

MIKROBIOLOGIE

Mgr. Šárka Bidmanová, Ph.D.

Loschmidtovy laboratoře, Ústav experimentální biologie

Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita

77580@mail.muni.cz

MIKROBIOLOGIE

1. Úvod do studia mikrobiologie
2. Archea
3. Bakterie
4. Fyziologie růstu bakteriální populace
5. Výživa a metabolismus bakterií
6. Metabolismus bakterií I
7. Metabolismus bakterií II
8. Genetika bakterií
9. Nejvýznamnější zástupci bakterií a jejich význam
10. Sinice
11. Kvasinky
12. *Vláknité houby*
13. Viry a priony

MIKROBIOLOGIE

Opakování – mikroskopické vláknité houby

- Vláknité houby jsou vícebuněčné organismy s prokaryotickou buňkou.
 - Správně
 - Špatně
- Buněčná stěna vláknitých hub je tvořena především z peptidoglykanu.
 - Správně
 - Špatně
- Jádro buňky vláknitých hub je relativně malé s jedním kruhovitým chromosomem.
 - Správně
 - Špatně
- Tělo vláknitých hub je tvořeno z hyf, které tvoří mycelium.
 - Správně
 - Špatně
- U vláknitých hub s pigmenty probíhá fotosyntéza rostlinného typu.
 - Správně
 - Špatně

MIKROBIOLOGIE

Opakování – mikroskopické vláknité houby

- Vlákňité houby se rozmnožují pouze pohlavně.
 - Správně
 - Špatně
- Sporangiospory jsou spory vznikající uvnitř sporangia.
 - Správně
 - Špatně
- Zygospory se vytváří pohlavním procesem u rodů *Penicillium* a *Aspergillus*.
 - Správně
 - Špatně
- K výrobě sýrů se využívají vláknité houby rodu *Penicillium*.
 - Správně
 - Špatně
- Mykotoxiny jako produkty primárního metabolismu vláknitých hub způsobují onemocnění a otravy člověka.
 - Správně
 - Špatně

MIKROBIOLOGIE

1. Úvod do studia mikrobiologie
2. Archea
3. Bakterie
4. Fyziologie růstu bakteriální populace
5. Výživa a metabolismus bakterií
6. Metabolismus bakterií I
7. Metabolismus bakterií II
8. Genetika bakterií
9. Nejvýznamnější zástupci bakterií a jejich význam
10. Sinice
11. Kvasinky
12. Vlákňité houby
13. Viry a priony

MIKROBIOLOGIE

Viry

- Nebuněčné živé soustavy
- Intracelulární parazité na molekulární úrovni – využívají translační systém hostitele
- Vně hostitelské buňky – metabolicky inertní
- Nemají žádné organely
- Reprodukce virů – syntéza jednotlivých složek
- Zralé virové částice – jen DNA nebo RNA



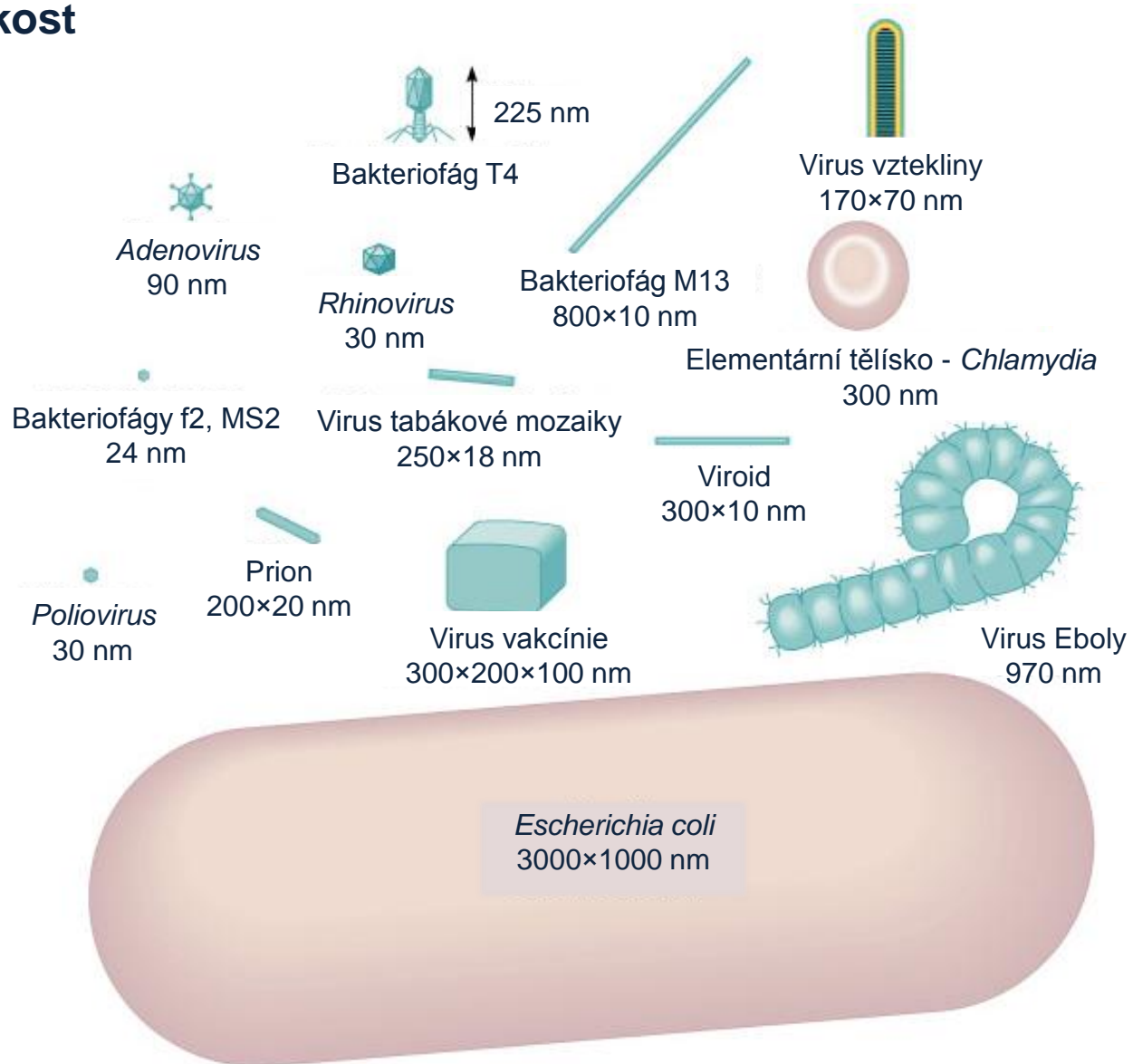
MIKROBIOLOGIE

Viry

- Původ
 - Bakterie, které ztratily organely
 - Část buněčného genomu, která získala schopnost se samostatně replikovat
- Dělení dle hostitele
 - Živočišné viry
 - Rostlinné viry
 - Viry hub
 - Bakteriální viry - bakteriofágy
 - Adaptace na hostitele, střídání hostitelů

MIKROBIOLOGIE

Viry – velikost



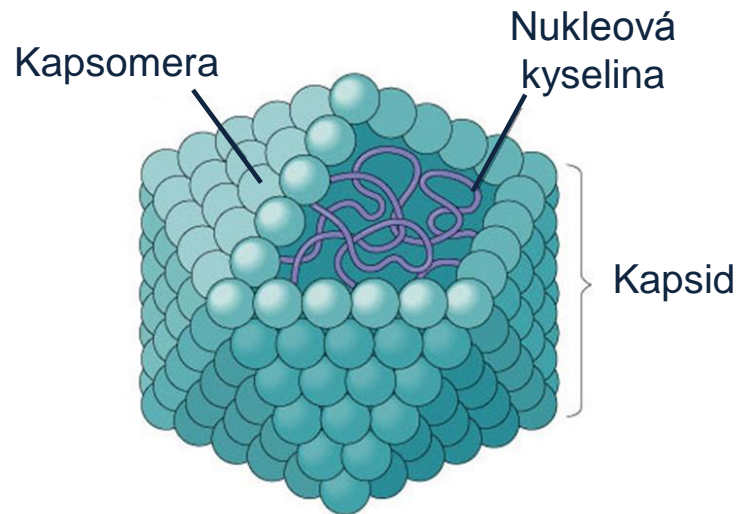
Viry – struktura a chemické složení

- Virion = virová částice
 - Jednotlivá částice viru schopná infikovat hostitelskou buňku a množit se v ní
 - Stavba – nukleová kyselina, kapsid a obal
- Chemické složení virionu
 - Nukleové kyseliny – obvykle jedna molekula DNA nebo RNA (nikdy obě!)
 - Proteiny – stavba kapsidu, enzymy – lysosym, RNA nebo DNA polymerasa, funkce ochranná, rozpoznávací, katalytická, regulační, antigenní
 - Lipidy – u obalených virů
 - Sacharidy – u obalených virů

