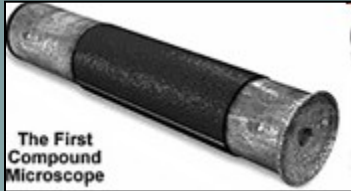
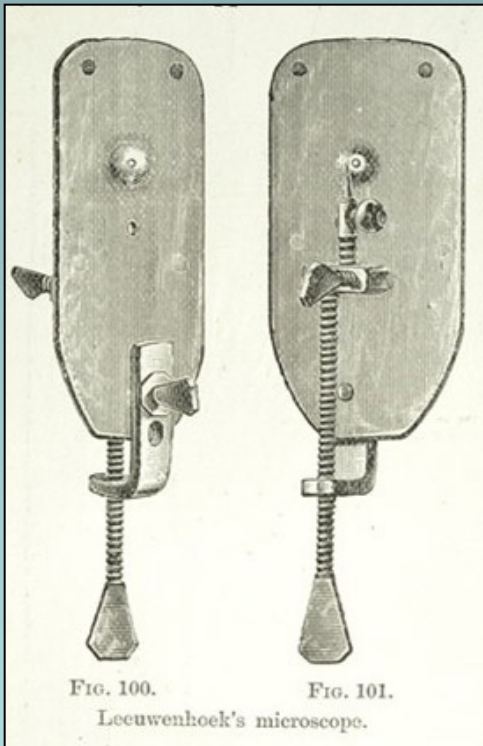


# Cytologie a morfologie bakterií



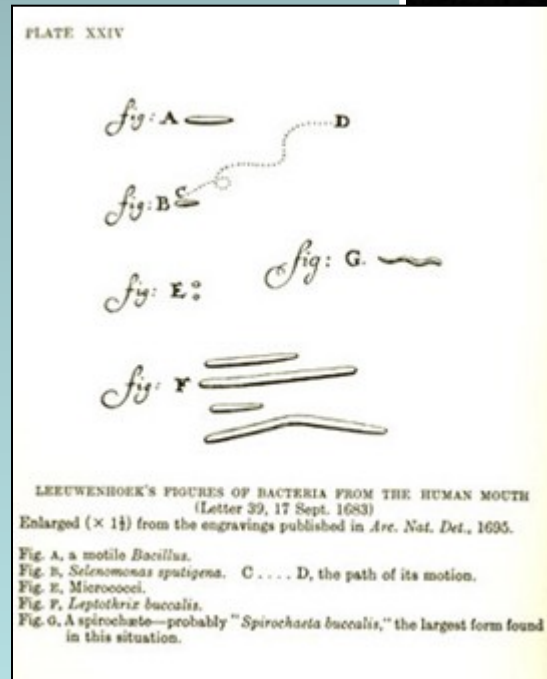
Janssenovi Z 9 x, ~ 1595



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



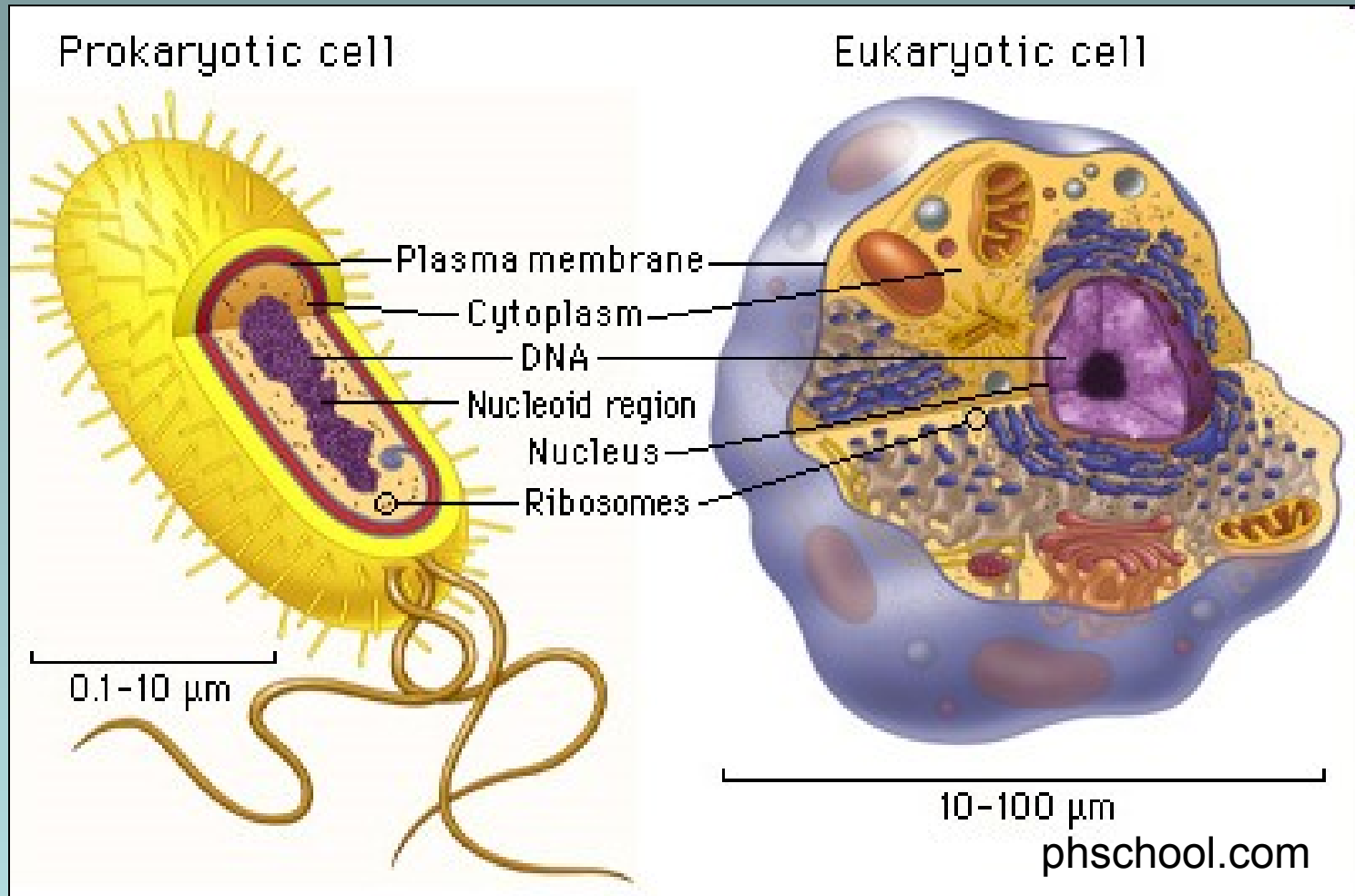
SEM *Treponema pallidum*  
útočící na membránu  
savčí buňky



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

# I.

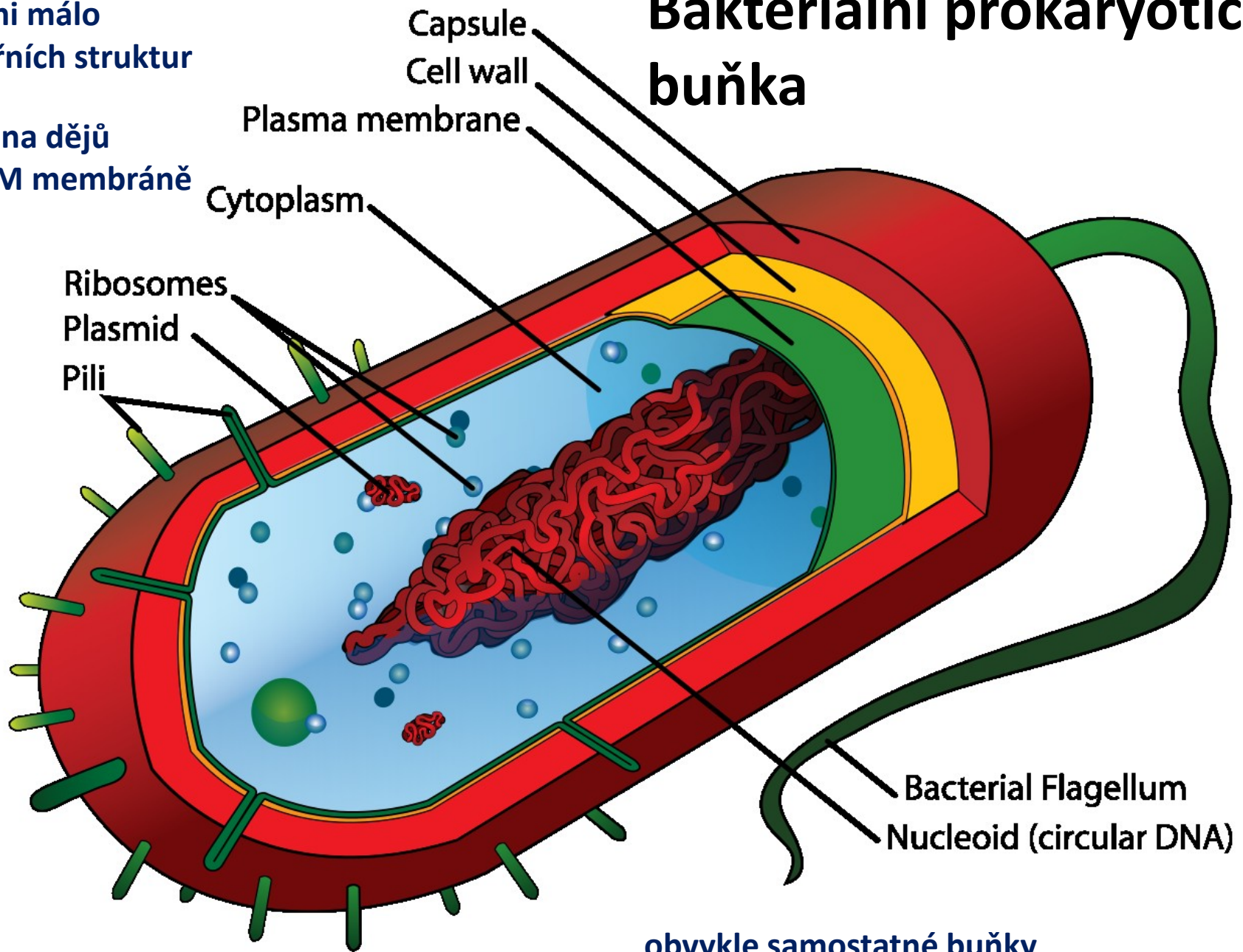
## Unikátní vlastnosti prokaryotických buněk



# Bakteriální prokaryotická buňka

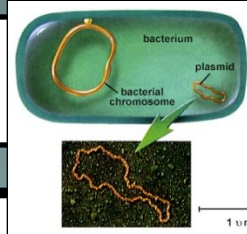
Velmi málo  
vnitřních struktur

Většina dějů  
na CM membráně



obvykle samostatné buňky

# 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

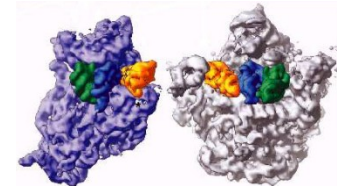
specifické struktury a vlastnosti bakt. buňky:

**peptidoglykan** (až na mykoplasmata)  
steroly v membránách zcela výjimečně

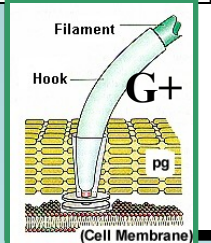
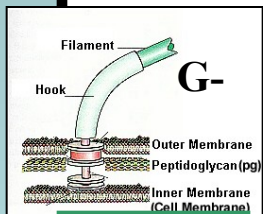
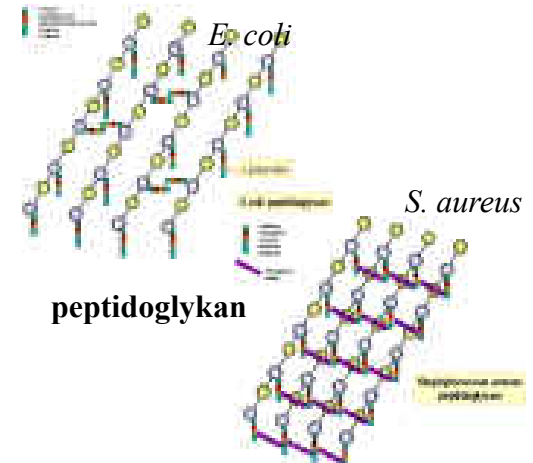
**bičík** – globul. bílk. flagelin, pohyb rotací  
**anaerobiosa**, schopnost vázat N

tvorba kyseliny **PHB** (zásob.l.)

pokud **fotosyntéza** - anoxigenní



bakteriální ribozom



# 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 – bakteriální cytoskelet**  
- **umístěním CM receptorů**

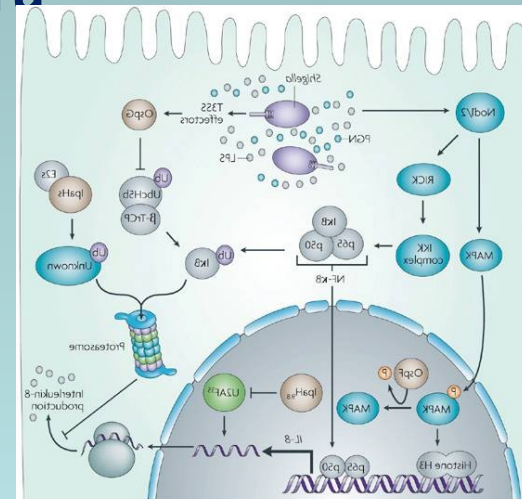
**polarita zabezpečuje**

**pohyb b.**

**adhezi b. (receptory, pilli větš. na pólech buňky)**

**vstup do hostitele; fyziologické děje v urč.**

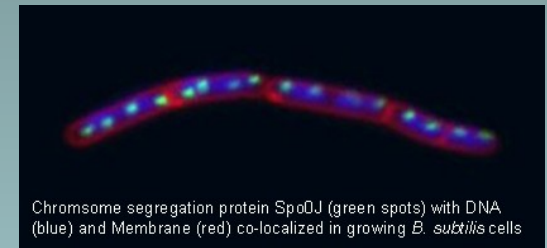
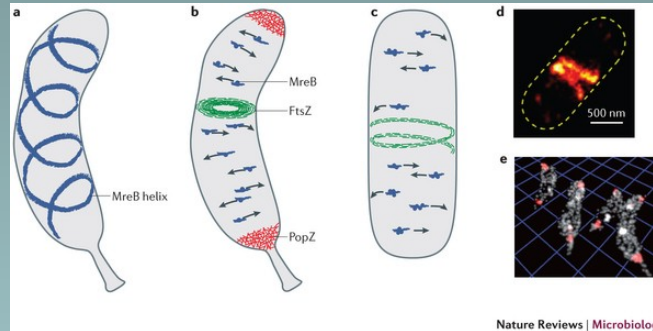
**kompartmentu**



# Bakteriální cytoskelet

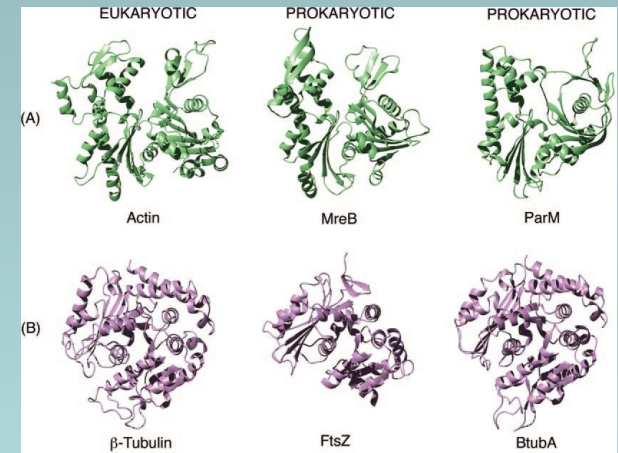
Bakteriální buňka obsahuje řadu **vláknitých proteinů** nutných pro

regulaci tvaru buňky  
buněčné dělení a  
segregaci chromozomů  
rozdělování plazmidů  
buněčné polaritě



Jsou analogické všem třem cytoskeletárním  
strukturám eukaryotní buňky

3D strukturou a biochemickými vlastnostmi.



