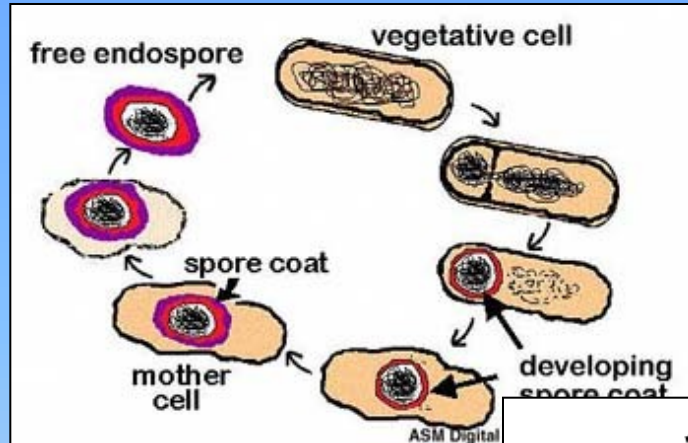
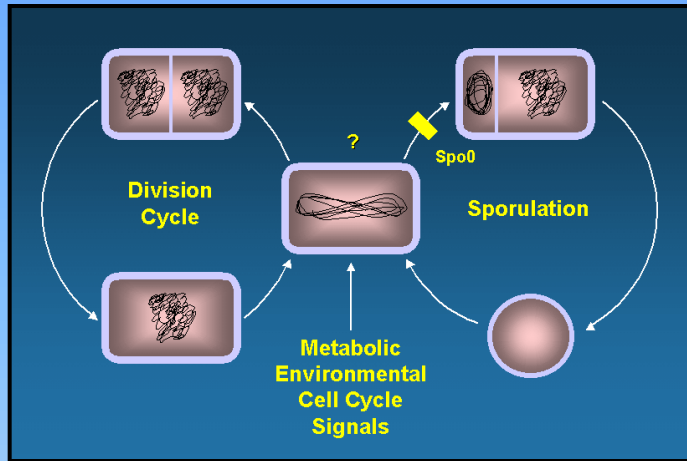
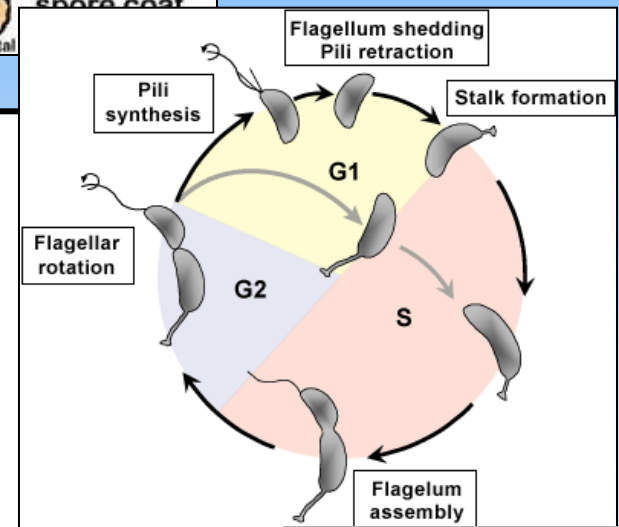


Růstové cykly bakterií



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*



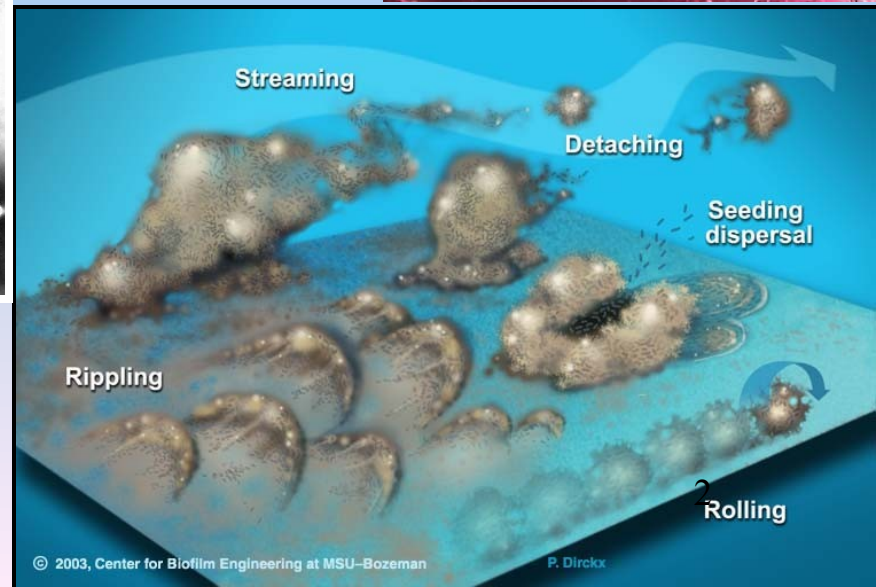
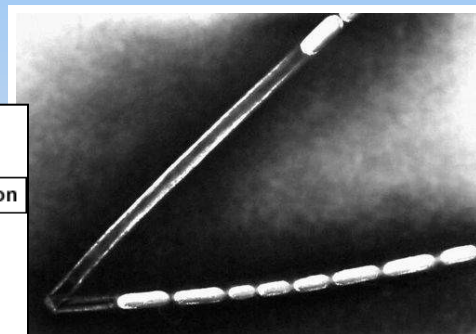
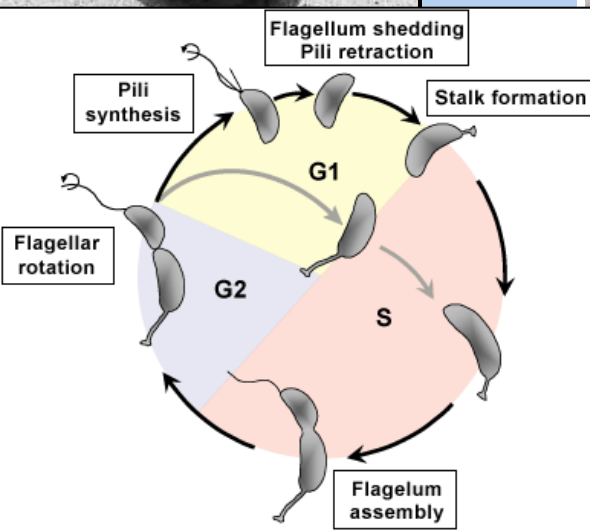
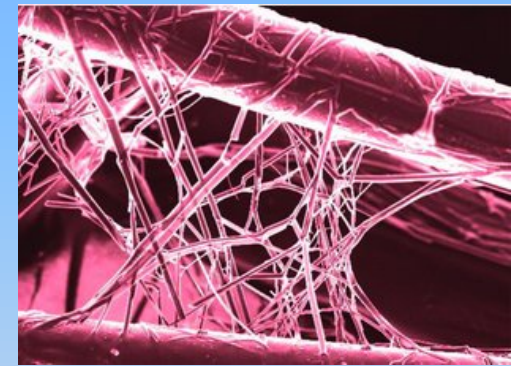
Buněčný cyklus
*Caulobacter
crescentus*

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

Early structure

Aggregate migration

Attachment

Single cells

© 2003, Center for Biofilm Engineering at MSU-Bozeman

Biofilms Impact . . .

Cooling Water



Food Processing



Teeth



Oil Recovery

Ship Hulls



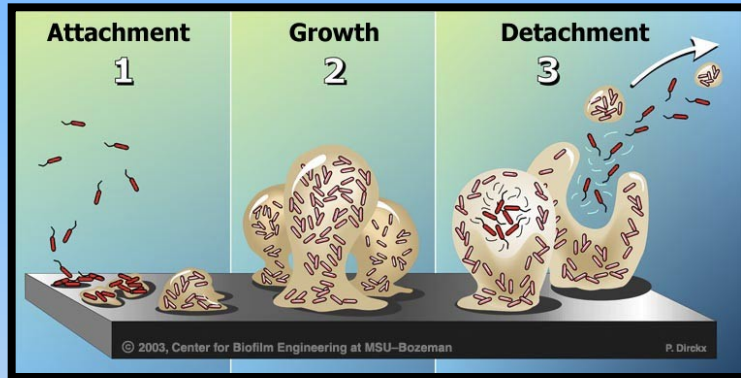
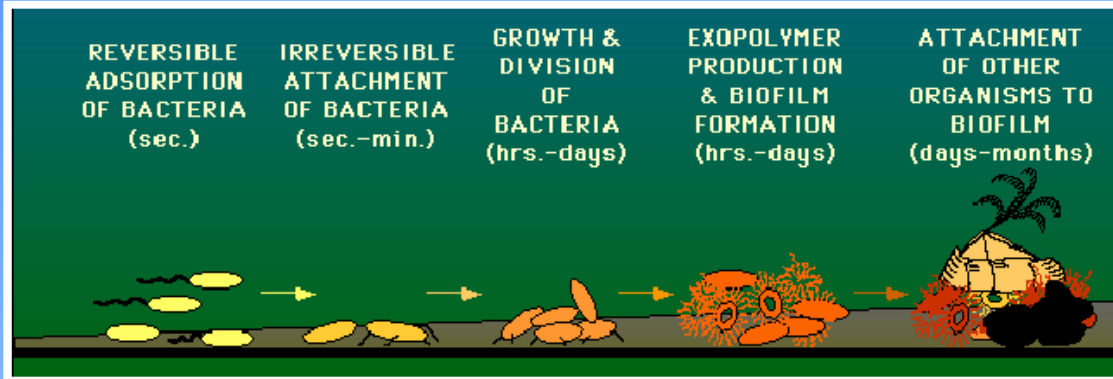
Drinking Water

Paper Manufacturing

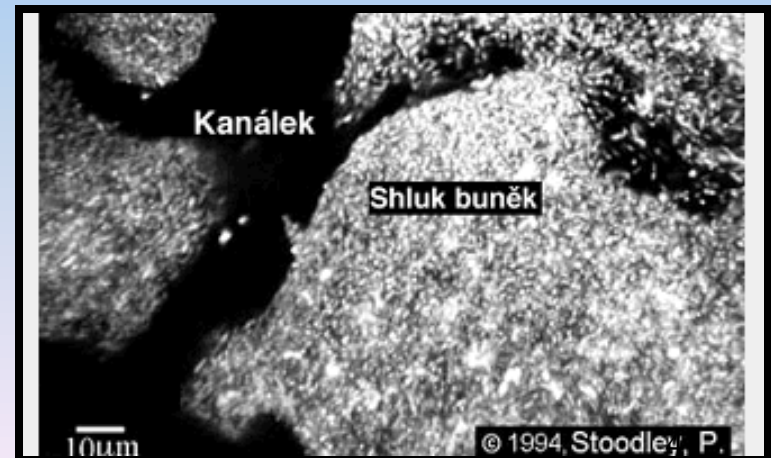
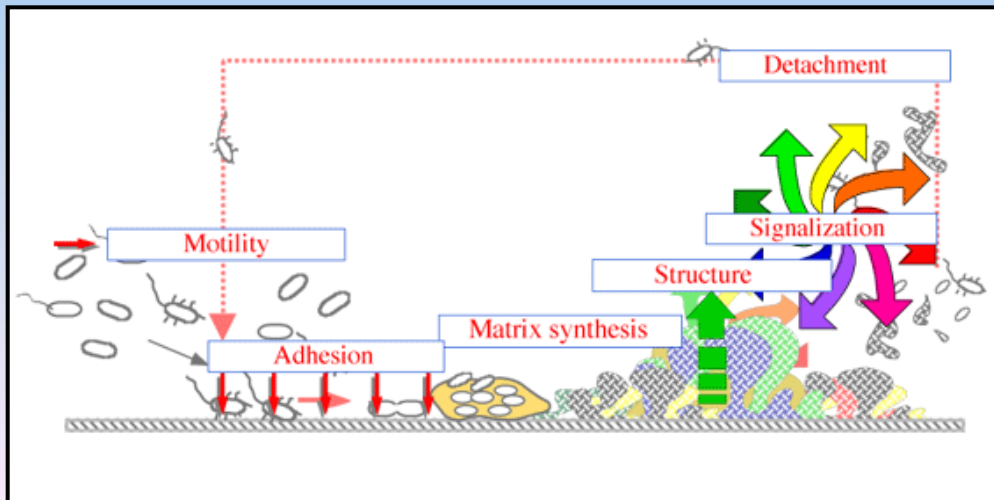


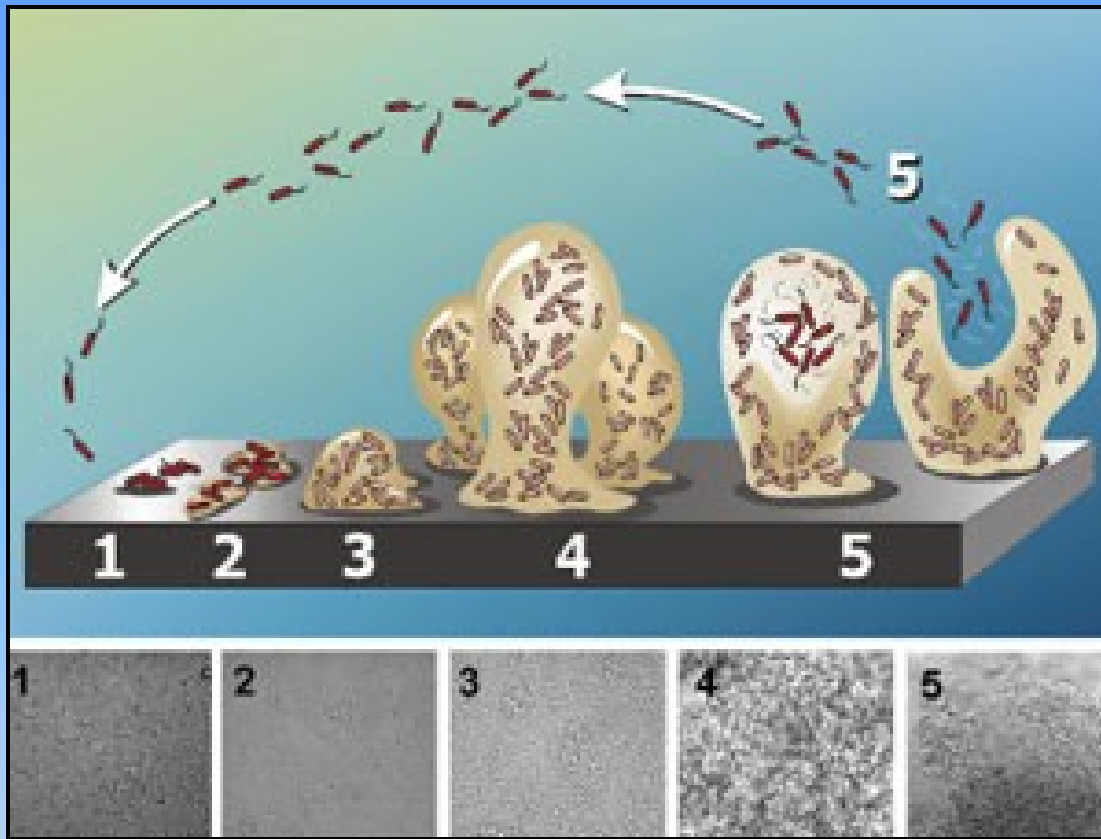
Medical Implants

Vodní prostředí pevné povrchy



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





Složky biofilmu:

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

- Jednodruhový
- Vícedruhový

Biofilm / mikrokolonie:

volně plovoucí (planktonické) buňky usazené (na **vhodném povrchu**) v **matrix z polysacharidů** formující „hřibovité“ útvary s dutinkami, kanálky a stopkami.

Je zodpovědný za 65% onemocnění západního světa.

- Charakterizace mikrobiální fyziologie:
 - planktonní buňky nebo buňky biofilmu?
- 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)

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

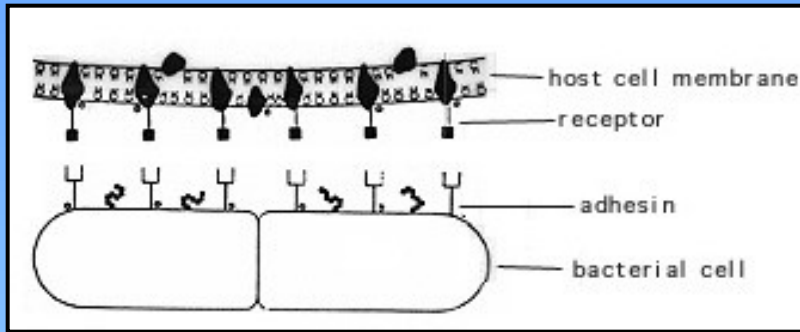
- **Síťovina** z polymeru - **hexagonální stěny kanálků, 150 nm**
- Kanálky vznikají z **plochých struktur** v **periodických vzdálenostech**
- Na periferii tvoří buňky kompaktní **závoje** - tlumí stříhové síly
- Funkce síťoviny: lešení, asi i přenos signálu a ukazatel směru posunu
- Popsány i struktury **vlákének** spojujících jednotlivá místa sítky

Zatím nezodpovězené otázky: jakto, že ne seskupení amorfní kapky?

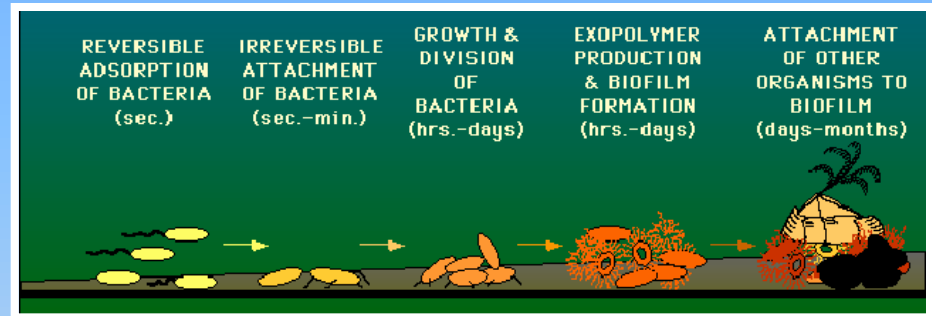
Jak to, že se řadí v pravidelných intervalech?

Co bakterie zastaví po dosažení 150ti nm tloušťky stěny?

Jak biofilm vzniká..



Přilnutí:
adheziny (GP nebo PS)



Změna **fenotypu**

Produkce PS

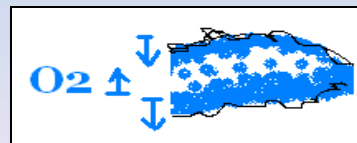
Lešení

Mikrokolonie a kanálky

Impulsy (buňky detekující hustotu populace - *quorum sensing*)

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

Koexistence
aerobů a anaerobů.



