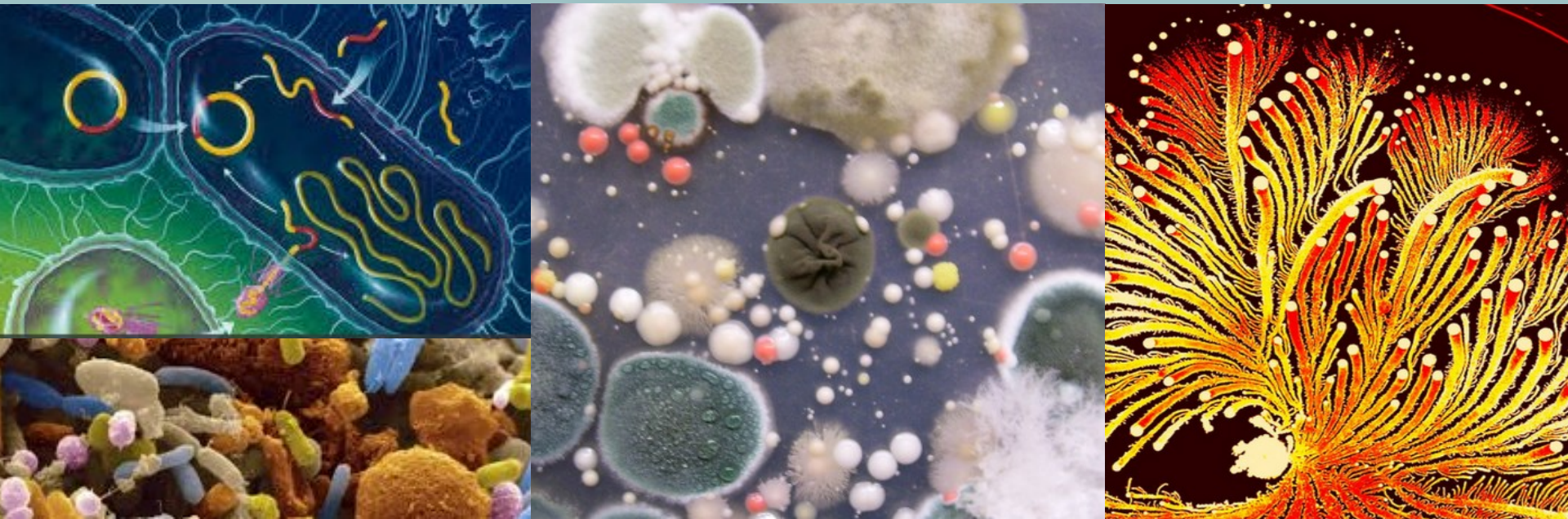
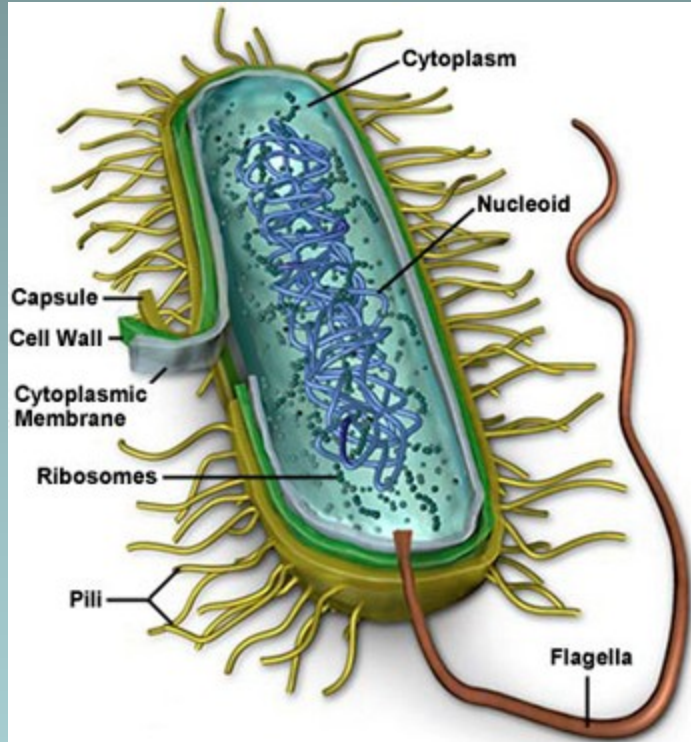


