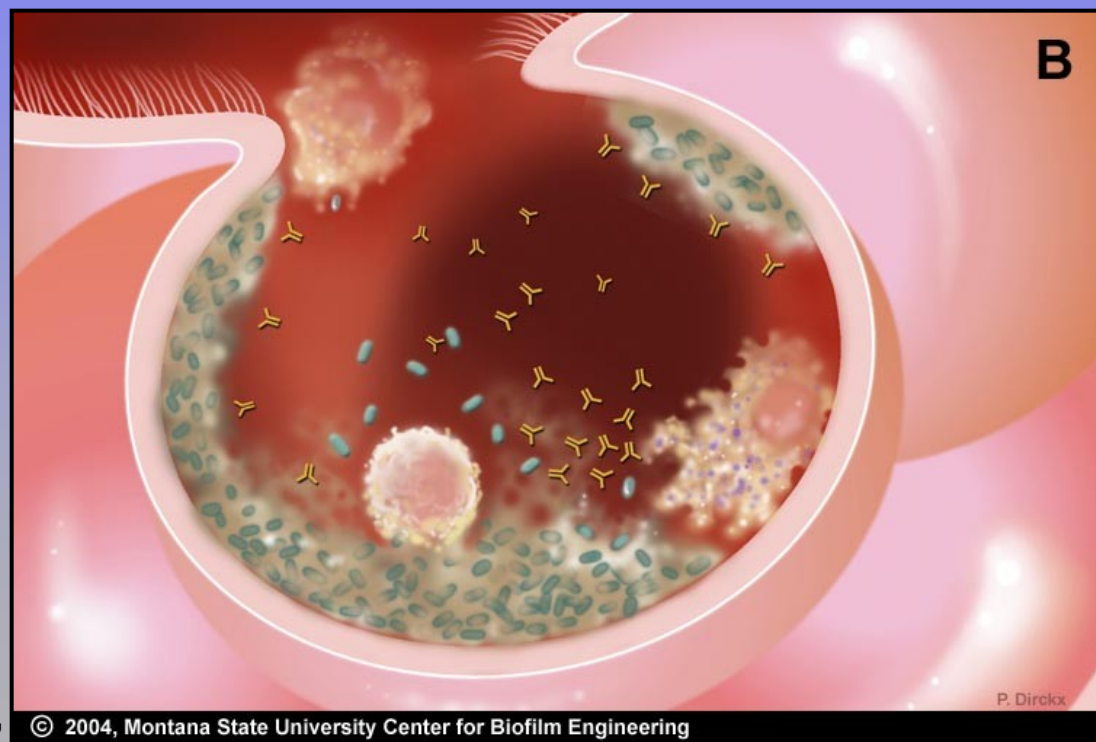
Cystická fibróza – genet. onemocnění (porucha iont. rovnováhy)

Vývoj: běžné infekce (stafylokoky, hemofily, pneumokoky)

později na poškozené tkáni *P. aeruginosa*; v alginátu odolné.

CHOPN

- ušní infekce
- močové cesty
- chronický zánět prostaty



© 2004, Montana State University Center for Biofilm Engineering

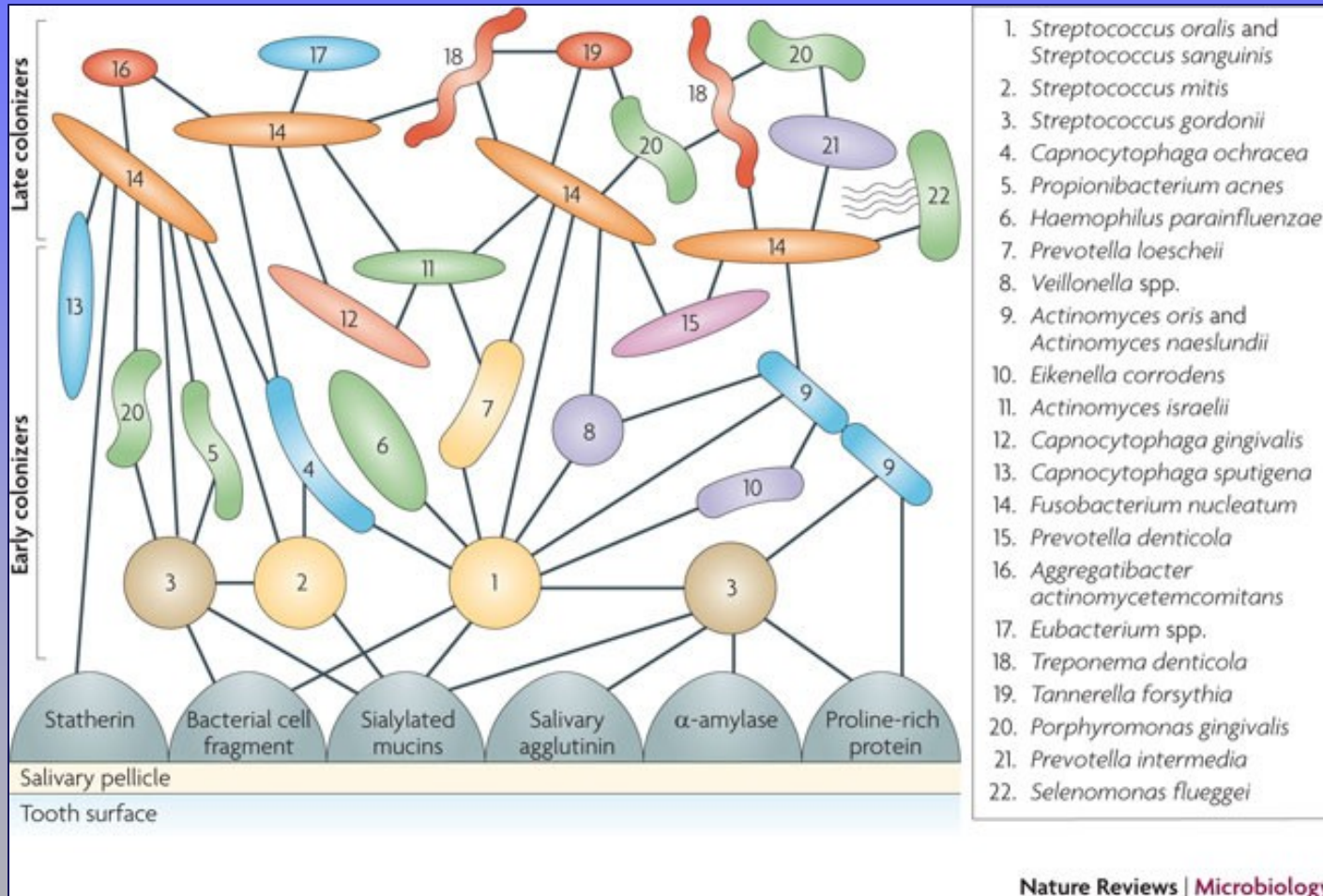
P. Dirckx

Imunokomprimovaní – kolonizace alveol, až kalcifikace..

Biofilm nespouští imunitní odpověď.

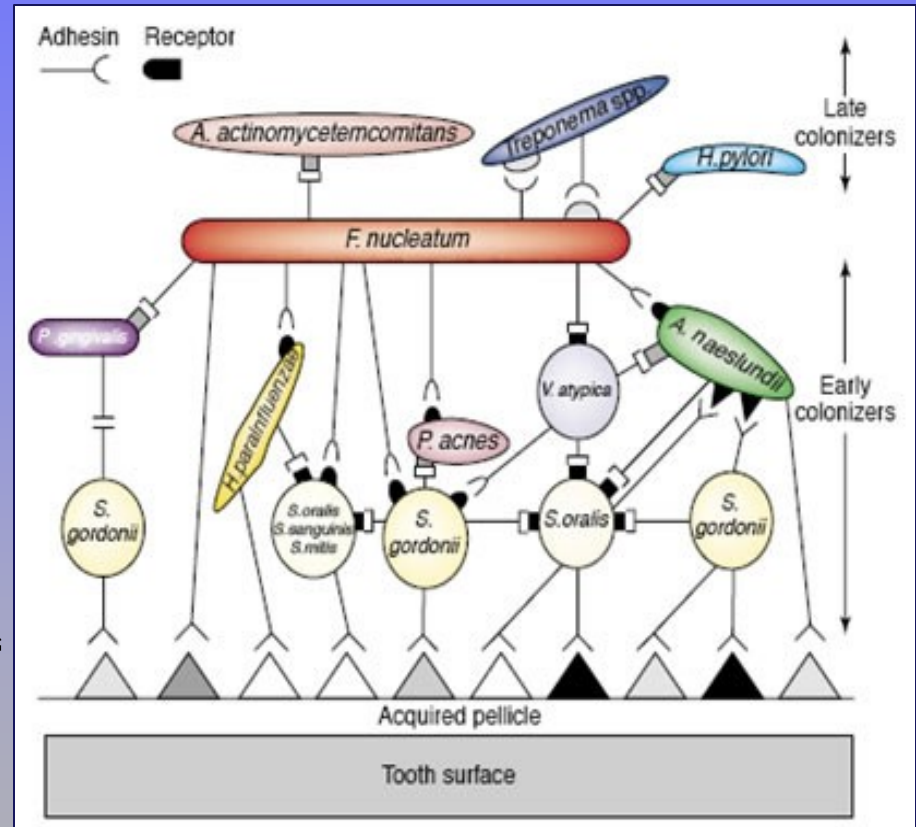
Biofilm skloviný

700 kmenů z 18ti rodů



Mezibuněčný kontakt – role adhezínů (lektiny) a receptorů (sacharidy)
 Kontak s povrchem zubu – pelikula proteinů, lektiny... (Rickert et al. 2003)