MIKROBIOLOGIE

Viry – struktura

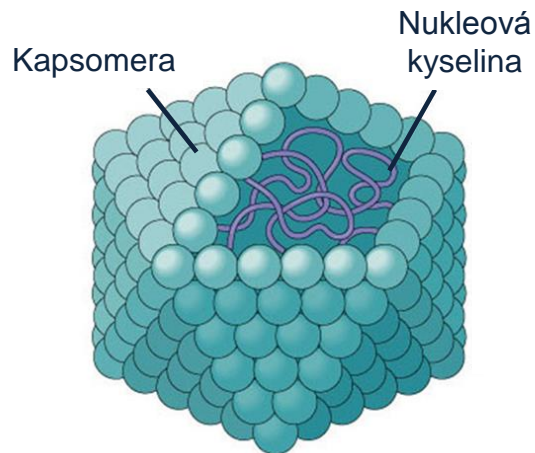
- Kapsid
 - Proteinový obal kolem nukleové kyseliny viru
 - Soubor proteinových makromolekul → kapsomera → kapsid
 - Nukleokapsid =



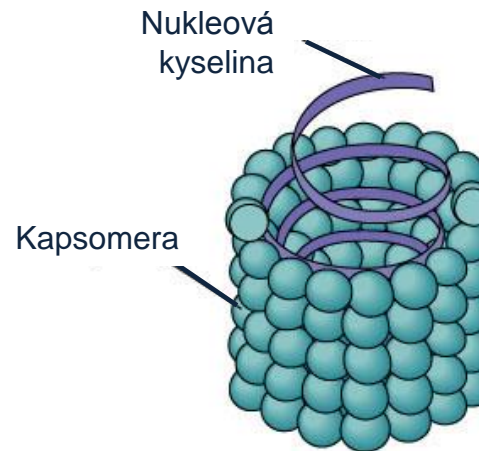
MIKROBIOLOGIE

Viry – kapsid

- Ikozaedrální symetrie kapsidu
 - U živočišných virů
 - Dvacetistěn, stěny kapsidu – rovnostranné trojúhelníky z 6 kapsomer
- Helikální symetrie kapsidu
 - U rostlinných virů
 - Sestavení kapsomerů šroubovicově do válcovitého kapsidu



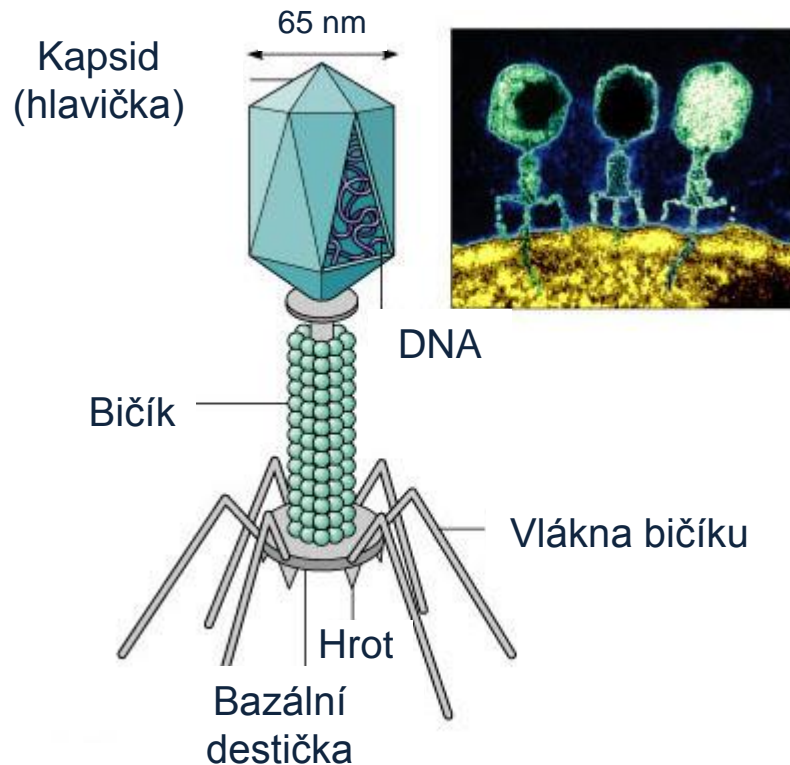
Ikozaedrální symetrie



Helikální symetrie

Viry – kapsid

- Binární symetrie kapsidu
 - Především bakteriofágy
 - Hlavička – ikozaedrální symetrie, obsahuje nukleovou kyselinu
 - Bičík – helikální symetrie, nikdy neslouží k aktivnímu pohybu



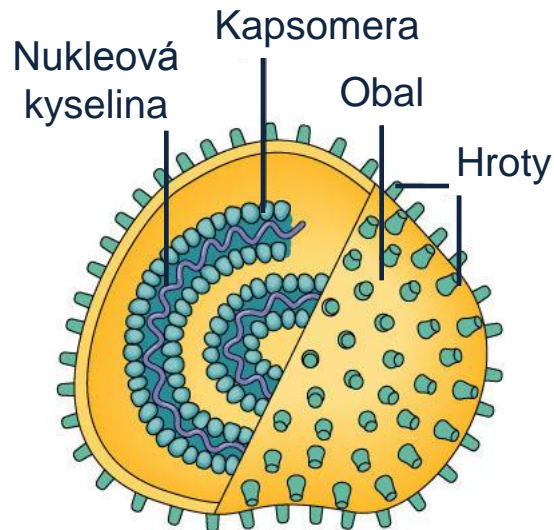
Viry - struktura

- Nukleová kyselina viru
 - Velikost genomu – 3-670 kbp
 - dsDNA – nebývá u rostlinných virů
 - ssDNA – živočišné viry – lineární, bakteriofágy – kružnicová
 - dsRNA – segmentace genomu, uložení ve společném kapsidu
 - ssRNA – častá segmentace genomu, u rostlinných virů segmenty v oddělených kapsidách
 - Rozdělení virů podle genomu – DNA viry, RNA viry, RNA-DNA viry (využívají DNA i RNA, ale v různých stádiích reprodukčního cyklu)

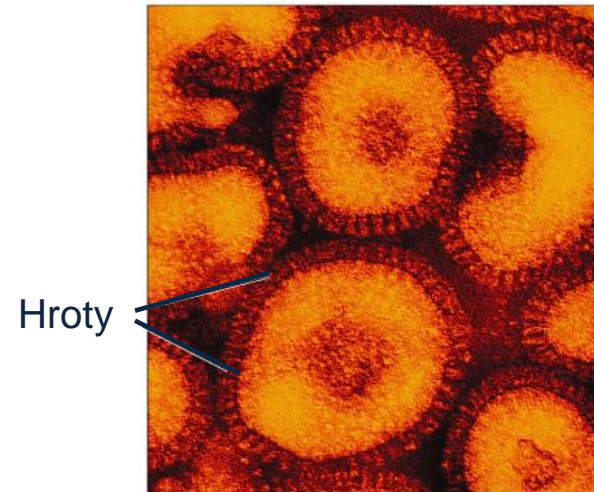


Viry - struktura

- Obal virů
 - Přítomen u větších virů, neobalené viry – chráněny pouze kapsidou
 - Vznik z membrány hostitelské buňky – fosfolipidová dvojvrstva s proteiny
 - Některé viry – hroty – z glykoproteinů, nápadné výčnělky
 - Některé viry – v obalu charakteristické proteiny – např. hemaglutinin, neuraminidasa



Obalený virus



Virus chřipky

Viry - reprodukce

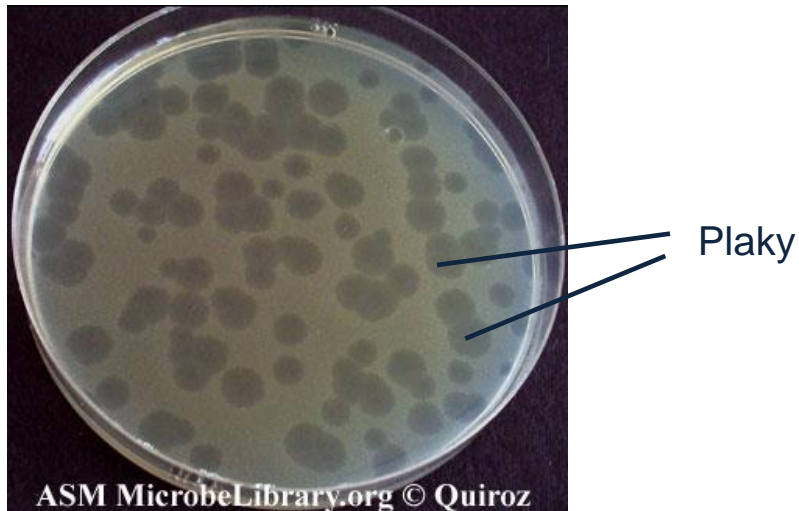
- Rozmnožování virů zcela závislé na hostitelské buňce
- Reprodukční cyklus
 - Vazba virionu na povrch buňky (adsorpce)
 - Proniknutí do buňky
 - Uvolnění nukleové kyseliny z kapsidu
 - Replikace virové nukleové kyseliny
 - Syntéza virových proteinů
 - Zrání (maturace) virionů
 - Uvolnění virionů z buňky