# Cytologie a morfologie bakterií

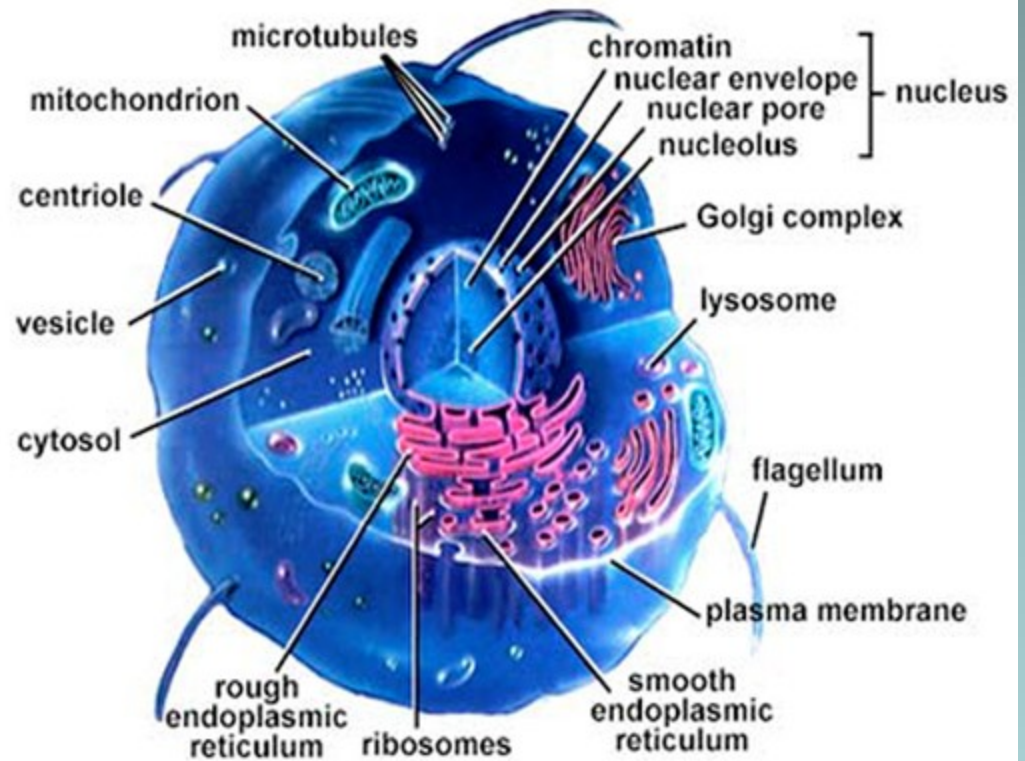


I.