([Yu-Ling Shih and Lawrence Rothfield \(2006\)](#)): The Bacterial Cytoskeleton. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, p. 729-754, Vol. 70, No. 3;

([Michie KA, Löwe J. \(2006\)](#)): Dynamic filaments of the bacterial cytoskeleton. *Annu Rev Biochem.*;75:467-92).

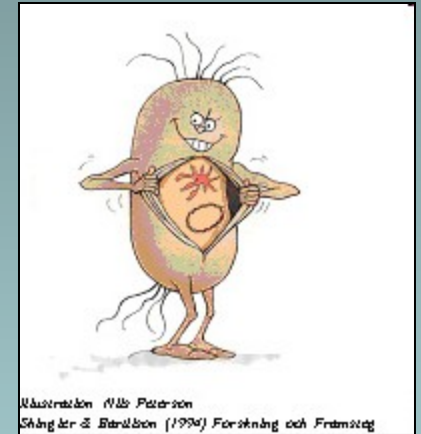
# Buněčné struktury - cytologie

## jejich vztah k fyziologii a taxonomii

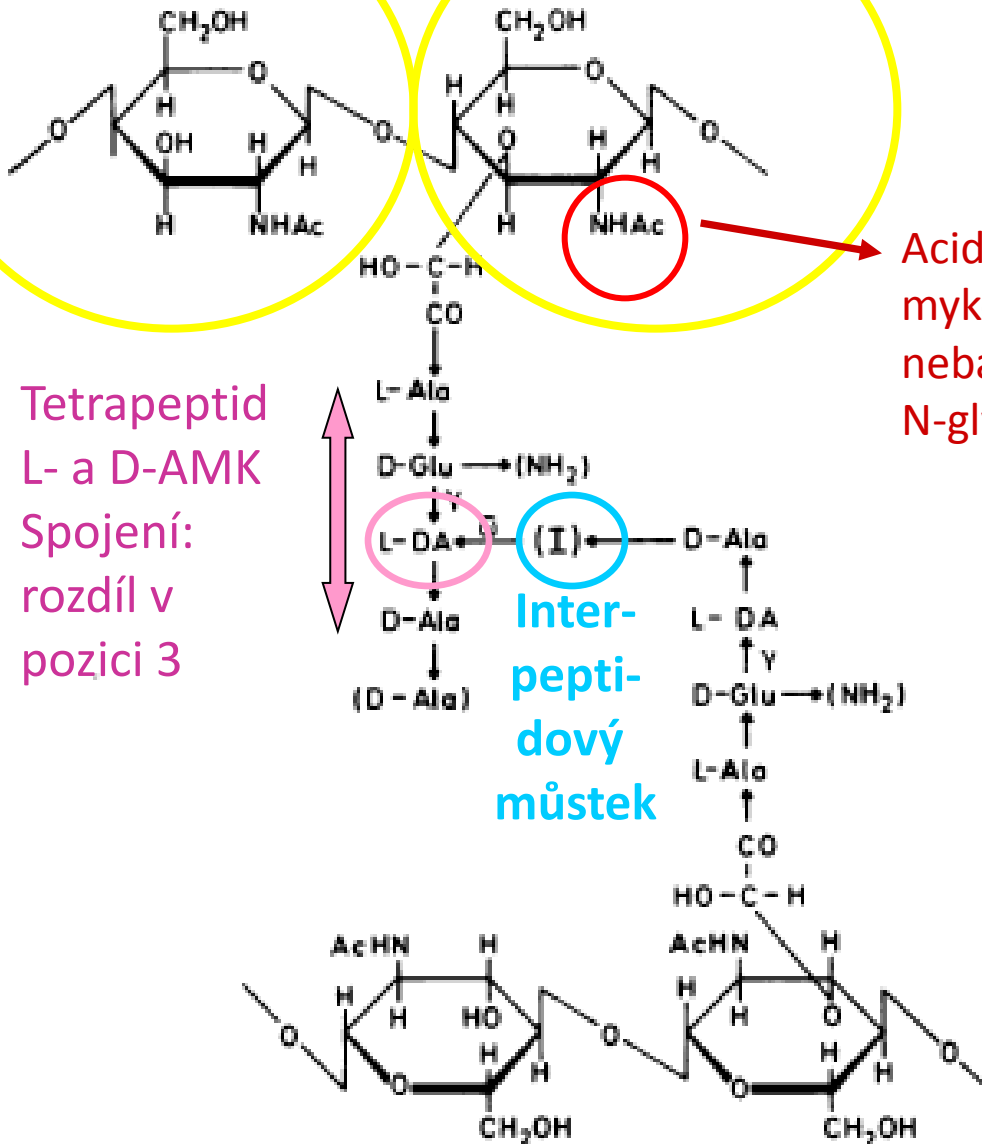
- metody výzkumu

### 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-acetylglukózin + N-acetylmuramová



Vztah mezi tvarem buňky a počtem disacharidových jednotek v peptidoglykanu (10 - 65)

Acidorezistentní mykobakteria, nokardie..  
 nebarvitelné Gramem:  
 N-glykolylmuramová

**CHEMOTAXONOMIE:**

Aminkokyselinové složení tetrapeptidu a můstku!!

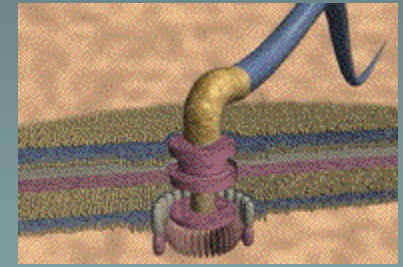
*Micrococcaceae* – až druhově charakteristická struktura můstku

Streptomycety: 3 pozice unikátní L-amino DAP kyselina

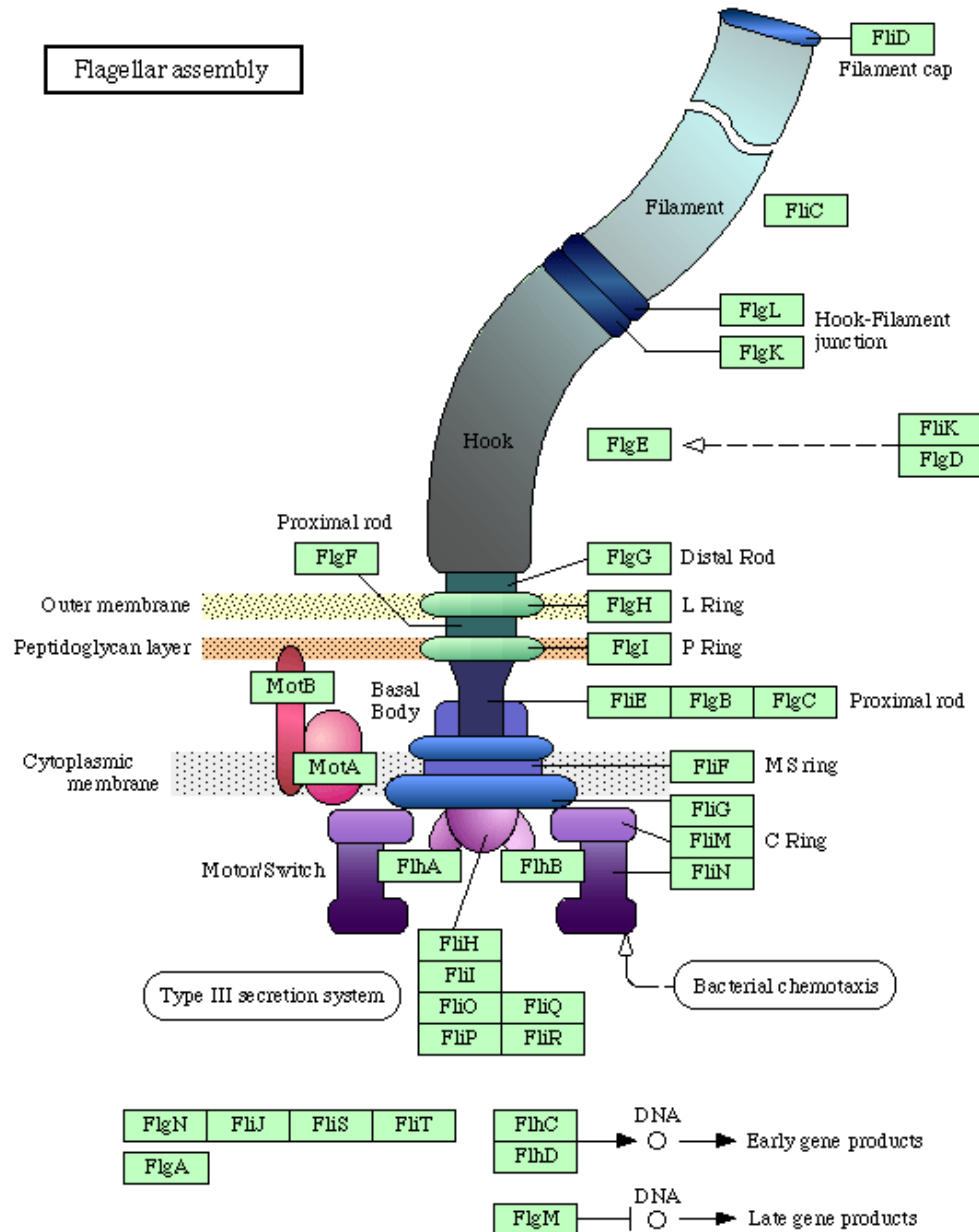
**Stěna spory: jiné a unikátní složení peptidoglykanu!**



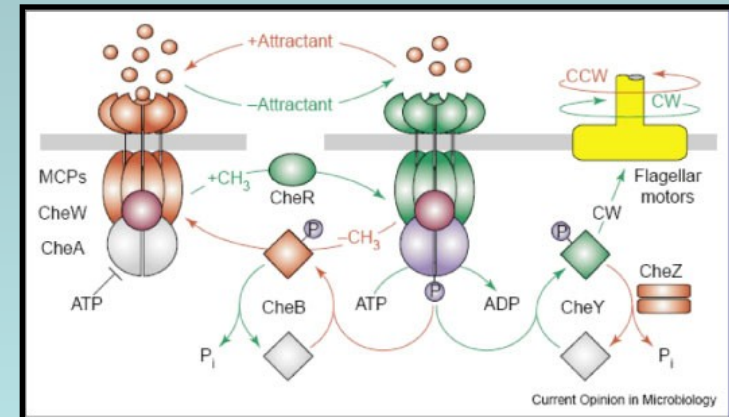
## UKÁZKA\_2



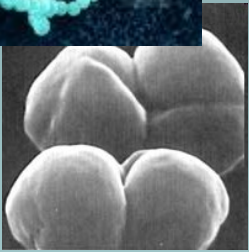
- rotace bičíku kolem vlastní osy – pouze u prokaryot
- poháněn proton motive force (pmf) – pohyb protonů přes CM
- Regulace pomocí MCP systému = proteiny



02040stm 9/20/02

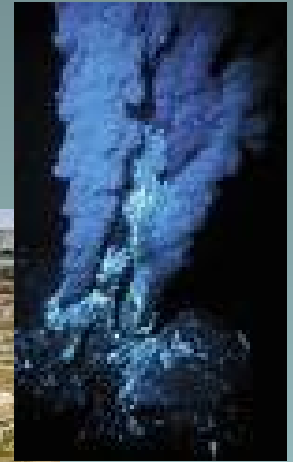
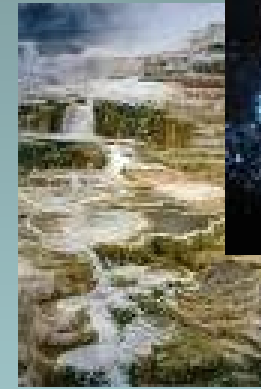


# *Bacteria vs. Archaea !!*



## Archea – extrémní podmínky:

strukturní shody  
ale rozdílné chemické složení



- ---- rozdílná citlivost na ATB

- PEPTIDOGLYKAN

### 5 typů buněčné stěny

- CM – 1 vrstevná
- tRNA archeí podobná eukaryotické



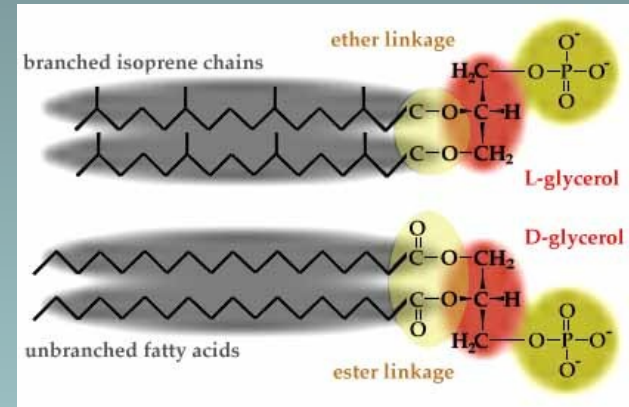
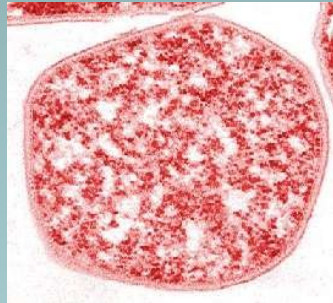
## Cytoplazmatická membrána archeí

Sulfolipidy, glykolipidy, nepolární isoprenoidní lipidy, fosfolipidy, větvené lipidy, mnoho proteinů v membráně

### FOSFOLIPID:

- (1) chiralita glycerolu (L-glycerol; dáno enzymy)
- (2) etherové vazby - glyceroldiether, tetraether = jiné chem.vlastnosti fosfolipidů
- (3) řetízky isoprenoidů namísto
- (4) větvení isoprenoidu