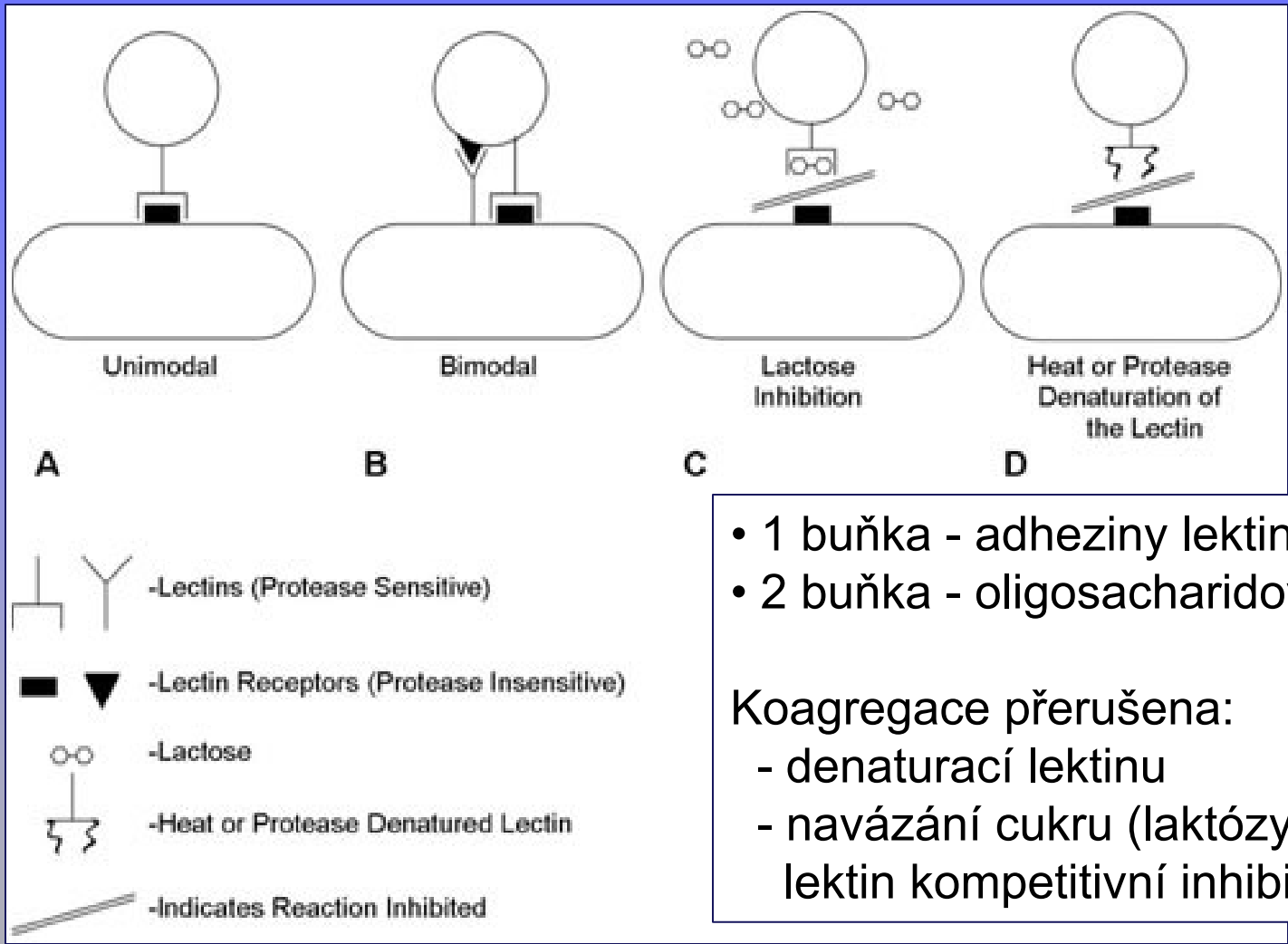
- 1970, Gibbons and Nygaard
 - ve smíšené kultuře *Actinomyces naeslundii* a *Streptococcus sanguinis* z dentálního povlaku – snížení turbidity v bujónu (minuty) = „koagregace“
- Proces vzniku biofilmu:
 - 1) přilnutí vrstvičky proteinů na zubní sklovinu – ze slin
 - 2) první kolonizátoři – streptokoky ústní dutiny
 - 3) aktinomycety, *Fusobacterium*
 - 4) pozdní kolonizátoři na fusobakteria
- Proces kolonizace – souslednost
 - podle ústní hygieny
 - a dostupnosti vhodných „partnerů“ pro agregaci mikrokolonií a jejich následné párování.



Často pouhá přítomnost kmene nestačí, je potřeba přítomnosti vhodných partnerů koagregace v dostatečném množství. Rickert et al. 2003

- bind to complementary salivary receptors (sialylated mucins, proline-rich protein, α -amylase, salivary agglutinin and bacterial cell fragments) in the acquired pellicle coating the tooth surface. Late colonizers bind to previously bound bacteria. Sequential binding results in the appearance of nascent surfaces that bridge with the next coaggregating partner cell. Coaggregation is different from aggregation that occurs between genetically identical cells and from agglutination of cells through interaction of cells with soluble molecules, for example, antibodies. Most coaggregations are between cells of different genera; *Fusobacterium nucleatum* strains, for example, coaggregate intergenerically with representatives of all oral bacterial species. However, intrageneric coaggregation among fusobacterial strains is only rarely observed. In sharp contrast, streptococci exhibit broad intrageneric coaggregation partnerships (for example, *S. gordonii* and *S. oralis*) as well as intraspecies partnerships (for example, *S. gordonii* DL1 and *S. gordonii* 38). Each bacterial strain exhibits specificity in partners. For example, some streptococci are capable of coaggregating with certain *Veillonella* spp., whereas other streptococci cannot coaggregate with those veillonellae but do coaggregate with a separate group of veillonellae²⁴. Figure modified, with permission, from Ref. [106](#) © American Society for Microbiology (2002).

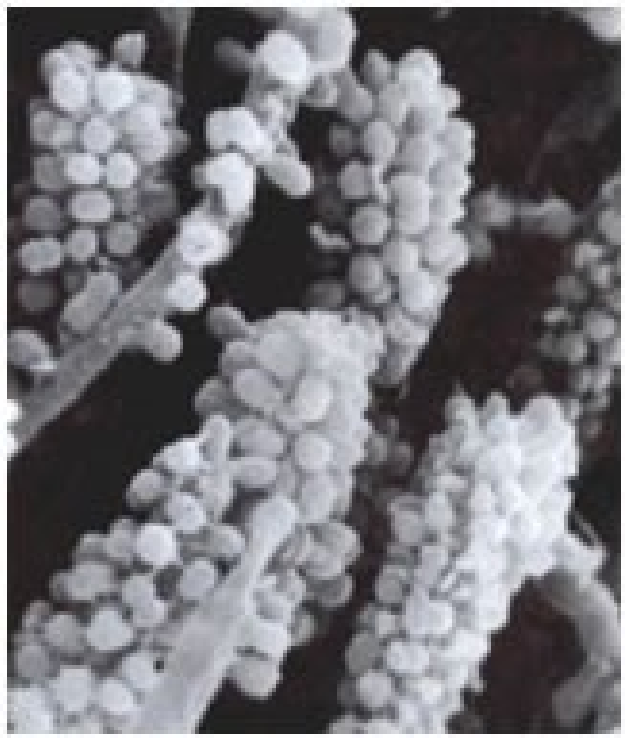
Mezibuněčné interakce biofilmu zubní skloviny



- 1 buňka - adheziny lektinového typu
 - 2 buňka - oligosacharidové skupiny
- Koagregace přerušena:
- denaturací lektinu
 - navázání cukru (laktózy) blokující lektin kompetitivní inhibicí

Figure 2. Interactions between coaggregating pairs of organisms.