V různých vrstvách různý náboj

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

Vlastnosti a změny buněk při vzniku biofilmu

- **Přilnutí:**

- **spouští** se řada genů

- uplatňují se **bičíky**

- u G- bakterií **fimbrie** (=pili)

- některé salmonely a *E. coli*

- zvl. typ fimbrií z **amyloidu**: *curli*

- (význam při studiu patogeneze u Alzheimerovy choroby)

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
- **Irreverzibilní** – chemická vazba (kovalentní, vodíková)
 - přítomnost extracelulárních polymerů

Změna fenotypu - ustává syntéza bičíků, mukózní látky

Spouštěcí podněty:

- Osmotický tlak
- Snížený obsah kyslíku
- Rostoucí hustota poulace - **quorum sensing**
např: acyl-homoserin lakton (G-), malé peptidy (G+)

- **Po přichycení změna vlastností:**
 - zprvu na úrovni regulace genů
 - 1/3 bílkovin se produkuje v rozdílném poměru
 - 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

Pseudomonas aeruginosa fáze vzniku biofilmu

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



Ireverzibilní přilnutí: reorientace buněk, shlukování, ztráta pohyblivosti
aktivace regulonu **quorum sensing**



Maturace I: buněčné shluky silnější, aktivován *rhl* quorum sensing system



Maturace II: buněčné shluky dosahují maximální tloušťky



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

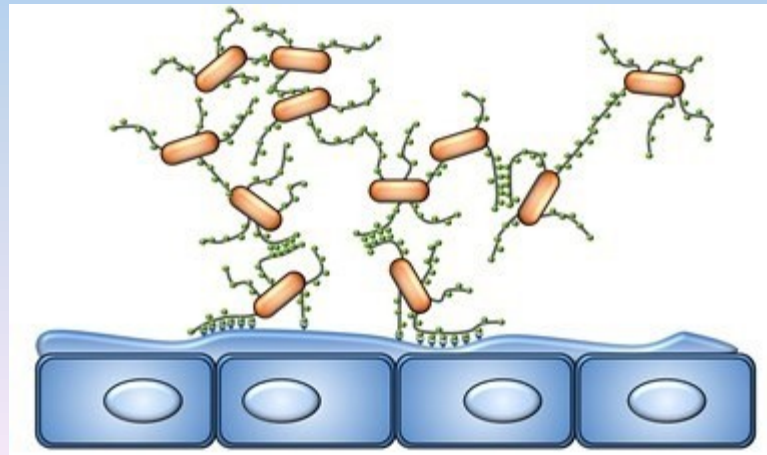
Fáze vzniku biofilmu: přilnutí k povrchu

Buněčné povrchy vs povrchy podkladu

Buněčný náboj

Adheze buňky

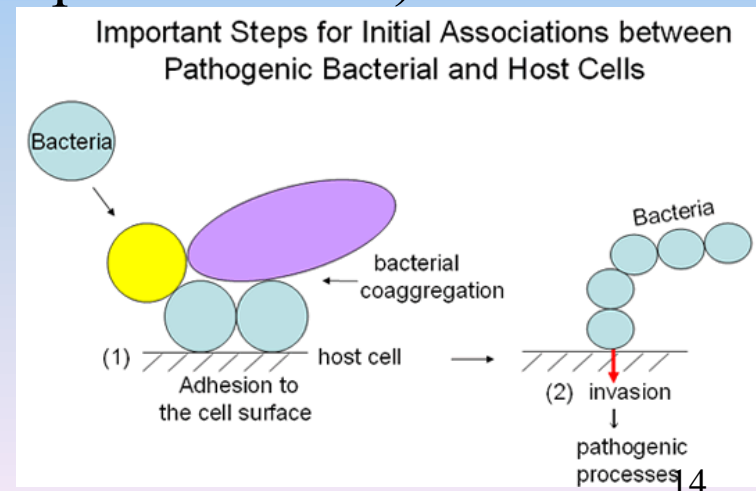
Souvislost mezi cytologickými znaky a proměnlivými formami existence buňky – v závislosti na kontaktu, receptorech, substrátu, prostředí...



Fáze vzniku biofilmu: přilnutí k povrchu

Adheze bakterií

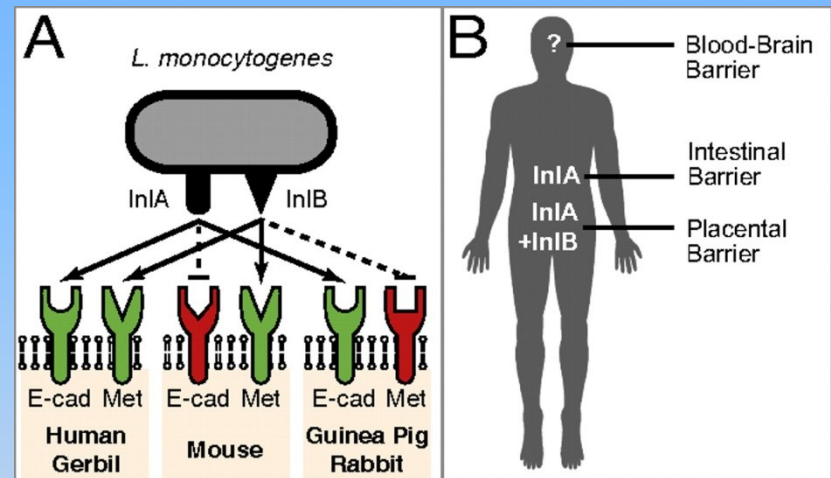
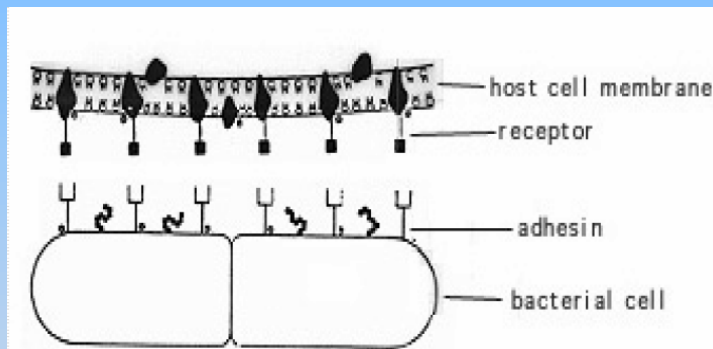
- **Interakce s povrchy** – biotickými i abiotickými
- Bakterie evolučně úspěšné – kolonizují všechny niky...
- Research topic (pubmed 120-200 publikací/rok)
- Jeden z **faktorů virulence**



Fáze vzniku biofilmu: přilnutí k povrchu

Adheze bakterií a indukce cytologických změn

- „surface sensing“;
ne všechny buňky na všechny povrchy



- **Roli hrají:**
 - vhodné receptory a kompatibilita s cílovou molekulou (*C. diphtheriae* epitel hrdla; *S. salivarius* – zub, chlopně...)
 - vznik ireverzibilní vazby s povrchem/mlk
 - hydrofobicita buněčného povrchu (hydrofobní MO formují biofilmy)
- Interakce buňky s povrchem indukuje **změnu exprese genů** buněčné morfologie, motility a adheze

Fáze vzniku biofilmu: přilnutí k povrchu

- Prostřednictvím: pilli, povrchových proteinů, kapsul a slizů
- „surface sensing“ --- swarming --- reverzibilní vazby (hydrostatické, elektrostatické) --- irreverzibilní vazby; specializace
- Inhibice adherence
 - izolované adheziny nebo molekuly receptorů
 - analogy receptorů nebo adhezinů
 - enzymy nebo chem. l. specificky ničící adheziny/ receptory
 - protilátky povrchově specifické
- Výhody:
 - substrát zdroj živin/iontů/... – přenos pilli/OMP
(Př. *Shewanella* – ionty kovů Fe, Mg – term.akcept. při respir)
 - biofilm – laterál. výměna genů, lipidů
 - vyšší rezistence (spuštění genů...)

Fáze vzniku biofilmu: Quorum – sensing

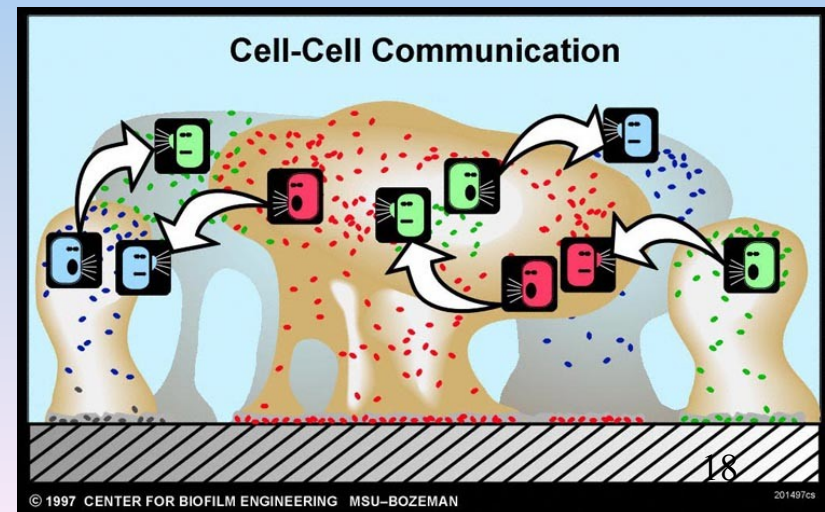
Signalizace mezi buňkami podmíněná jejich koncentrací.

Integrace signálů z prostředí - předávány buněčnými transdukčními mechanismy.

- Koordinace 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

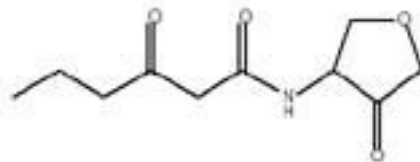
- Soustava **malých organických molekul**, které jsou buňkou tvořeny v závislosti na koncentraci jich samotných v prostředí
- Buňka tak reaguje na **hustotu populace**
- Kaskáda reakcí po vazbě na receptor spouští syntézu sekundárních metabolitů a komunikaci v rámci bakt. společenstva
- **Vnitrodruhová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



Quorum – sensing - regulace luminiscence u *Vibrio fischeri*



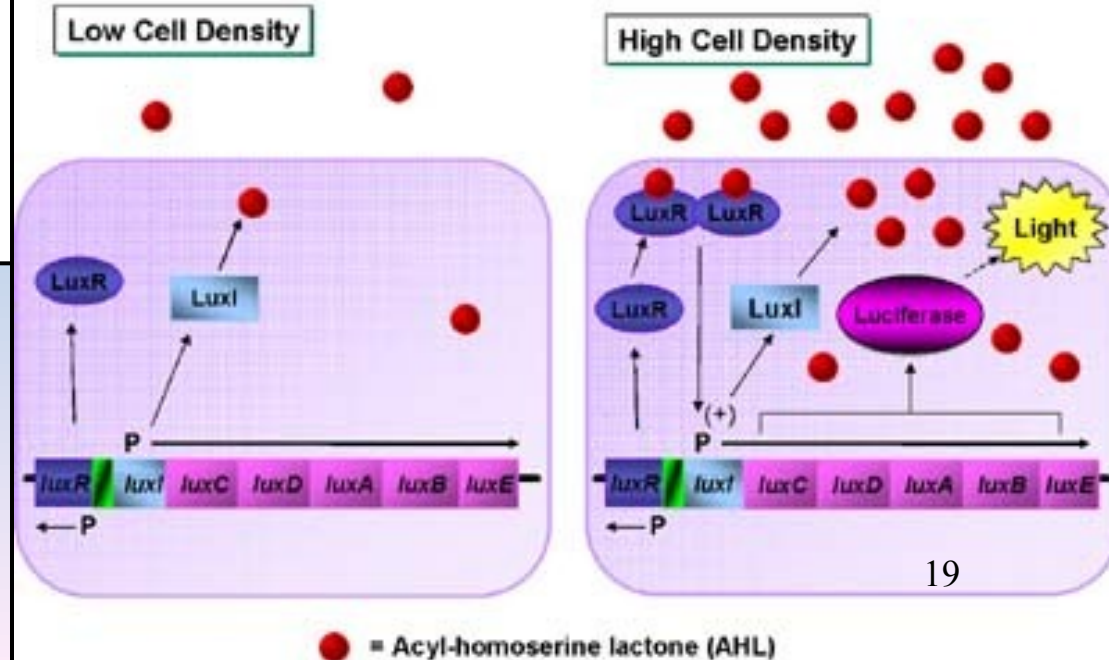
Quorum sensing was first discovered in the 1970s in the marine luminescent bacterium *Vibrio fischeri*, a facultative symbiont of marine animals (such as *Euprymna scolopes*)



3-Oxo-hexanoyl homoserine lactone (3OC6HSL or AHL) 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 energeticky náročný.

Quorum Sensing



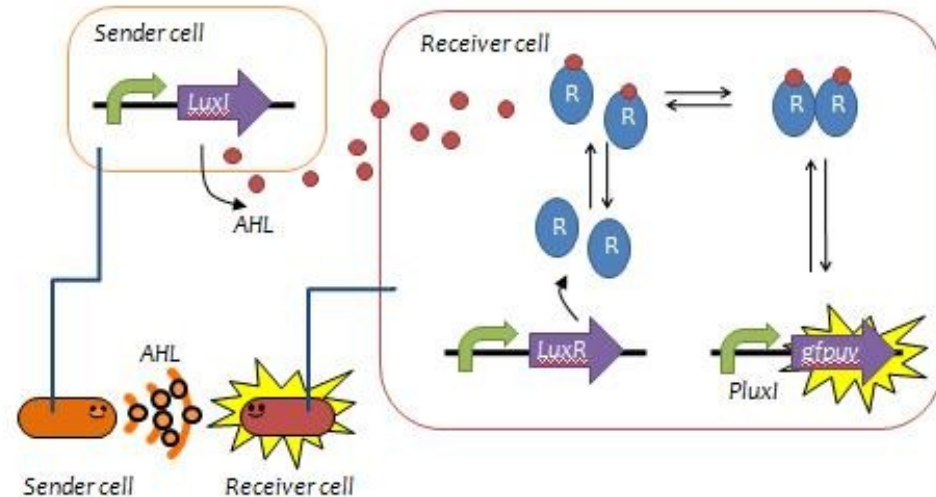
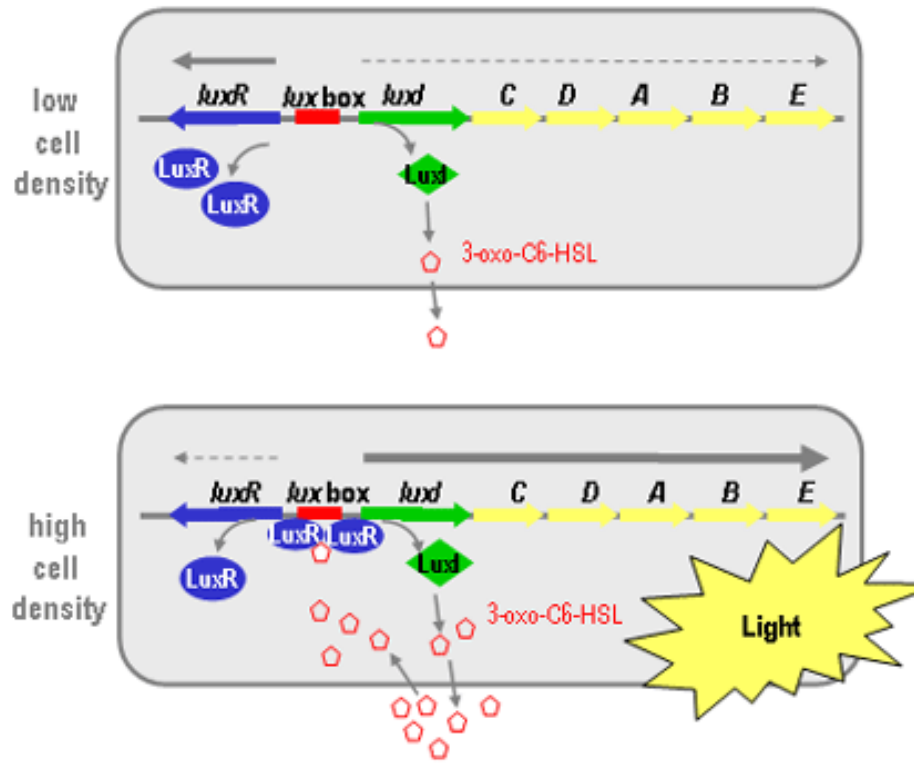
Quorum – sensing = cell/cell signaling

- Extracelulární molekuly – regulace transkripce operonů
- Výzkum – *Vibrio fischeri* – model QS systémů

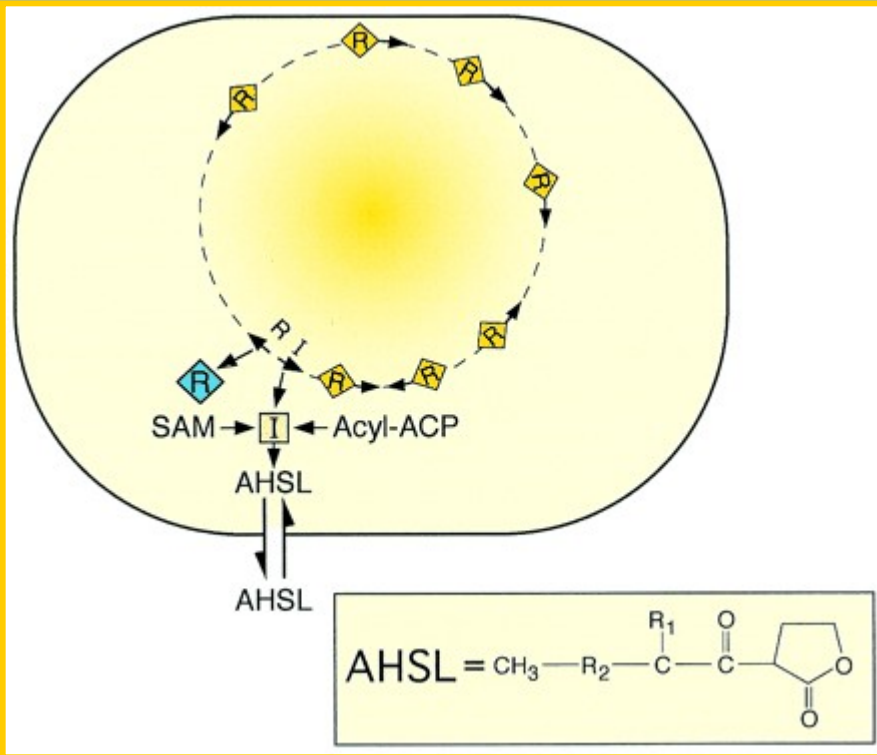
světélkování orgánů jen při určité hustotě buněk

akumulace *N-3-oxohexanoyl-homoserinlaktonu* (1981)

- tato mlk reguluje i syntézu jiných látek – ATB, elastáza, hemolysiny, rhamnolipidy...



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

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

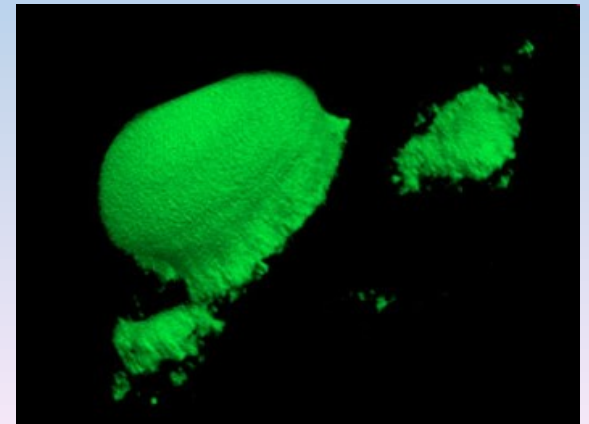
- Žluté diamanty v kruhu: LuxR homology aktivované HSL signálem – jeho difuze do a ven z b.
- Šipky: *qsc* genes.
- Substrát pro HSL syntázu je acetylovaný acyl-karyl protein (Acyl-ACP) a S-adenosylmethionine (SAM).