### **Nepřítomnost sterolů**

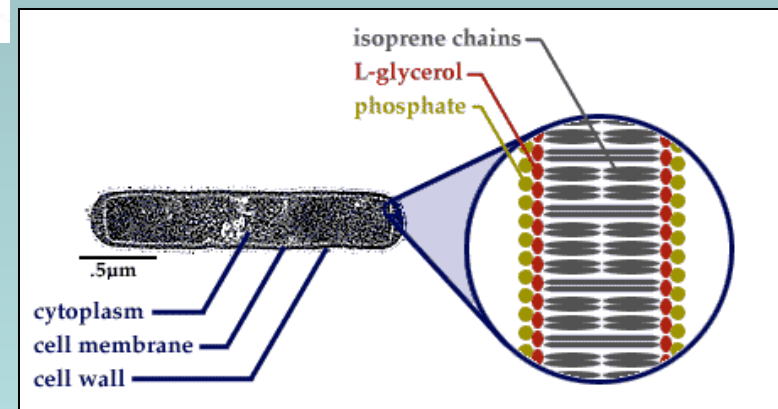


Často **jednovrstevná**

glycerolové jednotky na obou koncích MK  
tvorí 1vrstvu

### **Lepší přizpůsobení extrémům**

– monolayer rezistentnější k narušení teplem



## II. Příklady variability struktur bakteriální buňky

Příklady faktorů ovlivňujících morfologii a funkci struktur bakteriální buňky

*In vivo?? In vitro???*

# Cytoplazma

- Prostorová organizace (vysoký stupeň)
  - řízeno ATPázami, protonovým gradientem membrány, aktinovými vlákny – **udělují polaritu**
  - maximální hustota a rychlost a specifita reakcí
- Mobilizace cytoplazmy (difúze? X)
  - řízeno IR zářením a generováním vody exkluzní zóny
- Mikroskopická struktura - **gel**

# Nukleoid, plazmidy

- ATPáza ParA
  - aktivní rozdělování nízkokopiových plazmidů
  - par-geny i na chromozomu!
  - par-geny kódují – centromeru a trans-acting proteiny a,b
- TEM
- Nukleoid jako biosenzor – detekce Hg....
- **HU proteiny** – konzervované; nadšroubovice, 3D,  
+ **ncRNA** – komplex – architektura chromozomu

# Biogeneze CM membrány

- Při kolonizaci u parazitů
- shift
- Cílová léčba: ovlivnění mechanismů transportu beta-barelů

### III.

## Volba správného typu mikroskopie pro pozorování cytologických a morfologických znaků

Mikroskopie – nutno zvolí vhodný typ techniky dle  
sledované struktury

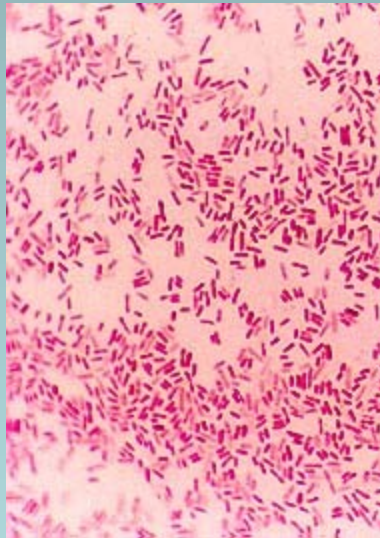
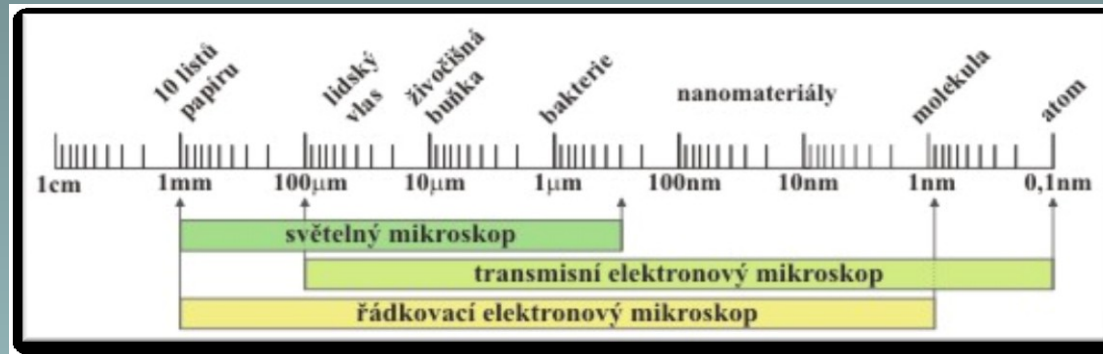
př: EM – 3 typy – mesozomy, nukleoid, cytoskelet

- dehydratace, pokovování – agregace nukleoidu

→ artefakty



# Světelný mikroskop (1000x) vs. Elektronový (100 000x)

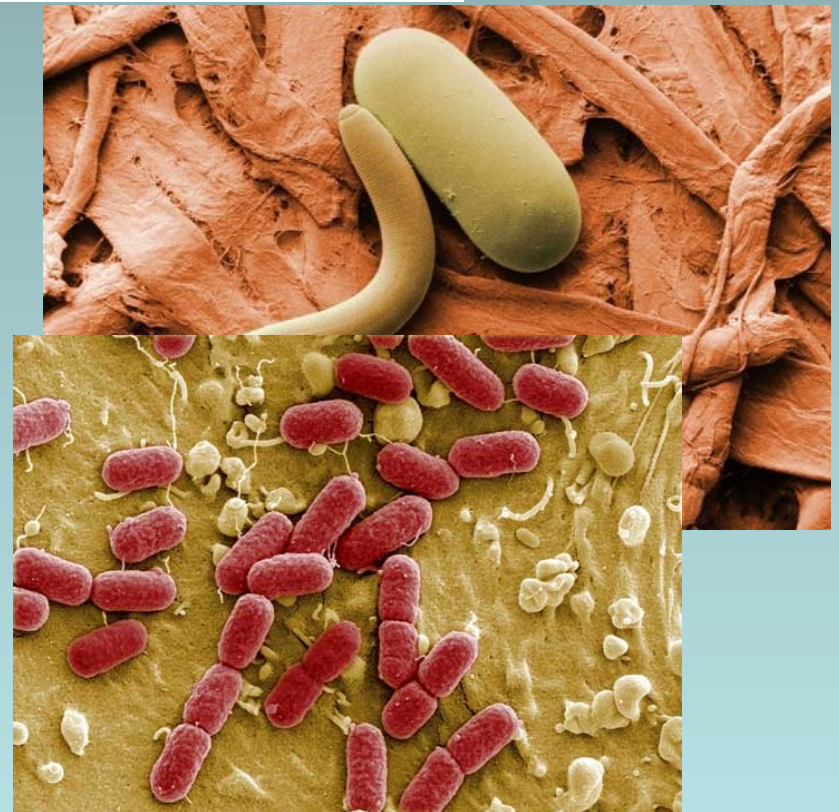


Světelný mikroskop  
- Fázový kontrast

ASM MicroLibrary.org©Graham



Světelný mikroskop  
- Jasně pole





Jasné pole,  
1000x

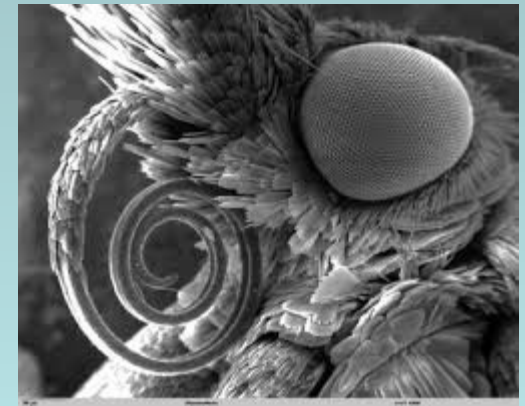
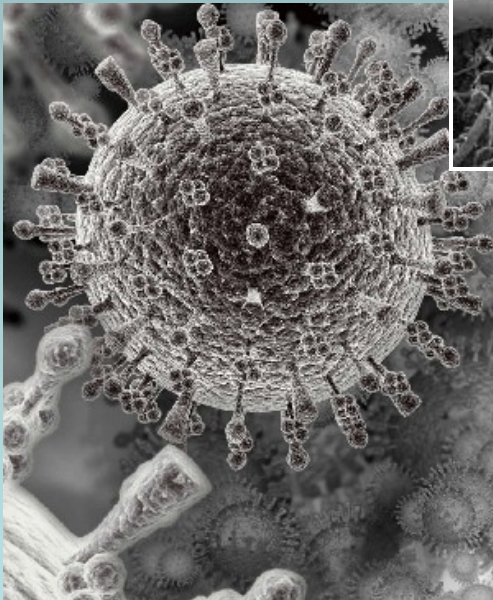
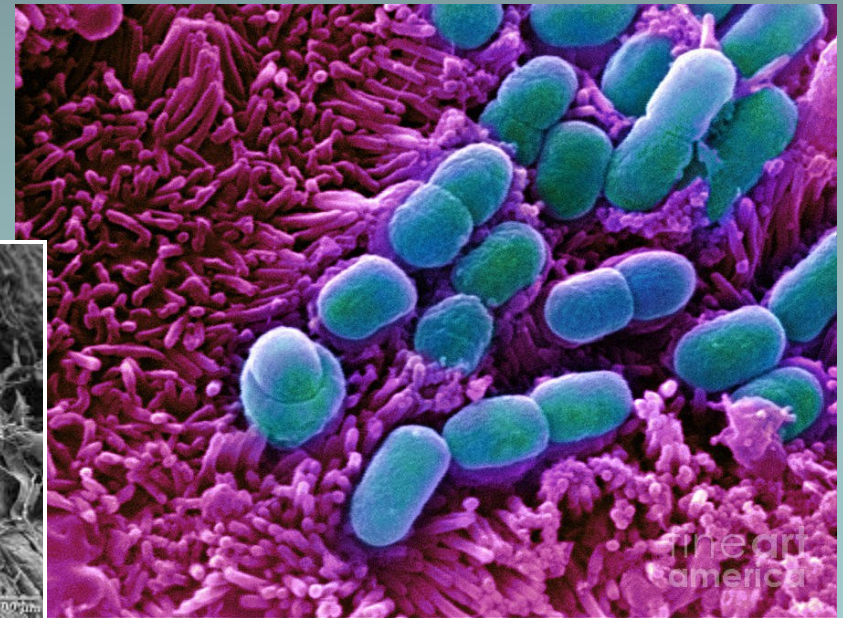


Rastrovací  
elektronová  
mikroskopie

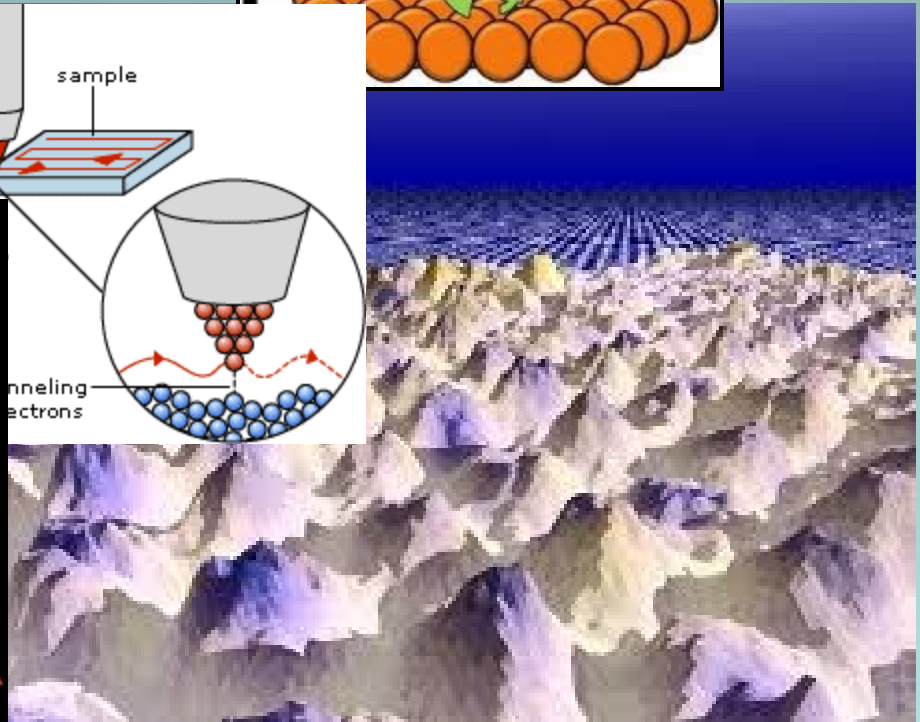
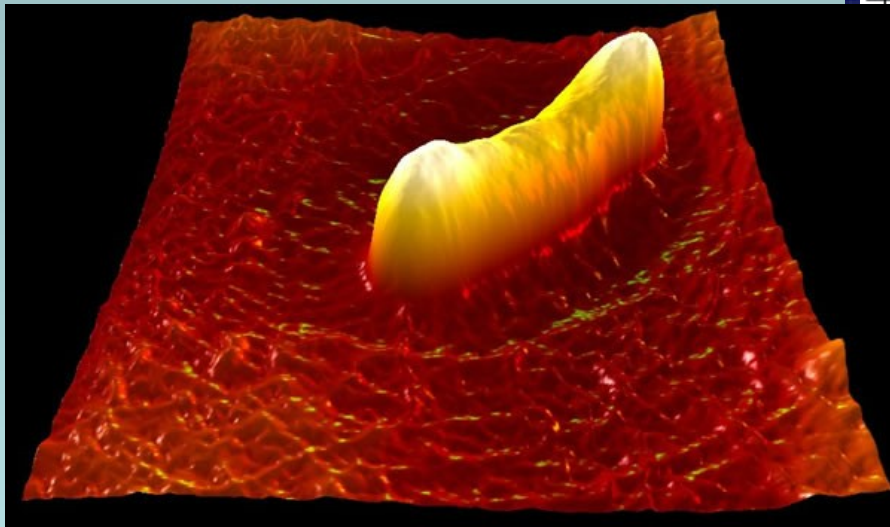
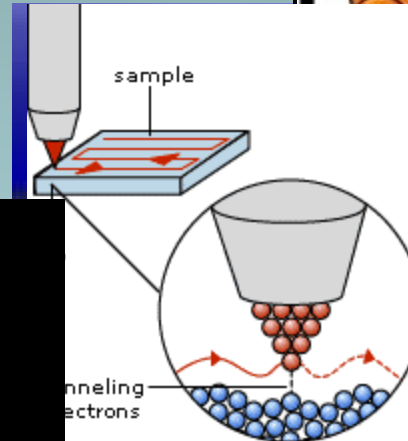
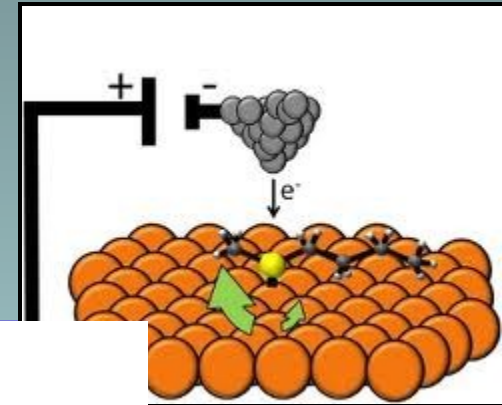
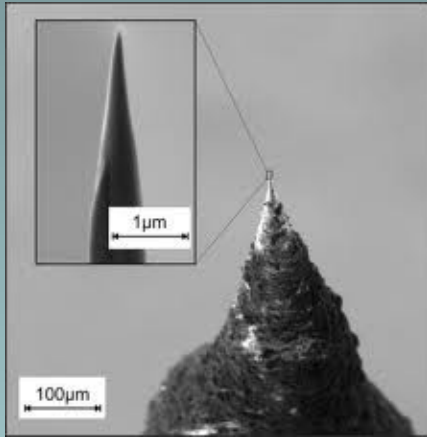
# Rastrovací elektronová mikroskopie