# Unikátní vlastnosti prokaryotických buněk



**prokaryotic cell**

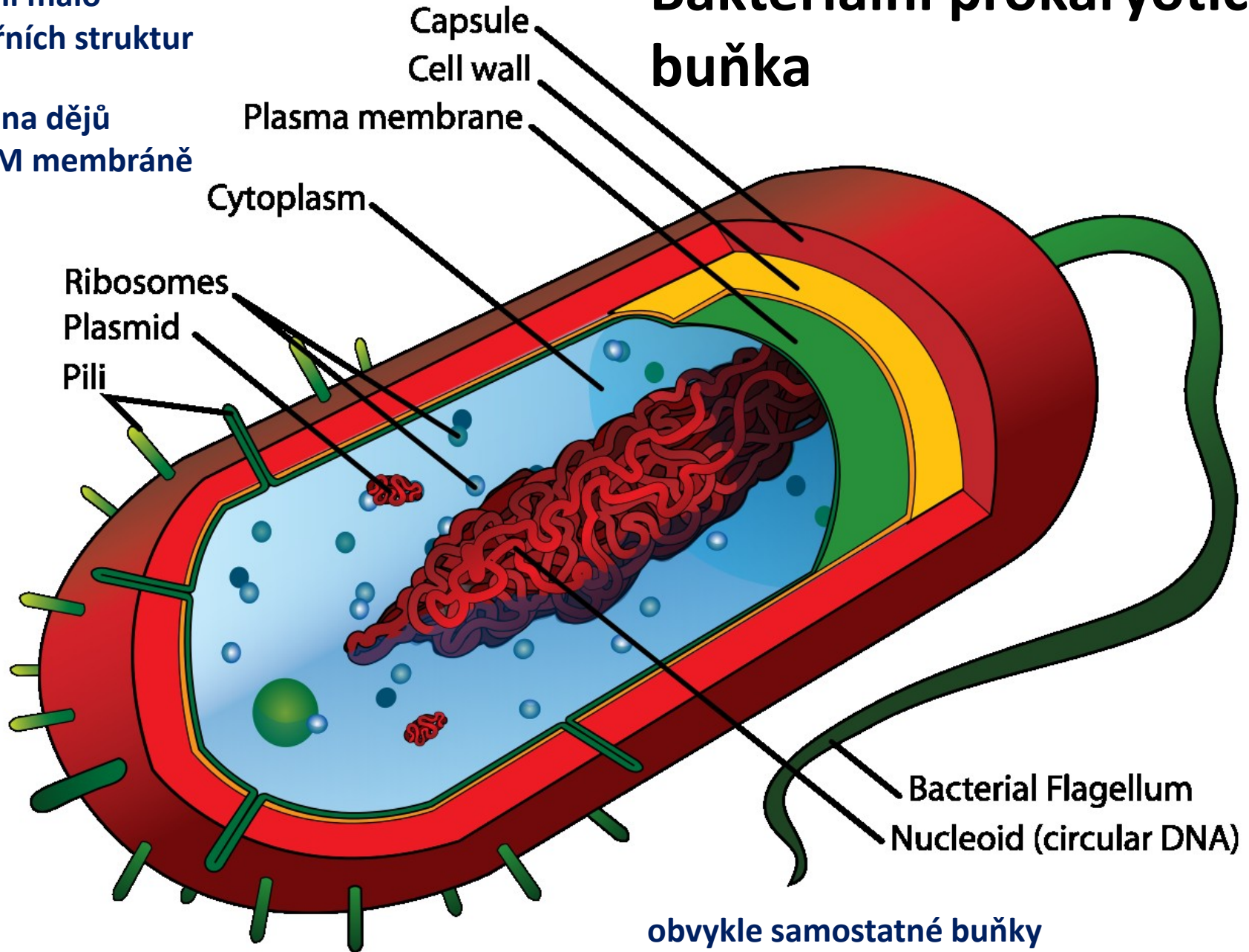


**eukaryotic cell**

# Bakteriální prokaryotická buňka

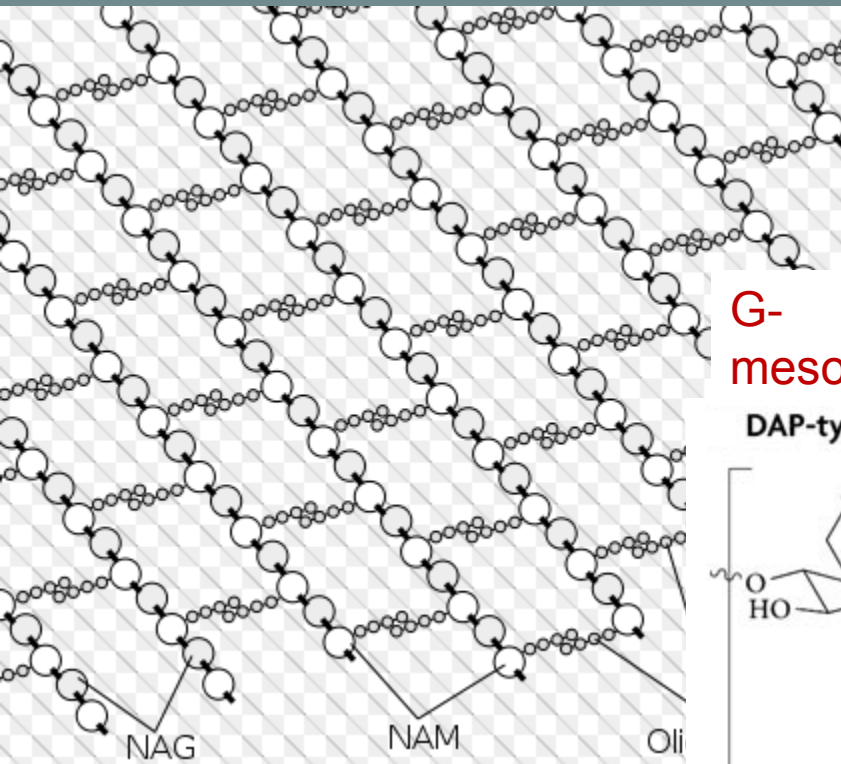