Morfologické struktury orálního biofilmu



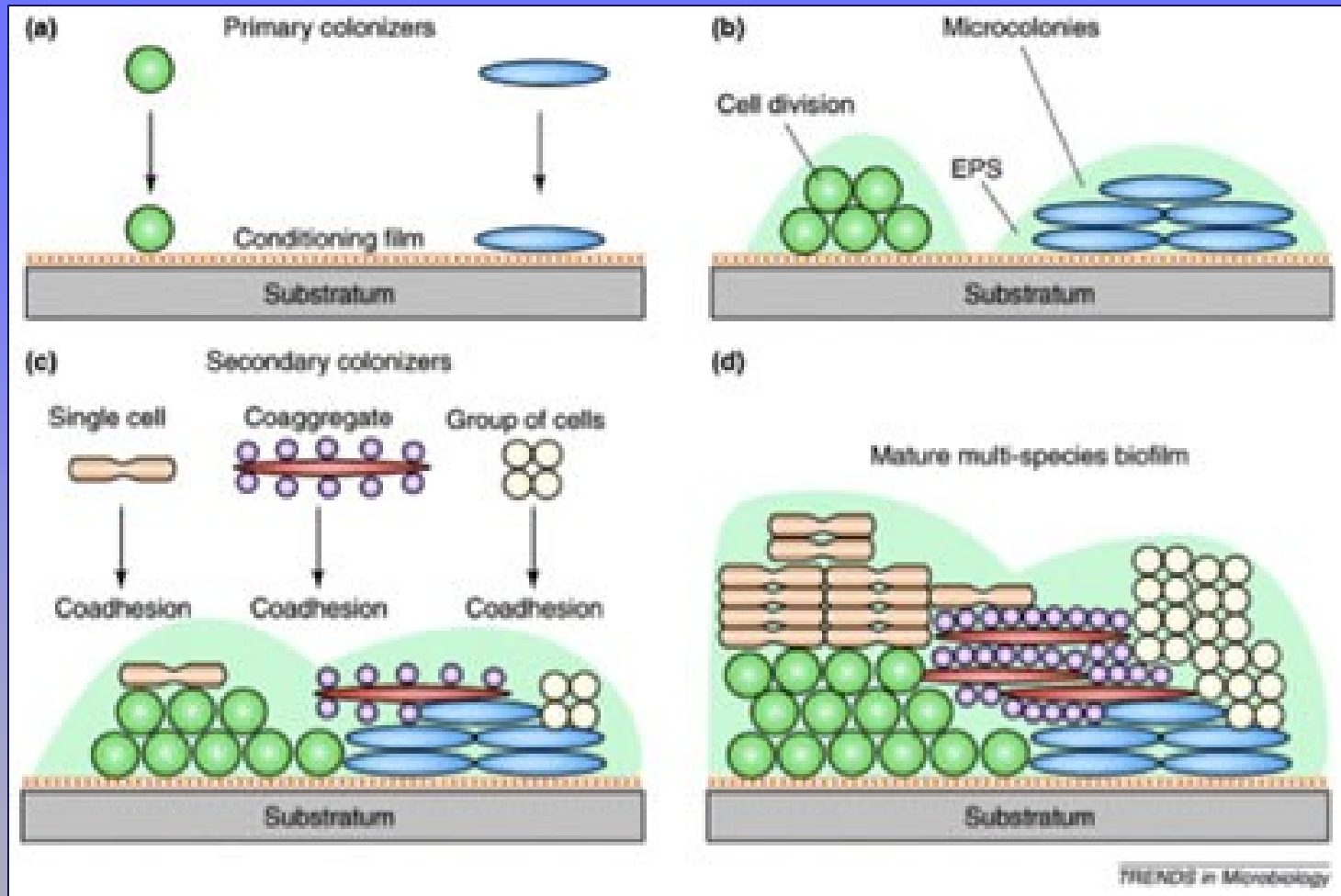
corncobs

“corncobs” – koky koagregující s
vláknitými bakteriemi

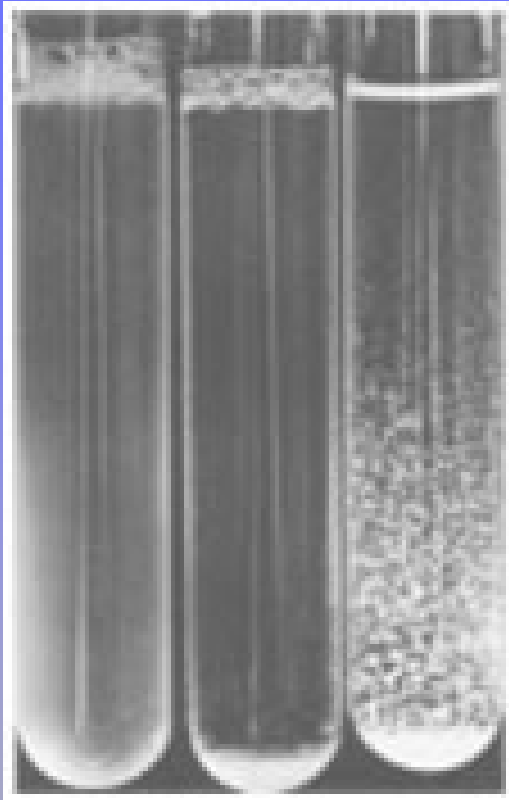
“rosette” - 1 buňka koagregující s koky

“test tube brush formations”

Růst dentálního biofilmu



- Tvorba a spojování koagregátů
- Dělení v mikrokolonii koagregátu

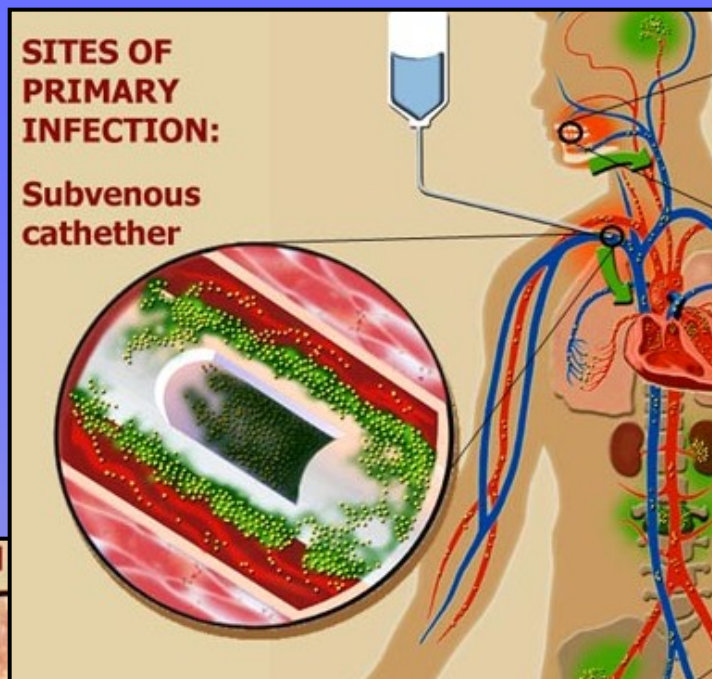
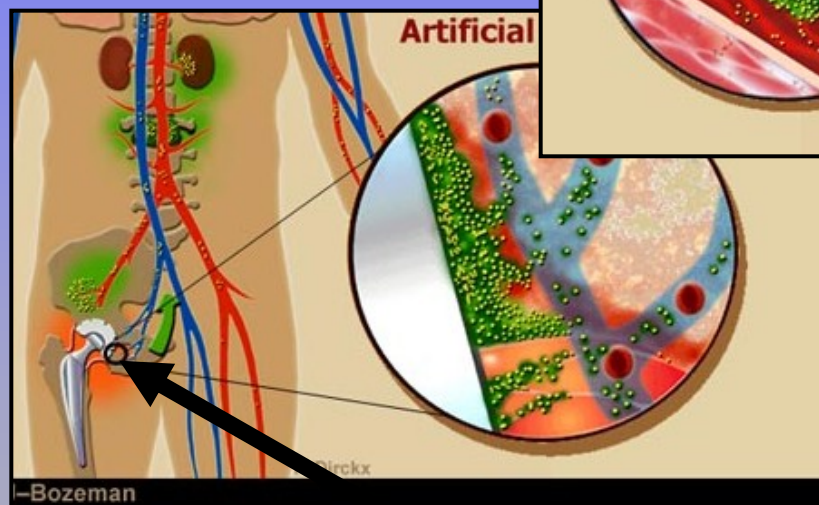


- Výsledek:
- Tvorba a spojování koagregátů
uvnitř 1 rodu a mezi různými rody
- Dělení v mikrokolonii koagregátu
- Pomnožené kultury, promyté v a kultivované v koagregačním pufri:
1 mM Tris [pH 8,0]
0,1 mM CaCl_2
0,1 mM MgCl_2
150 mM NaCl
0,02% NaN_3

Biofilm a medicína

Cévkky – arteriální, žilní
Močové katetry
Dýchací a dializační přístroje
Umělé chlopně
Kontaktní čočky
Děložní tělísko

Bakterie jsou unášeny proudem krve a mohou začít infekční proces na odlehlem místě....



Vytrvalá syntéza a uvolňování toxinů...

Nemusí být kontakt s vnějškem! - kovové náhrady kloubů

Stafylokoky – fibronektin-binding protein..

pseudomonády, *E. coli*, streptokoky, aktinomycety...

• Lékařská mikrobiologie:

Pg bakterie biofilmu nelze testovat na rezistenci k antibiotikům – vykultivované bakterie jsou již planktonické = s jinými vlastnostmi!

Bakterie biofilmu až 1000x rezistentnější k ATB než planktonické buňky.

Experiment:

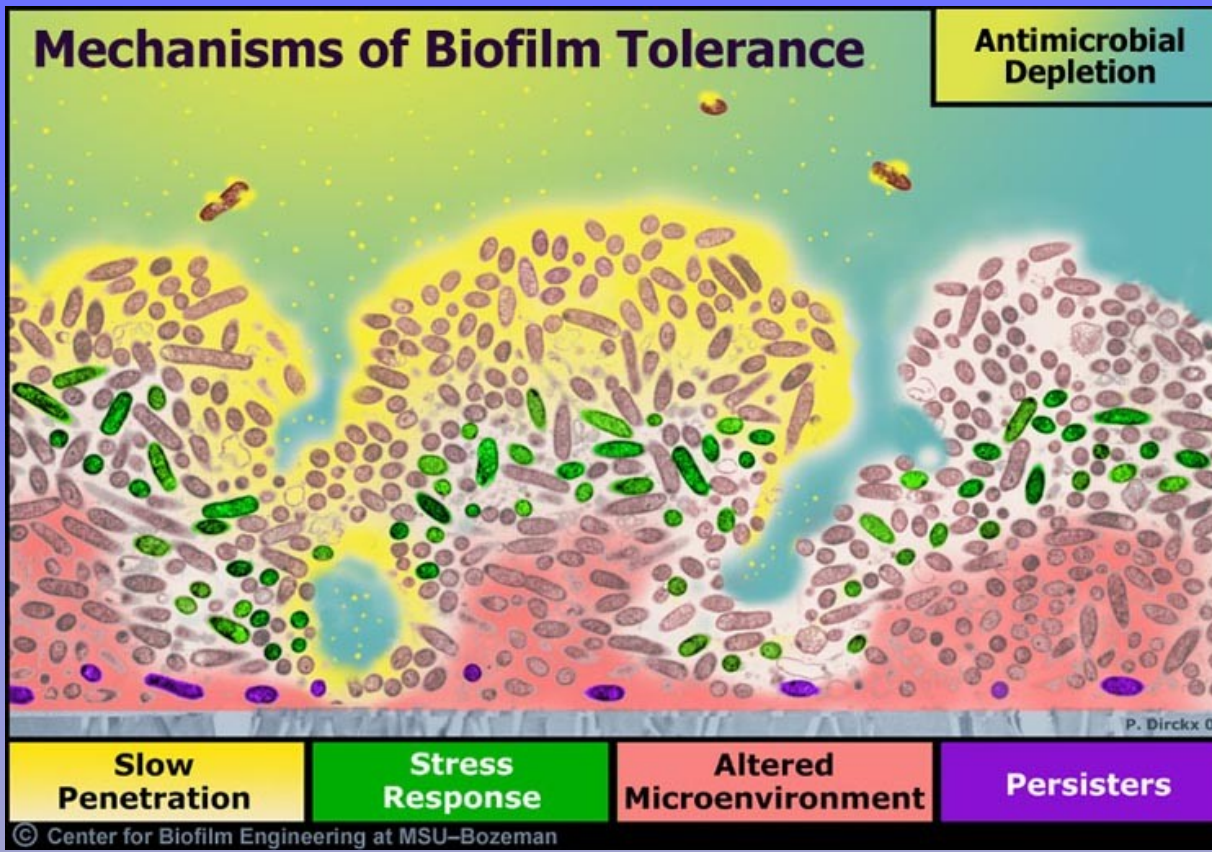
Byl vytvořen umělý biofilm

- Některá ATB vyvázána **polysacharidem**
- vylučování ATB pumpou **nebylo** zesíleno
- buňky možná v klidovém stavu a ATB působí jen na buňky rostoucí
- rezistence je jednou z fenotypových změn, vzniká po aktivaci regulačních genů určité části buněk

Např. u *P. aeruginosa* nalezen cyklický **glukan** (polymer glukózy) vyvazující ATB i *in vitro*, vně i uvnitř buňky.

Rezistence souvisí s množstvím změn při přechodu do společenství biofilmu.

Možné vysvětlení: snaha pseudomonád bránit se ATB streptomycet v prostředí právě tvorbou biofilmu.