(skenovací, řádkovací, Scanning Electron Microscope - SEM)

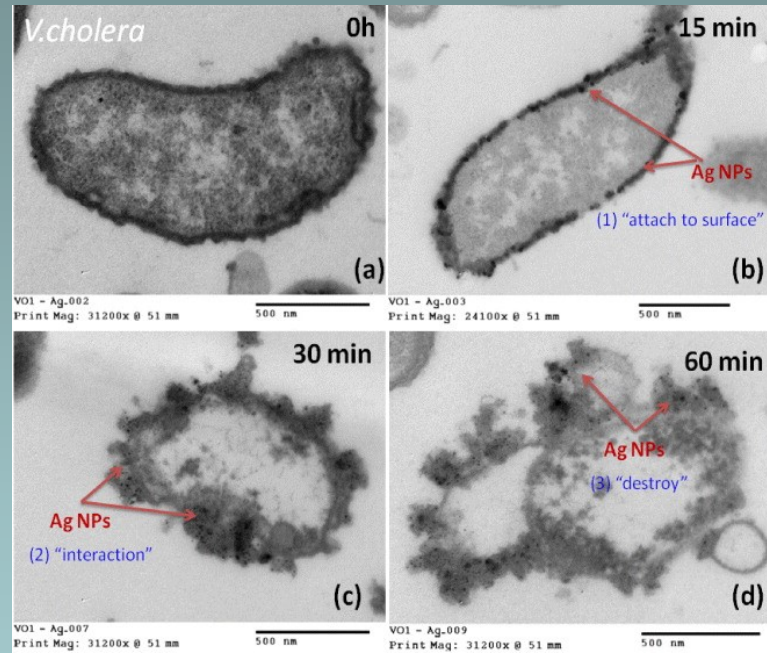
Popularita SEM pramení z možnosti získat obrázky povrchů širokého spektra objektů



# Skenovací tunelová elektronová mikroskopie (scanning tunneling electron microscopy, STM)



# Transmisní elektronový mikroskop (TEM)



Metoda umožňuje pozorovat **detaily buňky a virových částic**. Ke kontrastnímu znázornění zvýraznění struktur se používá **negativní barvení** solemi těžkých kovů, které **nepropuštějí elektrony** například **uranyl acetát, molybdenan amonný**.

# Cytologie a morfologie buňky

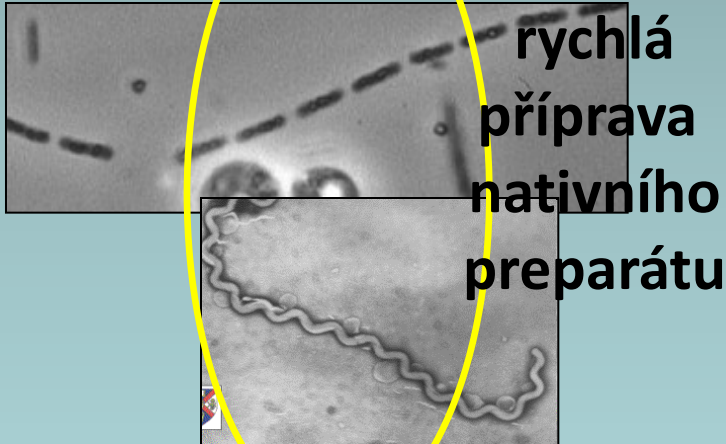
Světelná  
Fázový kontrast  
Fluorescenční  
Elektronová...

- **PREPARÁT**

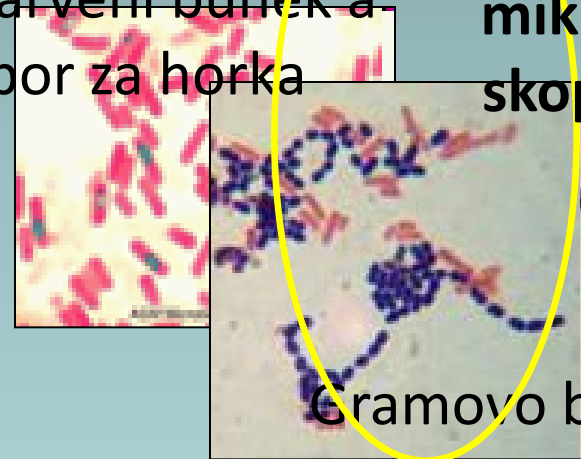
- co chceme vidět? – podle toho preparát a typ mikroskopie

**tvar buňky** – fázový kontrast, barvený fixovaný prep.

## a struktur



barvení buněk a  
spor za horka



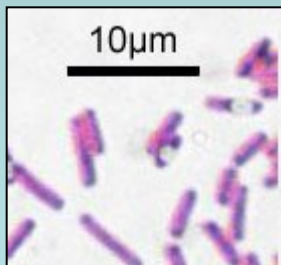
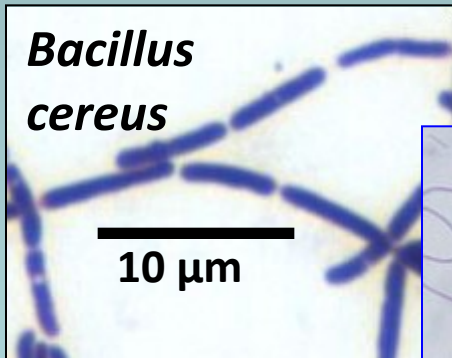
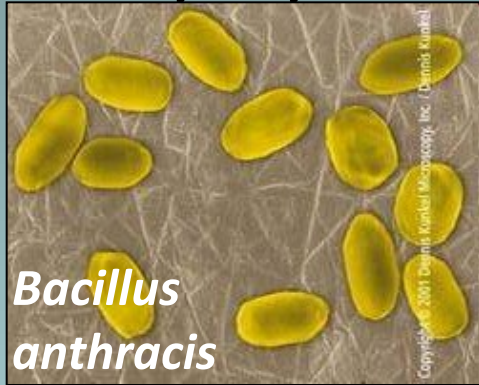
**pohyb buňky** – fázový kontrast, fluorescence

**barvené struktury** – pomáhají identifikaci (PHB, síra..)

**typ buněčné stěny** – Gramovo a acidorezistentní b.

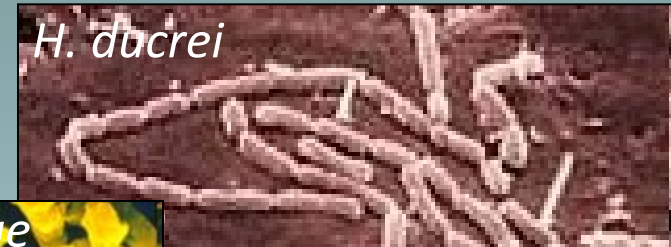
# U jednoho bakteriálního rodu různý vzhled char. tvaru buňky!

- Př: tyčky bacilů

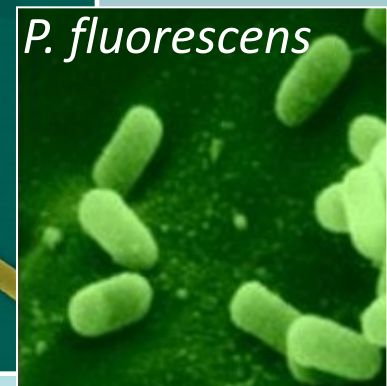
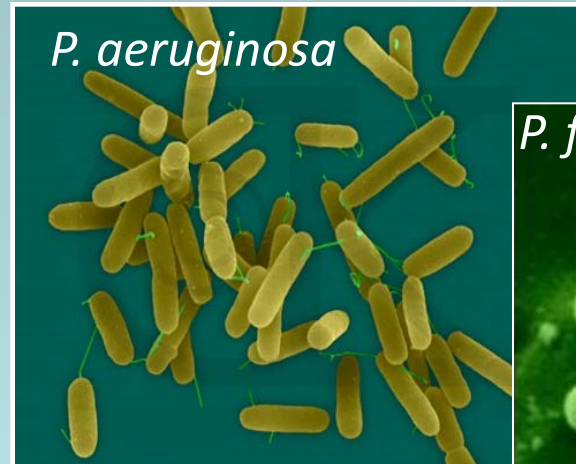


*Bacillus subtilis*

- *Haemophilus*



- *Pseudomonas*

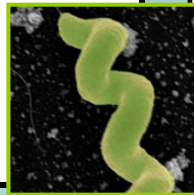


# Velikost a tvary bakteriální buňky

velký poměr povrch/objem – velká plocha kontaktu buňky s prostředím

## • Velikost bakt b. v $\mu\text{m}$

<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

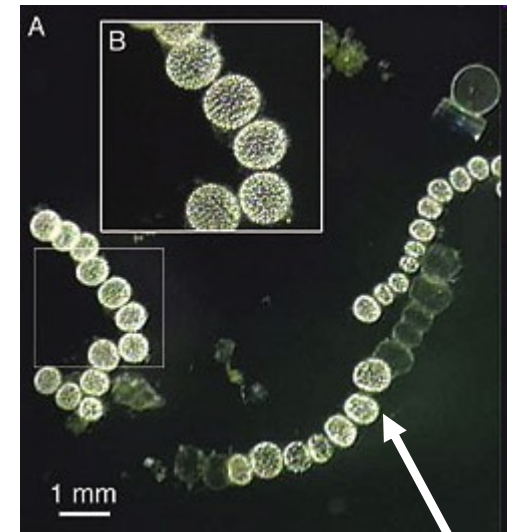
Pupeny

Prostéky

Spirily

Hvězdice

Mycelia



750  $\mu\text{m}$  - největší známá prokaryotní buňka,  
objevená r.1999: *Thiomargarita namibiensis*

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



## Bacterial Morphology

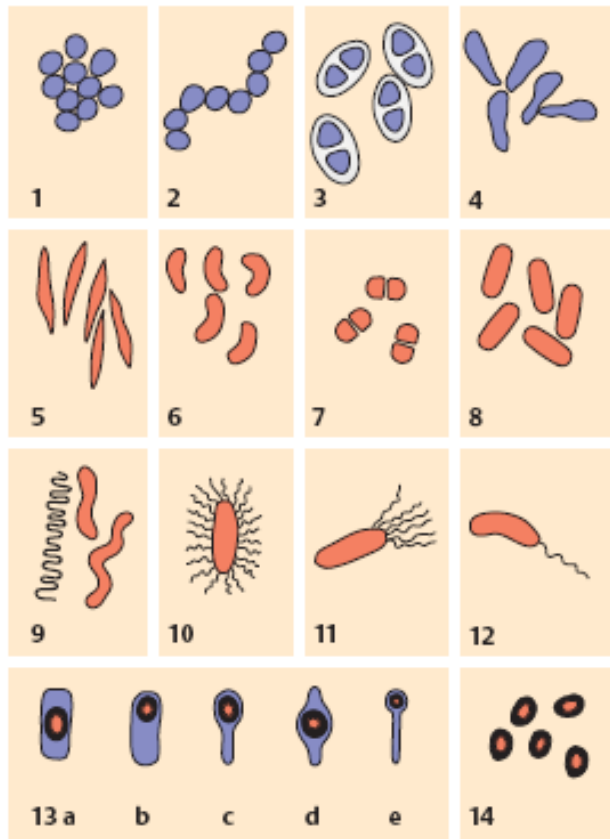
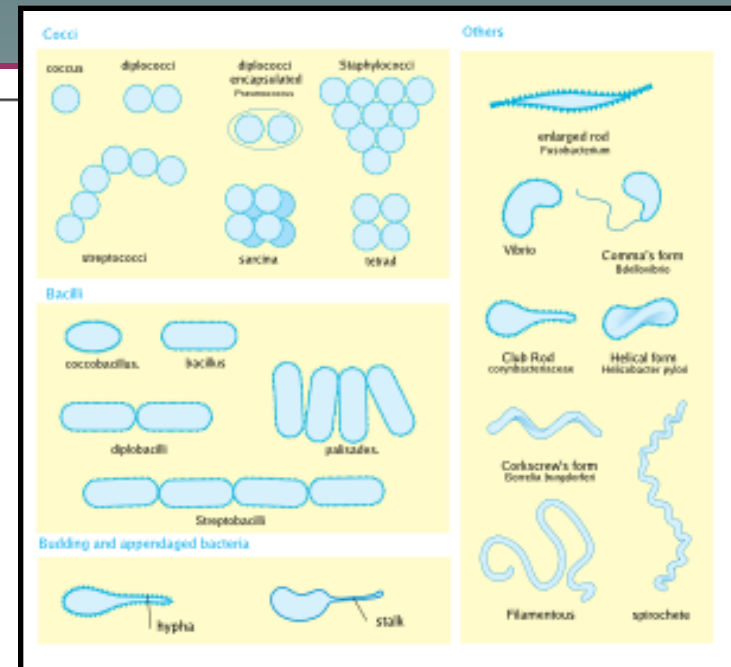


Fig. 3.1

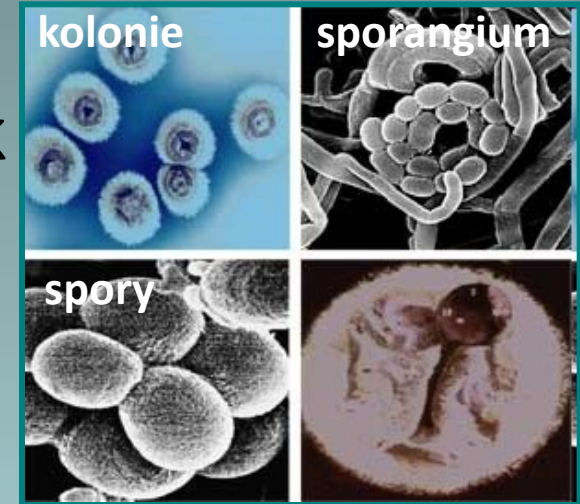


1. Gram-positive cocci in grape-like clusters (staphylococci)
2. Gram-positive cocci in chains (streptococci)
3. Gram-positive cocci with capsules (pneumococci)
4. Gram-positive, club-shaped, pleomorphic rods (corynebacteria)
5. Gram-negative rods with pointed ends (fusobacteria)
6. Gram-negative curved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