Velmi málo  
vnitřních struktur

Většina dějů  
na CM membráně



obvykle samostatné buňky

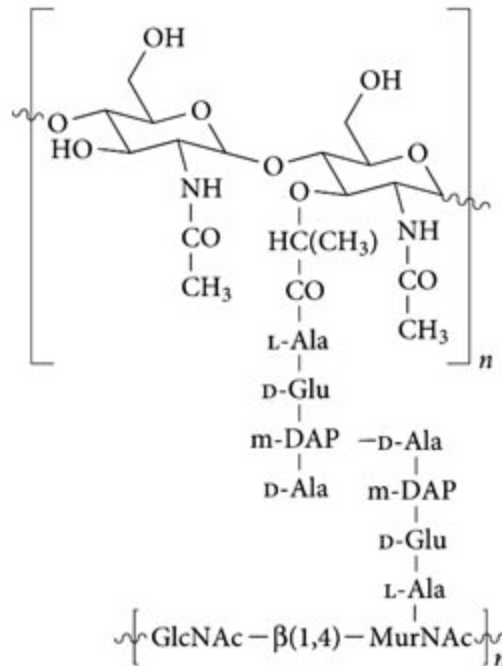
# Peptidoglykan



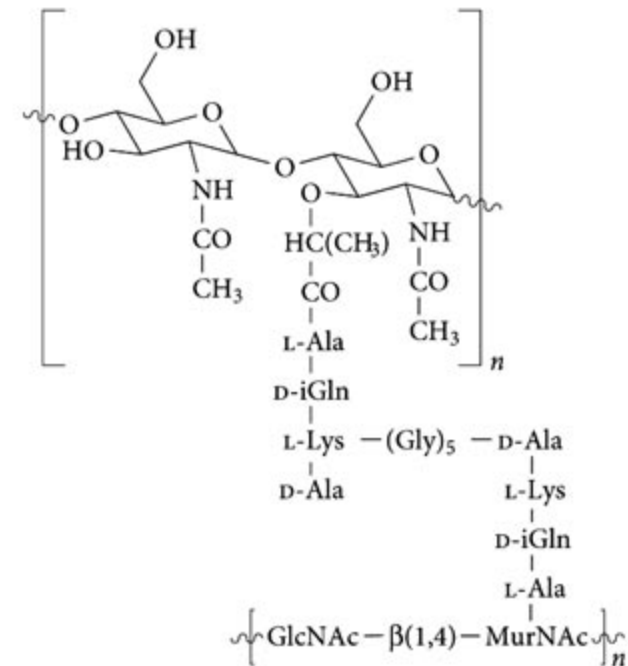