MIKROBIOLOGIE

Viry – metody studia

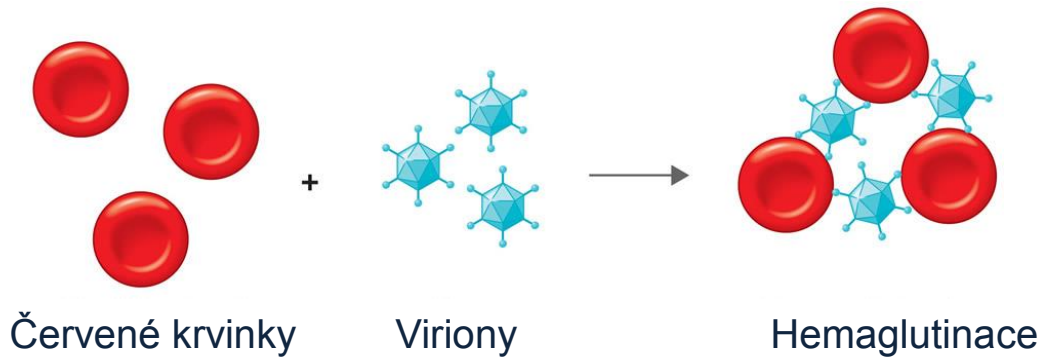
- Pro růst virů – nezbytné živé buňky
- Hostitelské buňky bakteriofágů – bakterie
- Kvantifikace virových částic
 - Přímé počítání virionů pod elektronovým mikroskopem
 - Plaková metoda – smíchání viru, bakterie a agaru, rozlití na kultivační misky a inkubace, virus lyzuje buňky – tvorba plaků



MIKROBIOLOGIE

Viry – metody studia

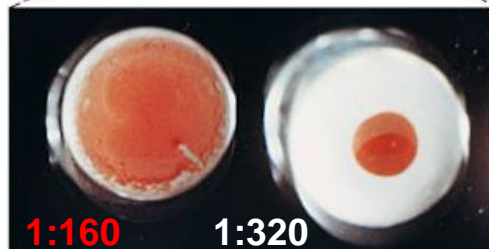
- Kvantifikace virových částic
 - Hemaglutinace – nepřímá metoda



1:20 1:40 1:80 1:160 1:320 1:640 Kontrola

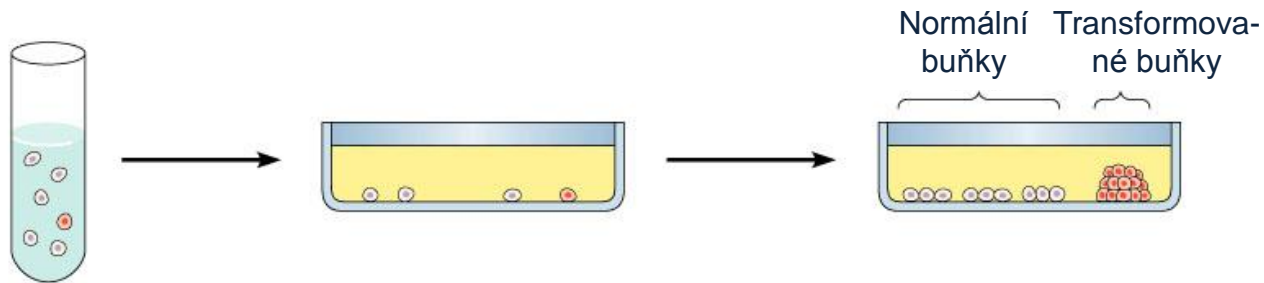


Jamky mikrotitrační destičky



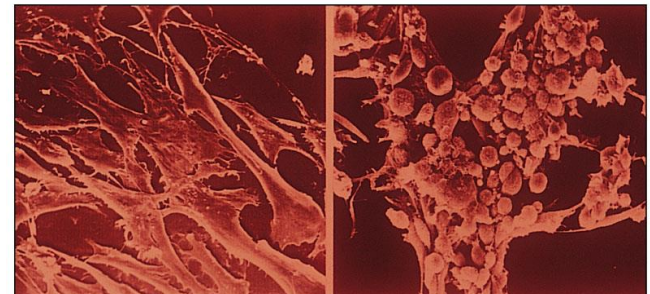
Viry – metody studia

- Kultivace živočišných virů
 - Metoda tkáňových kultur – buňky tvoří monovrstvu na povrchu kultivační nádoby – růst omezený počet generací nebo stále (nádorové buňky)



- Působení virů na hostitelskou buňku:
- Lyze buněk rostoucích v monovrstvě – tvorba plak
- Změna vzhledu buněk – cytopatický efekt
- Srážení červených krvinek interakcí s povrchem dvou buněk

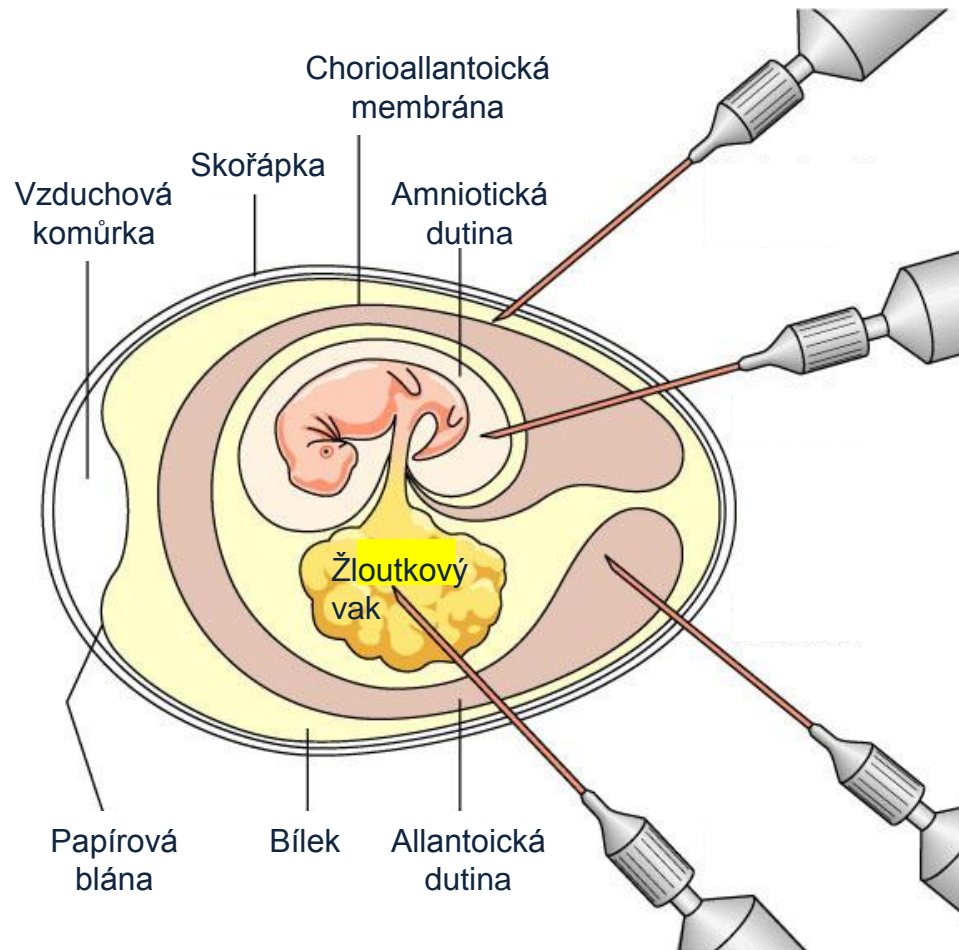
Cytopatický efekt



MIKROBIOLOGIE

Viry – metody studia

- Kultivace živočišných virů
 - Kuřecí embrya
 - Pokus na zvířeti



MIKROBIOLOGIE

Viry – vliv fyzikálních faktorů

- Sucho
 - Vysoušení virů při teplotě $> 0^{\circ}\text{C}$ – rychlá ztráta aktivity
 - Lyofilizace – zachování aktivity
- Teplota
 - Vliv na proteiny a nukleové kyseliny
 - 60°C po 30 min – pro většinu virů letální
- Ultrazvuk
 - Vysoká intenzita – inaktivace virů, dezintegrace kapsidu a uvolnění nukleové kyseliny
- Záření
 - Rentgenové a γ -záření – fragmentace nukleové kyseliny viru
 - UV záření – poškození nukleové kyseliny viru, tvorba dimerů thyminu

Viry – vliv chemických faktorů

- Dezinfekční látky
 - Fenol – denaturace proteinů, ztráta infekčnosti viru
 - Těžké kovy – sloučeniny rtuti – působení ve vyšších koncentracích
 - Oxidační činidla – H_2O_2 , $KMnO_4$, halogeny – inaktivace viru poškozením proteinů
 - Plyny – formaldehyd, β -propiolakton – inaktivace virů bez poškození antigenů – výroba vakcín
 - Povrchově aktivní látky – působí obnažení nukleové kyseliny viru
 - Organická rozpouštědla – koagulace proteinů, rozpouštění lipidů – diagnostika
- Protivirová chemoterapeutika – strukturní analogy virových nukleových kyselin a proteinů
 - Interferon a nukleosidové analogy