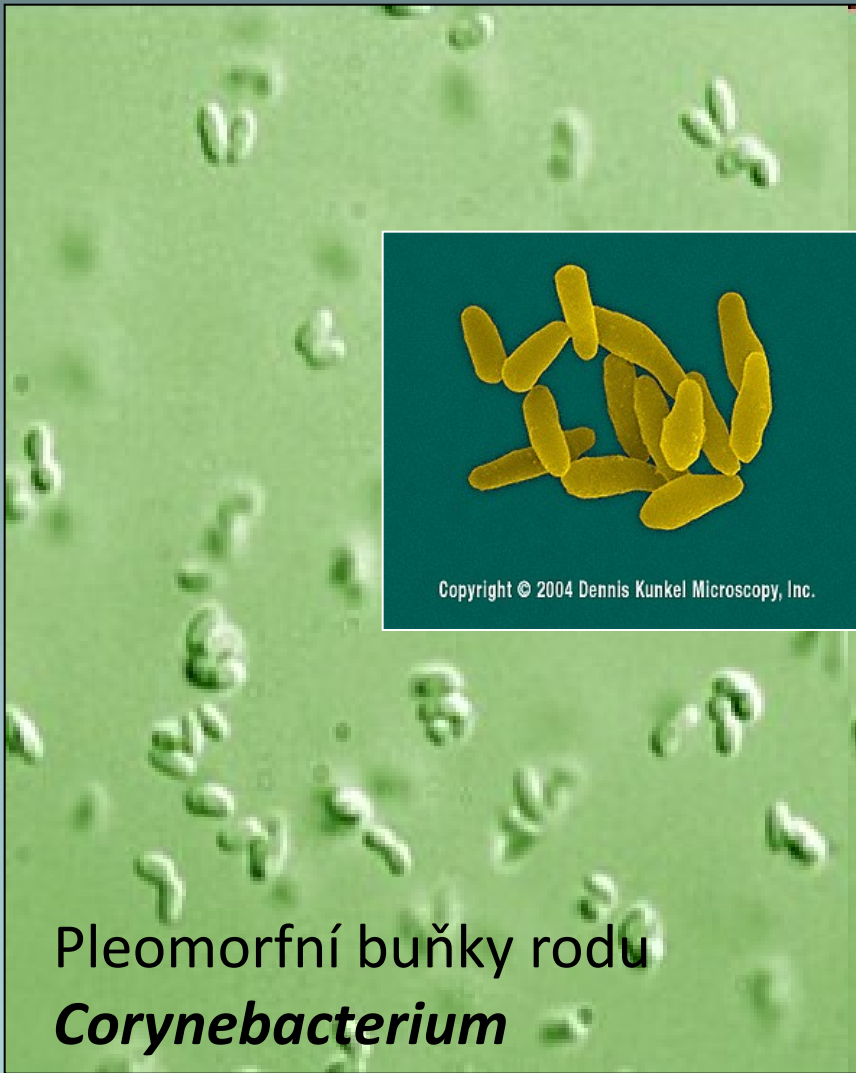
endospory vyklenující buňku

stáří kultury

pleomorfní buňky

*Clostridium  
botulinum*





Pleomorfní buňky rodu  
***Corynebacterium***

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

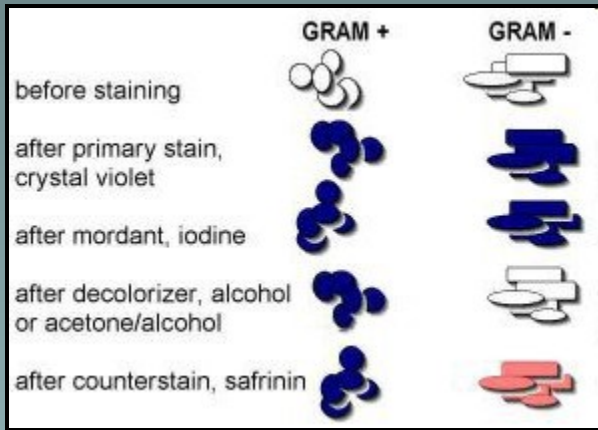
Mykologové kys

Pleomorfní buňky  
***M. tuberculosis***



***Mycobacterium avium-intracellulare***

Acidorezistentní barvení buněk  
histologického řezu lymfatické uzliny



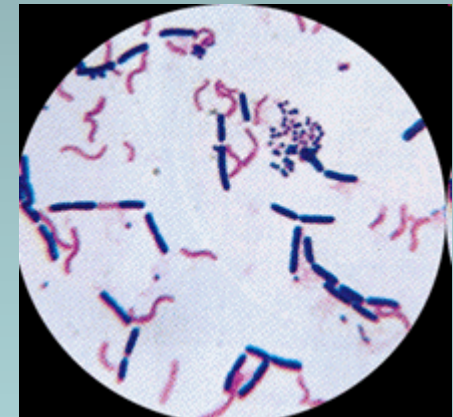
**Je neznámý vzorek vůbec barvitelný Gramem? Není gramlabilní? Fáze tyčka – kok?**



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

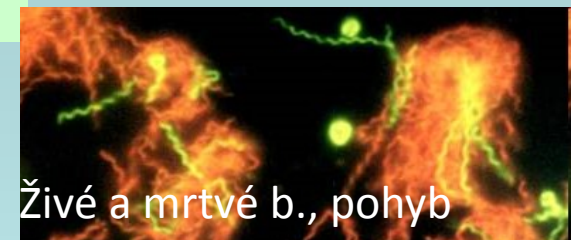


**Cíl mikroskopie? Typ preparátu Typ mikroskopie (typ b. stěny, průkaz struktur, růstového cyklu)**

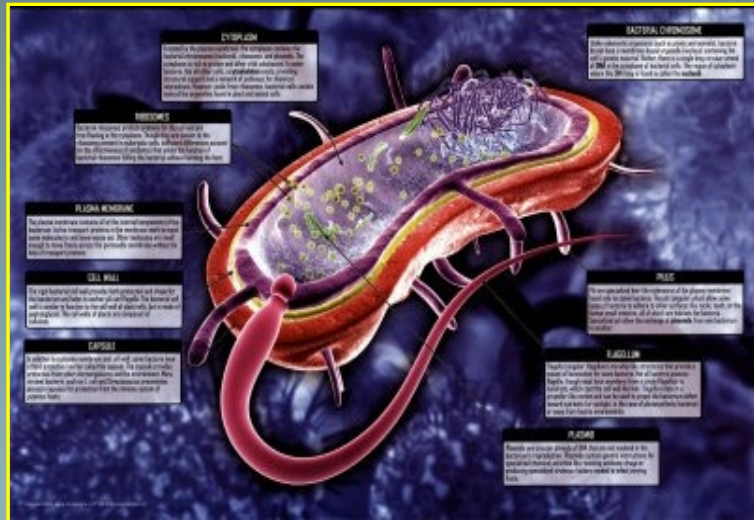


Fixov. prep. – tvar a typ b.

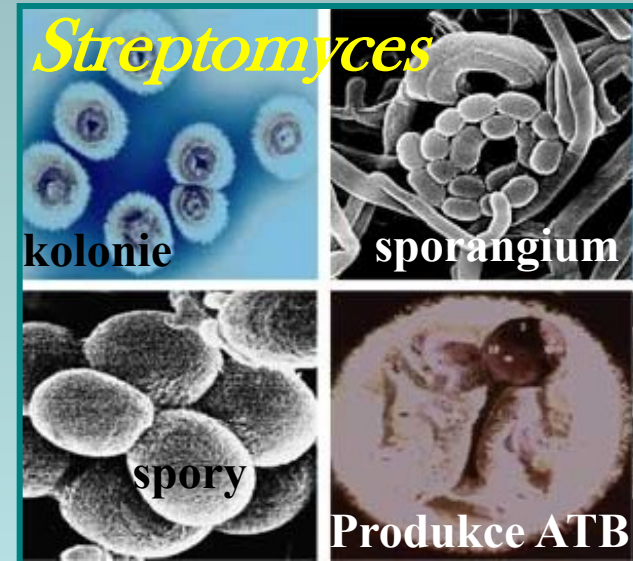
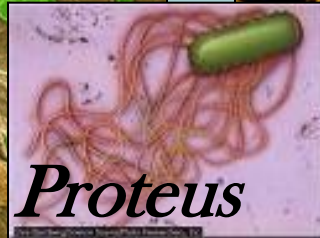
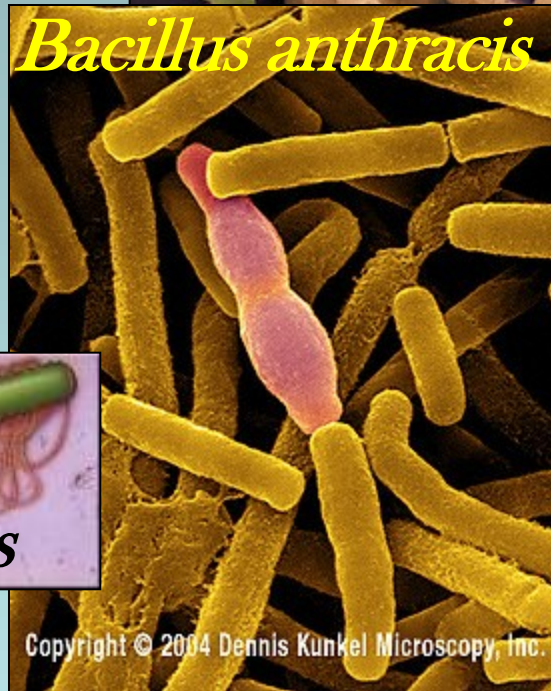
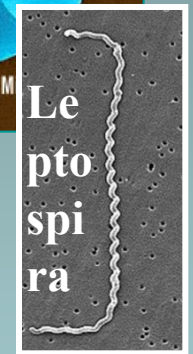
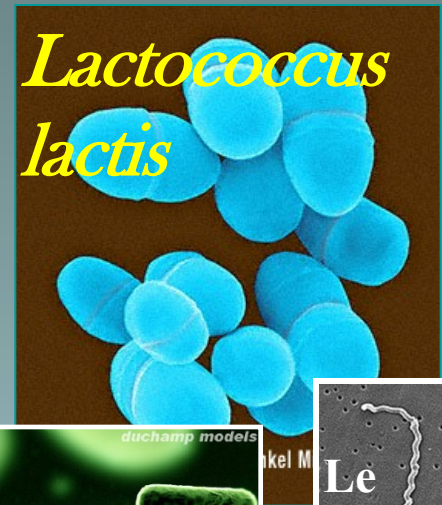
Živý (nativní) preparát bez fixace – vidíme nedeformovaný tvar buňky, spory, morfologii seskupení buněk, pohyb buněk



Živé a mrtvé b., pohyb



Struktury G- buňky



# IV.

## Buněčná stadia

Cytologické a morfologické proměny

Struktury a jejich konformace závisí.....

při dělení buňky



vstup parazitické, patogenní fáze do buňky

(př: remodelace proteinů listerií)

**Od jakých procesů se odvíjí cytologie a morfologie bakteriálních buněk?**

**Prosté binární dělení  
anebo  
přítomnost růstových cyklů?**

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

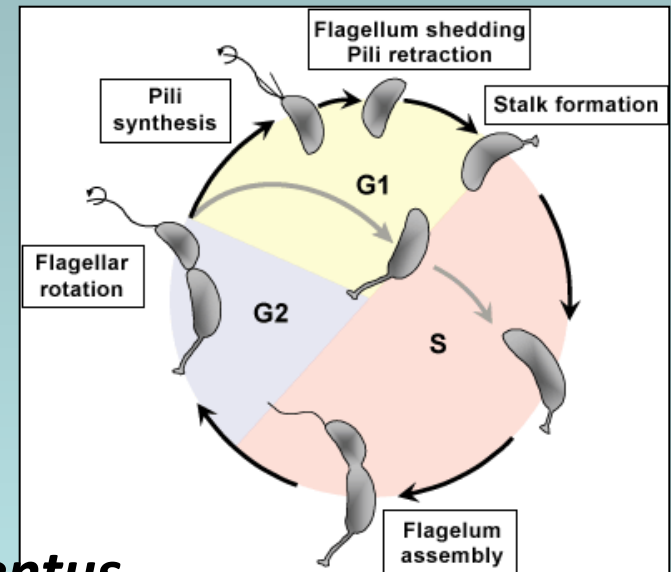
1) Prochází sledovaný druh růstovým cyklem?

- v každém z nich má pak buňka jinou cytologii a morfologii

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

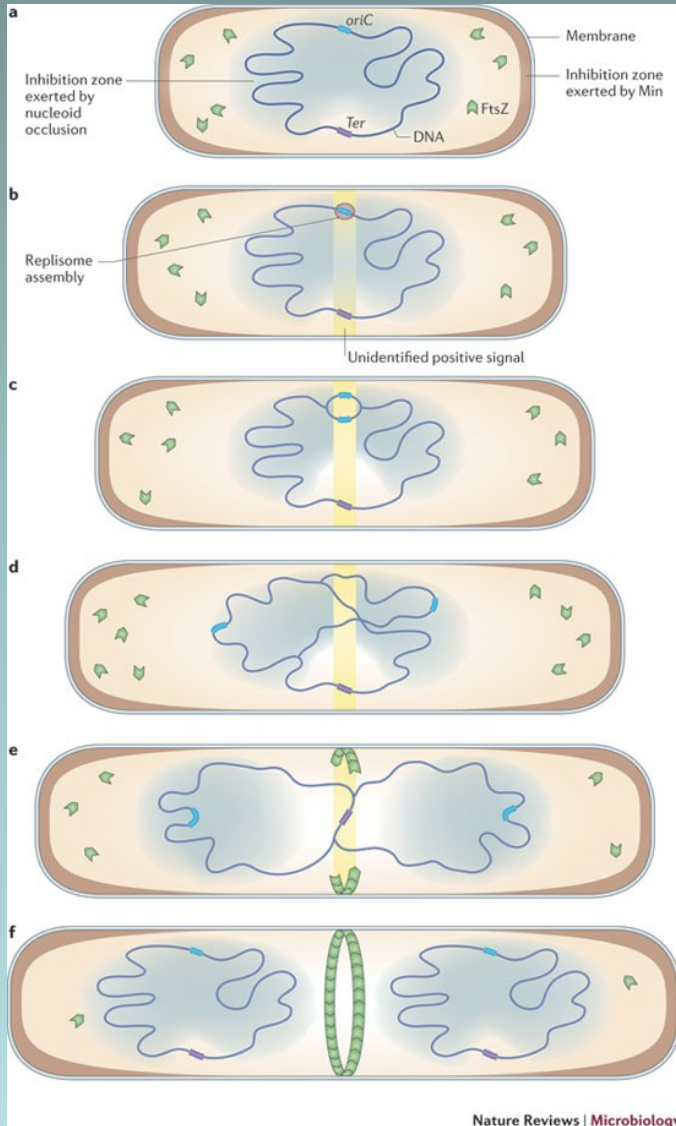
Mění se nejen vzhled buňky, ale buňka v cyklech prochází typickou změnou vnitřních struktur.