Terapie biofilmů

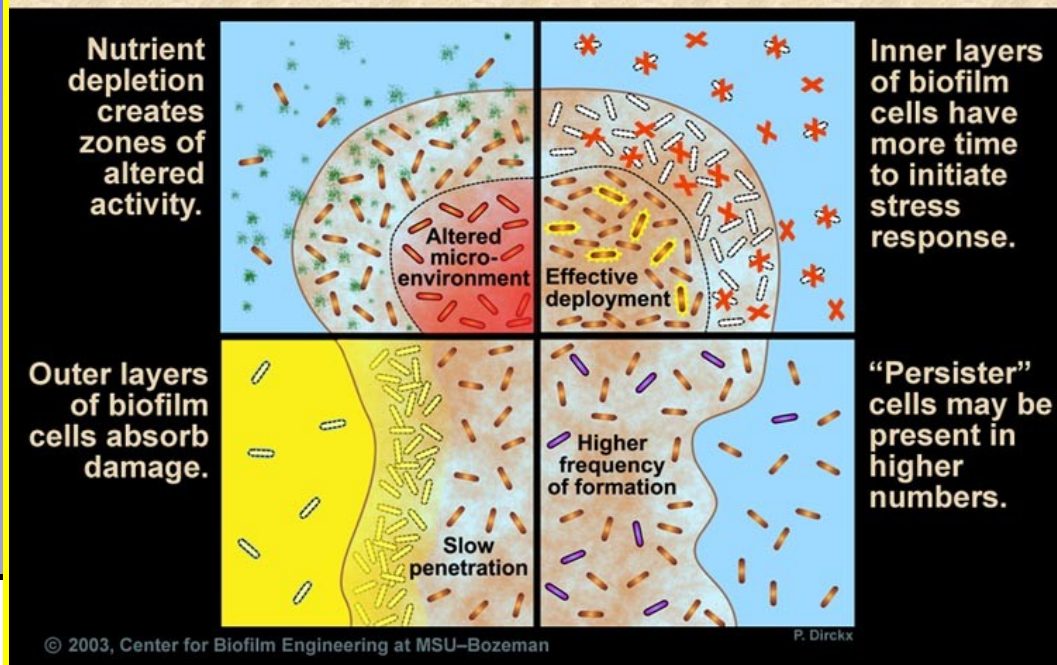
Studium mutací genů *gsc* = studium narušení formování biofilmu
 – poté přístupnější ATB a dezinfekci

Návrhy: aplikace ATB v **intervalech**; současné působení **ultrazvuku** a ATB,
kombinace ATB a el. pole..

Nevýhody přisedých stadií

- sedimentace, vyčerpání živin a neschopnost kolonizovat nové, vhodnější prostředí
- konzumace substrátu (částic) zooplanktonem
- vznik gradientů – živiny, kyslík

Biofilm multicellularity results in better bacterial defenses

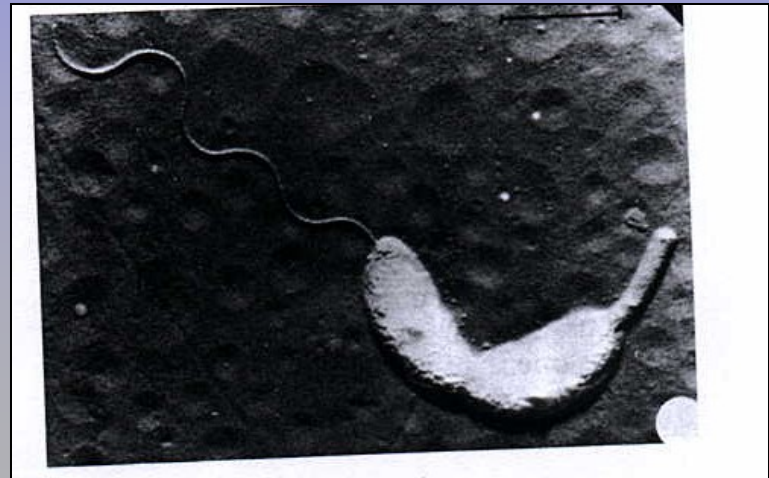
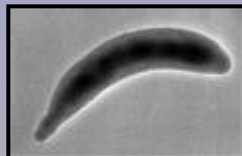


Výhody přisedých stadií

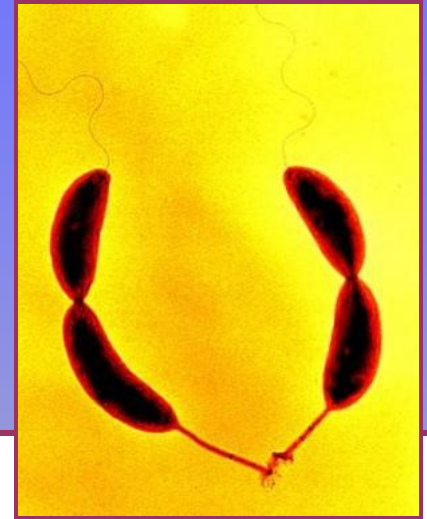
- lepší dostupnost a využitelnost substrátu
- ◆ adsorpce makromolekul a malých hydrofobních molekul na povrch
- ◆ lepší využitelnost koncentrovaných živin
- ochrana před inhibičními účinky antibakteriálních látek (antibiotika, chlor, těžké kovy)
- ochrana před bakteriofágy a parazitickými bakteriemi

Přisedlé bakterie

- pučení – pupen je syntetizován de novo, včetně buněčné stěny
- stélka – neživá struktura vylučovaná buňkou a rostoucí z buňky
- prostéka – prodloužení buňky, obsahuje plazmatickou membránu a buněčnou stěnu
- ◆ u kaulobakterů může být až 10x delší než buňka

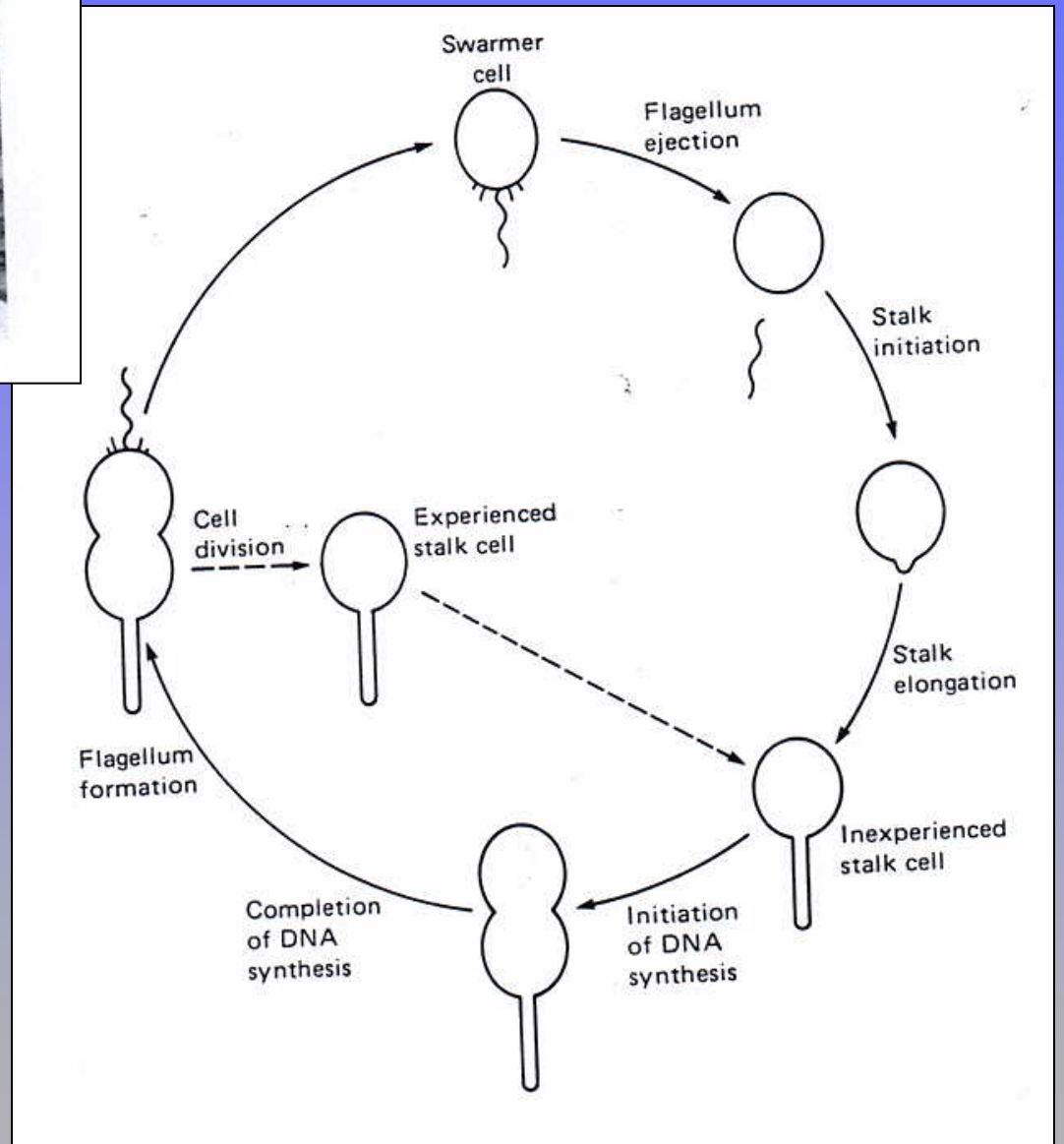
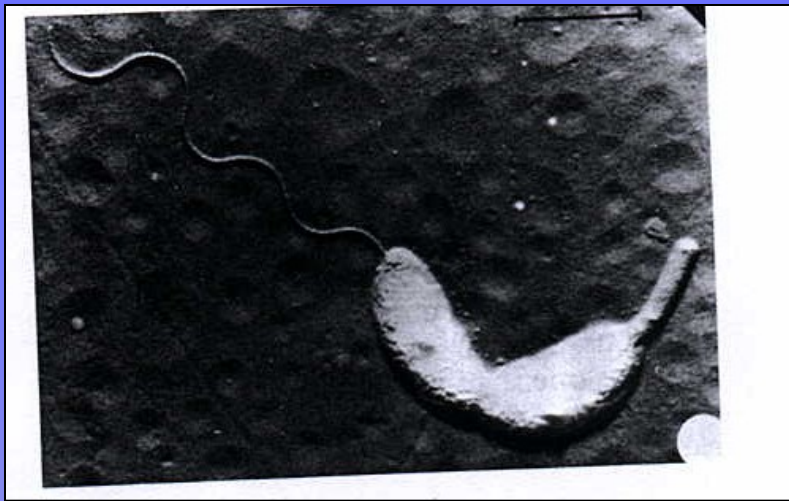