**G-**  
**meso-diaminopimelová kys.**

**G+**  
**L-lysin**

**DAP-type peptidoglycan**

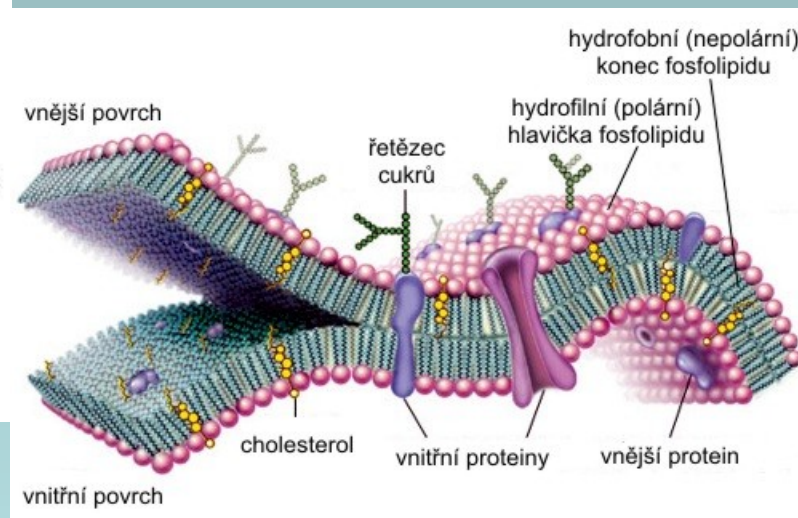
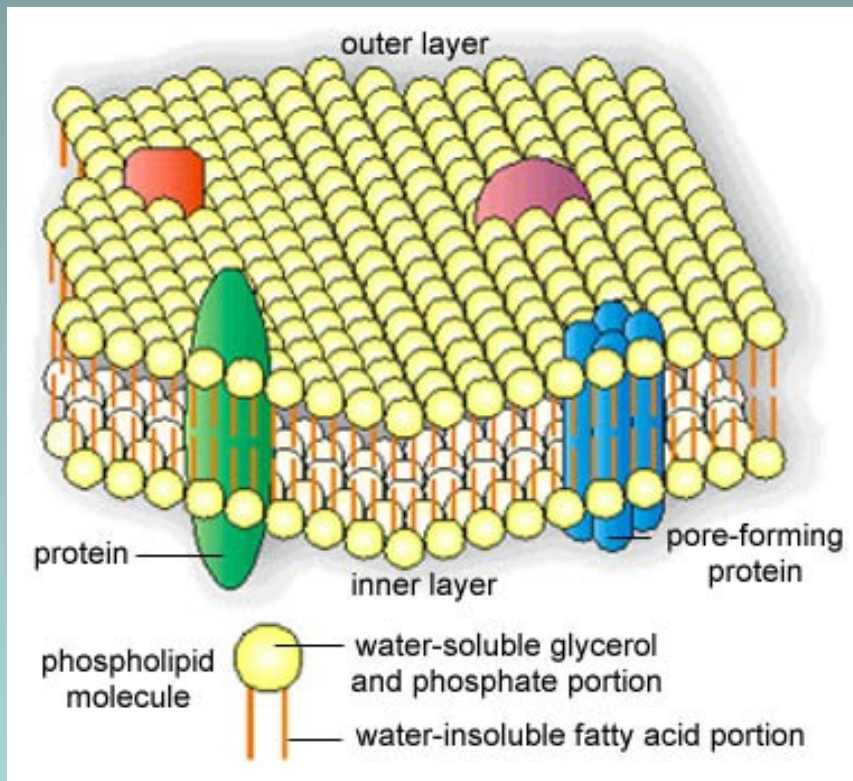