Signální molekuly

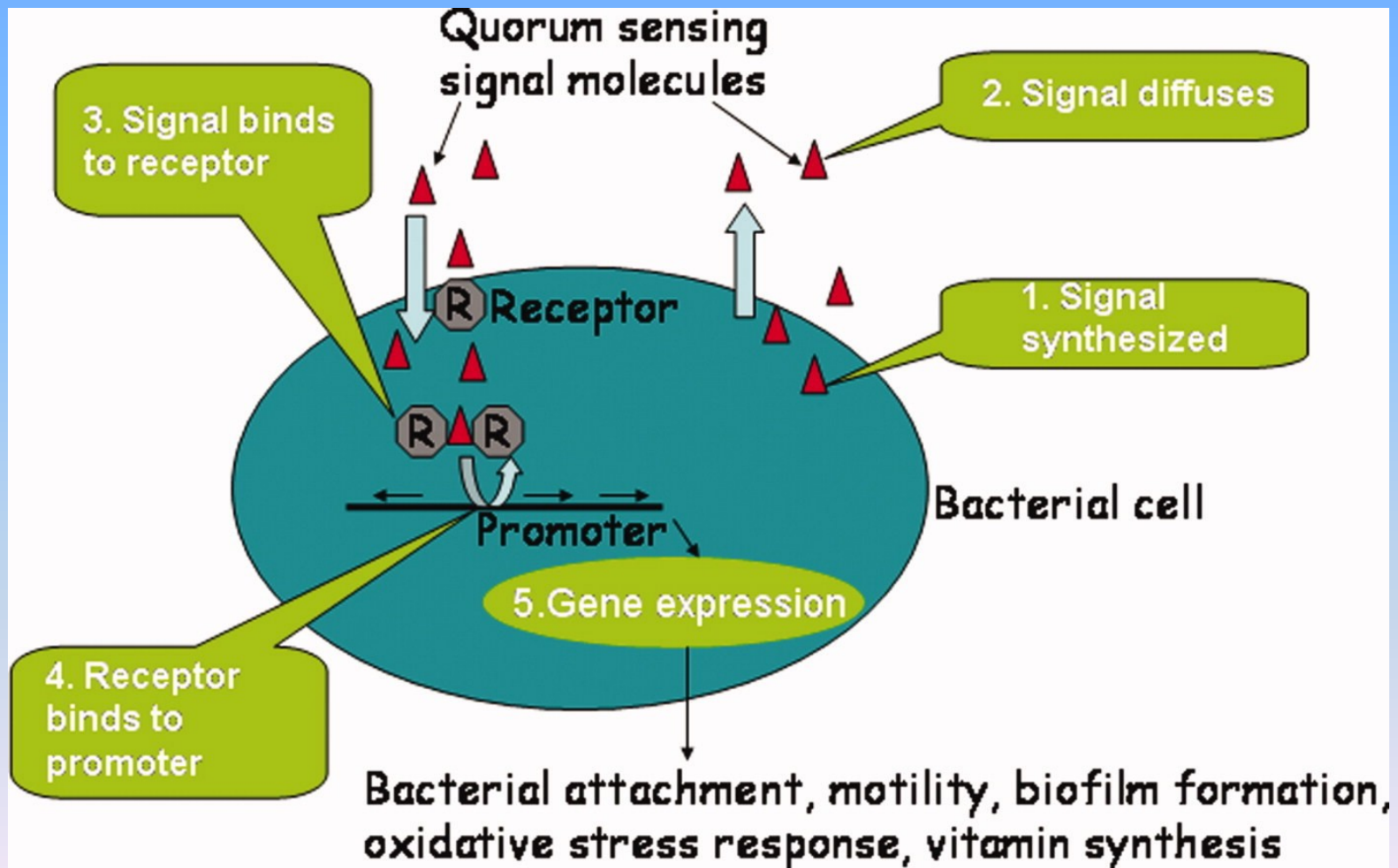
- 1 druh **více než 1 QS**
- **Fenotypy** – bioluminiscence, synt.enzymů, virulence, ATB, konjug.přenos plazmidu...
- Příklad: *P.aeruginosa*, *A. hydrophila*...
- Farmacie – snaha vyvíjet blokátory QS

- QS mezi druhy – „cross talk“
- QS a biofilm – accessory gene regulator = agr fenotyp (ovlivňuje patogenezi)

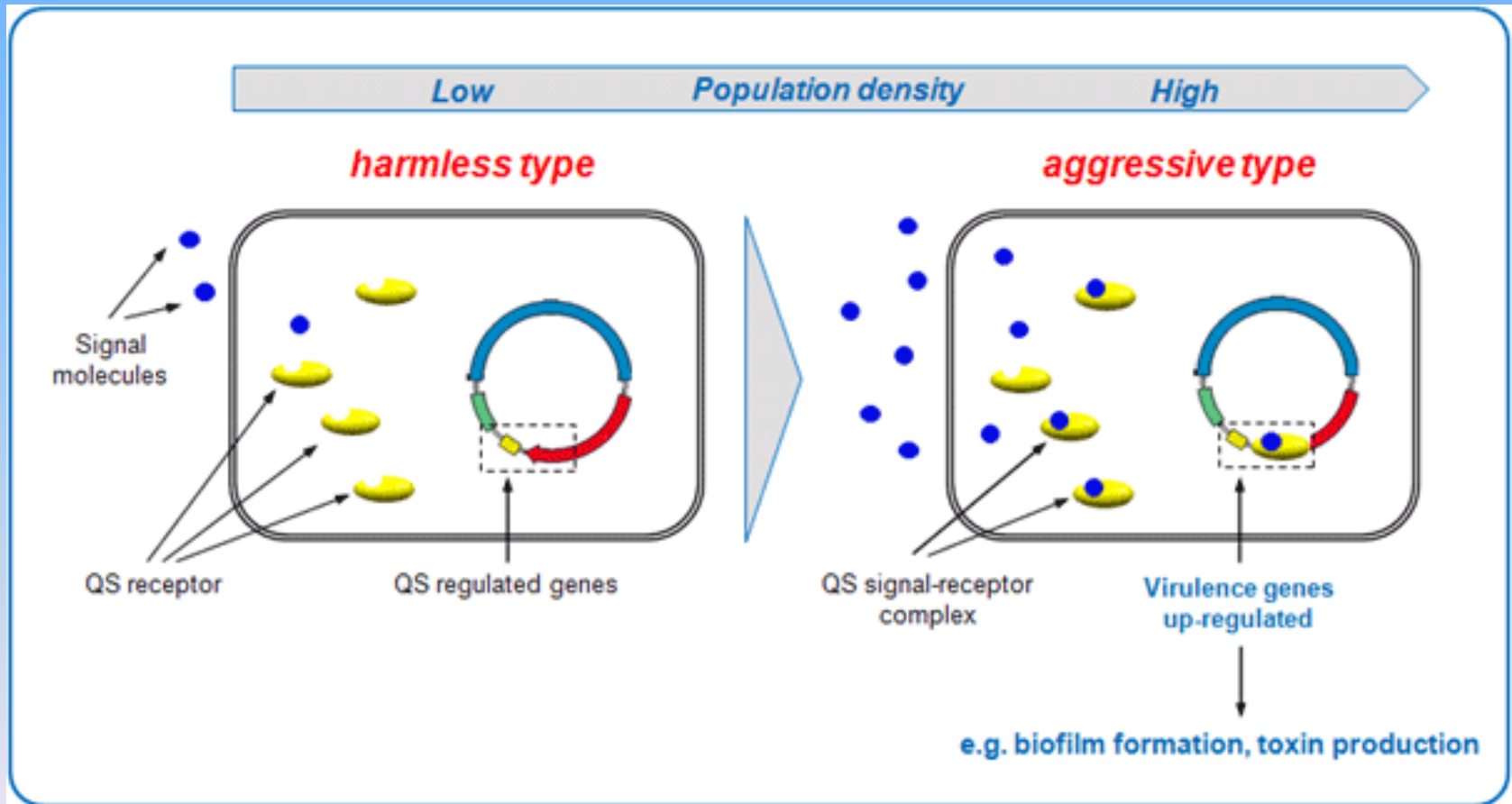
3D rekonstrukce dozrání biofilmu
Pseudomonas aeruginosa



Regulace nejen produkce luciferázy..



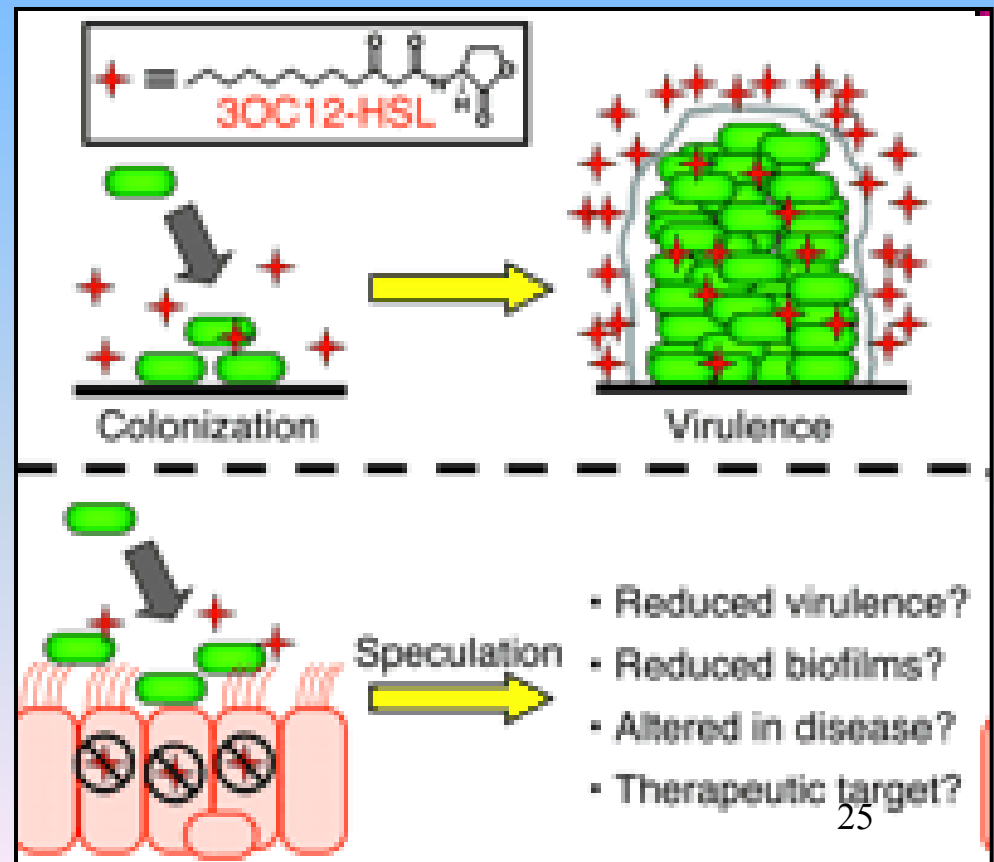
Regulace nejen produkce luciferázy..



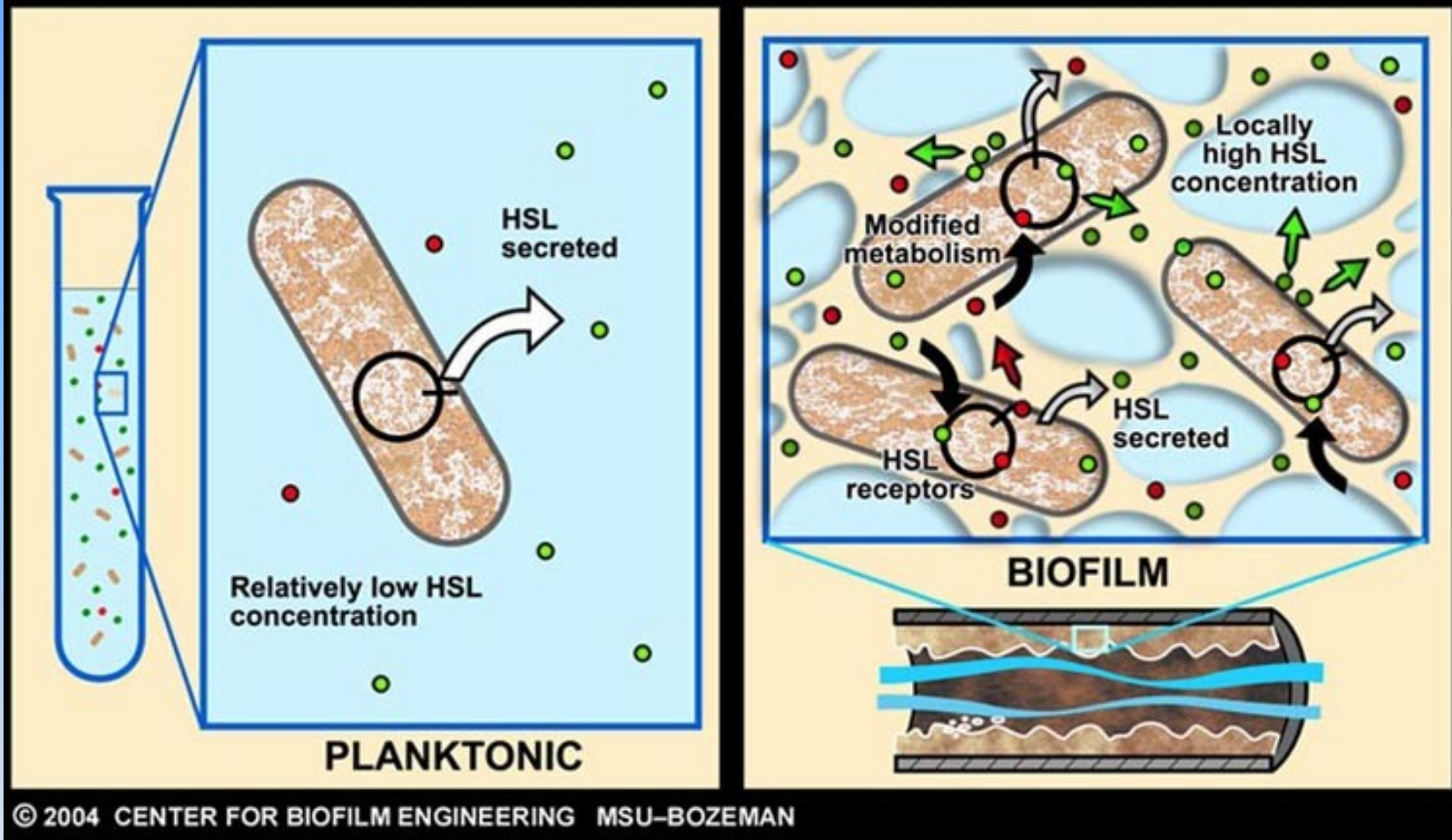
!!! **Ekonomika buňky: produkce extracelulárních signálů až nad určitou hustotou populace !!!**

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

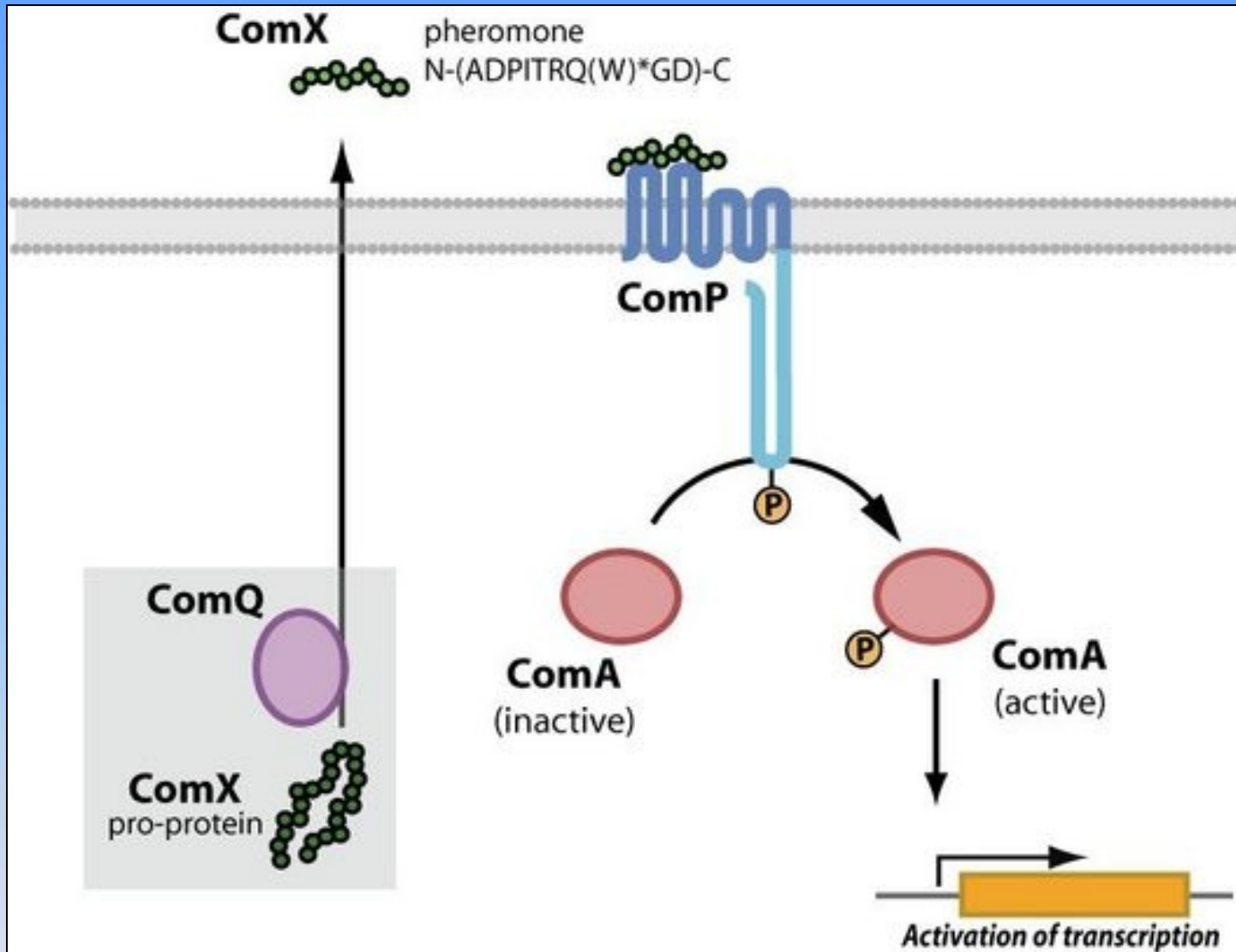
- Více než 4% z téměř 6 000 genů *P. aeruginosa* regulováno pomocí quorum-sensing



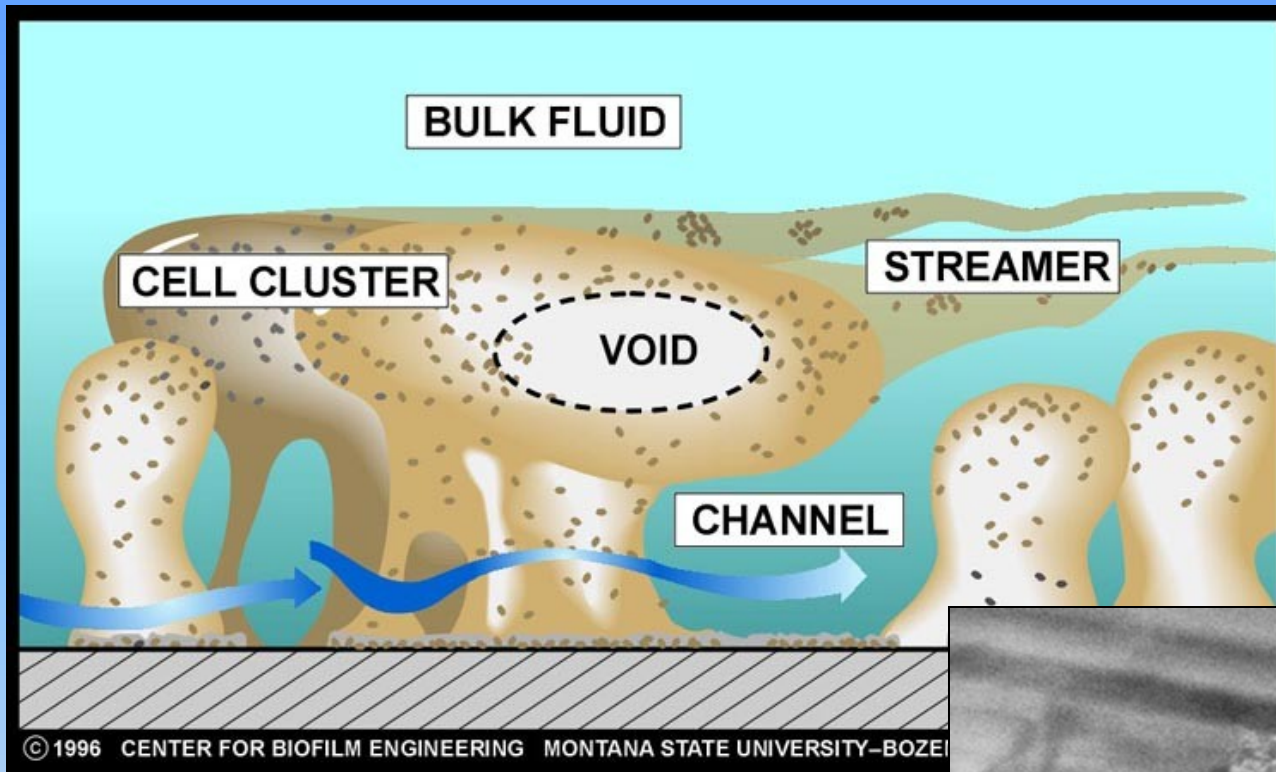
Quorum Sensing



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



Quorum response in gram-positive bacteria.