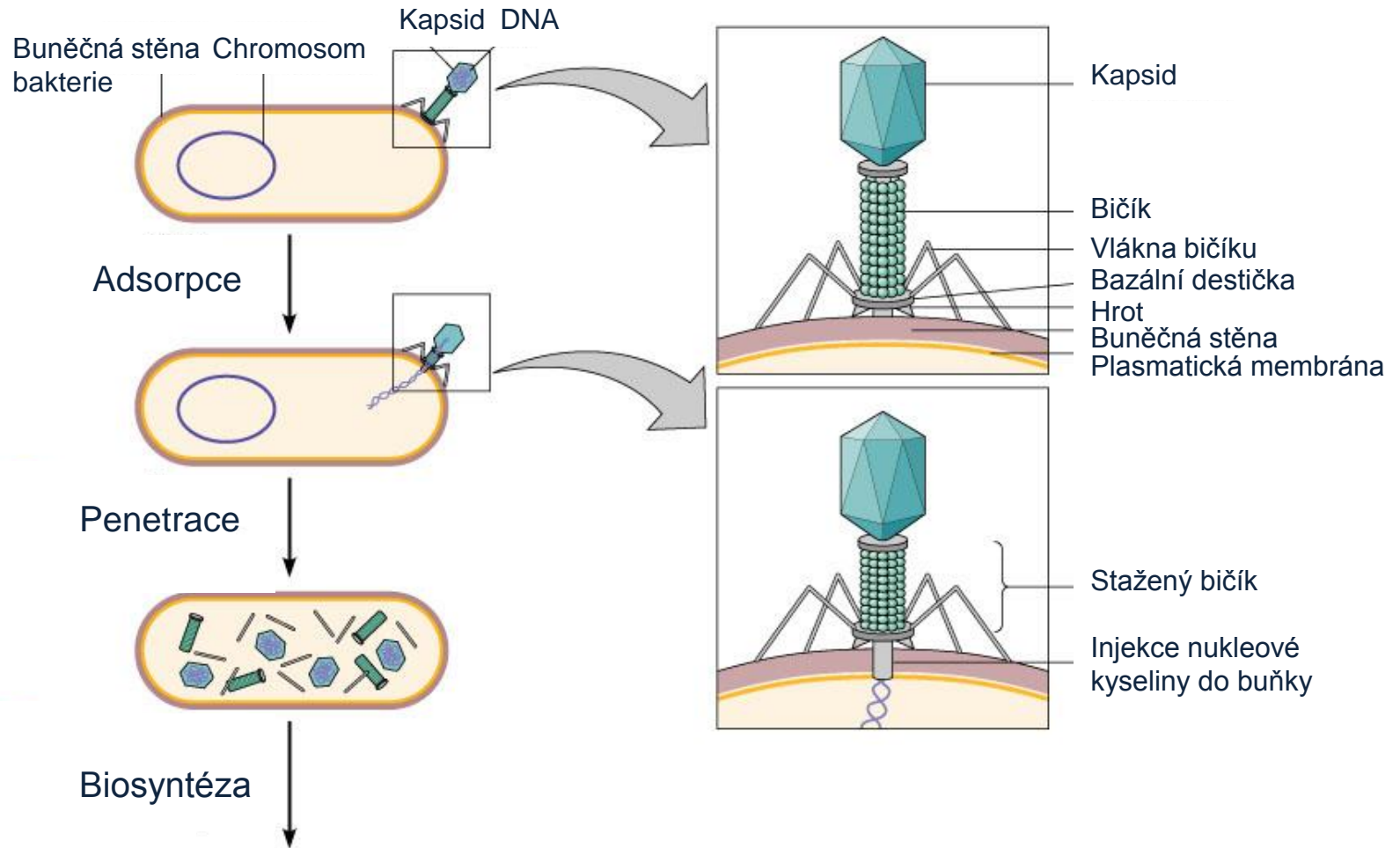
MIKROBIOLOGIE

Viry - bakteriofágy

- Specifické rozmezí hostitelských buněk – často *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*
- Vstup pouze genomu fága do hostitelské buňky, obalové struktury zůstávají vně buňky
- Klasifikace podle tvaru virionu
 - Bakteriofágy s dlouhým bičíkem
 - Bakteriofágy s krátkým bičíkem
 - Bakteriofágy bez bičíku