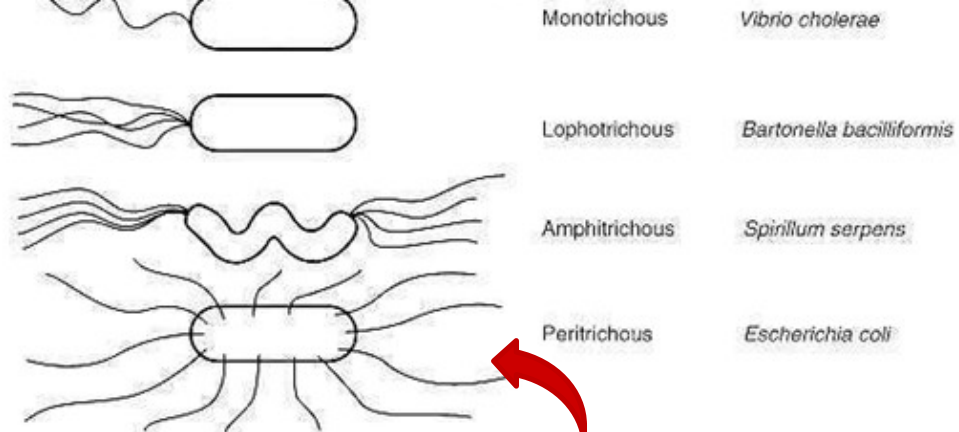
**Lys-type peptidoglycan**



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

„Model tekuté mozaiky“ tvořený tekutou fází lipidů je prostoupen globulárními proteiny, které jsou jednak periferní (umístěné na povrchu membrány) a integrální, prostupující celou membránu.

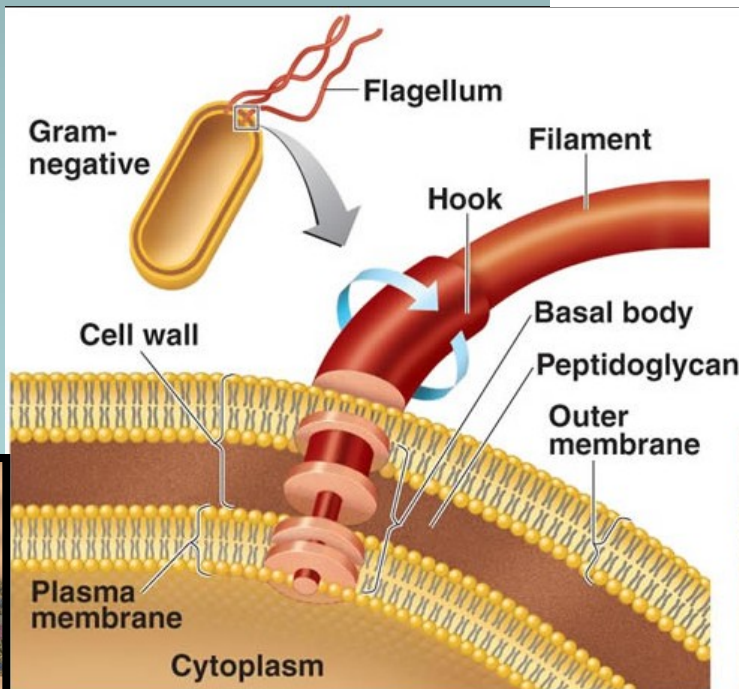
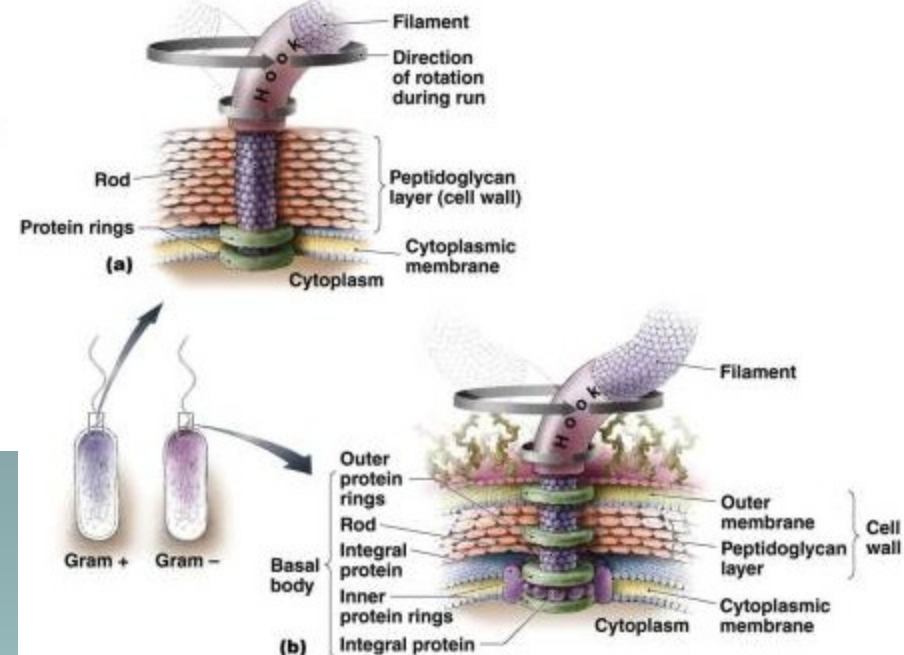