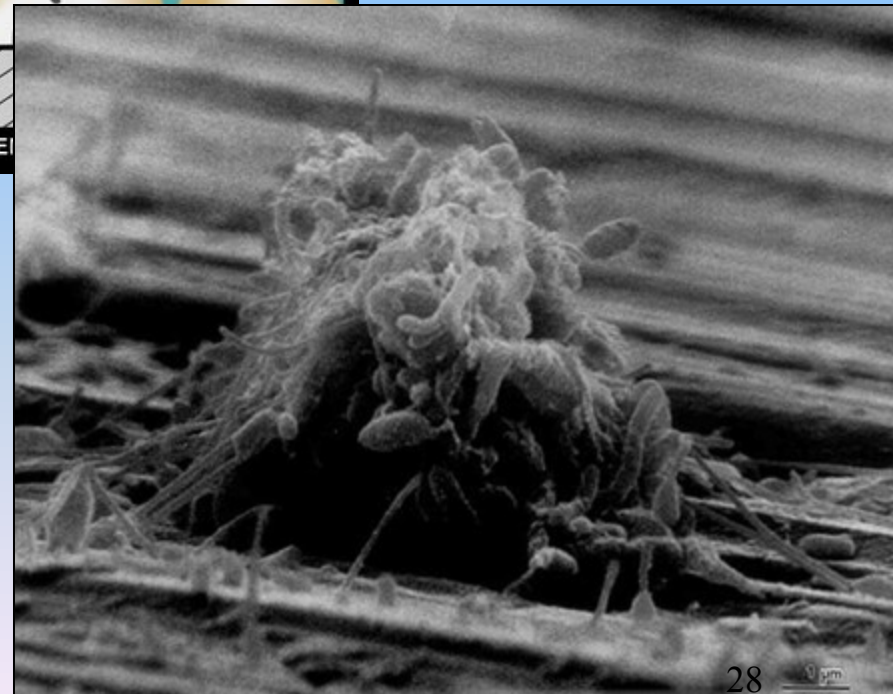
elastický
povrch

v silnějším proudu
posun po
podložce

Při dostatku živin:

- povrch biofilmu se vyrovnává

v 1/2 hloubky je průtok 5x pomalejší

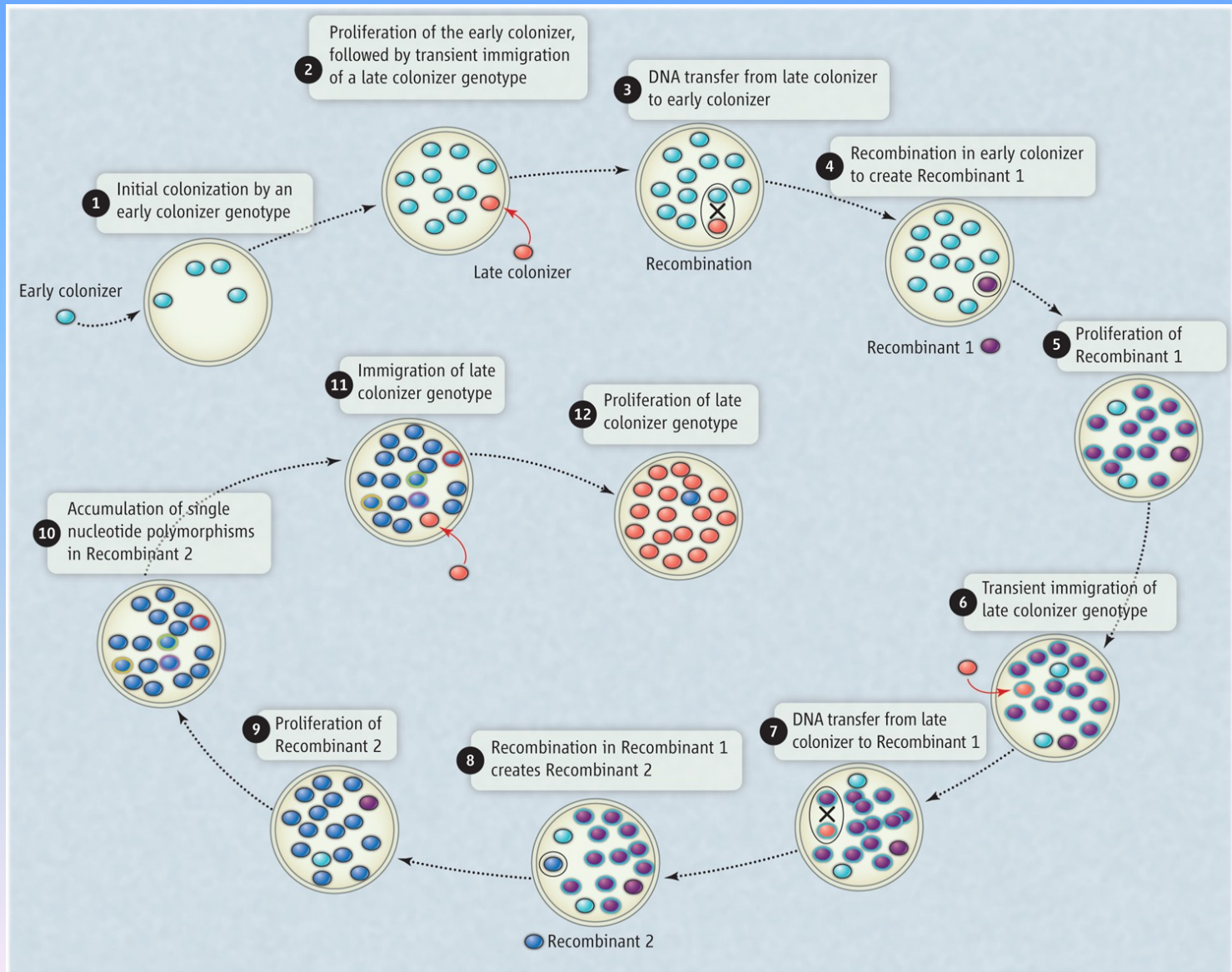


Početná populace....

Streaming

- **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

Mikroevoluce v biofilmu



Studium biofilmu – tematické okruhy

Controlled Cultivation, Molecular Biology, and Advanced Imaging of Microbial Biofilms

Imaging of biofilms

Biofouling - Bioadhesion and Biofilm Research

Quantifying biofilm structure

Noninvasive Biofilm Characterization Using Acoustic Microscopy

Model of stratified biofilms for data interpretation, analysis, and biofilm activity prediction

Experimental Metabolism Studies of Oral Biofilm Communities

Energy conversion in biofilms

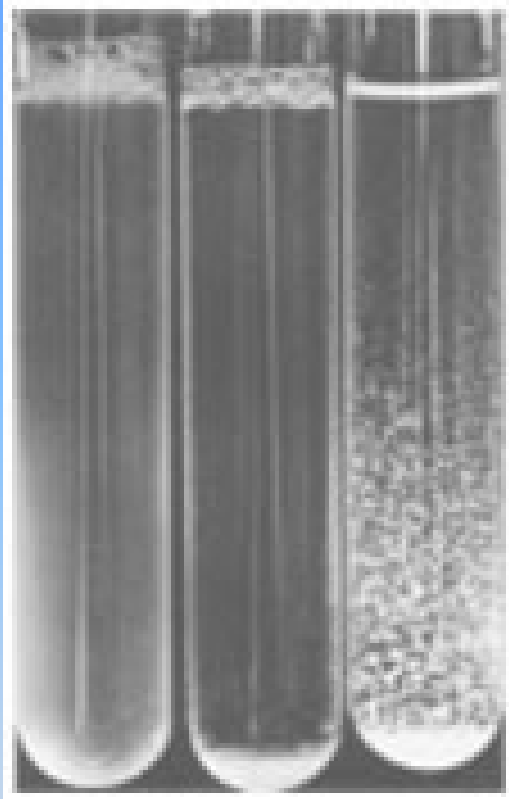
Biofilm-associated infectious diseases; contamination in industry

Dynamics and Spatial Expression and regulation of Signal Proteins

Biofilm antimicrobial sensitivity system

Studium biofilmu

- Jsme na čipu/v mikrotitračních destičkách schopni napodobit podmínky přirozeného prostředí biofilmu pro studovanou populaci buněk? (průtok; živiny; chem. Složení; množství kyslíku)
- **Vykazují buňky vůči sobě stejné interakce jako v přirozeném prostředí? (poté indukce genů...ovlivnění složení/chování populace buněk...)**
- Druhové zastoupení? V prostředí vyšší selekce – více vnějších faktorů...
- **Sbírkové kmeny? Z prostředí?**



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

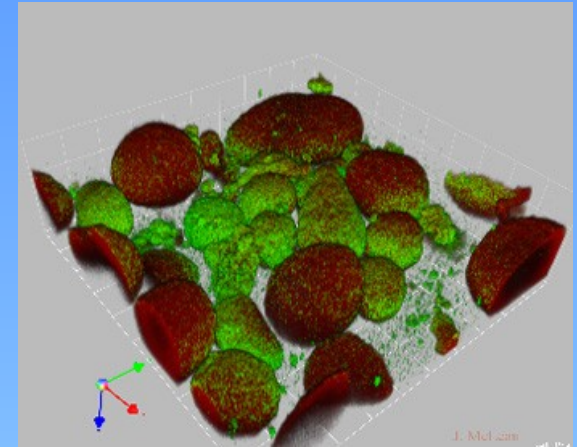
Studium biofilmu..

Studium struktury – větš. u G-

- polysacharidová glykokalyx
 - mikroskopie:
 - světelný mikroskop: obtížné
 - elektronový: nepracuje se živými buňkami
 - **konfokální**: - plochy ve zvolené hloubce
 - z řezů skládána struktura
- časoběrná metoda**: záznam
- řádkovací elektronoptická technika...

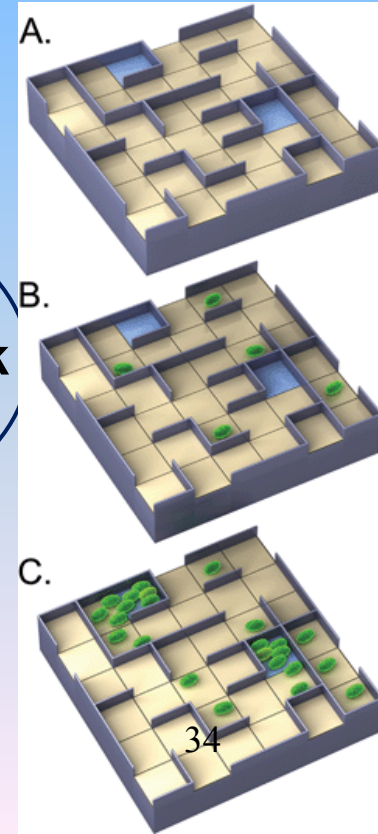
Studium složení

- Detekce** - studium přítomnosti genů/látek souvisejících s tvorbou biofilmu
- mikrotitrační destičky, mikročipy, sondy, PCR, hmotnostní spektrometrie....

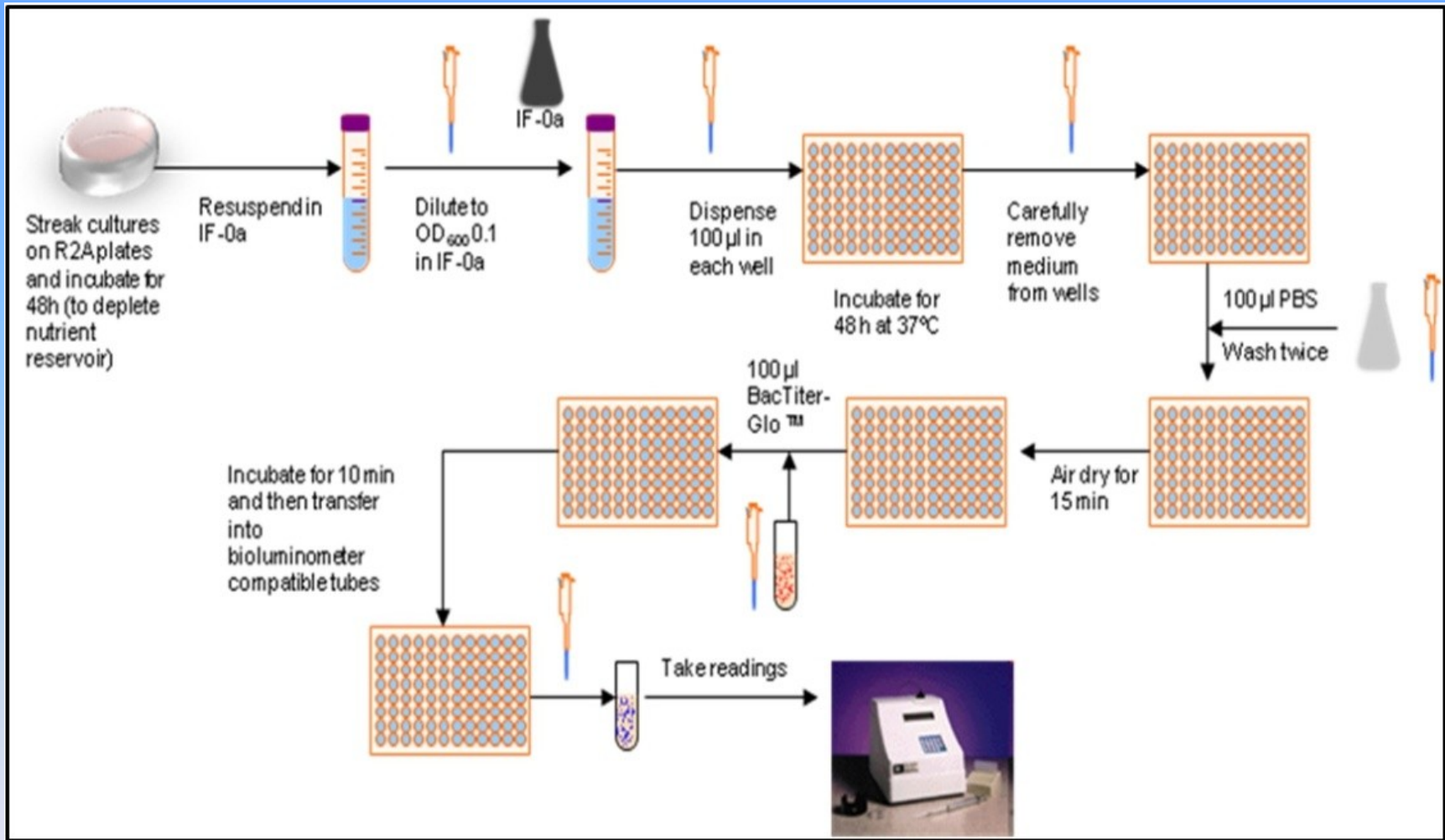


Shewanella biofilm – konf.mikr.

**Biofilm =
společenství buněk
v čase!!**

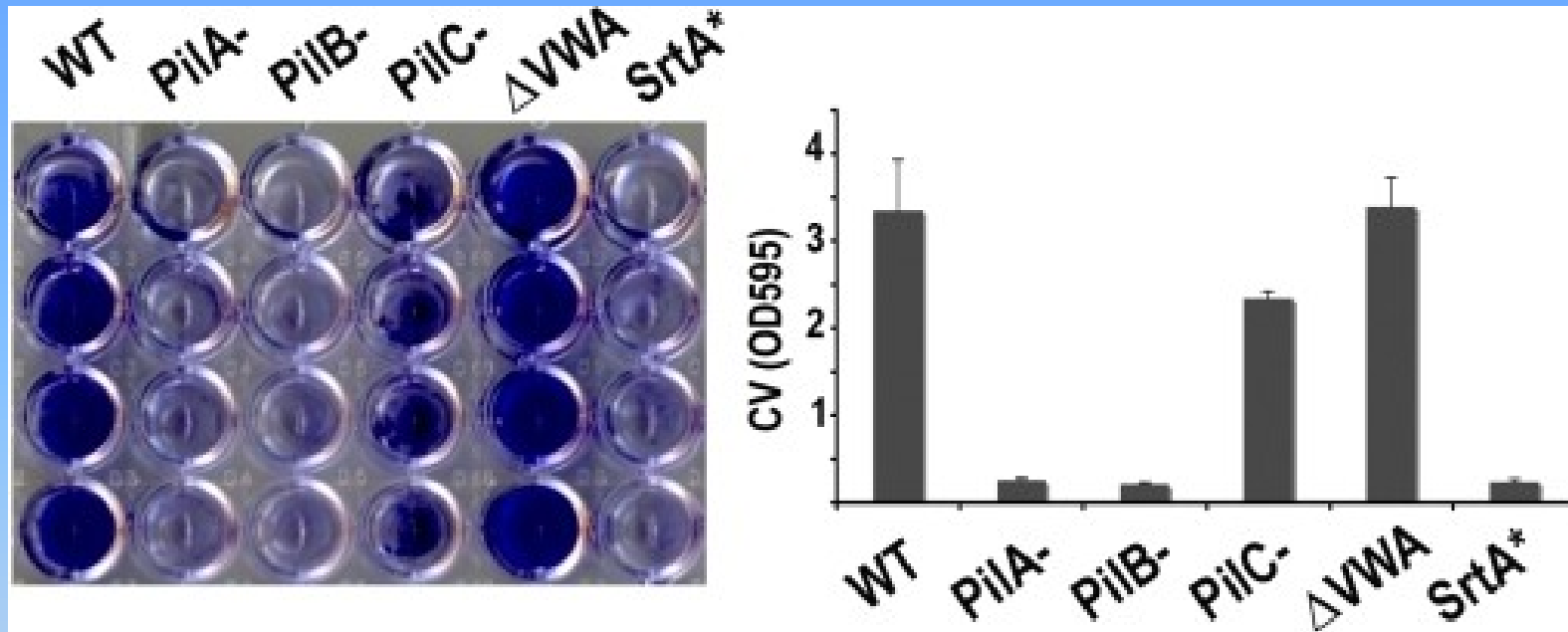


Studium biofilmu..



Bioluminescence ATP- assay

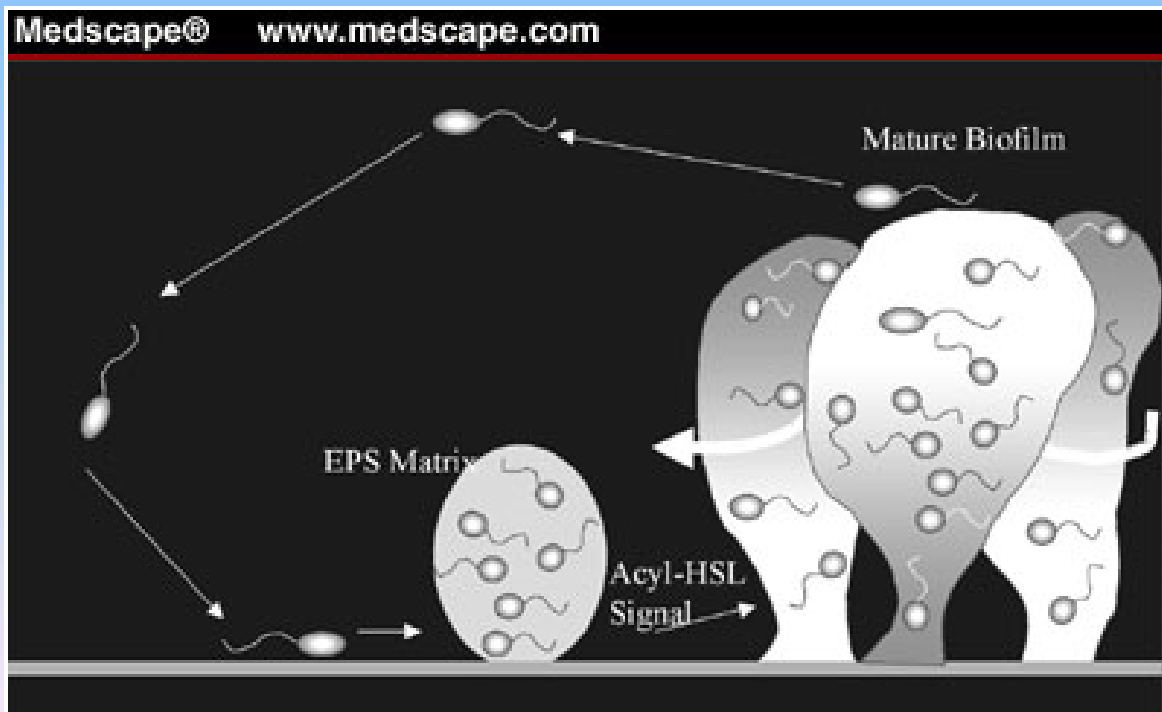
Studium biofilmu..



Role of the PI-2A pilus in biofilm formation. *S. agalactiae* strains were grown in 96 wells polystyrene plates in LB supplemented with 1% glucose at 37°C for 24 h. Adherent bacteria were stained with crystal violet (CV) and quantification was performed by measuring the absorbance at 595 nm. Results are representative of three experiments. Error bars show standard deviations.