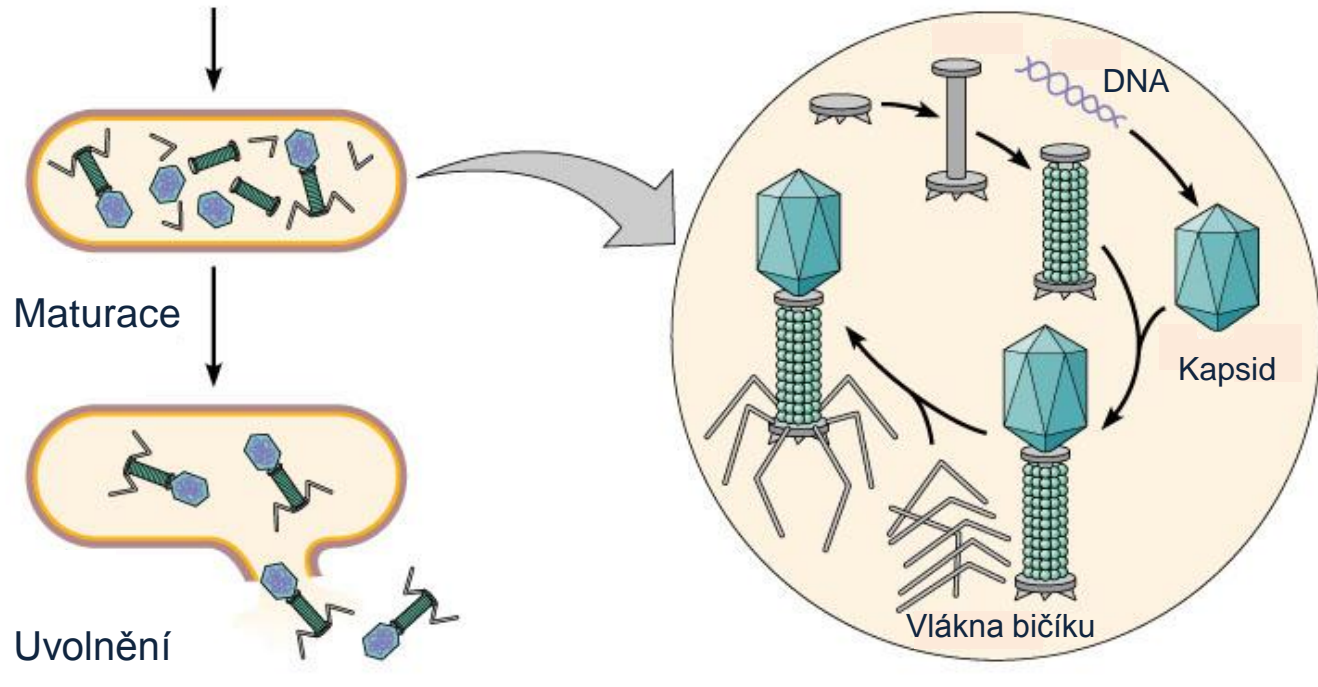
Viry – reprodukce bakteriofágů

- Lytický cyklus



Viry – reprodukce bakteriofágů

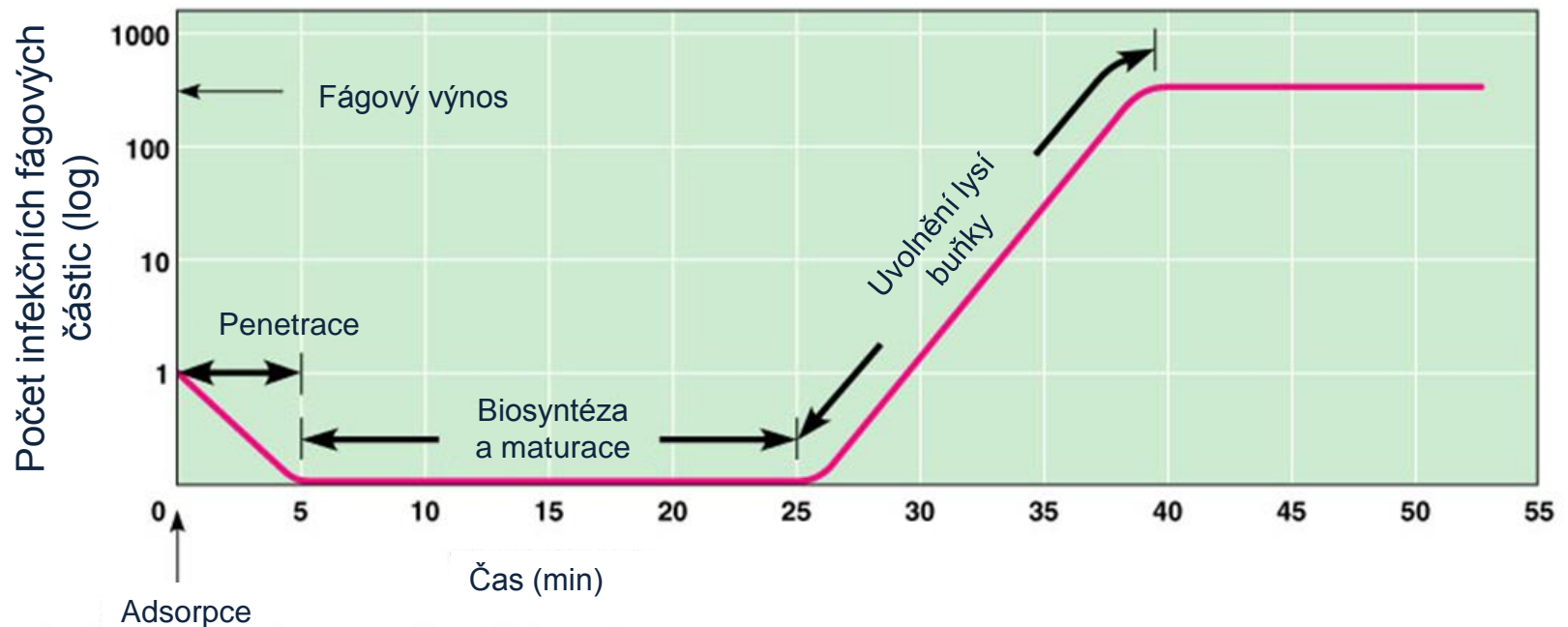
- Lytický cyklus



- Virulentní fágy – způsobují pouze lytickou infekci hostitelské buňky

Viry – reprodukce bakteriofágů

- Jednostupňová růstová křivka bakteriofága
 - Analýza počtu virionů v různých časech po adsorpci na hostitelskou buňku
 - Latentní fáze –
 - Fáze vzestupu –
 - Fágový výnos („burst size“) –

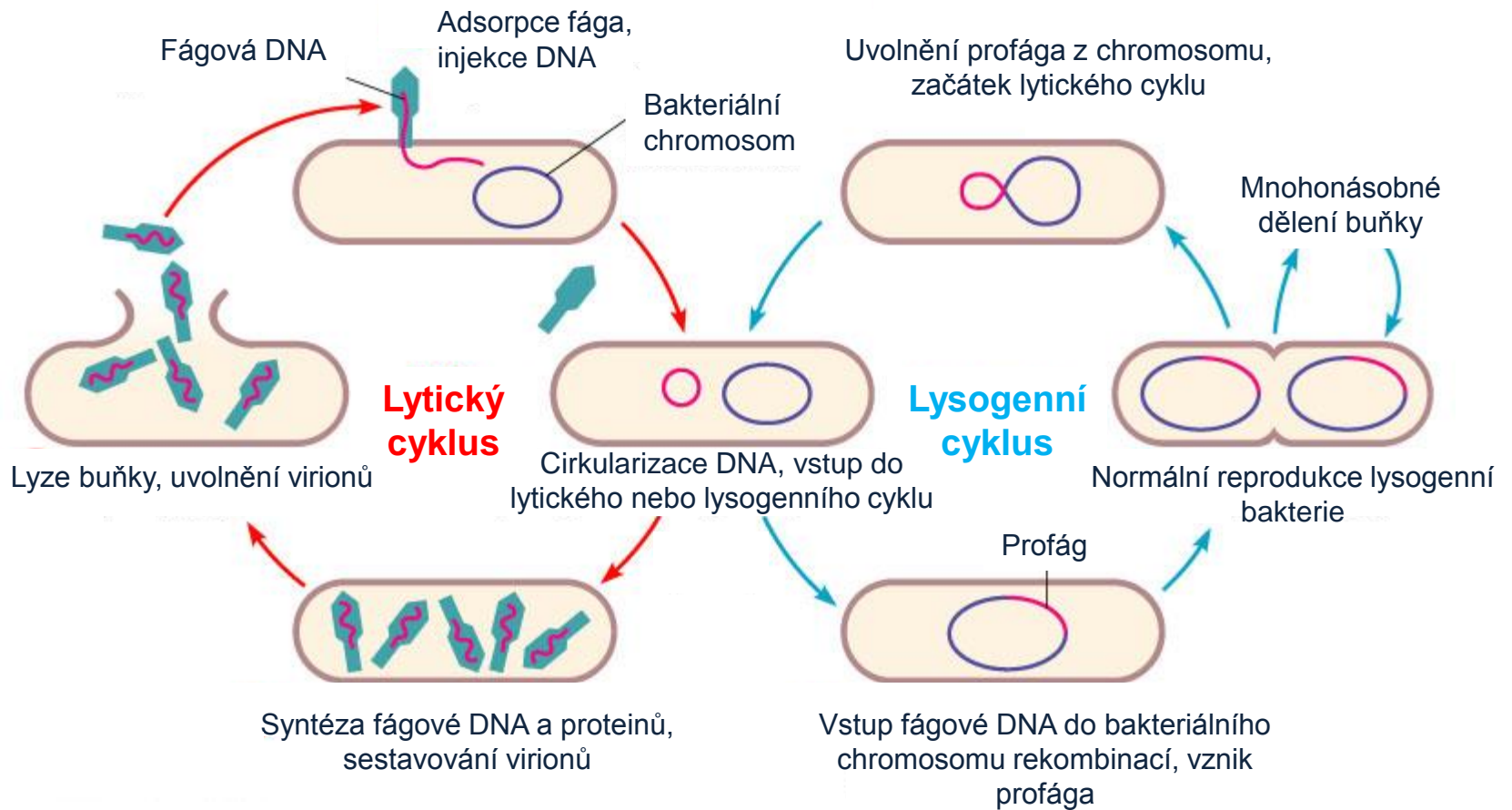


Viry – reprodukce bakteriofágů

- Lyzogenní cyklus
 - Temperované fágy – vyvolávají buď lytickou infekci hostitelské buňky nebo její lyzogenizaci
 - V lyzogenní buňce – integrace nukleové kyseliny viru do chromosomu hostitelské buňky – vznik **profága**
 - Lyzogenní buňka – imunní vůči infekci stejným fágem
 - Aktivace lytického cyklu – působením faktorů poškozujících DNA (UV záření)