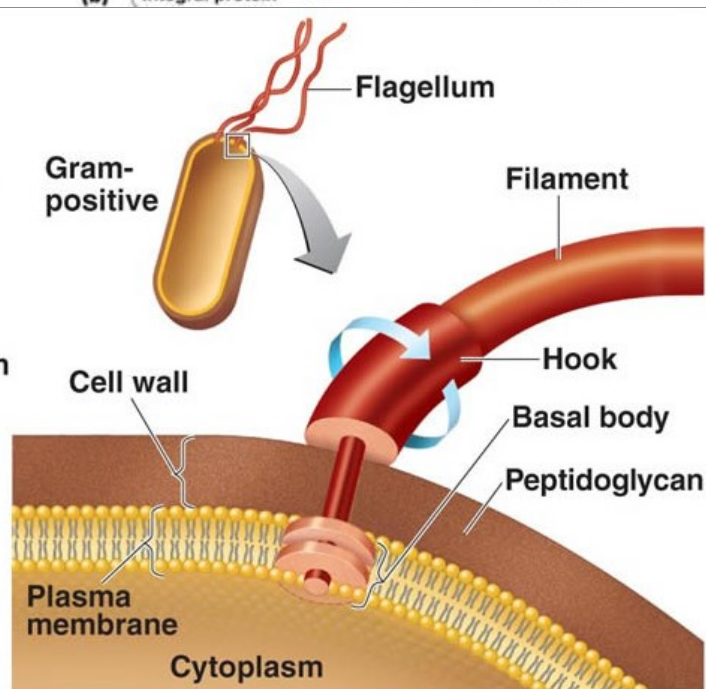
Uspořádání: taxonomický znak

# Bičík

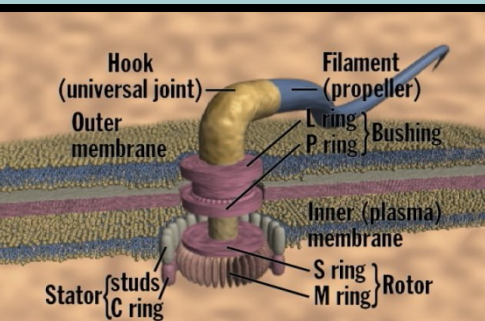
Rozdíl mezi G+ a G-