Značná část experimentů prováděna s kulturami:

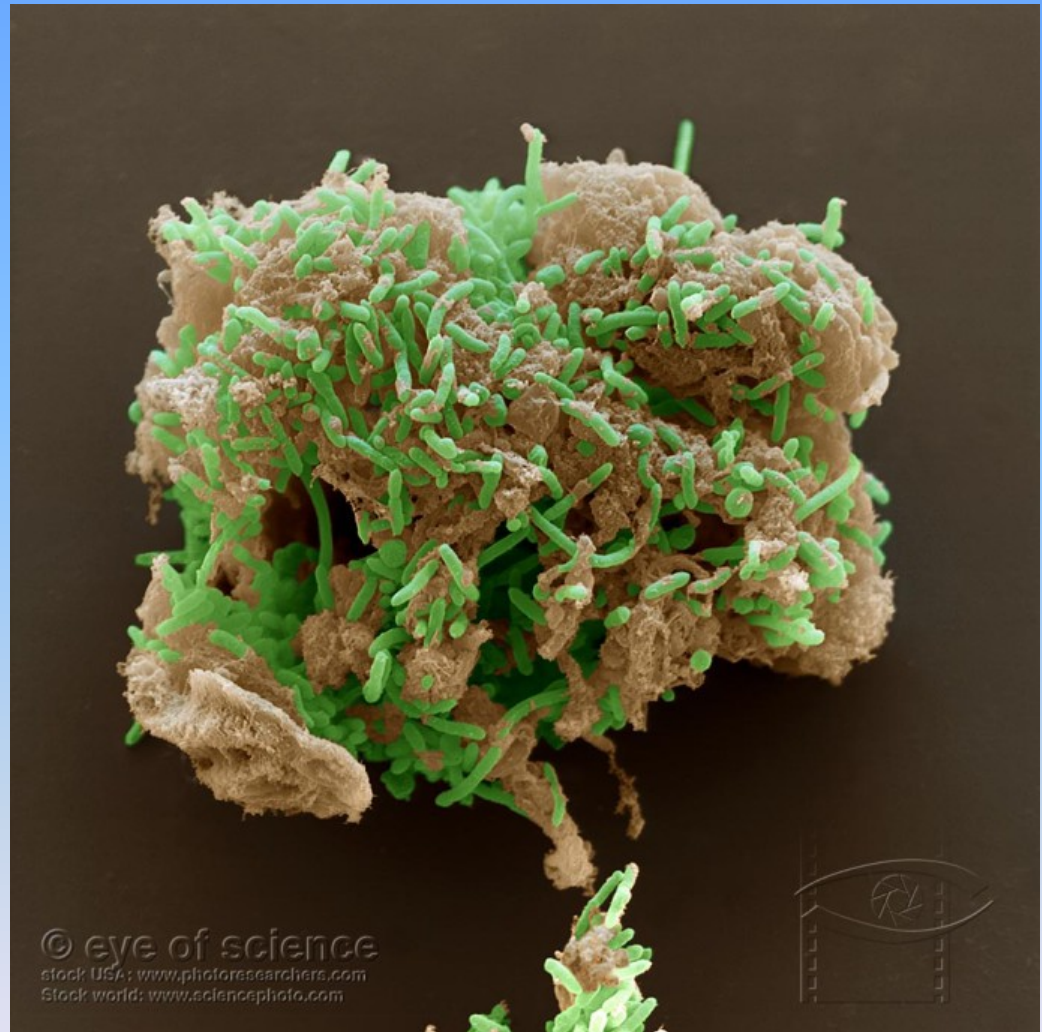
Pseudomonas aeruginosa
formování biofilmu - pět kroků
exprese více jak 800 proteinů
(tedy víc jak polovina proteomu)
6 i vícenásobně zvýšená



.. výzkum
patogeneze

Horniny a bakterie - koevoluce

- Složení minerálů ovlivňuje počet a diverzitu mikrobů
- Síru oxidující bakterie silně okyselují prostředí a tvoří póry
- Závisí tvorba biofilmu hornin na jejich složení?



Geobacter, a rock-dwelling bacteria coating iron oxide minerals.



- Bioreaktory s horninami (bohaté na uhličitan vápenatý a křemík)
- Inokulace síru metabolizujícími bakteriemi z parku Wyoming
- Tři týdny inkubace
- DNA extrakce + pyrosekvenace prourčení diverzity MO
- Na uhličitanech bakterie rostly v tenkých biofilmech a formovaly vlákna; alfa proteobakterie; síru oxidující - 10-45%
- Křemičitany – řidší růst + formování shluků či individuální buňky; firmicutes, aktinobakterie
- Co ovlivňuje hustotu osídlení? Dostupnost prvků, jako např. fosfor, v uhličitanech? Jejich pufrující schopnosti? Hliník obsažený v křemičitanech růst asi brzdí? Nebo kumulace kyseliny na nich, protože tak dobře nepufrují?
- I vazby bakterií na dva odlišné substráty se liší
- Ty co odolávají toxinům – mají jiné unikátní vlastnosti

Zvláštnosti biofilmu

Přenos genů mezi buňkami až 1 000x větší

Vyšší rezistence k ATB a dezinfekci (H2O2, chlor)

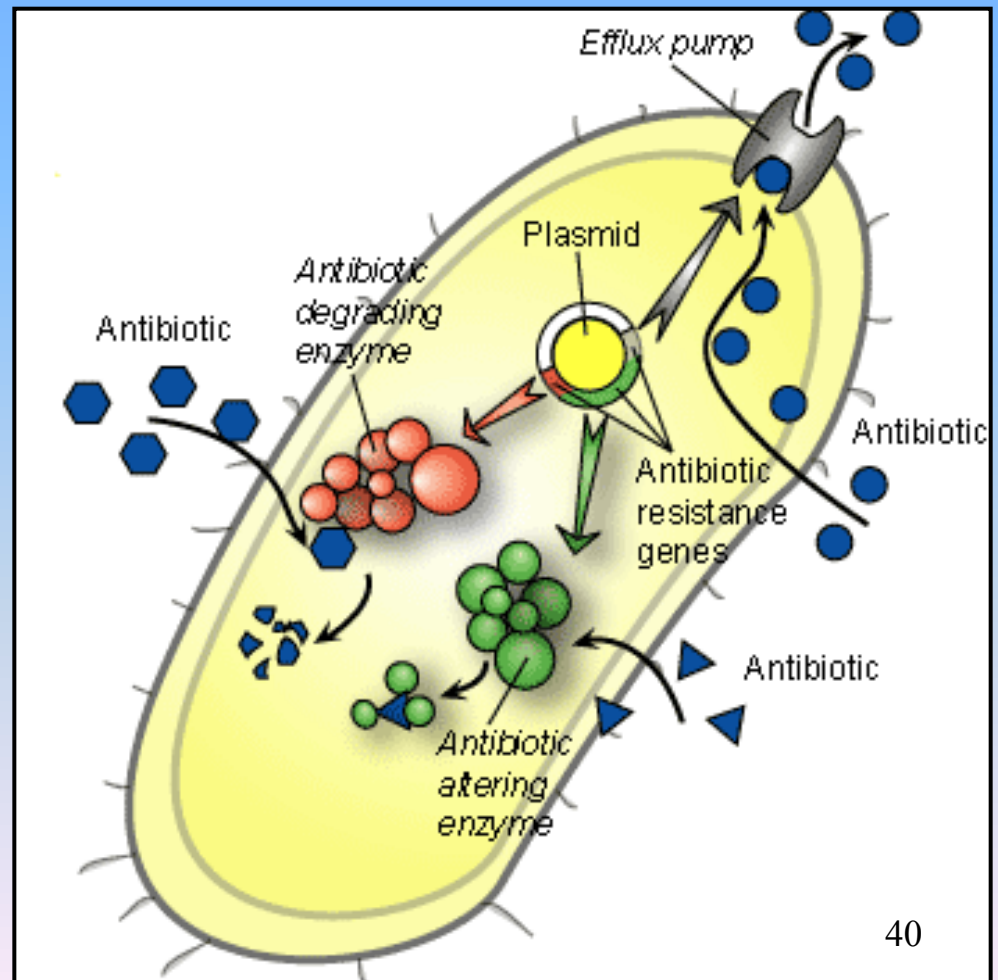
- omezená difúze
- sorpce ATB
- klidový stav, hladovění
- změna genotypu:

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

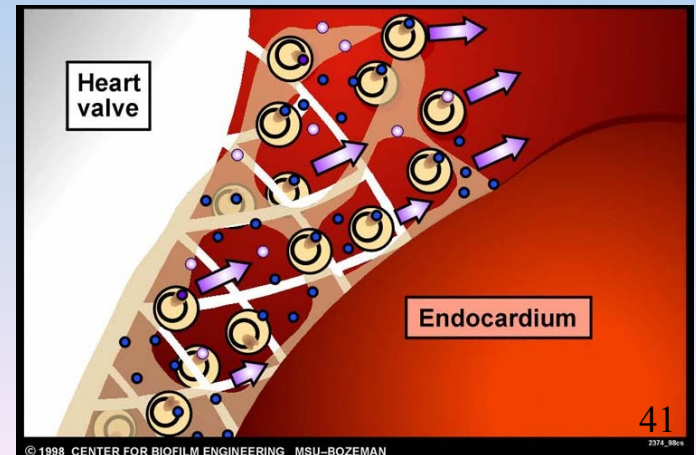
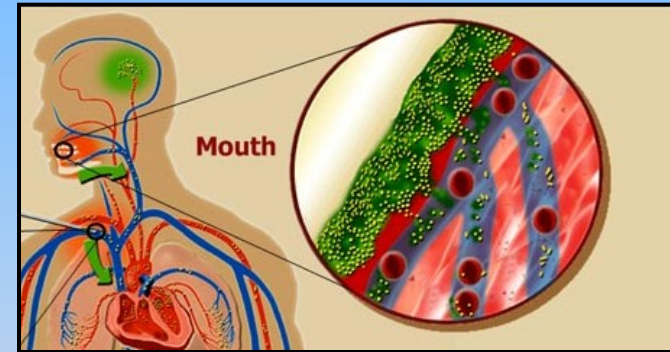
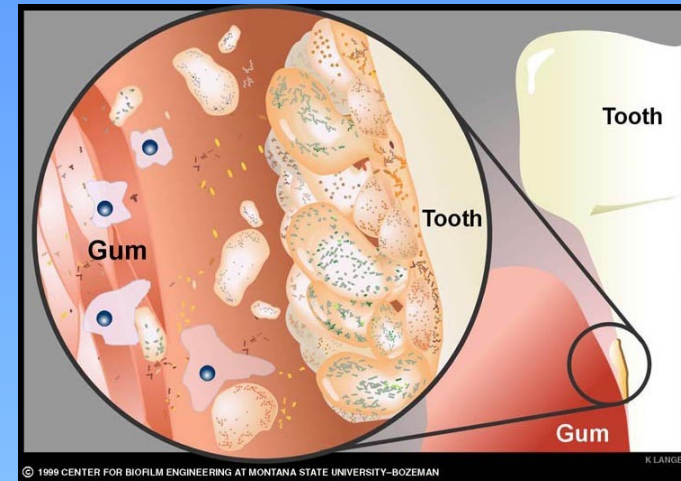
Zubní povlak

- 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

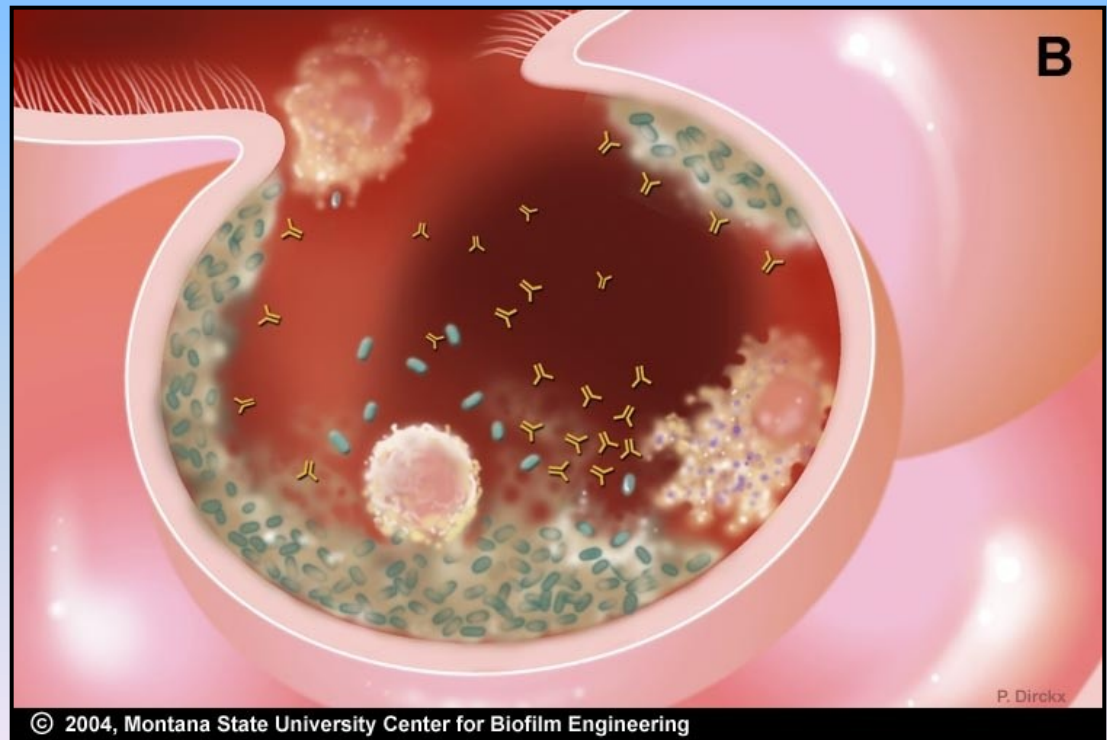
Cystická fibróza – genet. onemocnění (porucha iont. rovnováhy)

Vývoj: běžné infekce (stafylokoky, hemofily, pneumokoky)

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

CHOPN

- ušní infekce
- močové cesty
- chronický zánět prostaty

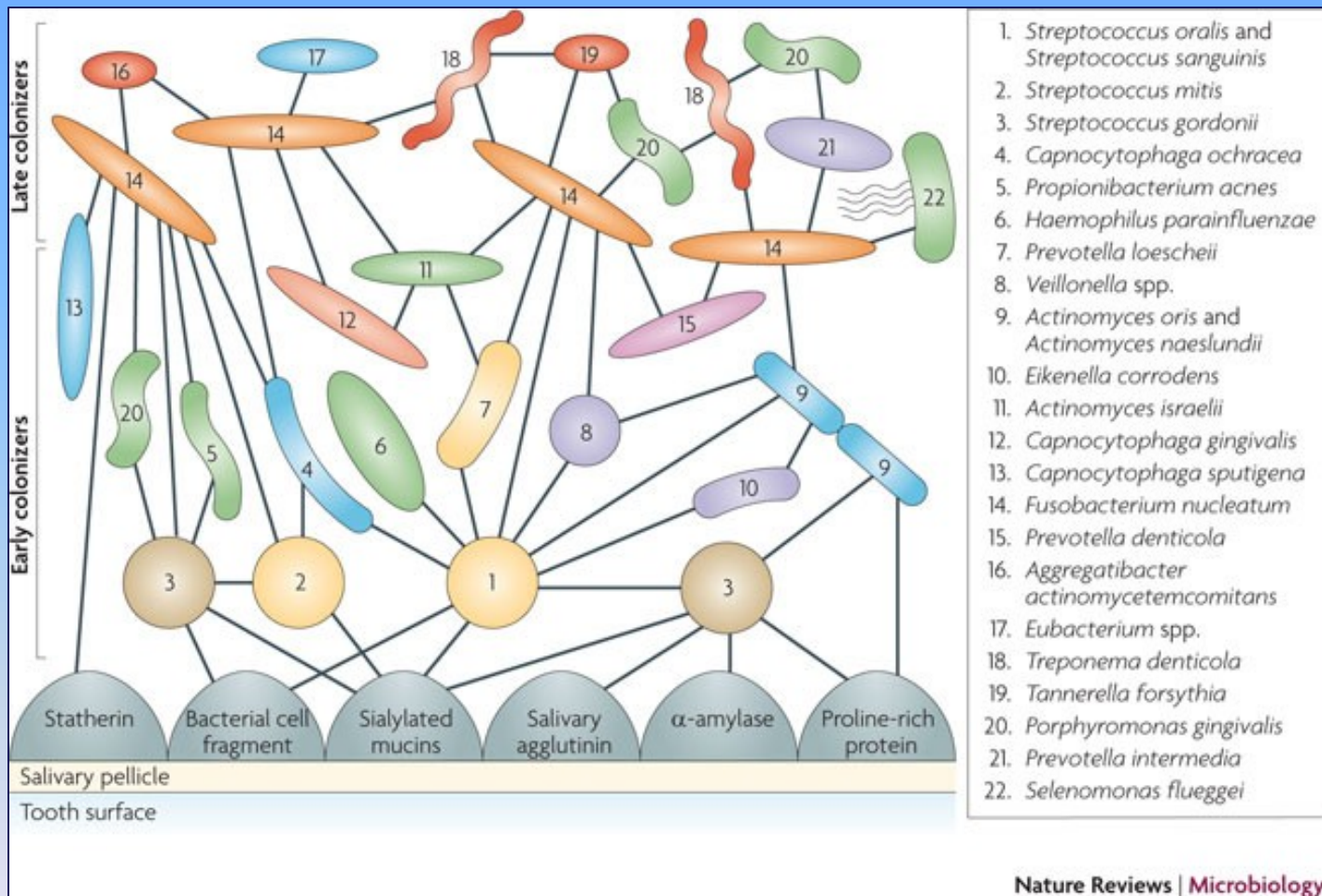


Imunokomprimovaní – kolonizace alveol, až kalcifikace..

Biofilm nespouští imunitní odpověď.

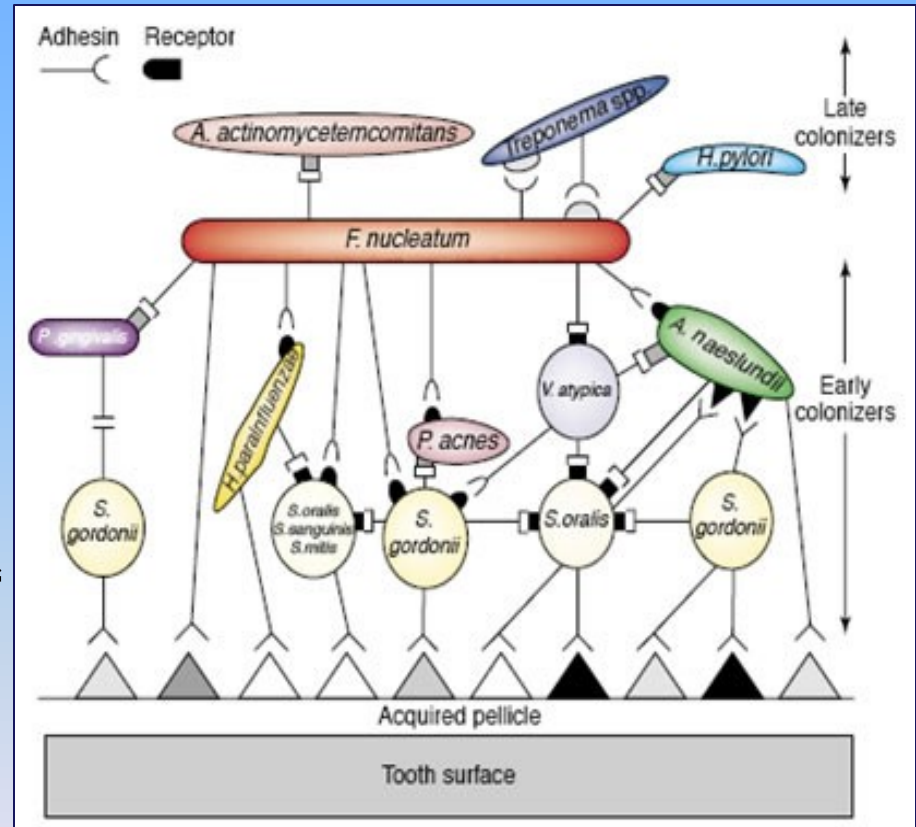
Biofilm skloviný

700 kmenů z 18ti rodů



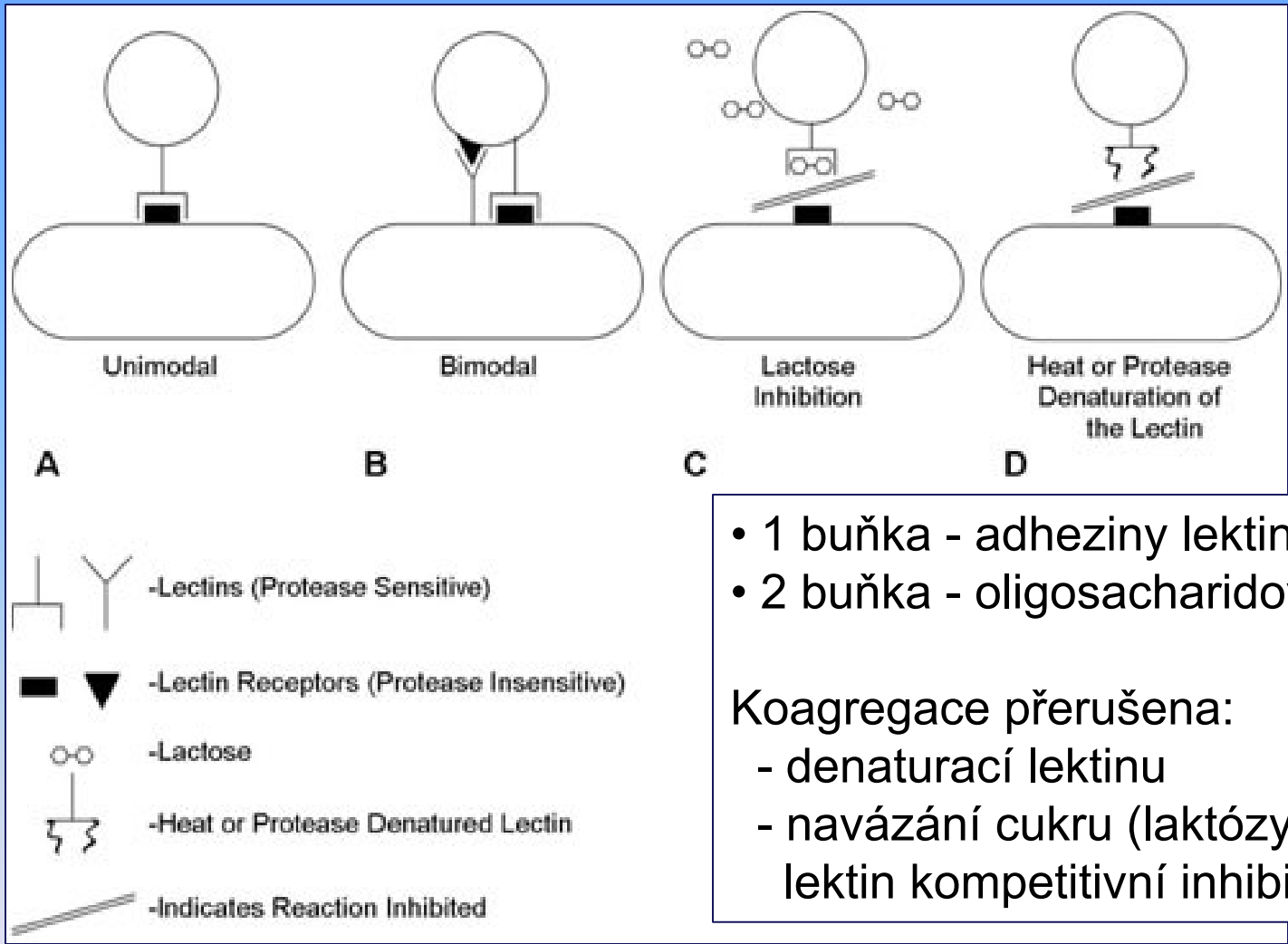
Mezibuněčný kontakt – role adhezinů (lektiny) a receptorů (sacharidy)
Kontakt s povrchem zubu – pelikula proteinů, lektiny... (Rickert et al. 2003)