**Buněčný cyklus**  
***Caulobacter crescentus***





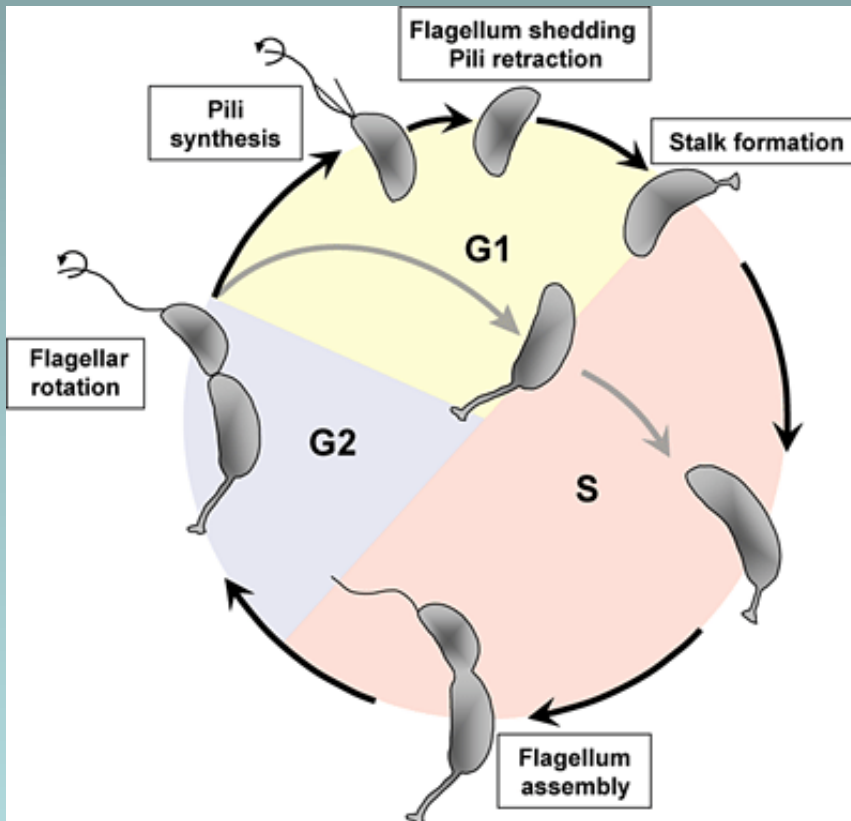
# Binární dělení bakteriálních buněk



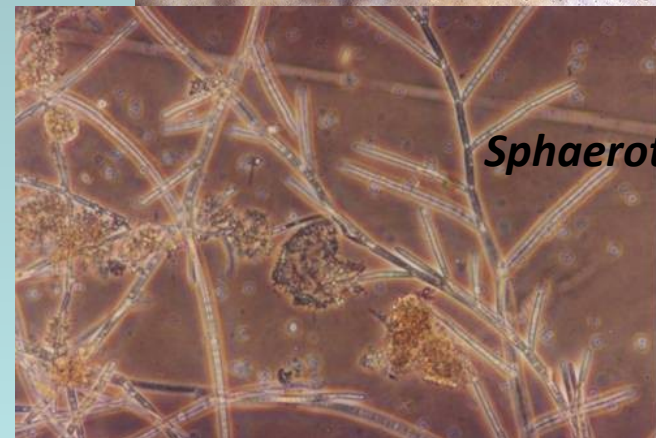
- Funkce bakteriálního cytoskeletu (přepážka, pohyb struktur)
- Ori C
- Zdvojení genetické informace

# Jiné životní cykly než binární dělení

## Střídání přisedlého a volného stadia



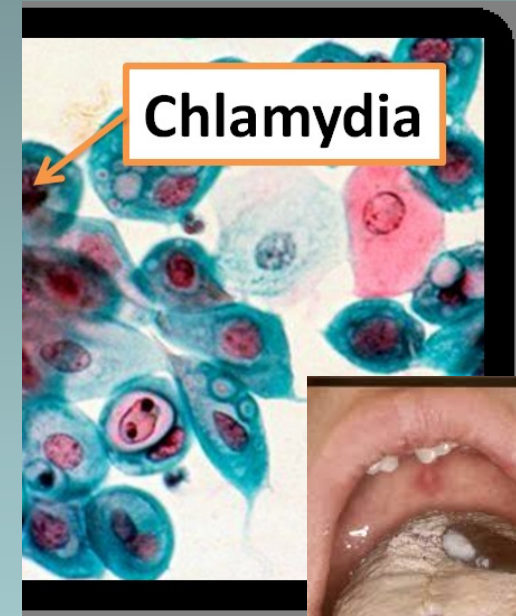
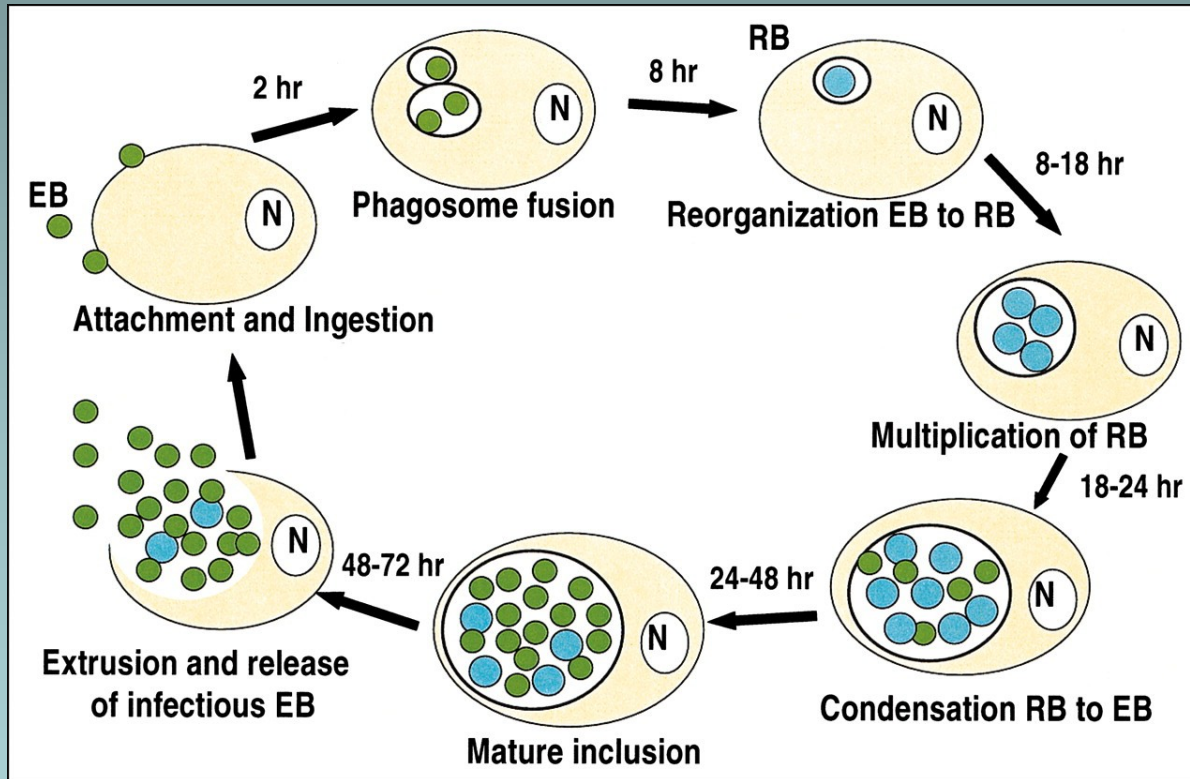
*Caulobacter*



*Sphaerotilus*

# Jiné životní cykly než binární dělení

## Střídání infekčního a reprodukčního stadia



CHLAMYDIA (Reiter's conjunctivitis)

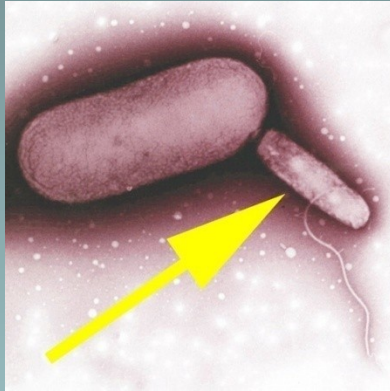


Chlamydial complication  
Reiter's conjunctivitis

Chlamydie – **retikulární** a **infekční** tělíska

# Jiné životní cykly než binární dělení

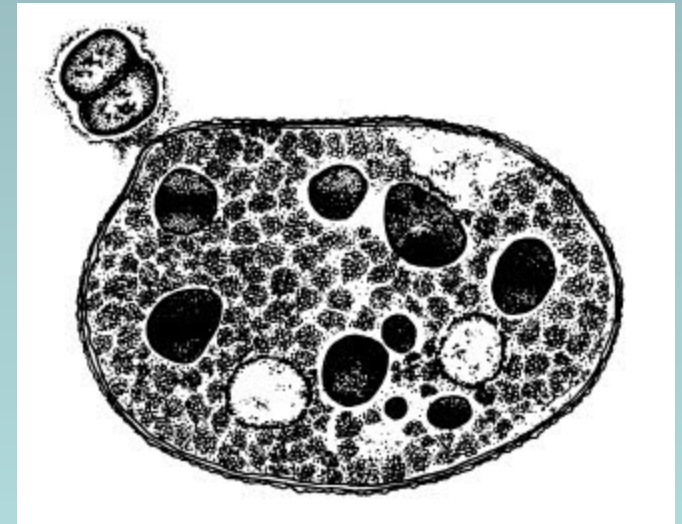
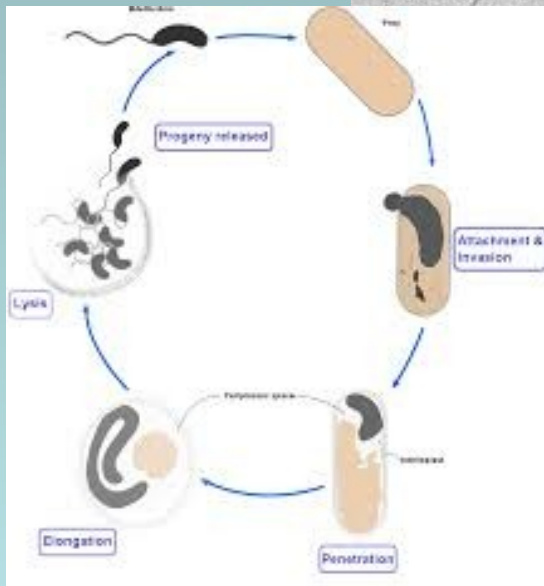
## Parazitické bakterie