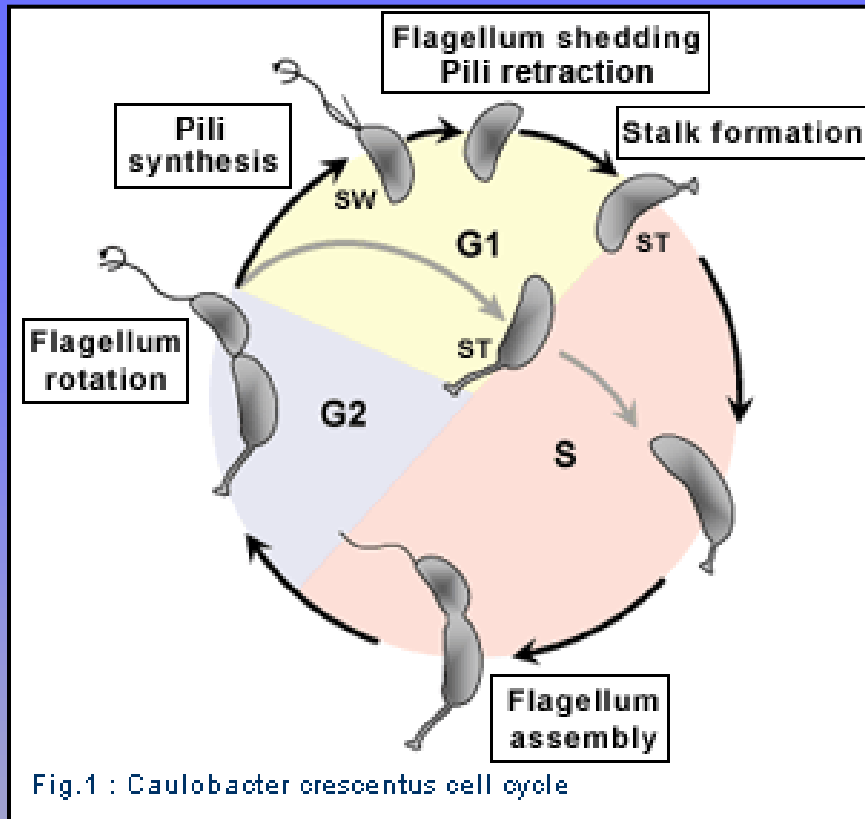
Růstový cyklus *Caulobacter crescentus*



Stádia růstového cyklu

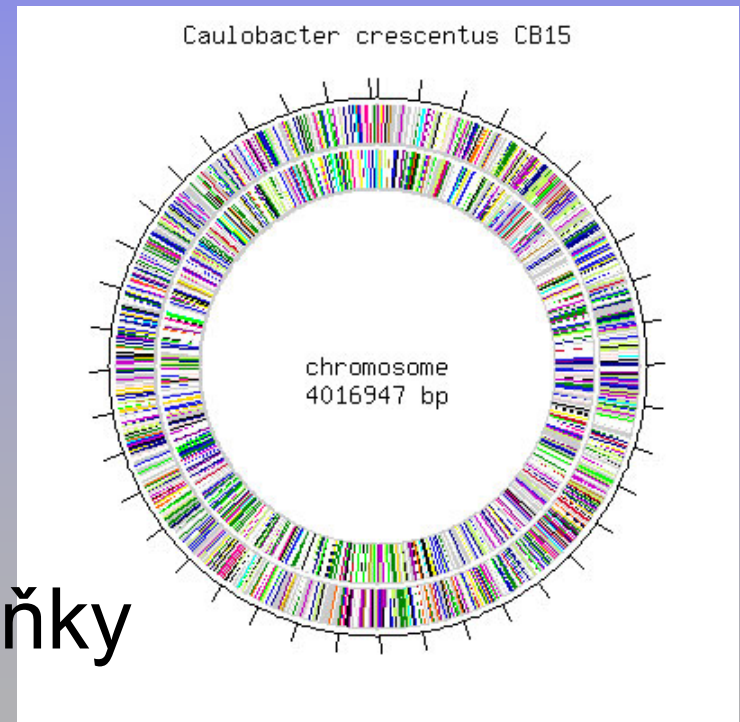
- 1. bičíkaté, volné stádium (swarmer cell) – nerostoucí, nepodléhá dělení
 - ◆ bičíkatá dceřinná buňka
- 2. stélkaté přisedlé stádium – reprodukční
 - ◆ „nezkušená buňka“ – ještě se nedělila (inexperienced cell)
 - ◆ „zkušená buňka“ – již „vyprodukovala“ dceřinnou pohyblivou buňku





- **Životní cyklus** závisí na jednotlivých krocích buněčné diferenciacce a asymetrického dělení
- 3 700 genů

- Každé buněčné dělení je asymetrické – vznikají dvě morfologicky odlišné buňky



Plovoucí bičíkatá buňka se **nereplikuje**

Pro replikaci buňky nutné
**přisednutí na místo s vhodným
substrátem a diferenciaci**
ve stélkatou buňku.
Poté **iniciace replikace DNA.**



Během proměny dochází k odhození a
nahrazení bičíku a pilusů **polární stélkou, která přichytí
buňku k podkladu**

Nezralá stélkatá buňka se **prodlužuje**

Reproduktivní stélkatá buňka replikuje DNA, vznik dceřinné buňky,
syntéza **nového bičíku** na pólu proti stélce.

Každá morfologická změna je kontrolována dokončením
specifických kroků buněčného cyklu – uzlové body.

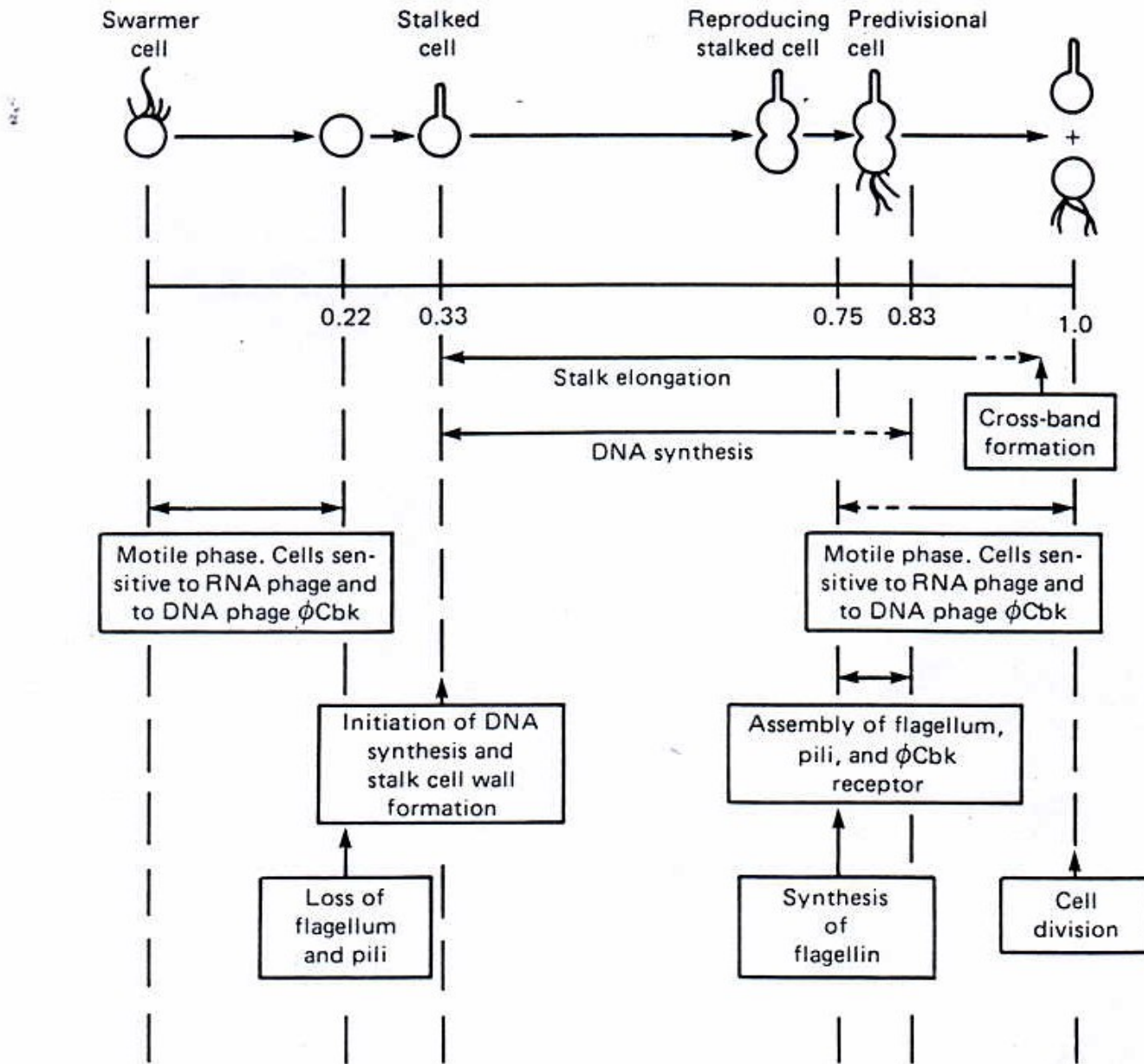
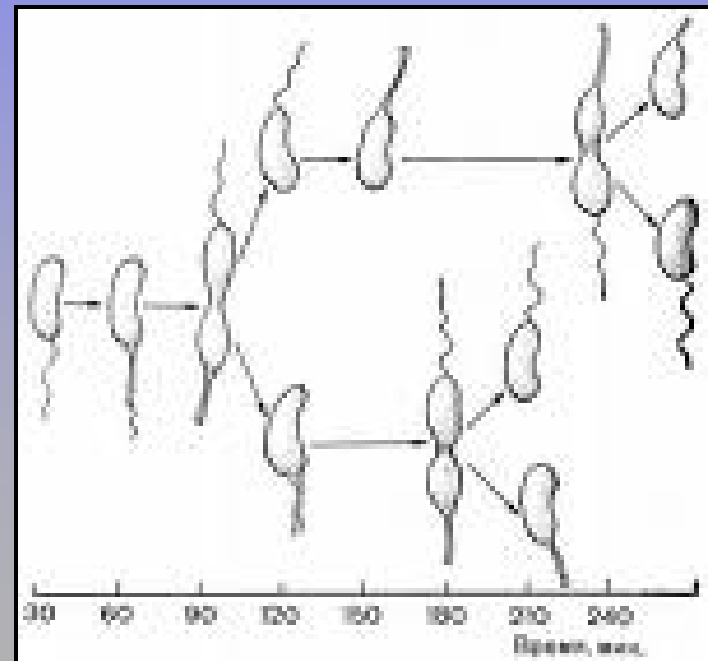
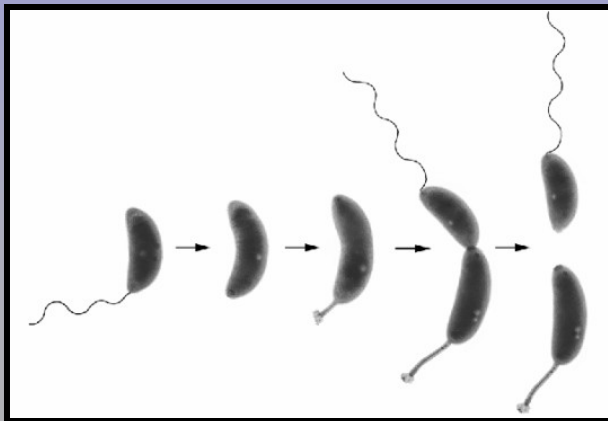


Fig. 13. Schematic diagram illustrating various developmental and biosynthetic events as a function of the cell cycle of *Caulobacter crescentus*. The numbers are fractions of a complete (1.0) cell cycle. (From Dworkin, 1985.)