- 1970, Gibbons and Nygaard
 - ve smíšené kultuře *Actinomyces naeslundii* a *Streptococcus sanguinis* z dentálního povlaku – „koagregace“
- Proces vzniku biofilmu:
 - 1) přilnutí vrstvičky proteinů
 - 2) první kolonizátoři
 - 3) aktinomycety, *Fusobacterium*
 - 4) pozdní kolonizátoři na fusobakteria
- Proces kolonizace – souslednost
 - ústní hygiena
 - 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 44

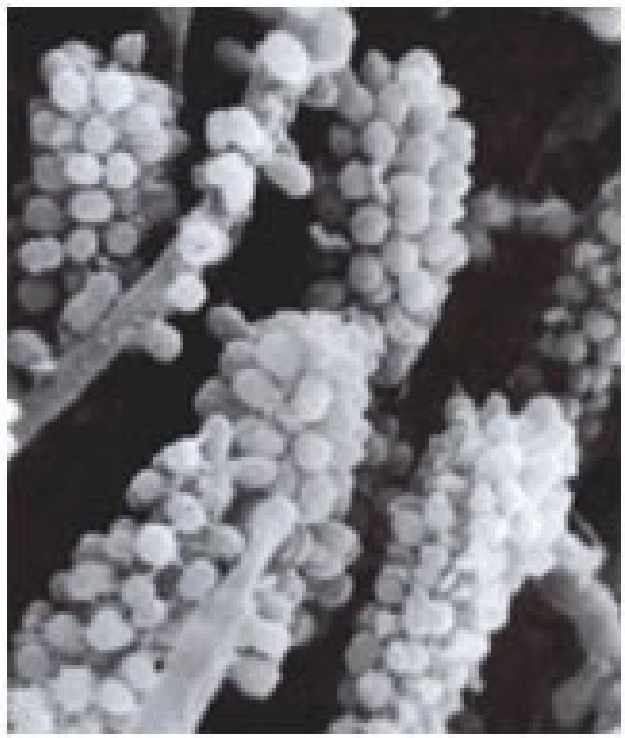
Mezibuněčné interakce biofilmu zubní skloviny



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

Interactions between coaggregating pairs of organisms.

Morfologické struktury orálního biofilmu



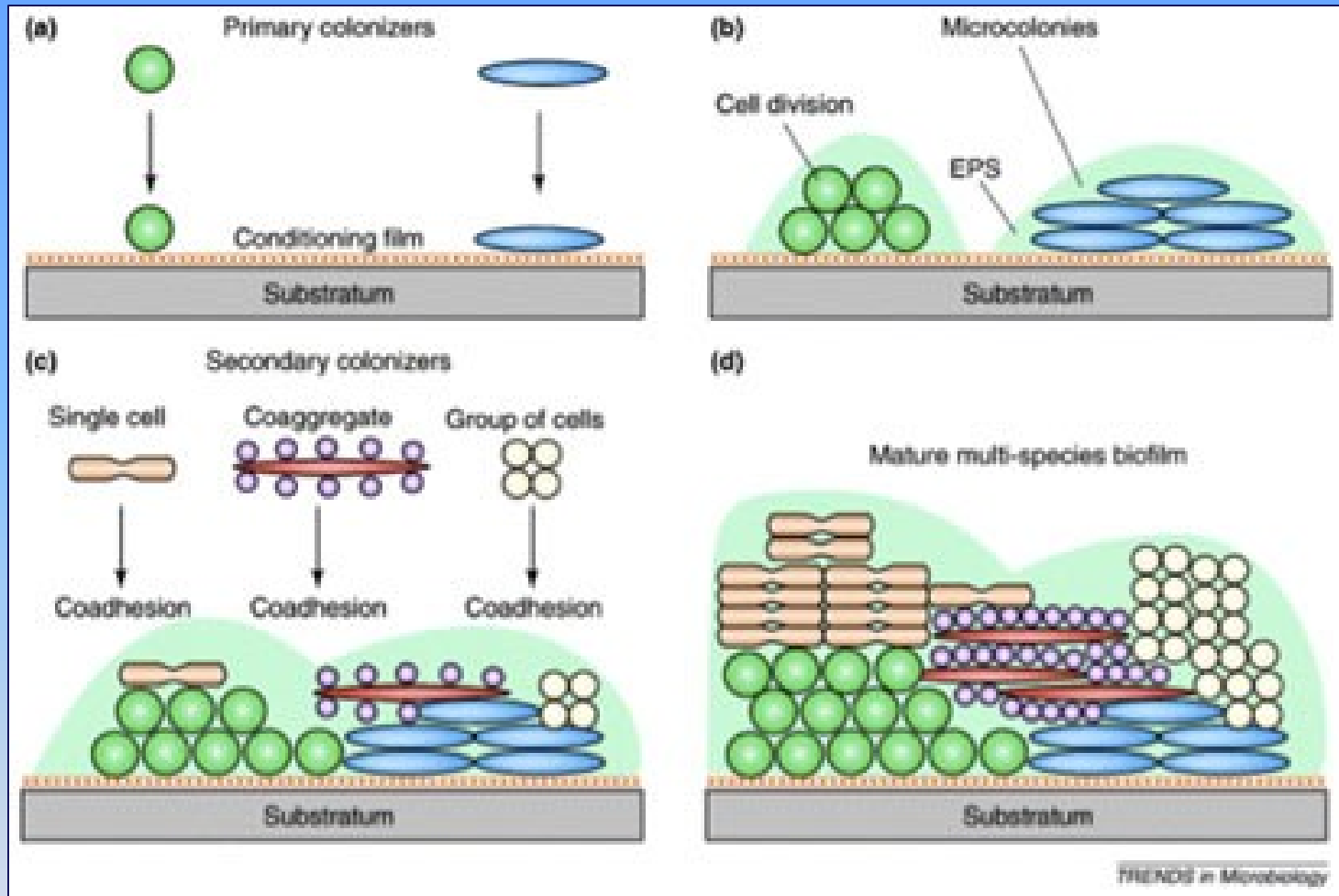
corncobs

“corncobs” – koky koagregující s
vláknitými bakteriemi

“rosette” - 1 buňka koagregující s koky

“test tube brush formations”

Růst dentálního biofilmu

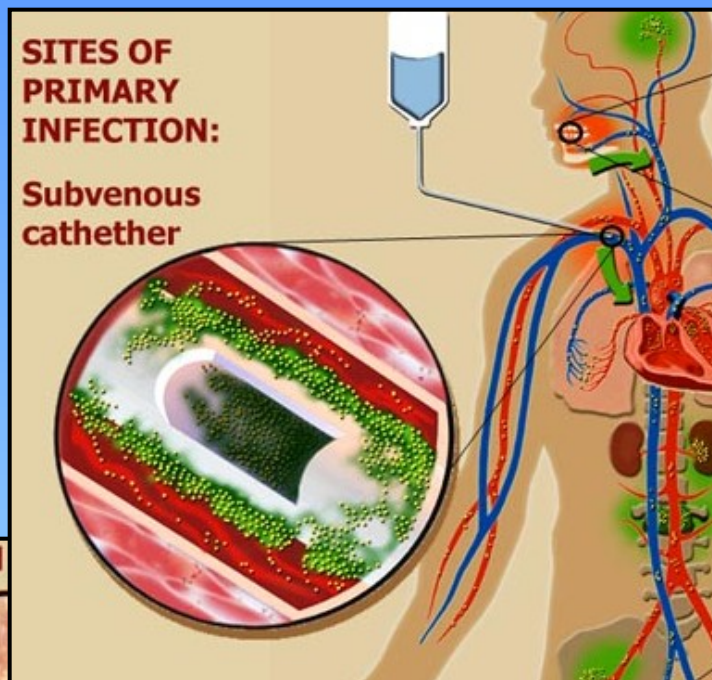
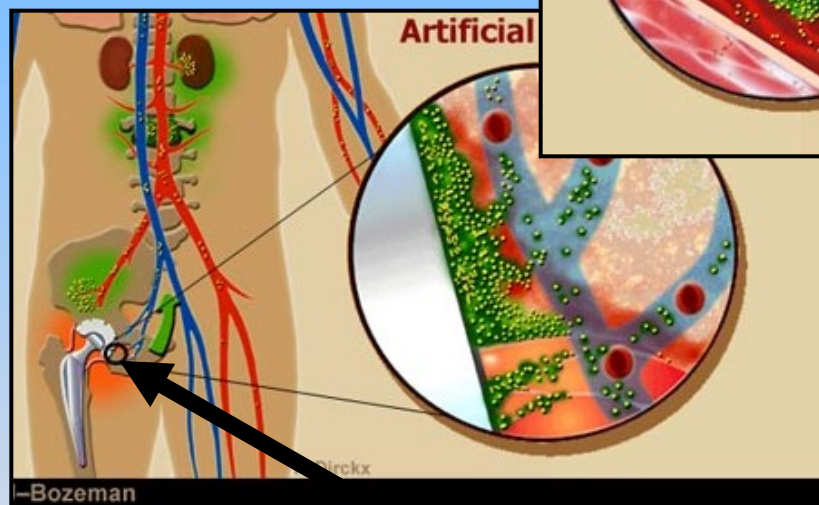


- Tvorba a spojování koagregátů
- Dělení v mikrokolonii koagregátu

Biofilm a medicína

Cévký – arteriální, žilný
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:

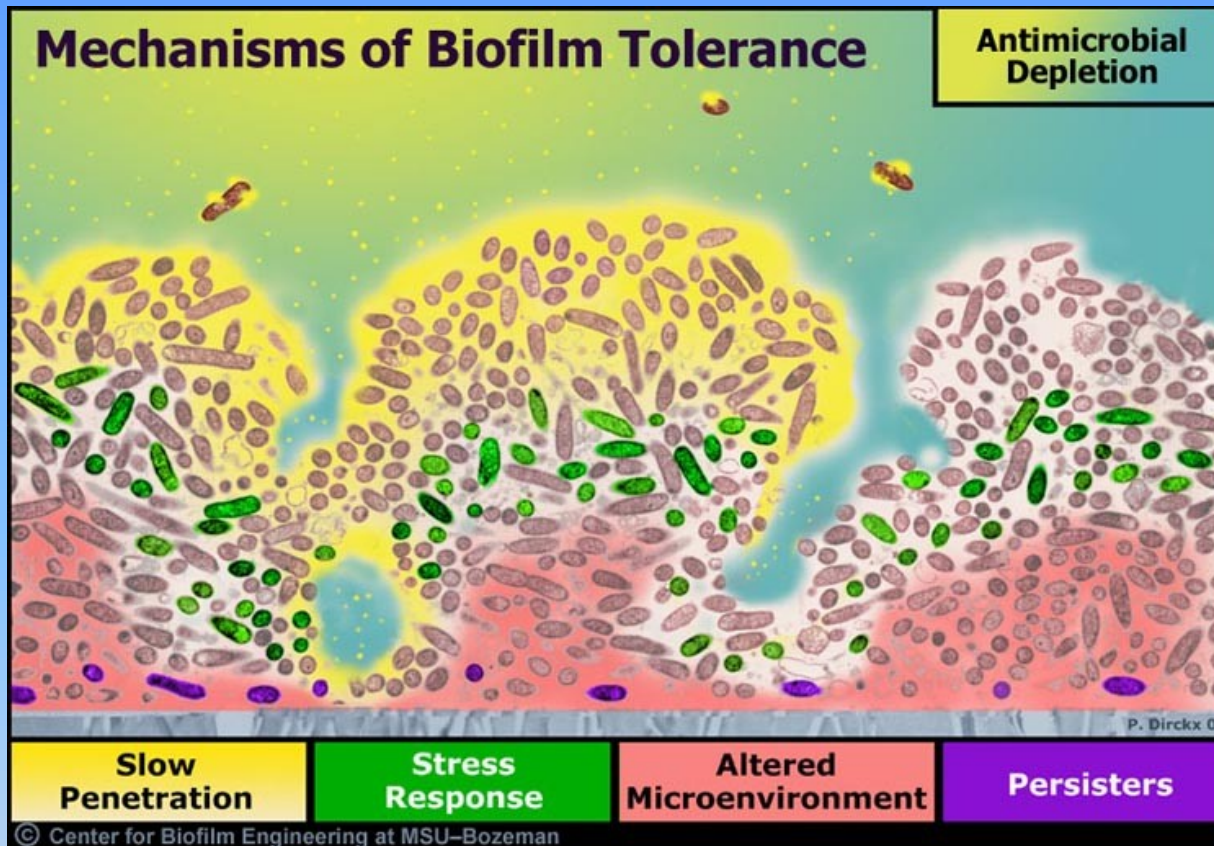
Byl vytvořen umělý biofilm

- Některá ATB vyvázána **polysacharidem**

-rezistence je jednou z fenotypových změn, vzniká po aktivaci regulačních genů určité části buněk

U *P. aeruginosa* nalezen cyklický **glukan** (polymer glukózy) vyvazující ATB i *in vitro*, vně i uvnitř buňky. **Možné vysvětlení:** snaha pseudomonád bránit se ATB streptomycet v prostředí tvorbou biofilmu, glukanů...

Rezistence souvisí s množstvím změn při přechodu do společenství biofilmu.



Terapie biofilmů

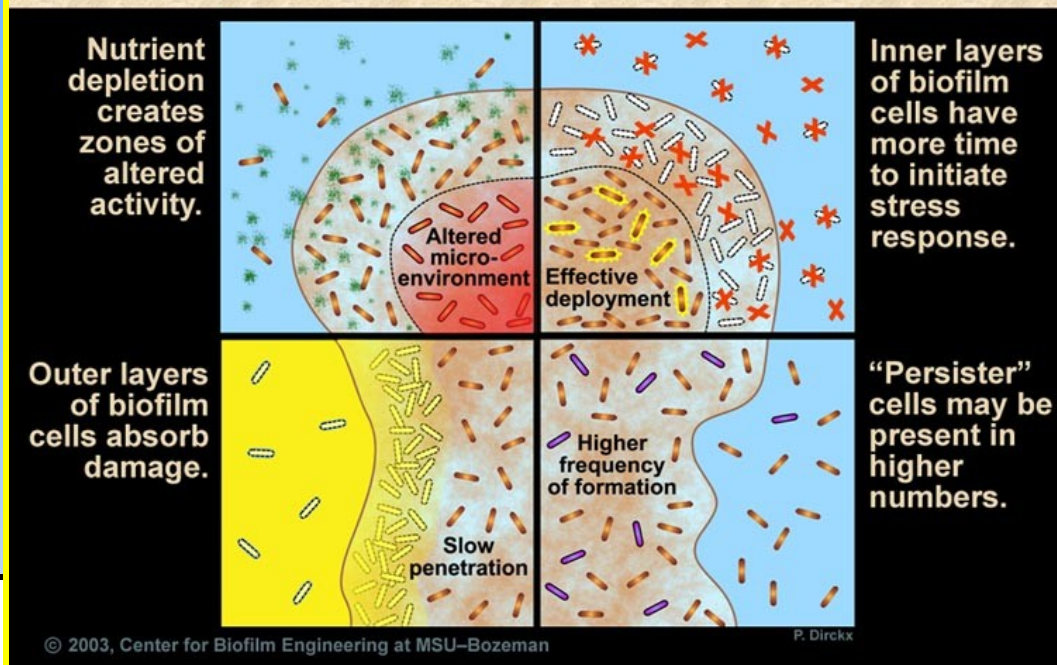
Studium mutací genů *gsc*, QS = studium narušení formování biofilmu – poté přístupnější ATB a dezinfekci

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

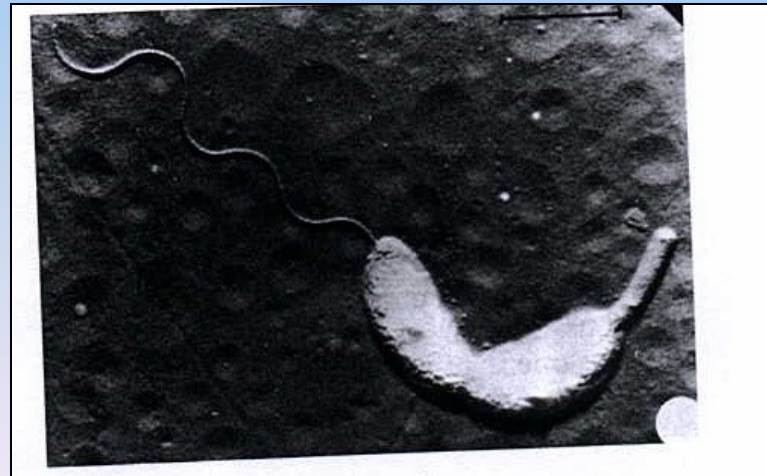
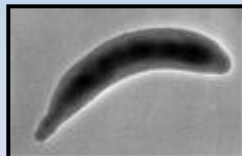


Výhody přisedých stadií

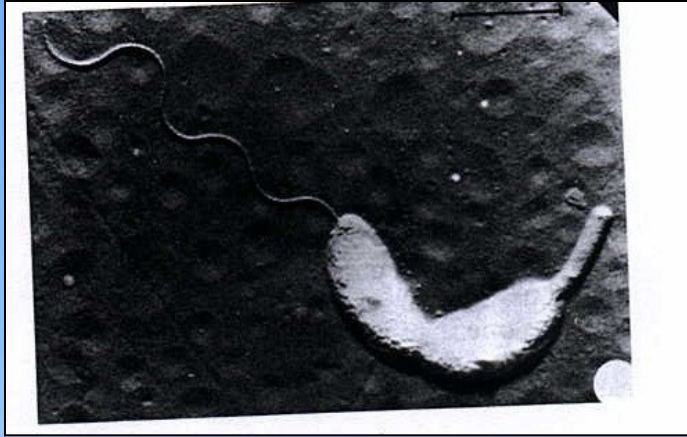
- lepší dostupnost a využitelnost substrátu
- ◆ adsorpce makromolekul a malých hydrofobních molekul na povrch
- ◆ lepší využitelnost koncentrovaných živin
- ochrana před inhibičními účinky antibakteriálních látek (antibiotika, chlor, těžké kovy)
- ochrana před bakteriofágy a parazitickými bakteriemi