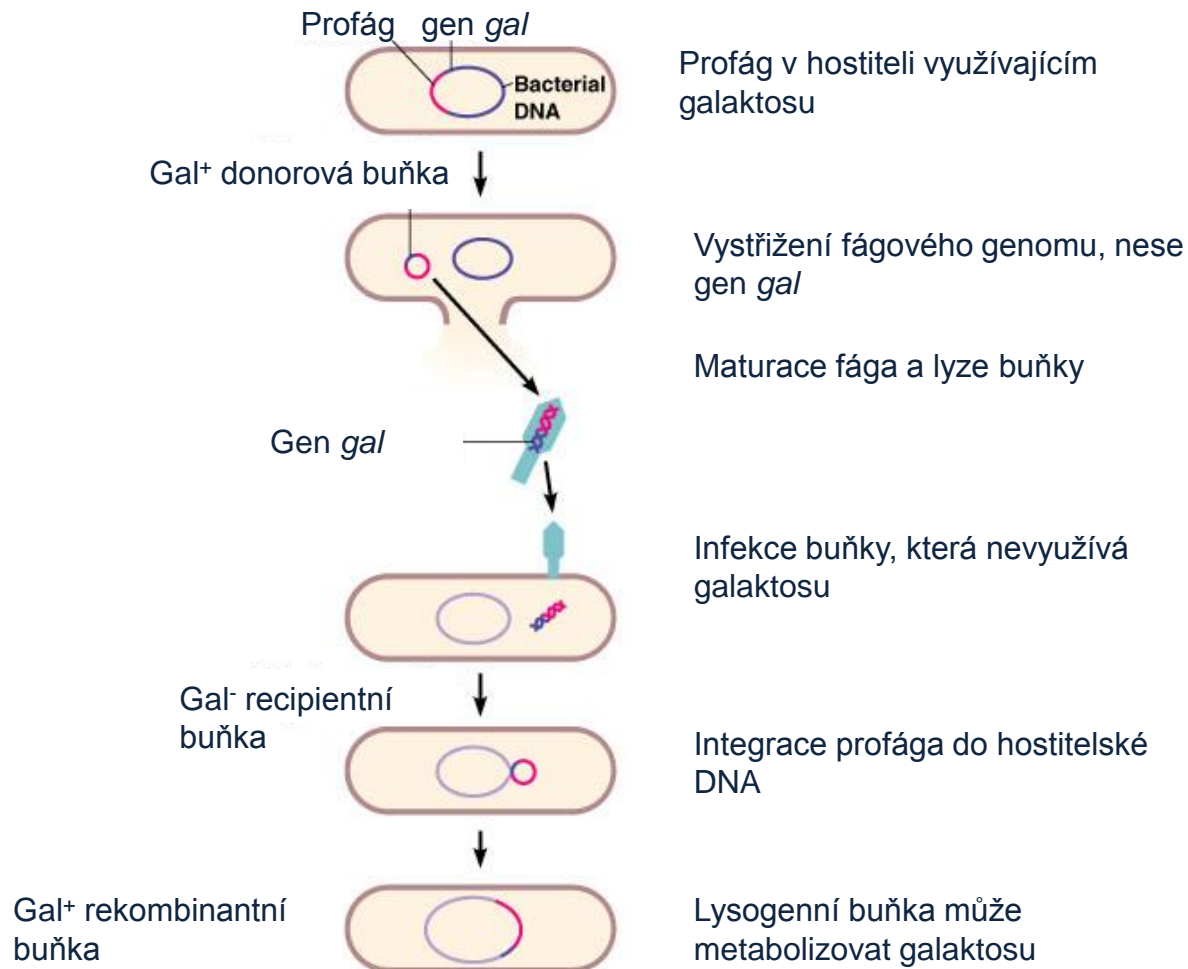
Viry – reprodukce bakteriofágů

- Lyzogenní cyklus



Viry – reprodukce bakteriofágů

- Lyzogenní cyklus



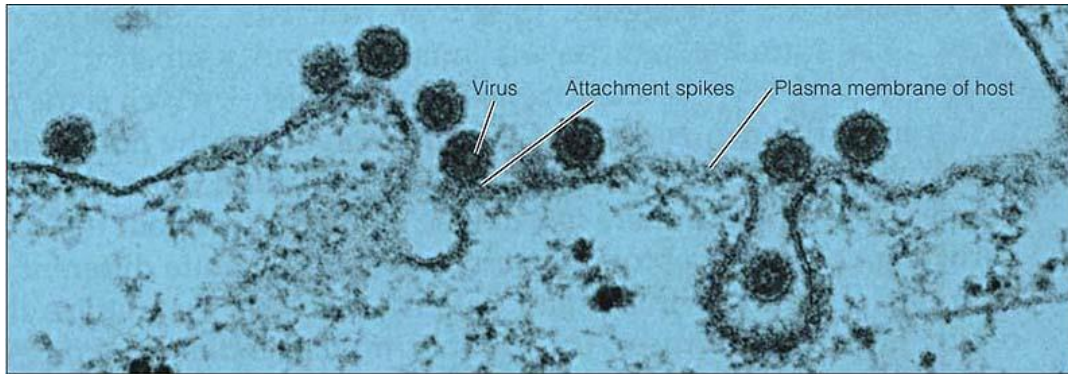
MIKROBIOLOGIE

Viry – živočišné viry

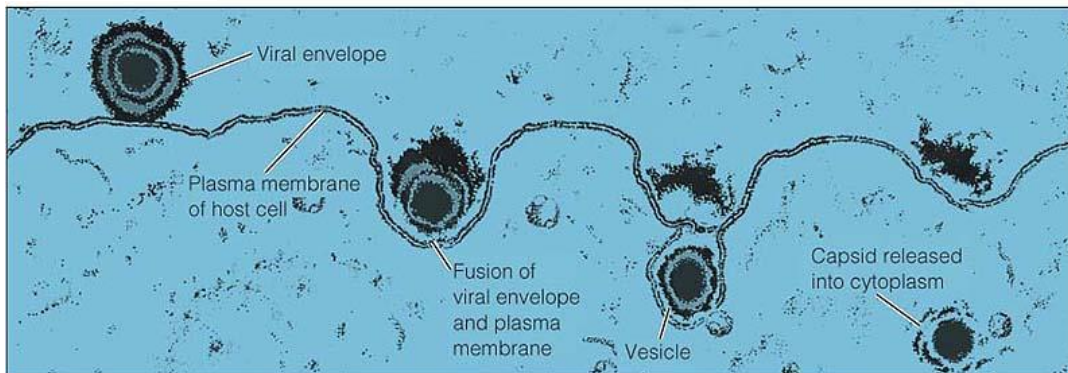
- Do hostitelské buňky vniká většinou celý virion
- Některé obalené viry – zbaveny obalu a kapsidu na cytoplasmatické membráně
- Reprodukce živočišných virů
 - Většinou v jádře hostitelské buňky
 - Kroky stejné jako u bakteriofága, odlišný počet fází

Viry – reprodukce živočišných virů

- Vazba virionu na povrch hostitelské buňky
- Proniknutí do buňky – endocytoza nebo fúze



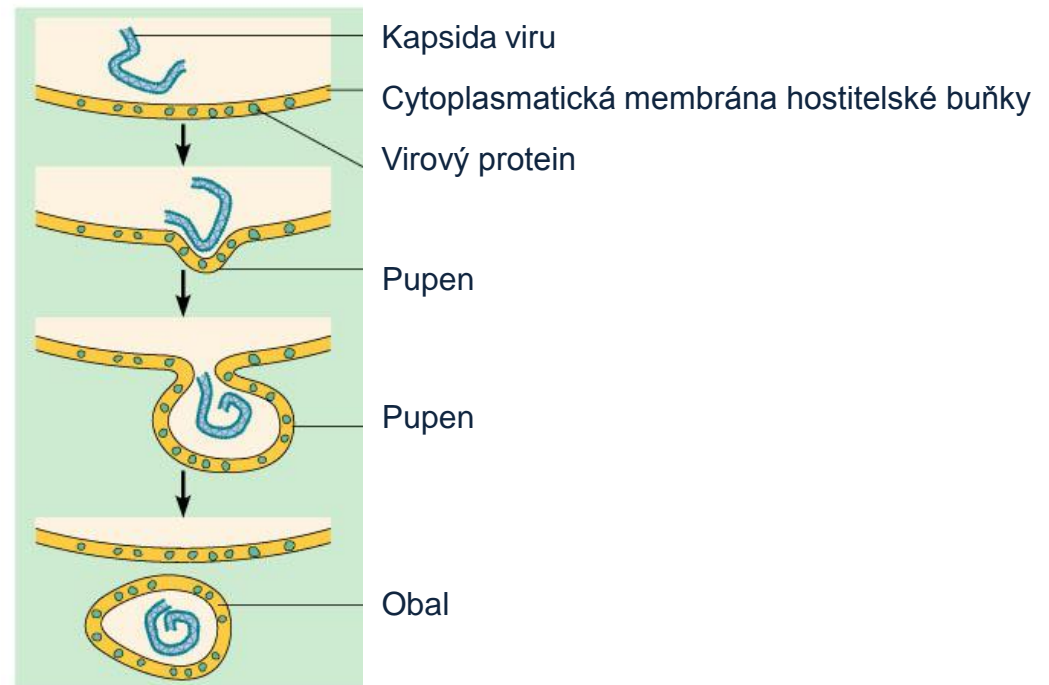
Endocytoza



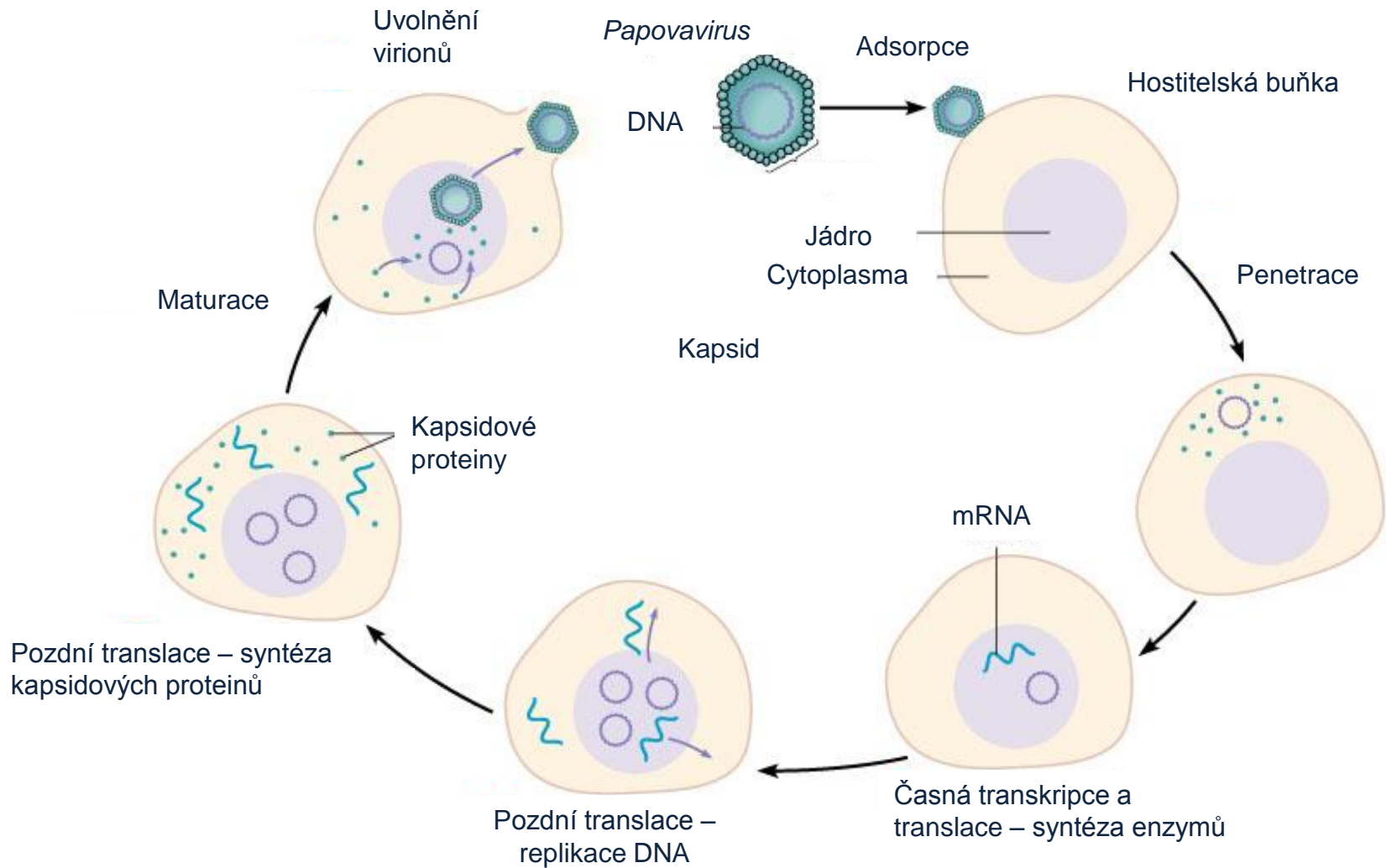
Fúze obalu viru a cytoplasmatické membrány