- Chemotaxe hraje roli u adherovaných buněk
- *Caulobacter* – volné plovoucí buňky – není syntéza DNA, ani dělení, ale exprese

MCP – podobných receptorů – silná chemotaxe. Pohyb za signály, dokud nenarazí na povrch bohatý na substrát – osídlení a iniciace buněčného dělení.

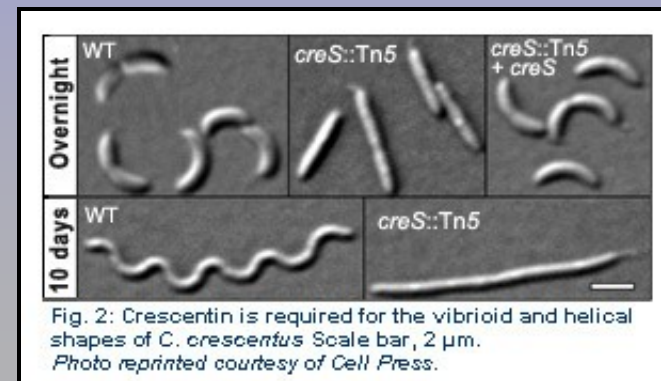


- Několik esenciálních transdukčních proteinů mění v průběhu cyklu buněk *Caulobacter* svou vnitrobuněčnou lokaci



Asymetrické umístění regulátorů cyklu –
= regulační systém přenosu sinálů

- Strukturální analogy aktinu (MreB)
 - předurčení tvaru buněk *C. crescentus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*
- Protein buněčného dělení: FtsZ, je protipólem tubulinu (bakterie tedy vlastní struktury vláknitého cytoskeletu)
- Crescentin – podobný intermediálním filamentům – helixy a zakřivení *Caulobacter* – asymetrické samouspořádávání molekuly – tvar b.



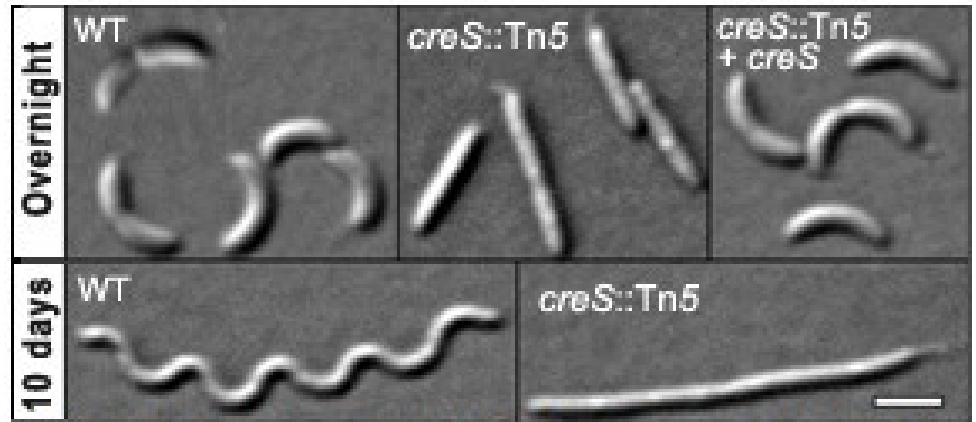


Fig. 2: Crescentin is required for the vibrioid and helical shapes of *C. crescentus*. Scale bar, 2 μ m.
Photo reprinted courtesy of Cell Press.

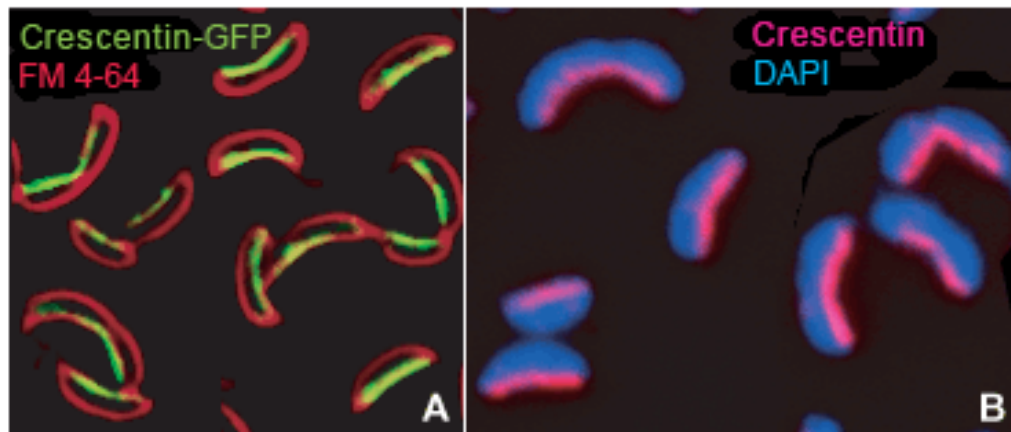


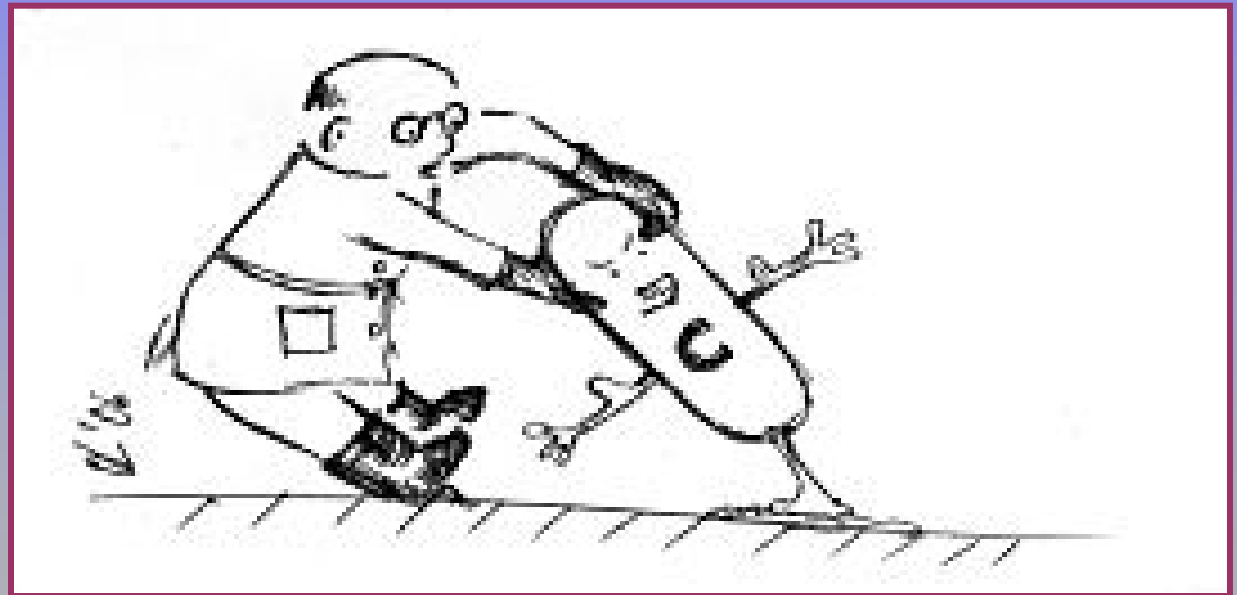
Fig. 3: Crescentin colocalizes with the inner cell curvature near the membrane. (A) Overlay between crescentin-GFP (green) and the membrane dye FM4-64 (red) in live merodiploid *creS-gfp creS* cells. (B) Immunofluorescence overlay between crescentin (red) and DAPI (blue) stainings.
Photo reprinted courtesy of Cell Press.