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

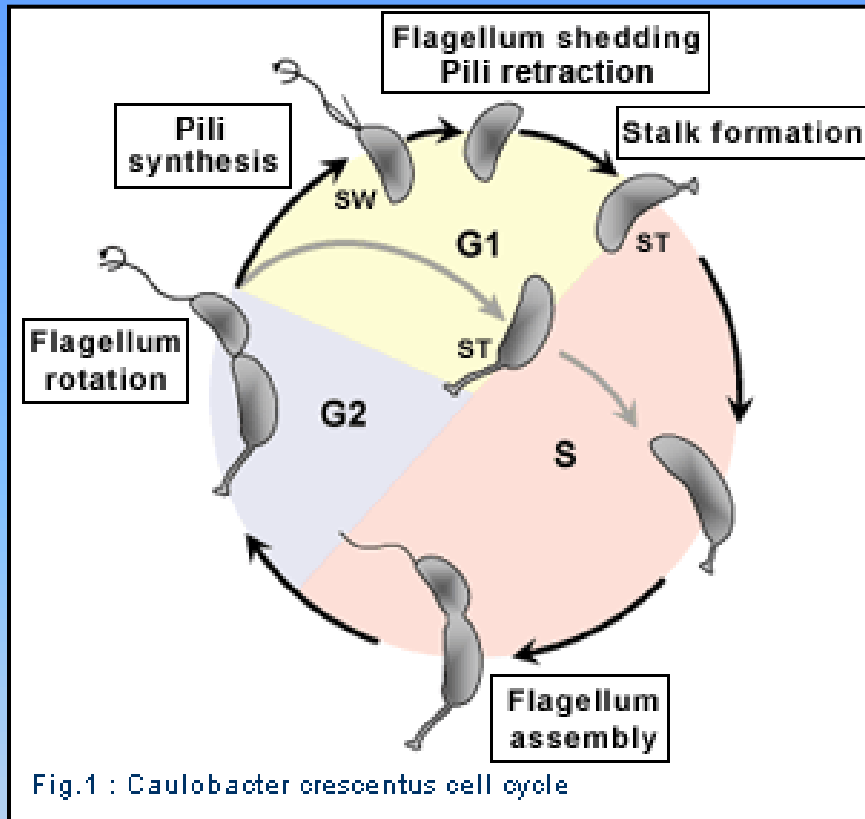


Růstový cyklus *Caulobacter crescentus*



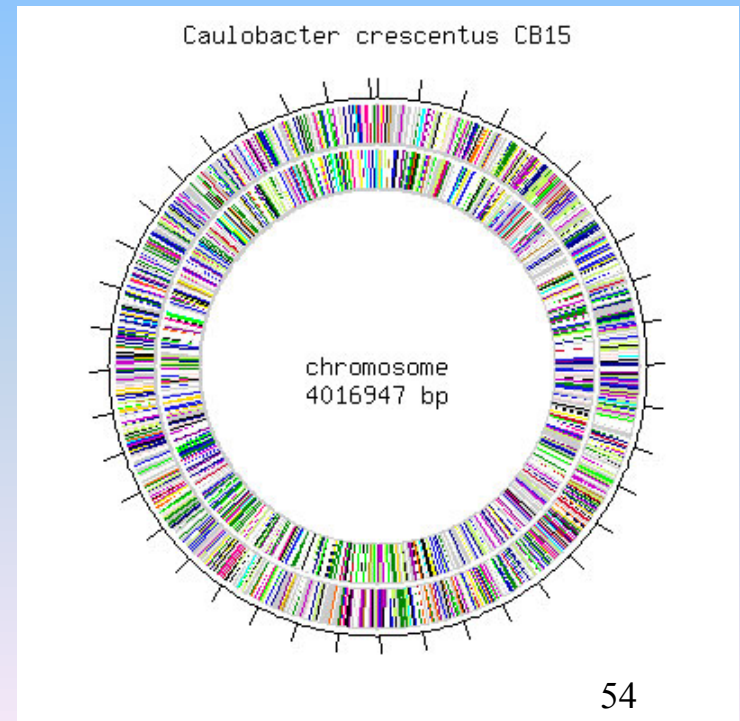
Stádia růstového cyklu

- 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

- Buněčné dělení asymetrické



Plovoucí bičíkatá buňka se **nereplikuje**

přisednutí na místo s vhodným
substrátem a diferenciaci

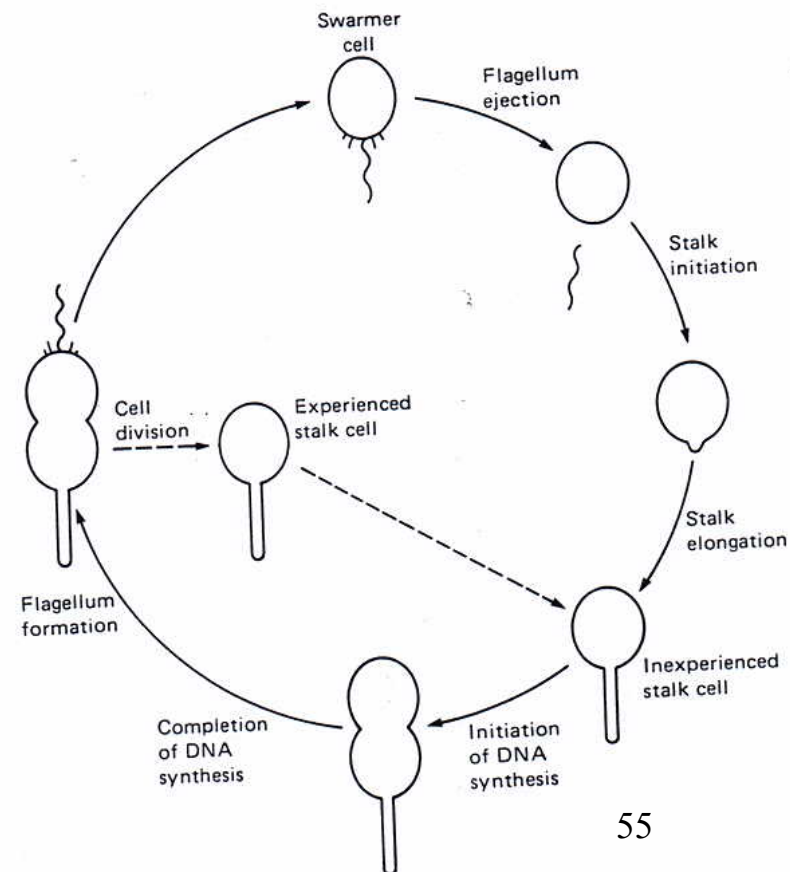
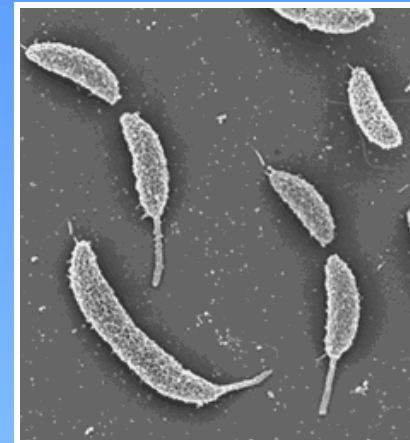
Poté iniciace replikace DNA.

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.

Uzlové body!!



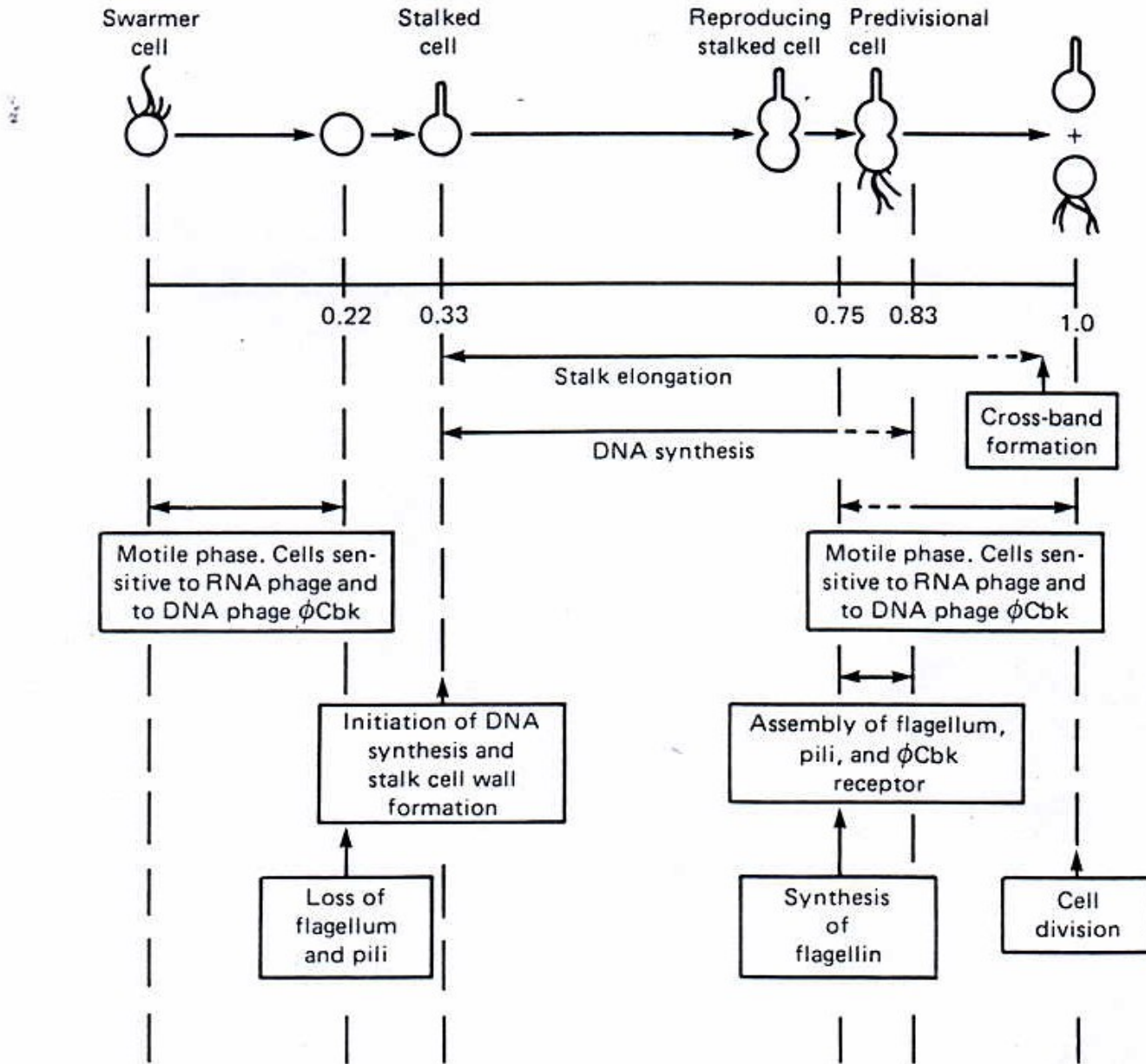
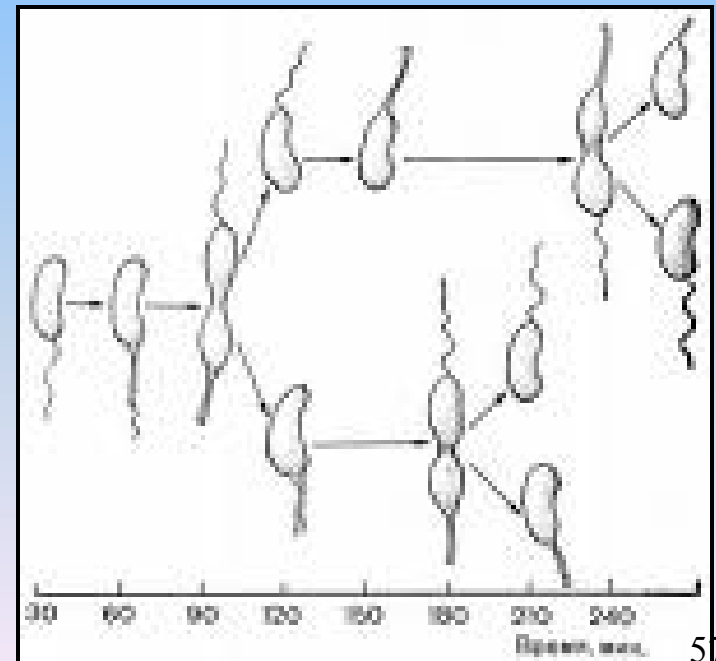
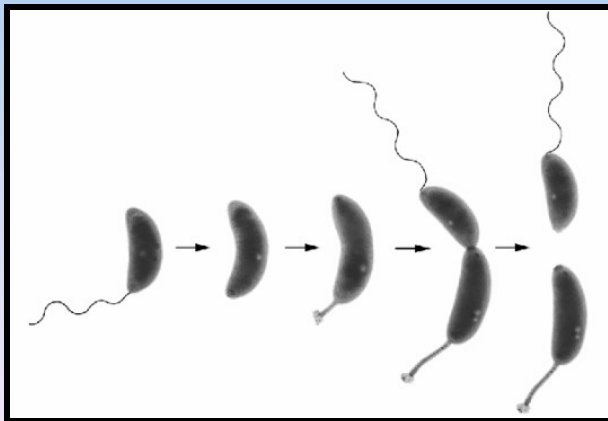


Fig. 13. Schematic diagram illustrating various developmental and biosynthetic events as a function of the cell cycle of *Caulobacter crescentus*. The numbers are fractions of a complete (1.0) cell cycle. (From Dworkin, 1985.)

- Chemotaxe
- *Caulobacter* – volné plovoucí buňky
 - exprese MCP-like receptorů – silná chemotaxe.

Pohyb za signály, dokud nenarazí na povrch bohatý na substrát – osídlení a iniciace buněčného dělení.



- **Esenciální transdukční proteiny mění v průběhu cyklu buněk *Caulobacter* svou vnitrobuněčnou lokaci**

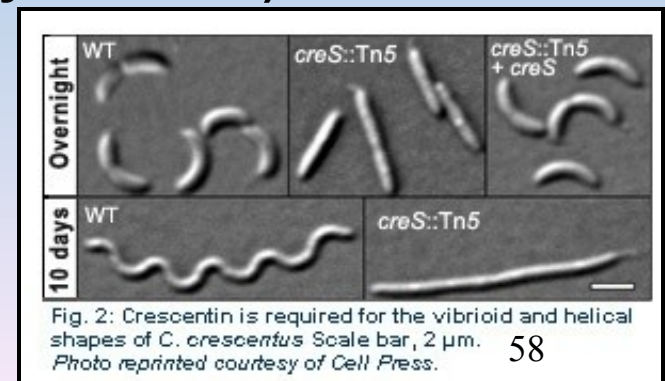


**Asymetrické umístění regulátorů cyklu –
= regulační systém přenosu sinálů**

- **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.**



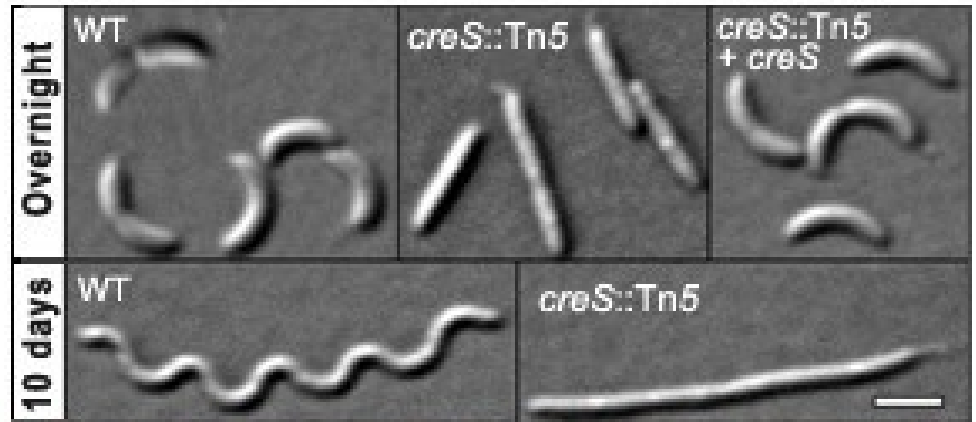


Fig. 2: Crescentin is required for the vibrioid and helical shapes of *C. crescentus*. Scale bar, 2 μ m.
Photo reprinted courtesy of Cell Press.

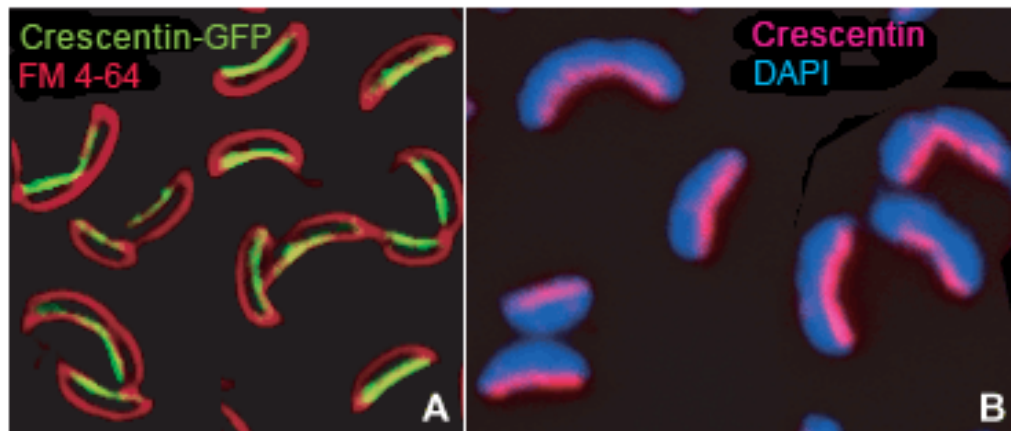


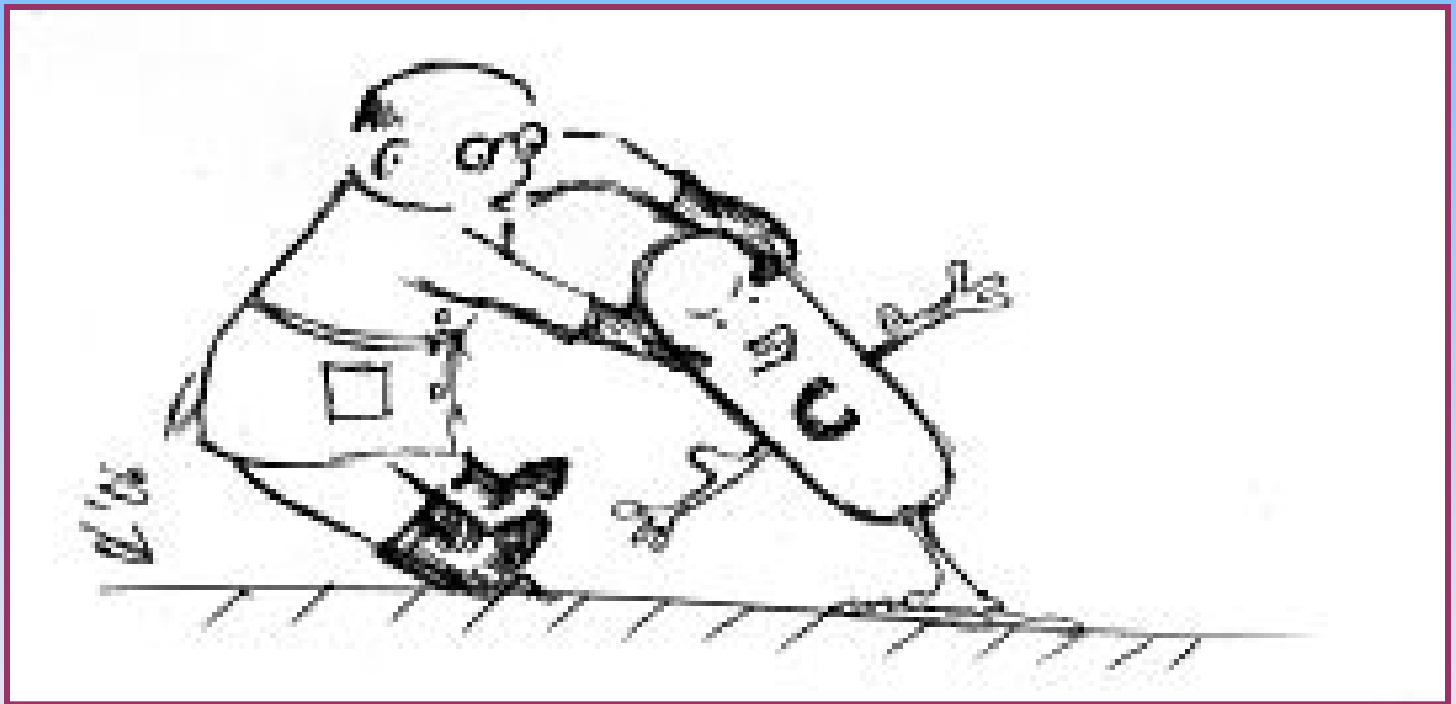
Fig. 3: Crescentin colocalizes with the inner cell curvature near the membrane. (A) Overlay between crescentin-GFP (green) and the membrane dye FM4-64 (red) in live merodiploid *creS-gfp creS* cells. (B) Immunofluorescence overlay between crescentin (red) and DAPI (blue) stainings.
Photo reprinted courtesy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