Viry – reprodukce živočišných virů

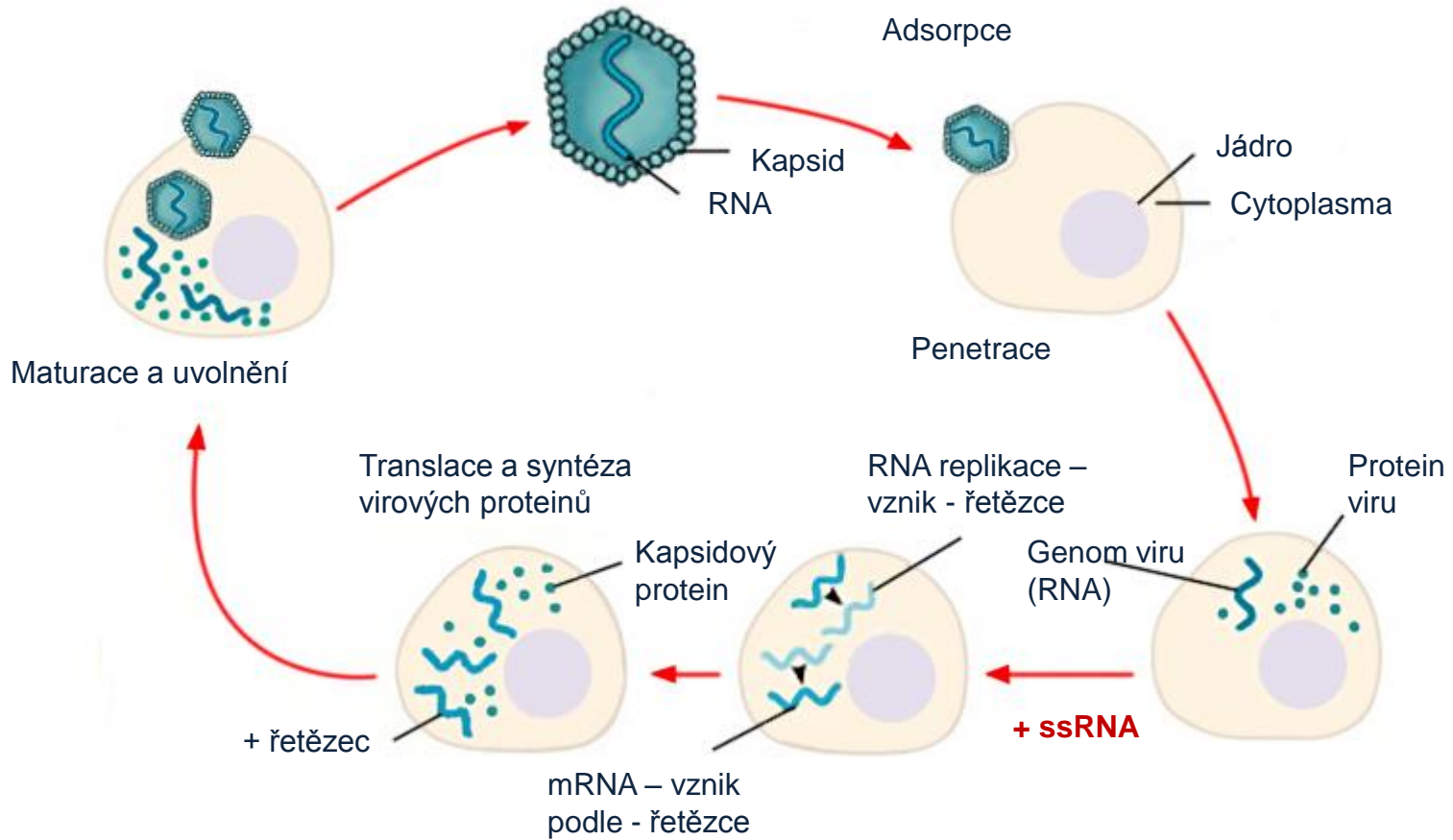
- Obnažení virové nukleové kyseliny – pomocí hostitelských nebo virových enzymů
- Biosyntéza – replikace virové nukleové kyseliny a syntéza proteinů
- Zrání (maturace) virionů
- Uvolnění z hostitelské buňky – pučení nebo lyze buňky



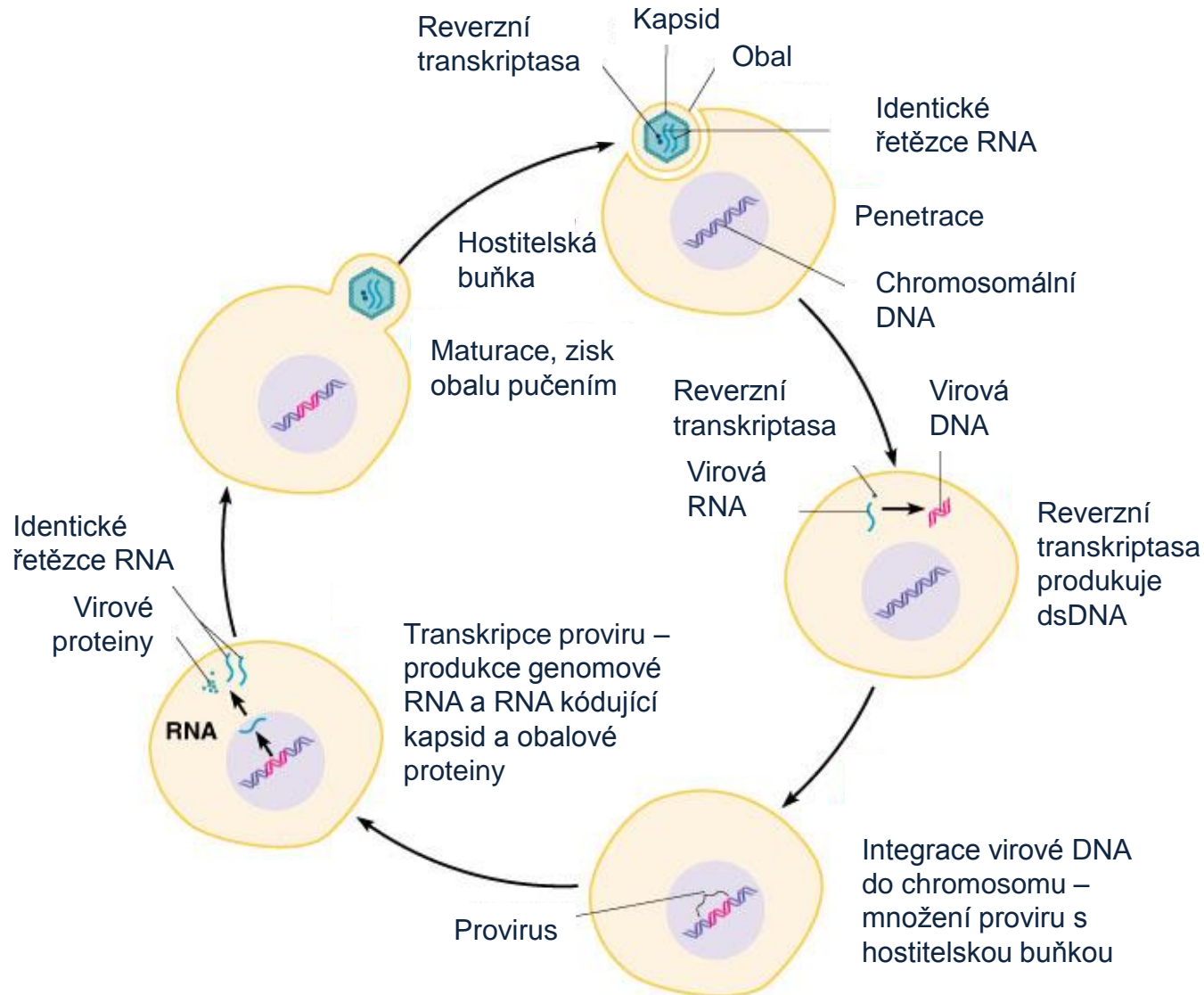
Viry – reprodukce dsDNA virů



Viry – reprodukce +ssRNA virů



Viry – reprodukce ssRNA virů se zpětnou transkriptasou



Viry – interakce živočišného viru s hostitelem






- Viry většinou nezpůsobují zjevné nemoci
- Zdraví lidé a zvířata – často přenašeči různých virů
- Akutní infekce – obvykle rychlý průběh, virus postupně eliminován z organismu, např. příušnice, spalničky
- Perzistentní infekce – dlouhodobá infekce, replikační cyklus viru zablokován
 - Chronické infekce – virus lze v organismu prokázat, ale nevyvolává chorobné příznaky
 - Latentní infekce – virus se v organismu nereplikuje, nelze prokázat, replikace viru aktivována teplotou, UV zářením, např. pásový opar