Zvláštnosti růstového cyklu

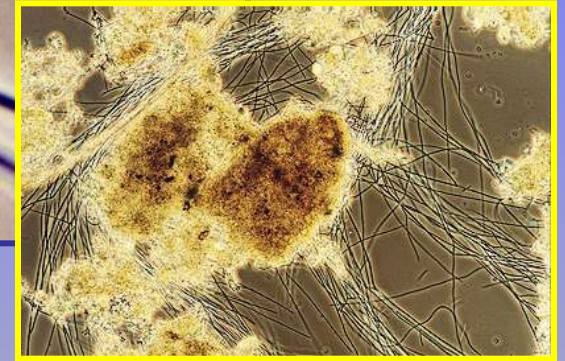
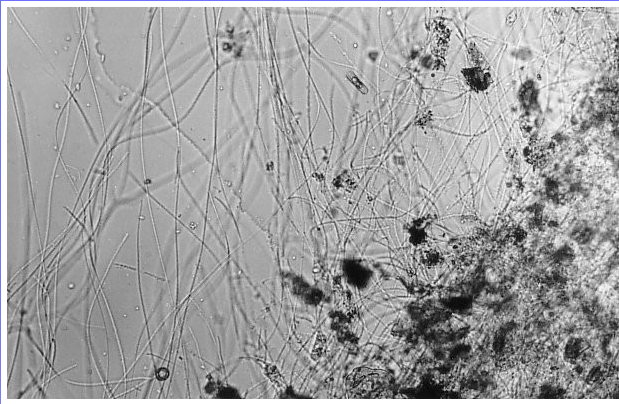
- růstová stádia se nutně střídají, žádné není alternativou, která se nemusí realizovat (viz klidová stádia)
- mateřská buňka je v jistém slova smyslu „nesmrtelnou buňkou“, která produkuje velké množství dceřinných buněk (na rozdíl od konvenčního dělení, kde nelze striktně odlišit mateřskou a dceřinnou buňku)

- *Caulobacter crescentus* je modelovým organismem pro studium diferenciaci u prokaryot
- velmi intenzivně studován
- genom

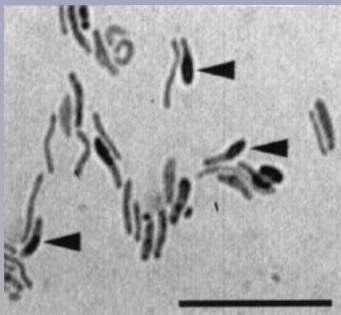


Sphaerotilus natans

G- tyčky, medium 12

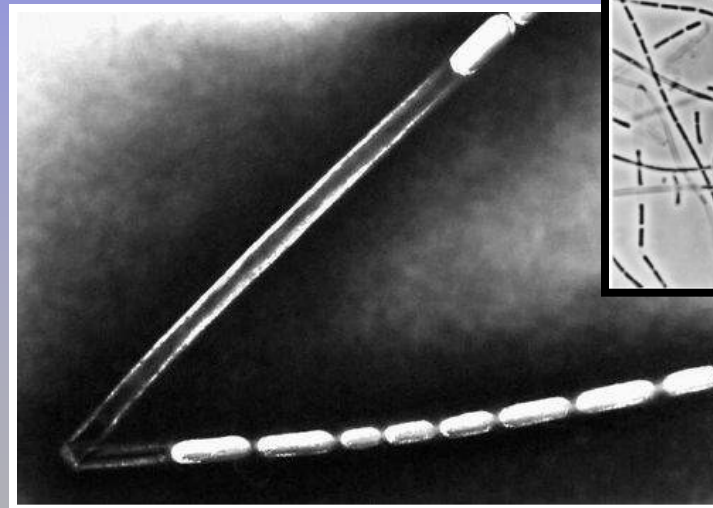
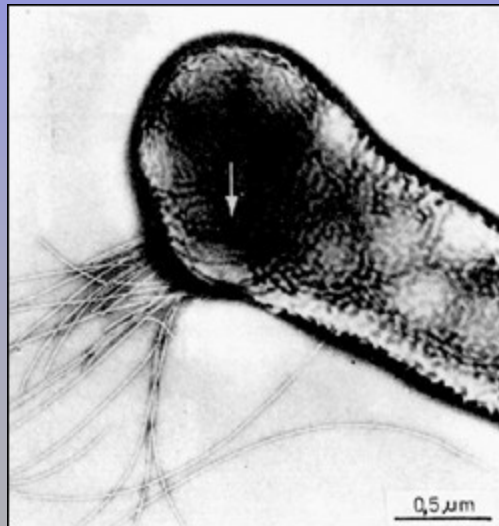


- Tekoucí vody
- Papírenské vody
- Kaly
- Aktivované kaly
 - problém sedimentace
- Degradace pochev – *Bacillus* - enzym



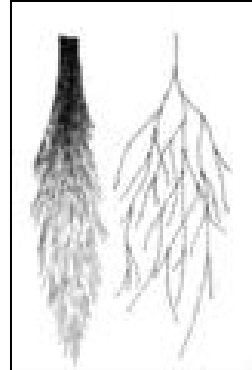
Životní cyklus *Sphaerotilus natans*

- není zdaleka tak podrobně prozkoumán, jako životní cyklus rodu *Caulobacter*
- střídání přisedlé a volné životní formy
- volné buňky – bičíkaté, pohyblivé G-tyčky
- přisedlé stadium – vláknitá pochva, která uzavírá tyčkovité nepohyblivé buňky a je jedním koncem (stopka, holdfast) přichycena k pevnému podkladu



Sphaerotilus natans

- volné buňky najdou vhodné životní prostředí
- přichytí se k podkladu
- odhodí bičík
- začnou tvořit pochvu
- dělí se uvnitř pochvy
- z pochvy se uvolňují dceřinné pohyblivé buňky



- V prostředí s nízkou koncentrací kyslíku
- Dokáže využít široké zdroje org.látek: polysacharidy, polyalkoholy, org.kyseliny

Pochva

- trubicovitý útvar, který se nikdy nedotýká buněk, často uzavřená
- může obsahovat oxidy železa nebo manganu
- funkce – přichycení k pevným povrchům a zachycování živin pro buňky, ochrana proti predátorům (prvoci, *Bdelovibrio*)

Výskyt

- Sphaerotilus*
- ◆v pomale tekoucích vodách znečištěných odpadem
- ◆na čističkách – problematický vláknitý organismus

Sphaerotilus natans

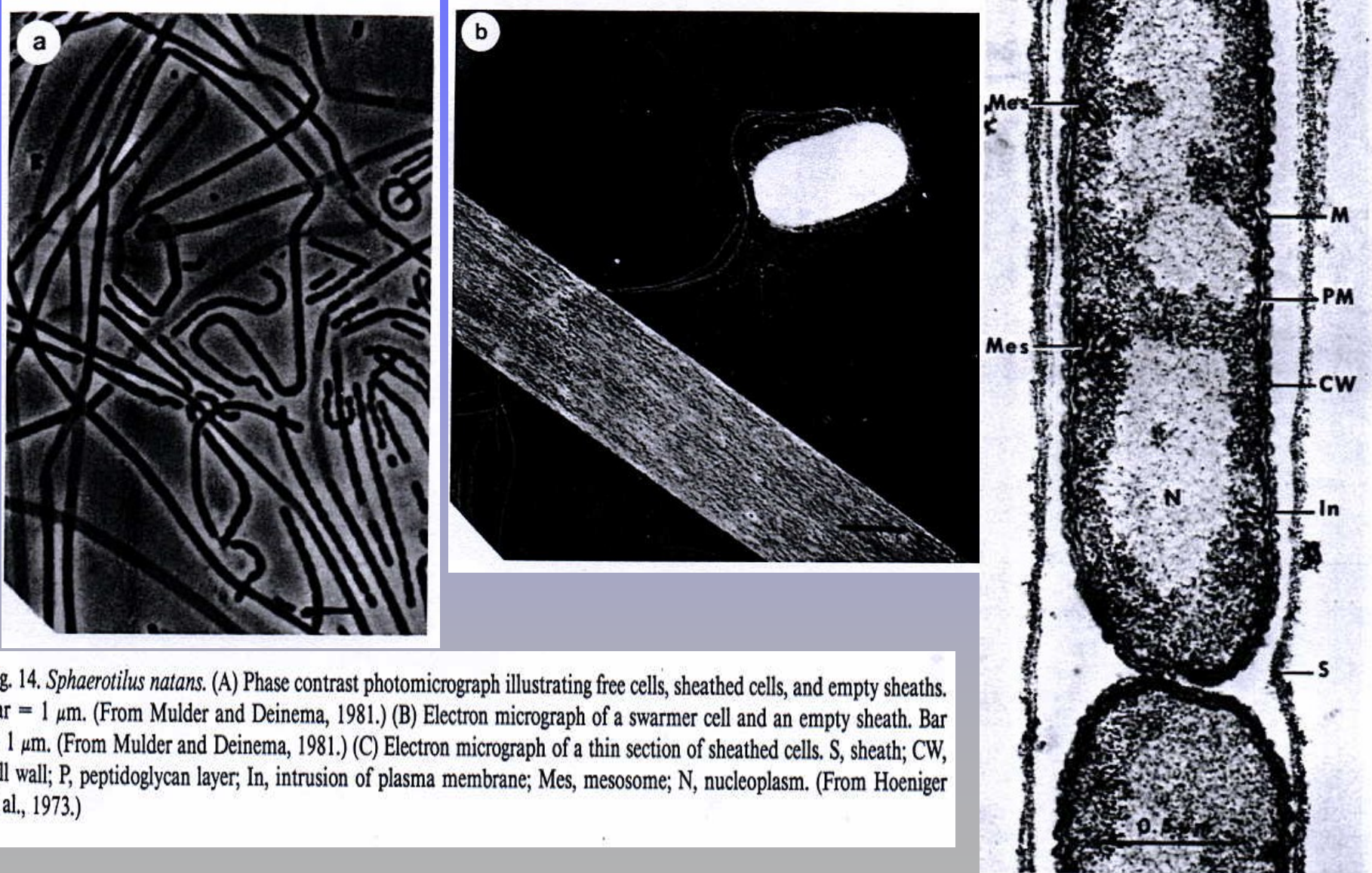
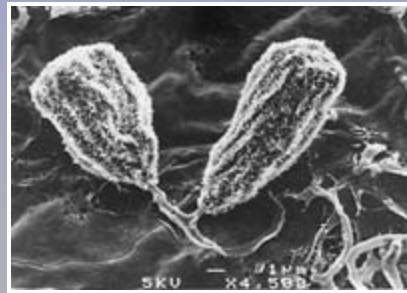
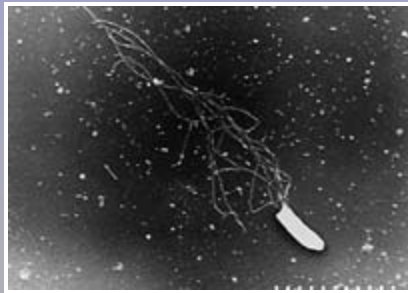
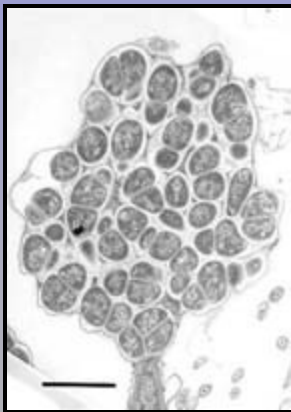


Fig. 14. *Sphaerotilus natans*. (A) Phase contrast photomicrograph illustrating free cells, sheathed cells, and empty sheaths. Bar = 1 μm . (From Mulder and Deinema, 1981.) (B) Electron micrograph of a swarmer cell and an empty sheath. Bar = 1 μm . (From Mulder and Deinema, 1981.) (C) Electron micrograph of a thin section of sheathed cells. S, sheath; CW, cell wall; P, peptidoglycan layer; In, intrusion of plasma membrane; Mes, mesosome; N, nucleoplasm. (From Hoeniger et al., 1973.)