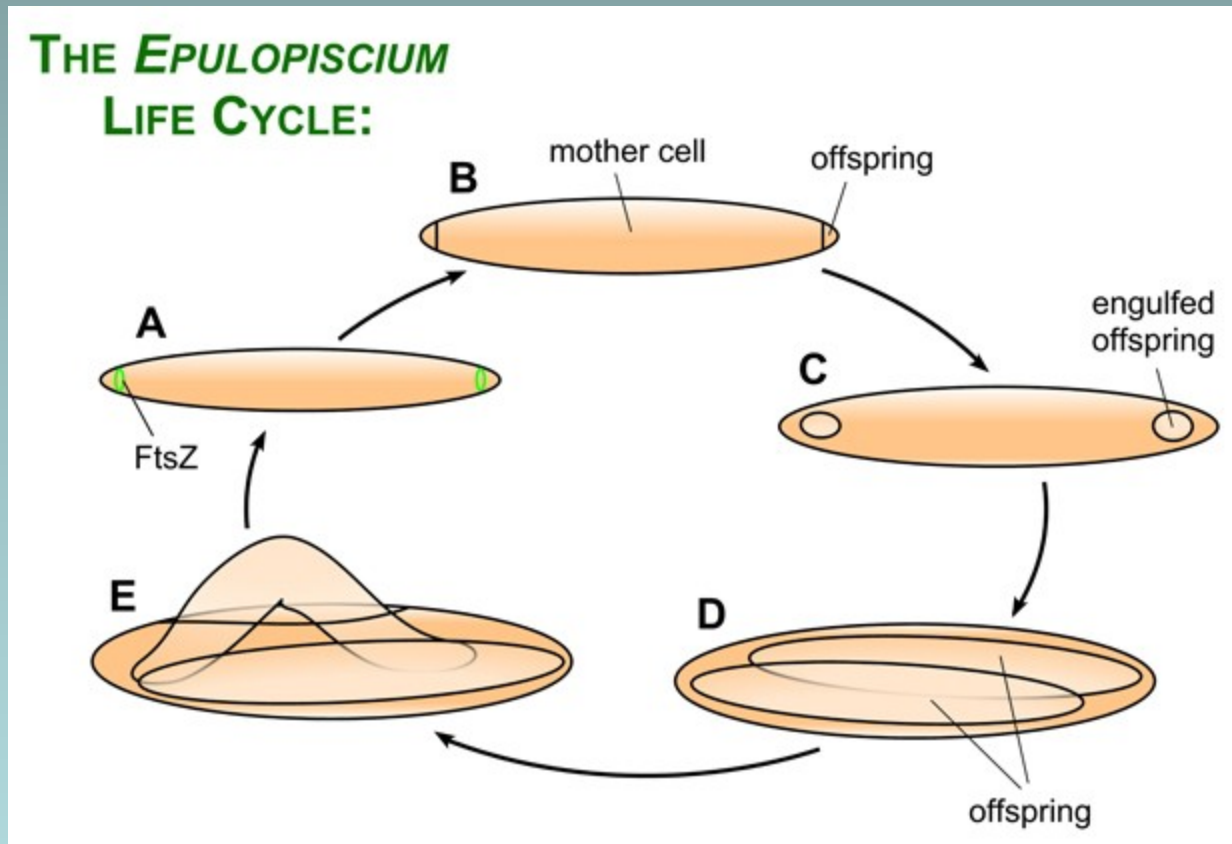
Dravé *Bdellovibrio*

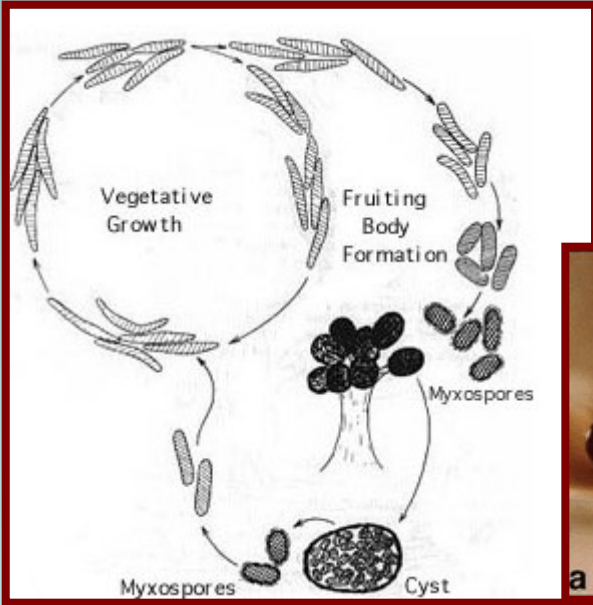
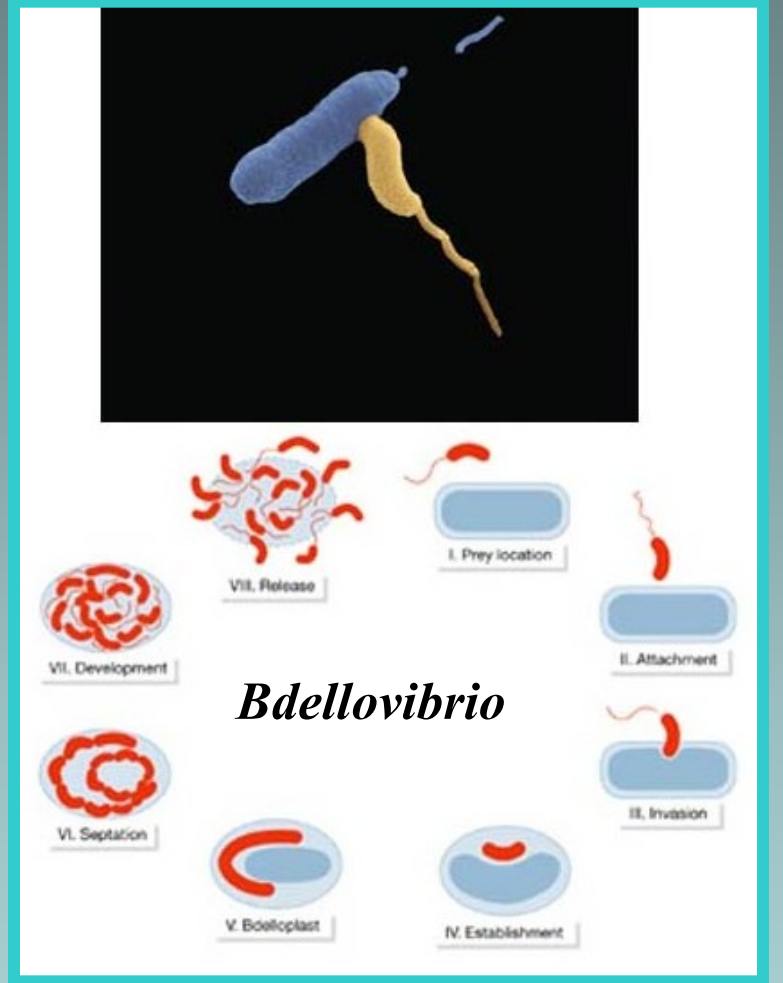
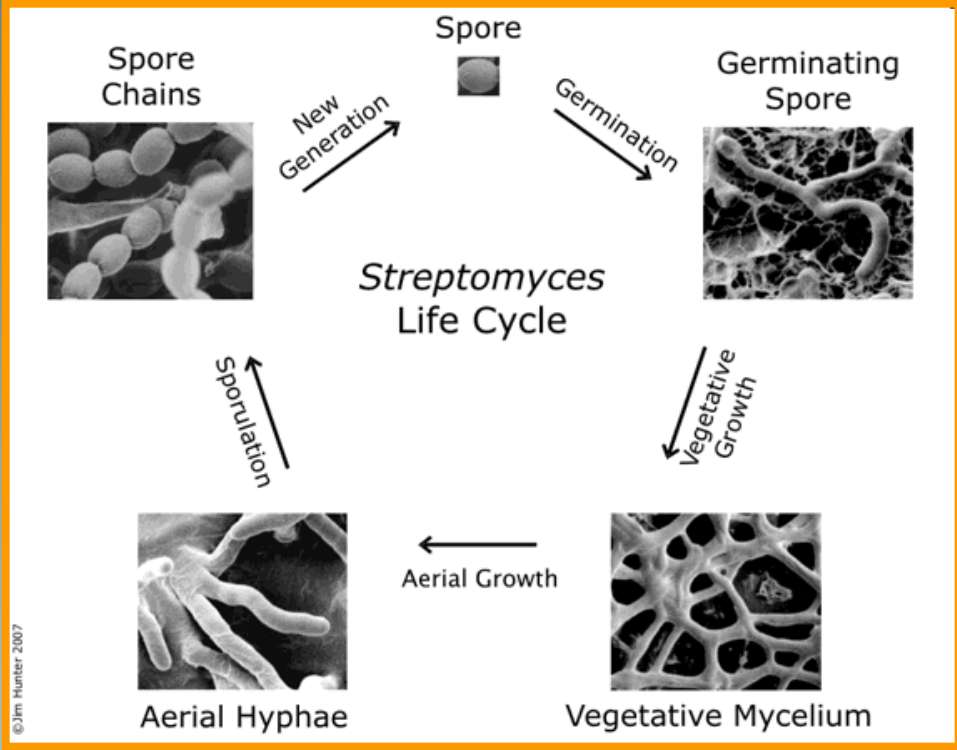


*Vampirococcus*

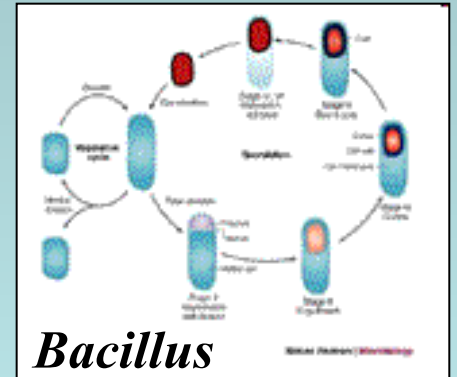
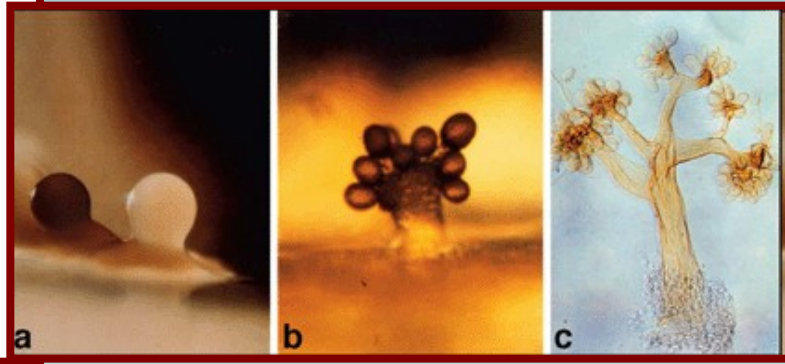


# Jiné životní cykly než binární dělení



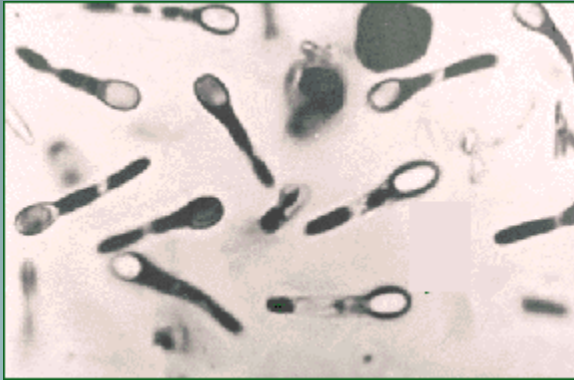


## Myxobakterie

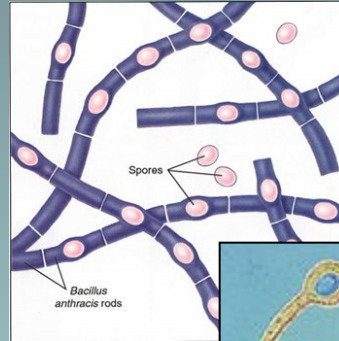


## 2) Vytváří posuzovaný druh endospory?

- v preparátu pak mohou měnit tvar buněk!



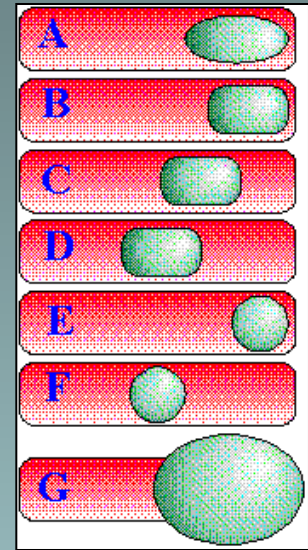
*Clostridium difficile*



*Bacillus anthracis*



*Clostridium tetani*



„Voják umírající na tetanus“

Sir Charles Bell

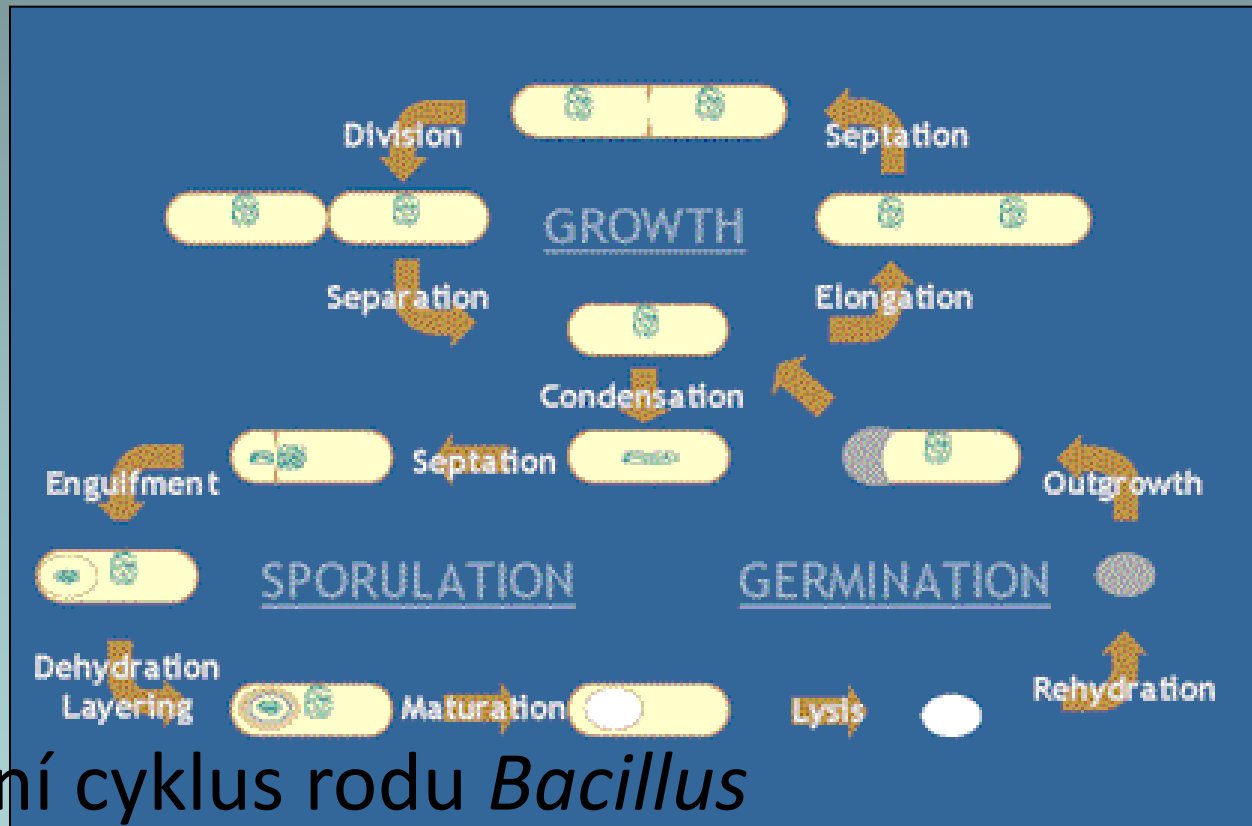
lukovité prohnutí zad (opisthotonus)

křečovitý výraz

Originál je k vidění:

Royal College of Surgeons  
of Edinburgh, Scotland.

# Morfologie buňky uprostřed 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!**



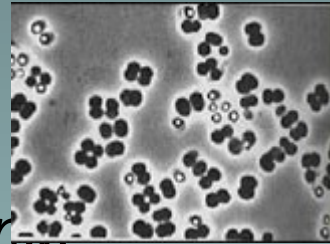
## Endospory vs. exospory

- **G+ bakterie – endospory**

termorezistentní

*Bacillus, Clostridium, Sporosarcina,*

*Sporolactobacillus, Thermoactinomyces*



*Sporosarcina*

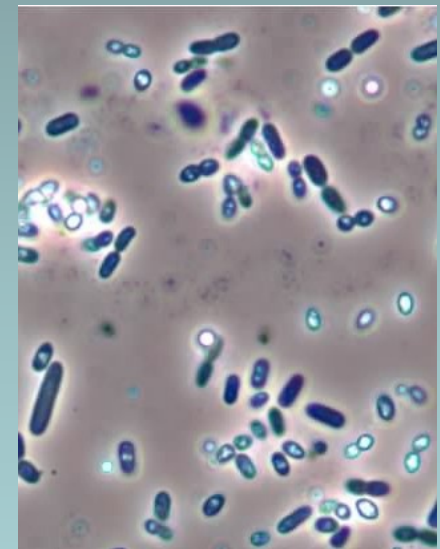
– balíčky 8 buněk

fázový kontrast

- **G- bakterie – exospory**

Méně rezistentní, odolné zejm.vůči vysychání

*Azotobacter, Methylosinus*

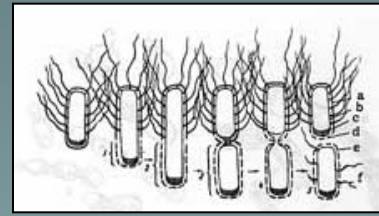


*Azotobacter*

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

- **Konidie**: Actinobacteria

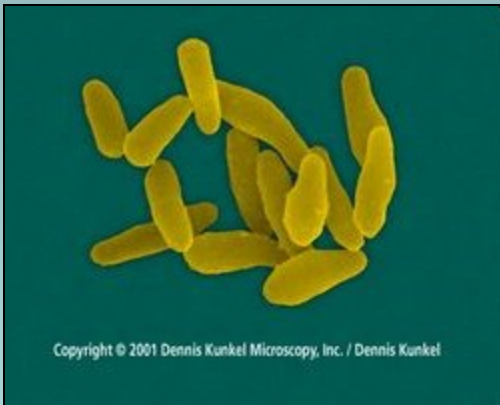
3) Stárnutím mění buňky tvar



4) Závislost tvaru buňky na vnějším prostředí

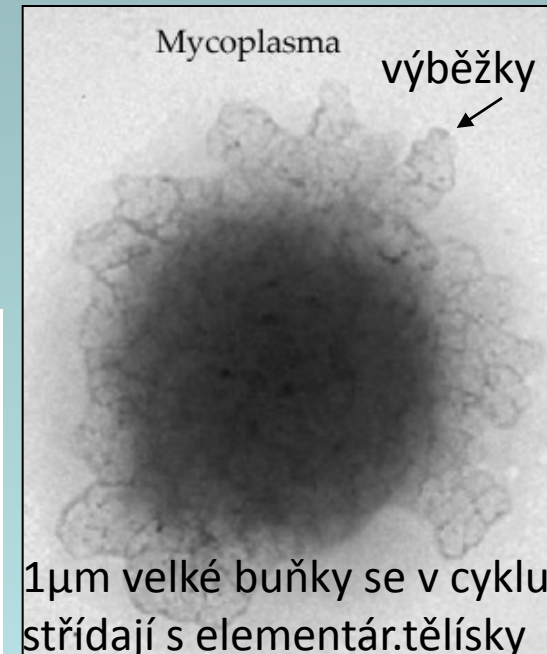
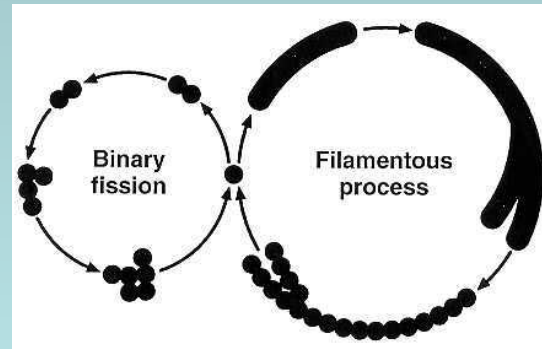
- živiny, tlak, osmolarita...