Viry a nádory

- Transformující viry – viry narušující kontrolu normálního růstu buňky
- Mechanismus transformace buňky viry
 - Narušení funkce důležitých enzymů
 - Tvorba defektních proteinů
 - Zvýšená exprese genů pro kontrolu replikace a transkripce
- Nádory způsobené DNA viry – výsledek integrace a exprese virové DNA v hostitelské buňce
- Nádory způsobené RNA viry (retroviry) – RNA je kopírována do DNA, její integrace do chromosomu hostitele
- Viry vyvolávající nádory u člověka – virus Epstein-Barrův, virus hepatitidy B, lidský papillomavirus, retroviry





MIKROBIOLOGIE

Viry – nejvýznamnější zástupci




Genom, obal viru	Velikost	Čeď	Virion	Zástupci
dsDNA neobalené viry	70-90 nm	<i>Adenoviridae</i>		<i>Mastadenovirus</i> - respirační onemocnění
	40-57 nm	<i>Papovaviridae</i>		<i>Papillomavirus</i> – tvorba nádorů
dsDNA obalené viry	200-350 nm	<i>Poxviridae</i>		<i>Orthopoxvirus</i> – pravé neštovice
	150-200 nm	<i>Herpesviridae</i>		<i>Simplexvirus</i> – opar, <i>Varicellovirus</i> – plané neštovice, pásový opar
	42 nm	<i>Hepadnaviridae</i>		<i>Hepadnavirus</i> – virus hepatitidy B, nádory jater

MIKROBIOLOGIE

Viry – nejvýznamnější zástupci

Genom, obal viru	Velikost	Čeď	Virion	Zástupci
+ssRNA neobalené viry	28-30 nm	<i>Picornaviridae</i>		<i>Rhinovirus</i> – respirační onemocnění (rýma)
+ssRNA obalené viry	60-70 nm	<i>Togaviridae</i>		<i>Rubivirus</i> – zarděnky
	40-50 nm	<i>Flaviviridae</i>		Virus hepatitidy C Virus klíšťové encefalitidy
	100-120 nm	<i>Retroviridae</i>		Virus HIV – AIDS, viry vyvolávající nádory

Viry – nejvýznamnější zástupci

Genom	Velikost	Čeď	Virion	Zástupci
	70-180 nm	<i>Rhabdoviridae</i>		Virus vztekliny
-ssRNA, nesegmento- vaný genom	150-300 nm	<i>Paramyxoviridae</i>		<i>Paramyxovirus</i> – para- chřipka, <i>Morbillivirus</i> – spalničky, <i>Rubulavirus</i> – příušnice
-ssRNA, segmentovaný genom	80-200 nm	<i>Orthomyxoviridae</i>		<i>Influenzavirus</i> – virus chřipky

Viry – vakcíny

- Živé atenuované vakcíny – snížená virulence, snížená schopnost množení virů, infekce bez klinických příznaků
- Heterologní vakcíny – využití příbuzných virů s nižší virulencí, ale se stejnými antigeny jako původce onemocnění
- Inaktivované vakcíny – inaktivace virů β -propiolaktonem, formaldehydem, vakcína neinfekční
- Subjednotkové vakcíny – využití purifikovaného antigenu viru nebo rekombinantní (vpravení genu kódujícího antigen do vektoru, exprese genu v hostitelské buňce, extrakce a purifikace antigenu)

MIKROBIOLOGIE

Viry – rostlinné viry

- Původci závažných onemocnění rostlin
 - Žloutnutí listů, kroužky a čáry na listech, nevyvinuté rostliny, někdy abnormální růst
- Zejména RNA viry
- Mechanismus přenosu rostlinných virů
 - Neváží se na specifické receptory, vstup poraněními v buněčné stěně
 - Velmi odolné k inaktivaci
 - Přenos – semeny, hlízkami, pylem, hmyzem, z půdy

Mozaika okurku



Mozaika okurku



Šarka švestek



MIKROBIOLOGIE

Defektní viry a viroidy

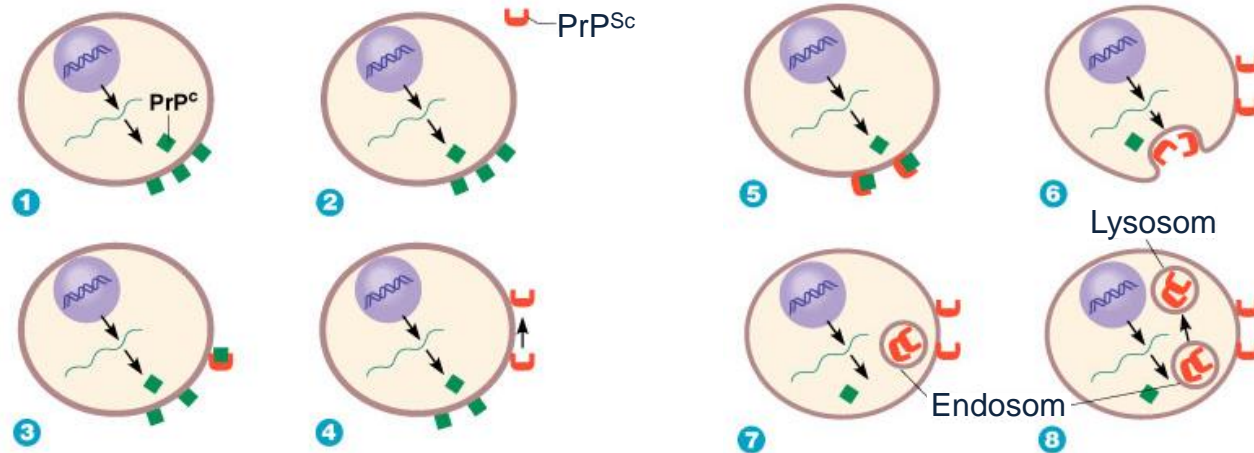
- Defektní viry =
 - Satelitní viry –
- Viroidy
 - Krátká ssRNA
 - Neobsahují proteinový obal
 - Replikace zcela závislá na hostiteli
 - Původci rostlinných chorob

Viroid vřetenovitosti u bramborových hlíz



Priony

- Prion =
- Mechanismus infekce
 - Hostitelské buňky obsahují protein PrP^C
 - Prionový protein PrP^{Sc} modifikuje PrP^C
 - PrP^{Sc} se hromadí v buňkách



- Způsobují smrtelné neurodegenerativní nemoci – Creutzfeldtova-Jakobova choroba, nemoc šílených krav, klusavka ovcí a koz

Shrnutí

	Bakterie*	Viry
Intracelulární parazité		
Přítomnost cytoplasmatické membrány		
Binární dělení		
Přítomnost DNA i RNA		
Metabolismus produkující ATP		
Ribosomy		
Citlivost k antibiotikům		
Citlivost k interferonu		

* Odlišnosti u ricketsií a chlamydií



Reference

- Brandenburg B., Zhuang X. (2007): Virus trafficking – learning from single-virus tracking. *Nature Reviews Microbiology* 5: 197-208.
- Dimitrov D.S. (2004): Virus entry: Molecular mechanisms and biomedical applications. *Nature Reviews Microbiology* 2: 109-122.
- <http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio225/chap13/ss1.htm>
- <http://highered.mcgraw-hill.com/>
- Miller S., Krijnse-Locker J. (2008): Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nature Reviews Microbiology* 6: 363-374.
- Rosypal S., *Nový přehled biologie*, Scientia, Praha, 2003.
- Rosypal S. a kol., *Obecná bakteriologie*, SPN, Praha, 1981.
- Šilhánková L., *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*, Academia, Praha, 2008.
- Willey J., Sherwood L., Woolverton C., *Prescott's principles of microbiology*, McGraw-Hill, New York, 2009.

MIKROBIOLOGIE

Animation

- http://highered.mcgraw-hill.com/sites/0072556781/student_view0/chapter17/animation_quiz_1.html
- http://highered.mcgraw-hill.com/sites/0072556781/student_view0/chapter17/animation_quiz_2.html
- http://highered.mcgraw-hill.com/sites/0072556781/student_view0/chapter18/animation_quiz_1.html
- http://highered.mcgraw-hill.com/sites/0072556781/student_view0/chapter18/animation_quiz_2.html
- http://highered.mcgraw-hill.com/sites/0072556781/student_view0/chapter18/animation_quiz_3.html
- http://www.professorcrista.com/files/animations/posted_animations/prions_characteristics.html