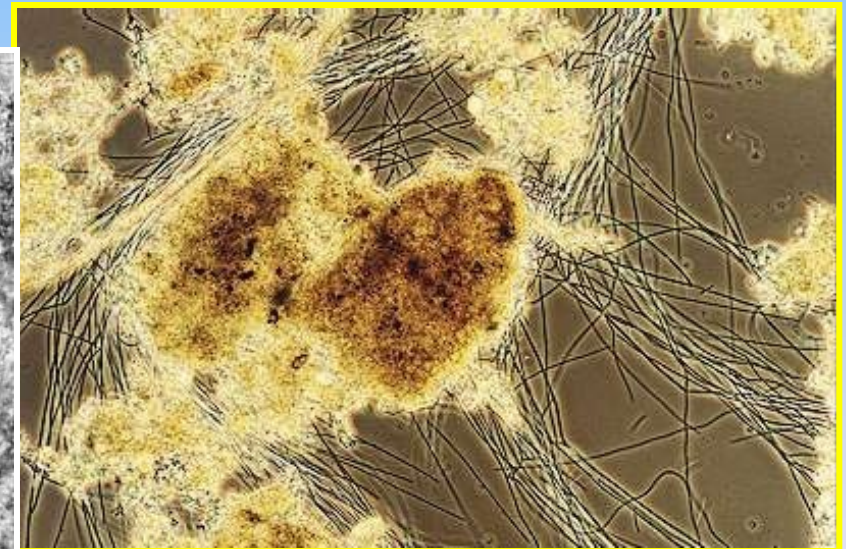
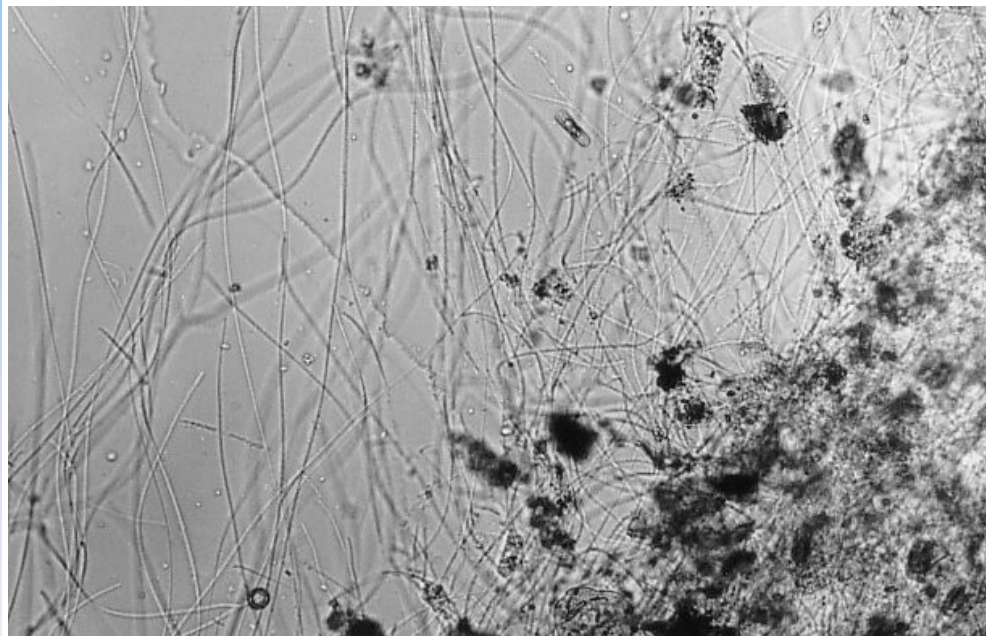
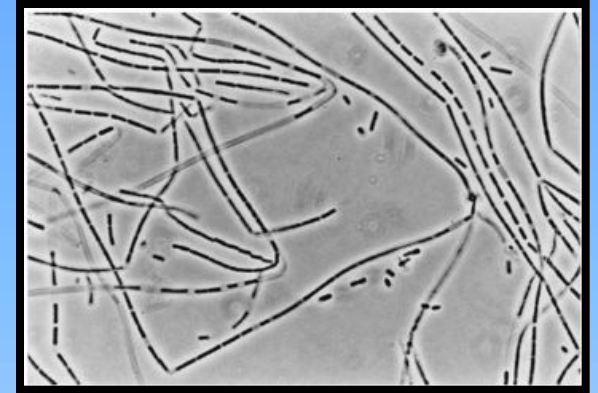


- Tekoucí vody
- Papírenské vody
- Kaly
- Aktivované kaly

– problém sedimentace

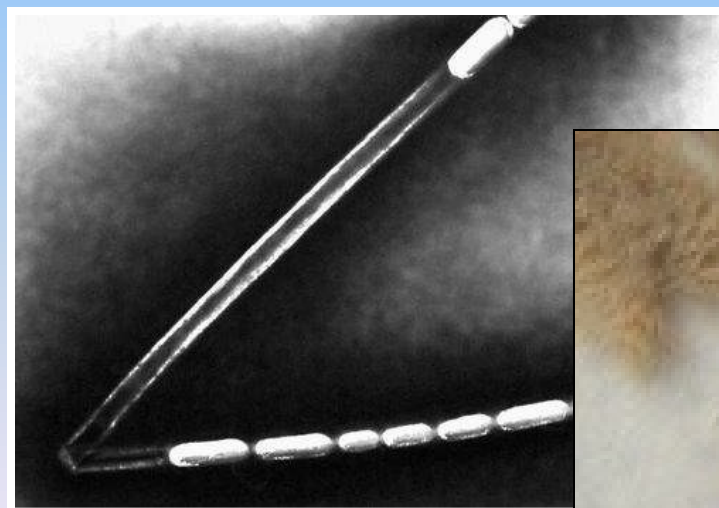
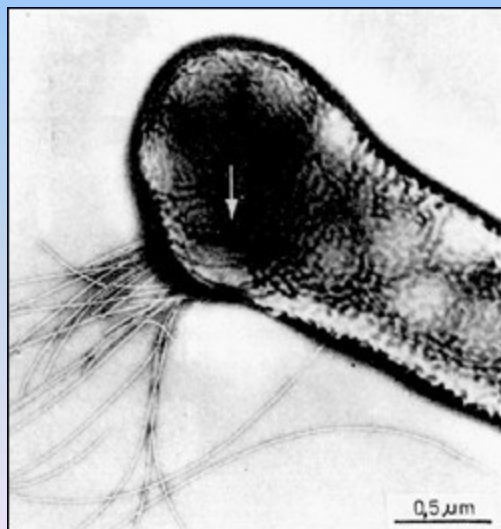
Degradace pochev – *Bacillus* - enzym

Sphaerotilus natans
G- tyčky, medium 12



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

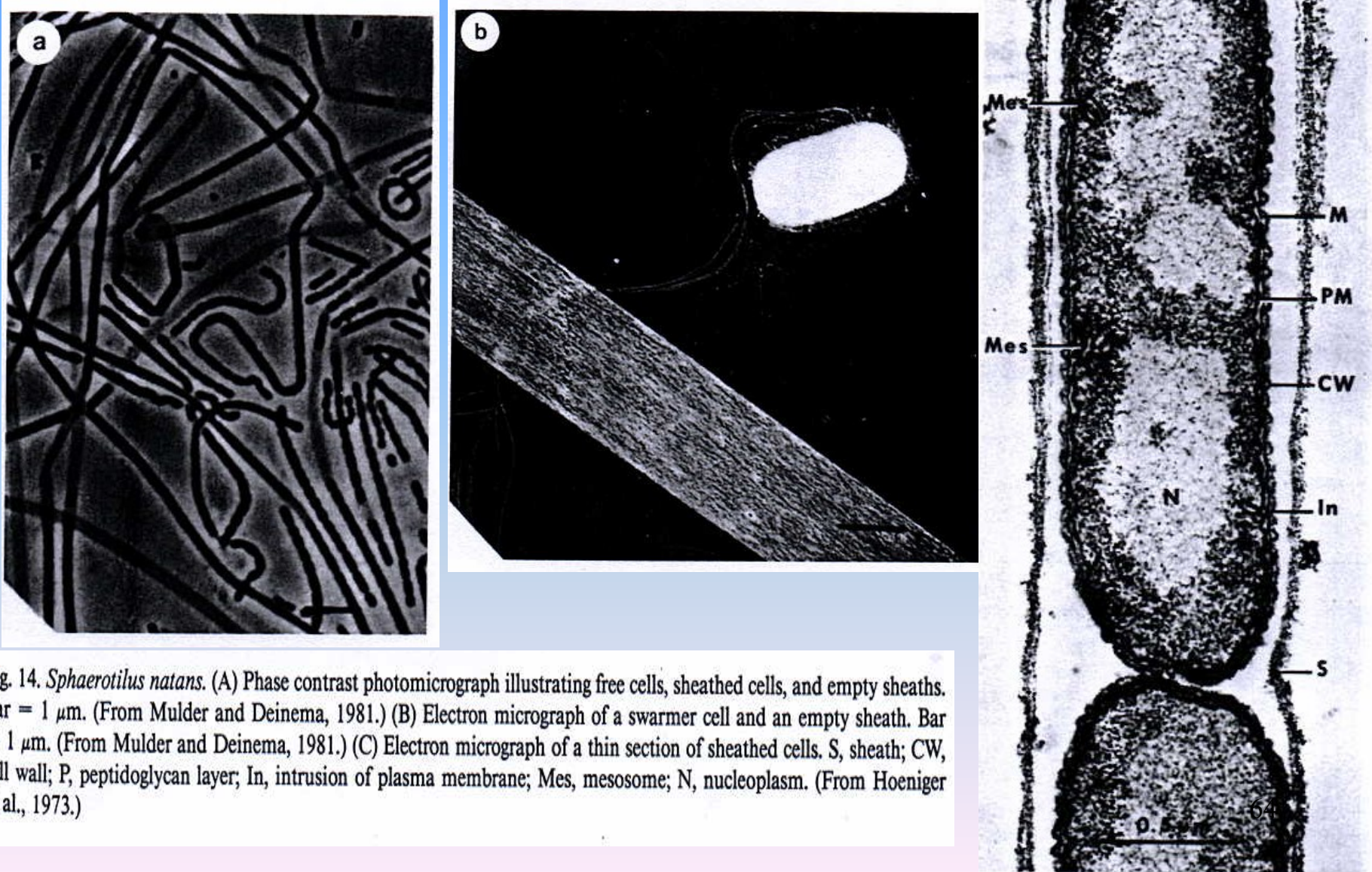
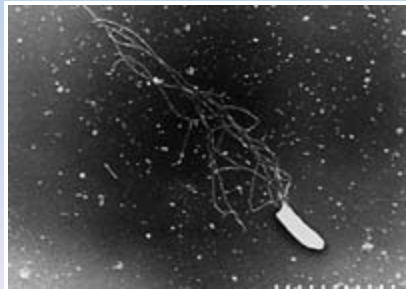
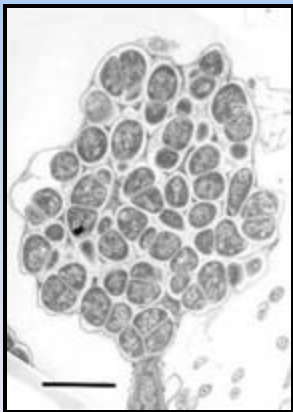


Fig. 14. *Sphaerotilus natans*. (A) Phase contrast photomicrograph illustrating free cells, sheathed cells, and empty sheaths. Bar = 1 μm . (From Mulder and Deinema, 1981.) (B) Electron micrograph of a swarmer cell and an empty sheath. Bar = 1 μm . (From Mulder and Deinema, 1981.) (C) Electron micrograph 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



Micromonosporaceae, Actinoplanes sp.

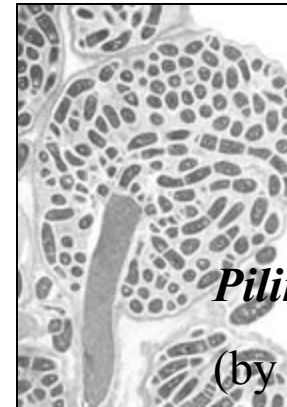
Pilimelia

- 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 66

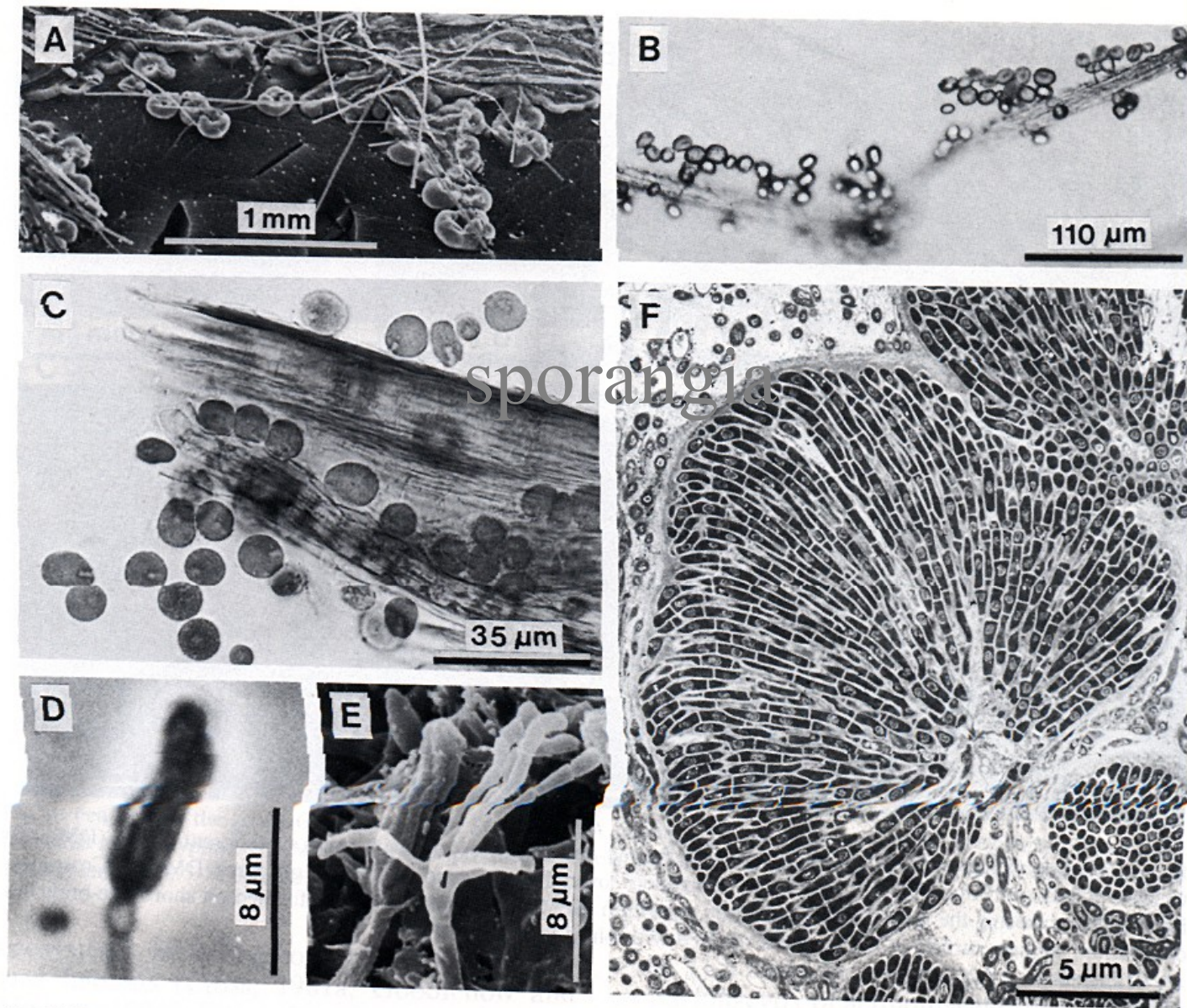


Fig. 7. Features of the genus *Pilimelia*. (A) Compact, small colonies on agar medium; hairs added as natural substrate (SEM). (B) Bundles of sporangia formed on hair (LM). (C) Globose to pyriform sporangia with internal columella; structure of the colonized part of the hair was destroyed (LM). (D) Cylindrical 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.)

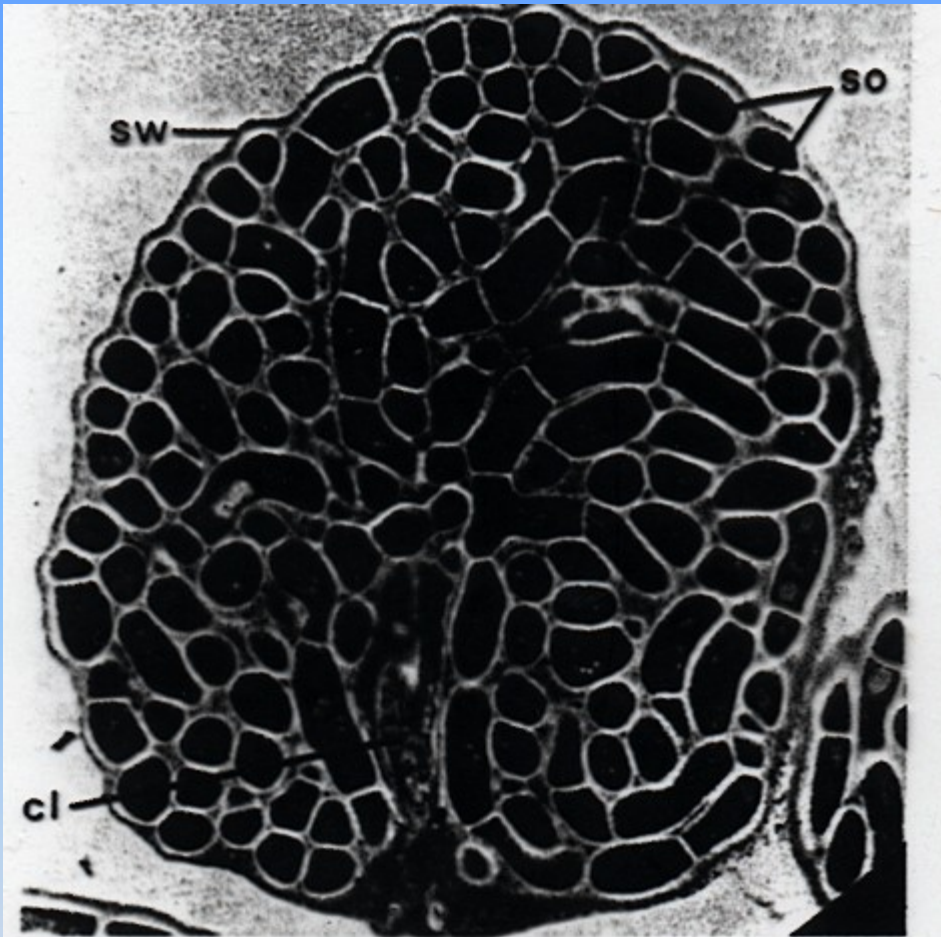


Fig. 18. Electron micrograph of a thin section of a sporangium of the actinoplanete genus *Pilimelia*, illustrating the arrangement of the spore chains. sw, sporangial wall; cl, columella; sp, spore. (From Vobis, 1984.)

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