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



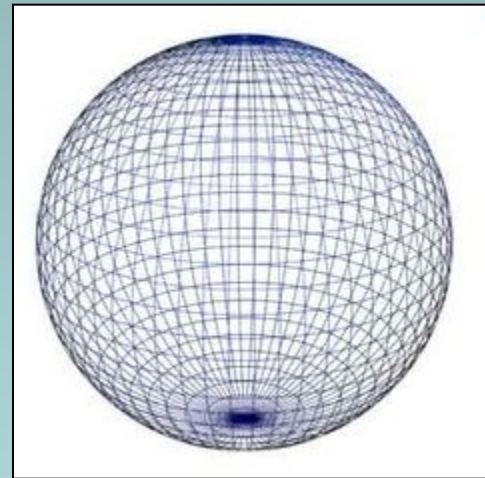
*Corynebacterium*

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)
- 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

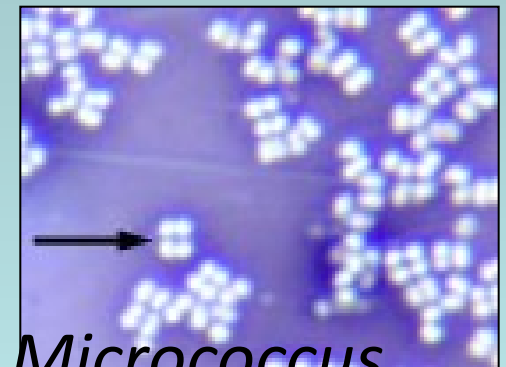
*Staphylococcus*



*Strepto*



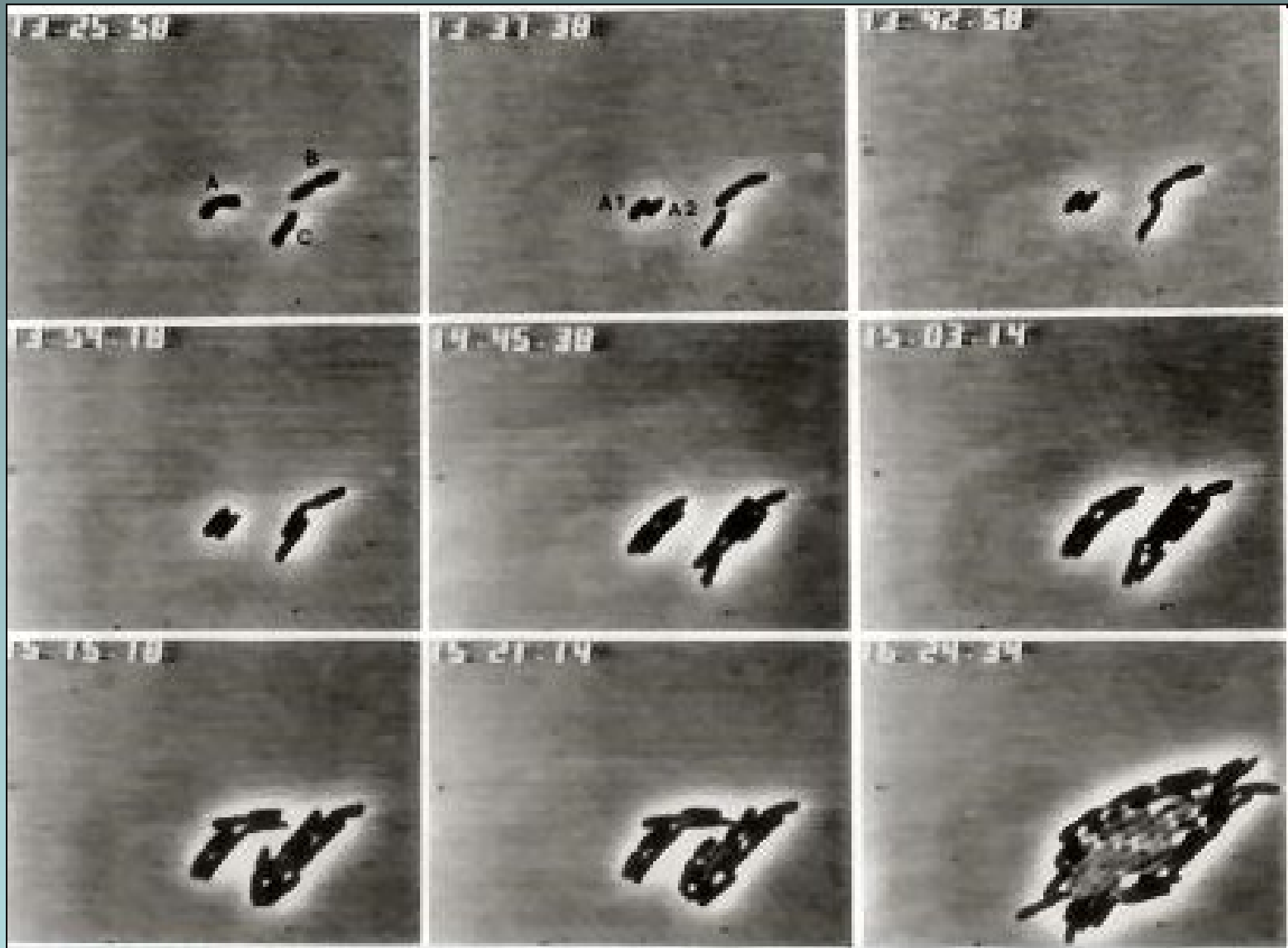
*Bacillus*



*Micrococcus*



*Staphyloc*



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

# Morfologie bakt. kolonií

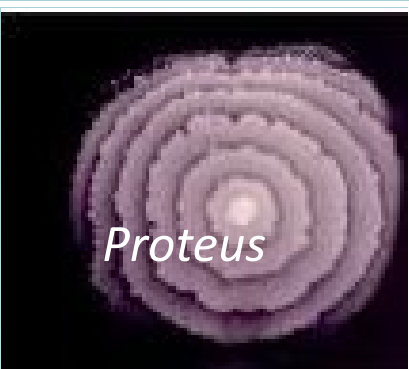
- potřeba zvážit typ media, na kterém kolonie hodnotíme!  
kultivace - zda vůbec kultivovatelné?? - sledování typu kolonií
- stáří kultury

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*)

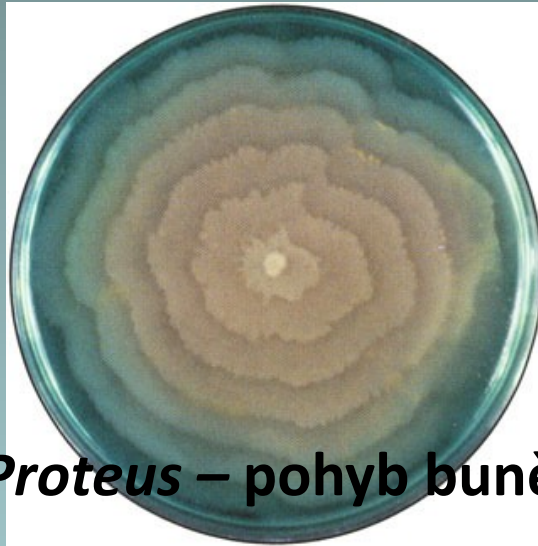


# Morfologie bakteriálních kolonií

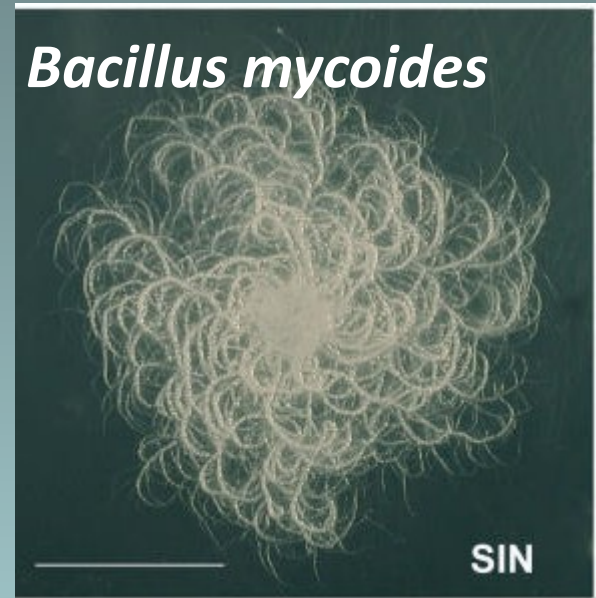
## I. na základních půdách



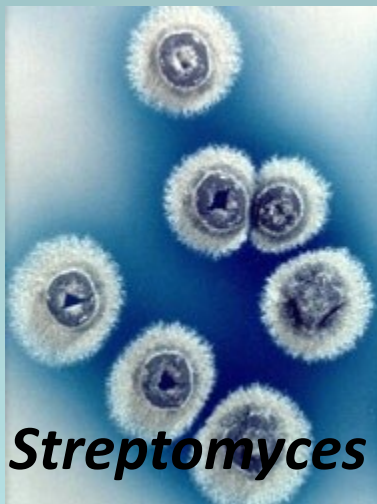
*Nocardia*



*Proteus* – pohyb buněk



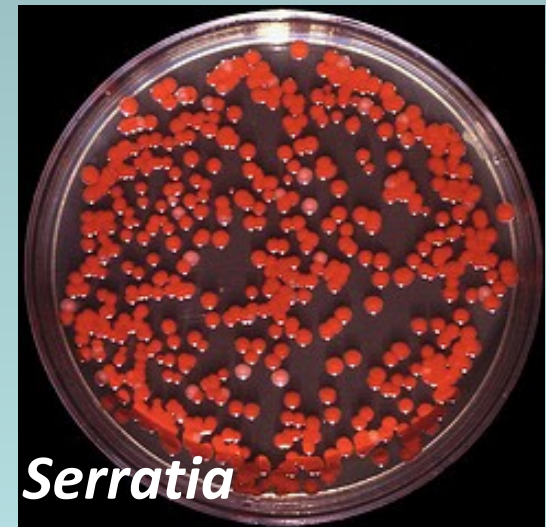
*Bacillus mycooides*



*Streptomyces*



*Streptomyces*



*Serratia marcescens*

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

Bakteriální kolonie na  
II. diagnost. půdách



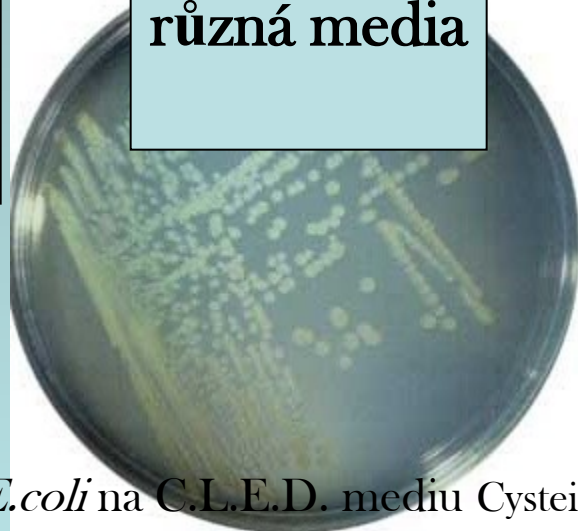
Jeden druh  
bakterie  
různá media



*E.coli* na krevním agaru



*E.coli* na MacConkey agaru



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

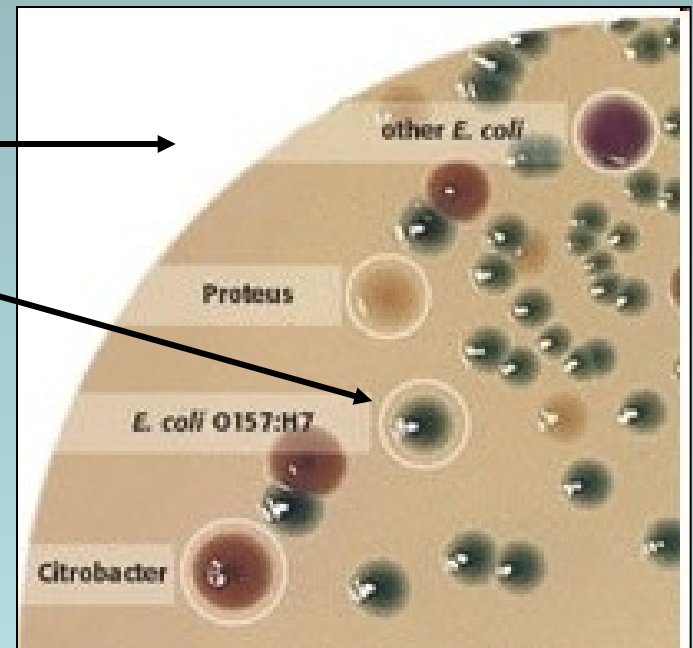




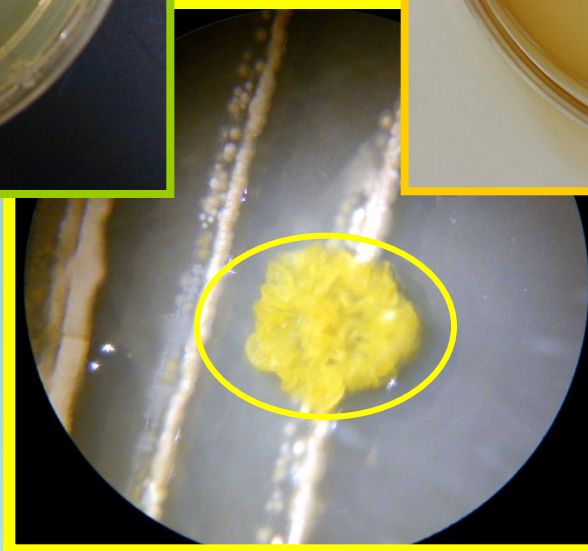
## Bakteriální kolonie na III. selektivních půdách

**O157:H7 ID Agar**

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



# Kontaminace na misce!



Děkuji za pozornost 😊

# Sylabus cvičení

## Mikroskopické a makroskopické znaky; cytologie

- 1) práce s čistými sbírkovými a smíšenými kulturami (izoláty) 26.9. v 9 h
  - a) práce s čistými sbírkovými kulturami
    - mikroskopické techniky (jasné pole, fázový kontrast), preparát dle Grama a preparát nativní, porovnávání kultur, křížový roztěr, makrofoto, program na analýzu obrazu NIS
  - b) izoláty - zaočkování vlastní mikroflory
- 2) Práce se a) smíšenými kulturami – pozorování mikroflory v preparátu
  - b) acidorezistentní vs. Gramovo barvení
- 3) Morfologie sporulujících buněk (*Bacillus*; vliv media a délky kultivace), morfologie buněk vytvářejících cysty (*Azotobacter*)
- 4) Vnitřní a vnější struktury
  - inkluze – *Bacillus*, kvasinka (glykogen, lipidy, ..)
  - bičíky – makroskopické znaky růstu bičíkatých kultury: založení kultivace v polotekutém mediu (miska i zkumavka) – *Proteus*, *Bacillus*, *E.coli*
- 5) Příprava sklíčkových kultur – skupina *Actinomyces*
- 6) Pozorování sklíčkových kultur

# 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 otevírat co nejméně  
a po práci správně zavřít

Nemluvit při očkování mikroorganismů

Sterilní práce - žihání kličky v plameni kahanu..

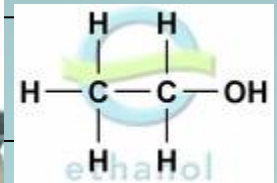
!!



:



případně



ethanol

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