Střídání volného a přisedlého stadia u *Actinoplanes* a příbuzných rodů

- přisedlé stadium – vegetativní mycelium, množící se
- volné stadium – bičíkaté spory, které se tvoří ve sporangiu (zoospory)
- *Actinoplanes* – patří mezi aktinomycety, kromě těchto 2 stadií se uplatňuje komplexní růstový cyklus



- Sporangium: 10 μm
- Zoospory v řetězcích nebo ve dvojicích
- Uvolněné z mycelia dlouho přežívají

Micromonosporaceae, Actinoplanes sp.

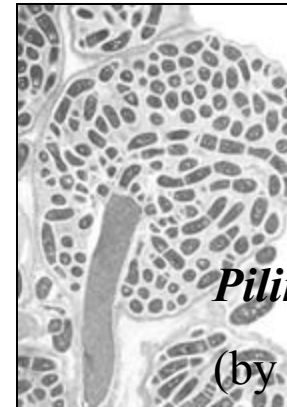
Pilimelia

- vlasy, chlupy, kůže hadů
- není známa jako dermatofyt
- běžně v půdě



Výskyt

- půda a spadané listí
- rostlinný a živočišný odpad
- jezera, rybníky, řeky
- primárně prostředí se střídavým vysycháním
- rozšířeny celosvětově – tropy, pouště ...



Pilimelia columellifera

(by G. Vobis)

Příbuzný rod s *Actinoplanes*
Sporangia s typickými řetízky spor

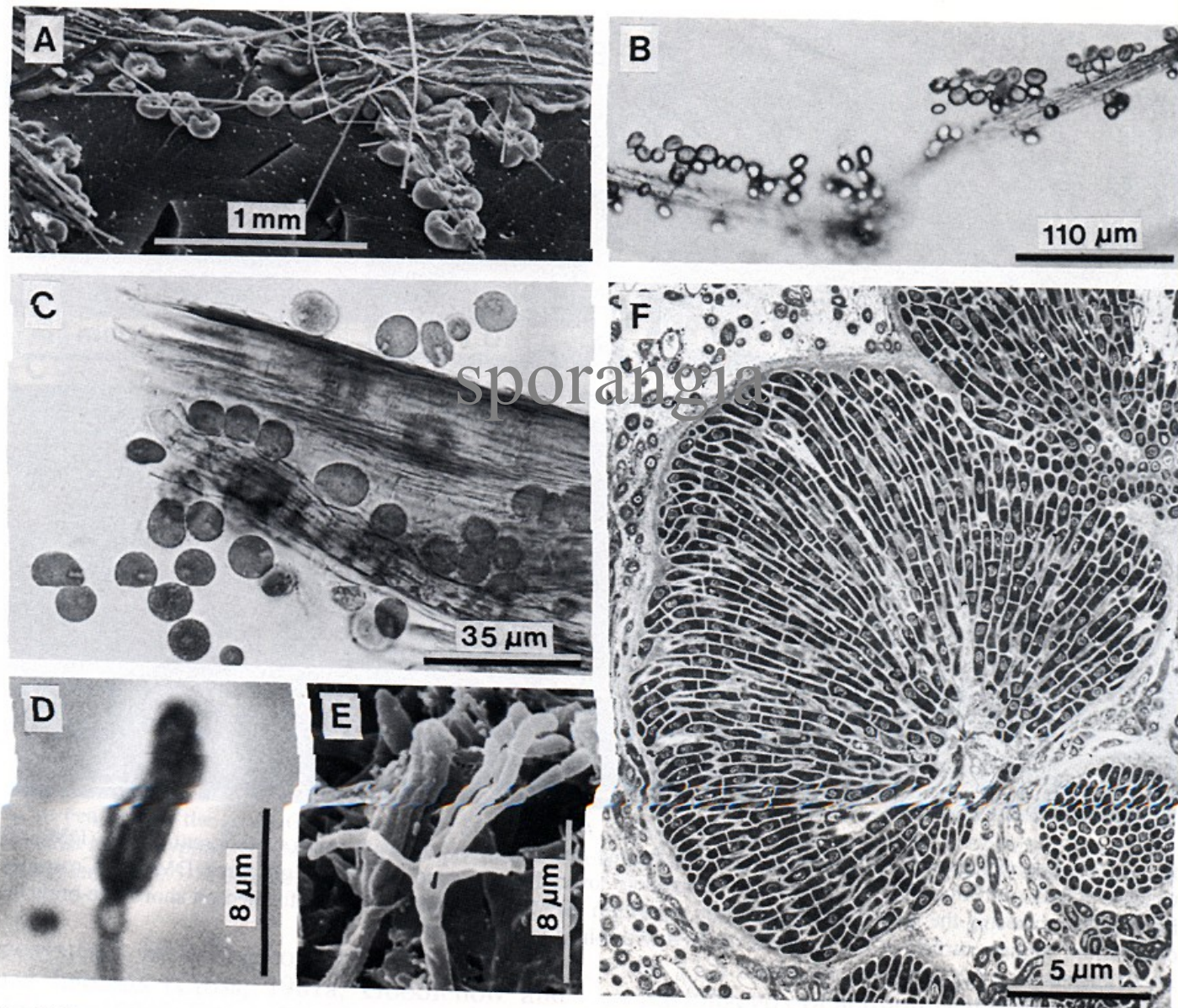


Fig. 7. Features of the genus *Pilimelia*. (A) Compact, small colonies on agar medium; hairs added as natural substrate (SEM). (B) Bundles of sporangia formed on hair (LM). (C) Globose to pyriform sporangia with internal columella; structure of the colonized part of the hair was destroyed (LM). (D) Cylindrical sporangium with an annulus at the base (PHACO). (E) Penicillate conidiophore with bacilliform conidia; the sporangium behind it has parallel-arranged sporogenous hyphae (SEM). (F) Section of a campanulate sporangium with branched spore chains (TEM). (C and D from Vobis et al., 1986; E from Vobis, 1987; F from Vobis, 1984; with permission.)

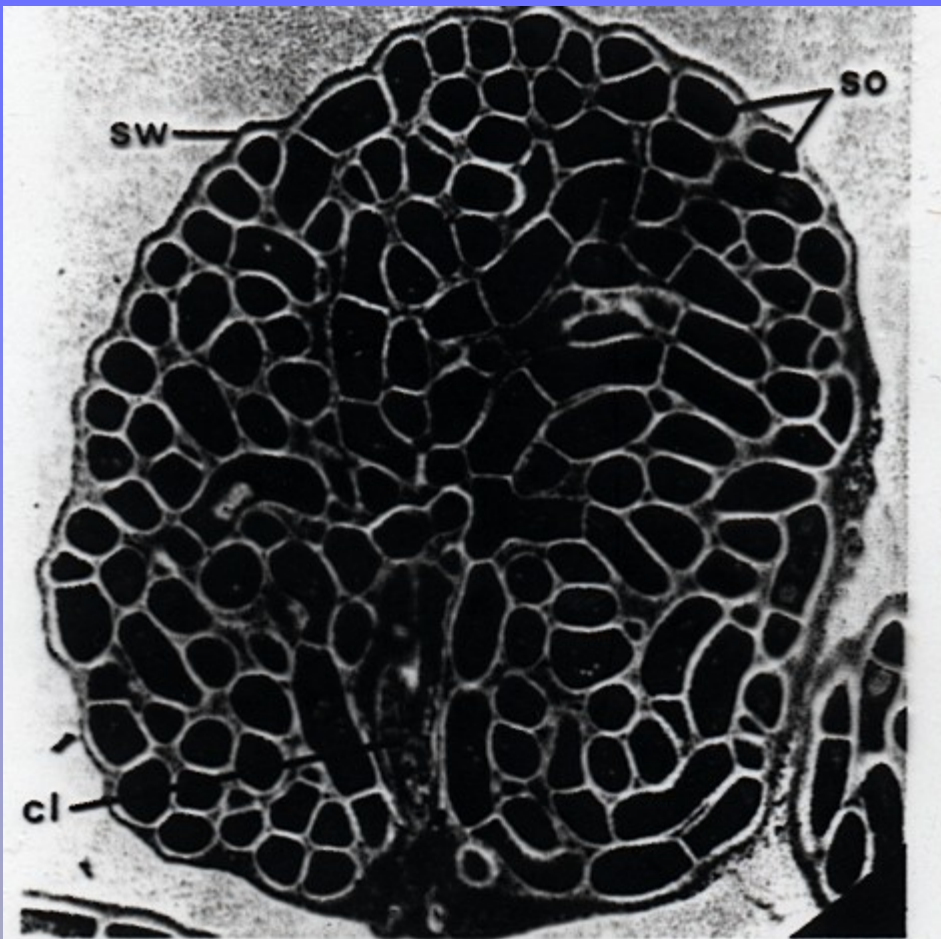


Fig. 18. Electron micrograph of a thin section of a sporangium of the actinoplanete genus *Pilimelia*, illustrating the arrangement of the spore chains. sw, sporangiial wall; cl, columella; sp, spore. (From Vobis, 1984.)

Zdroje:

Schindler J. (2008): Ze života bakterií, ACADEMIA, Praha

- www.yale.edu/jacobswagner/research.htm
- <http://www.sciencedaily.com/releases/2006/04/060411222211.htm>
- biology.kenyon.edu/.../Chap11/Chapter_11A.html
- <http://www.pnas.org/cgi/content/full/97/16/8789>

- http://www.hypertextbookshop.com/biofilmbook/v005/r001/Contents/02_Lab_Exercise_s/03_Applications/01_Instructor_Version/06_Bacteria_in_Dental_Biofilms.html
- <http://www.sanedentist.com/>

Návody pro cvičení

- Biofilm:

http://www.hypertextbookshop.com/biofilmbok/v005/r001/Contents/02_Lab_Exercises/03_Applications/01_Instructor_Version/06_Bacteria_in_Dental_Biofilms.html

http://www.hypertextbookshop.com/biofilmbok/v005/r001/Contents/02_Lab_Exercises/02_Protocols_and_Methods/01_Instructor_Version/01_Buried_Slide_Technique.html

- http://www.hypertextbookshop.com/biofilmbook/v005/r001/Contents/02_Lab_Exercises/00_Lab_Overview/01_Lab_Exercises_Overview.html

Děkuji za pozornost