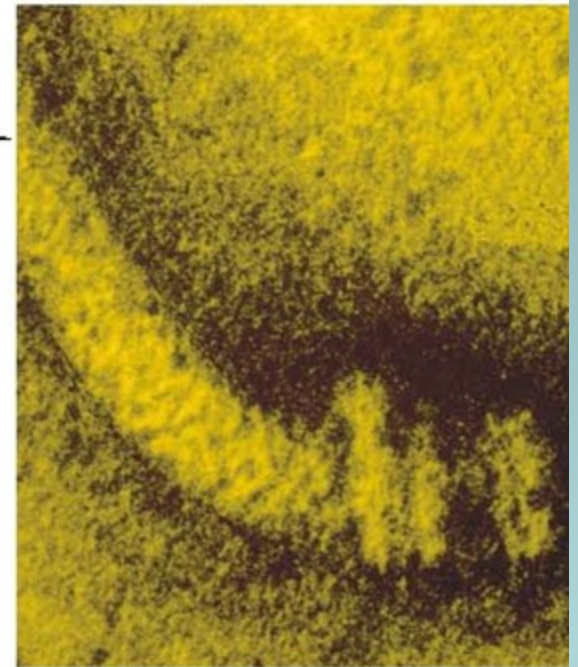
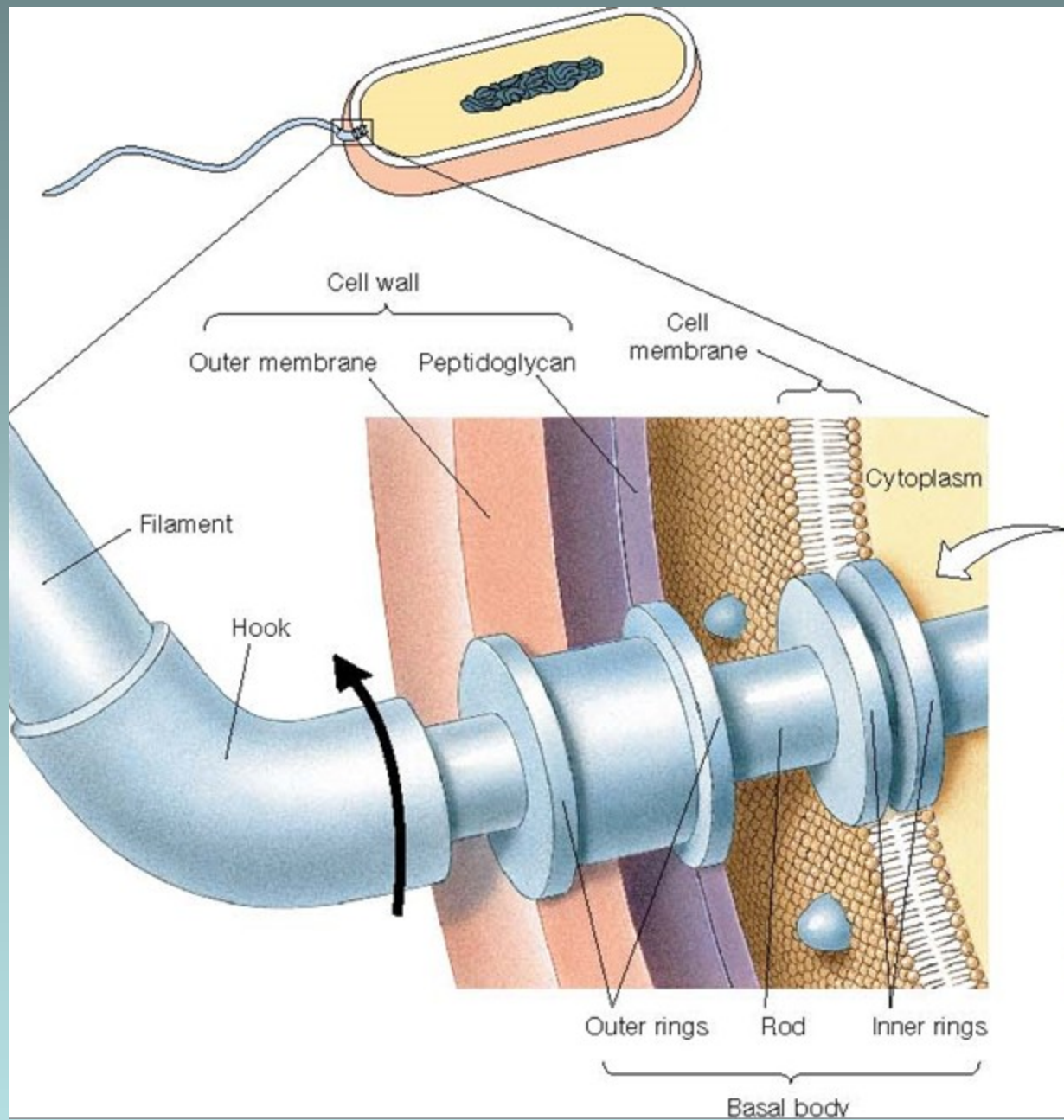


(a) Parts and attachment of a flagellum of a gram-negative bacterium



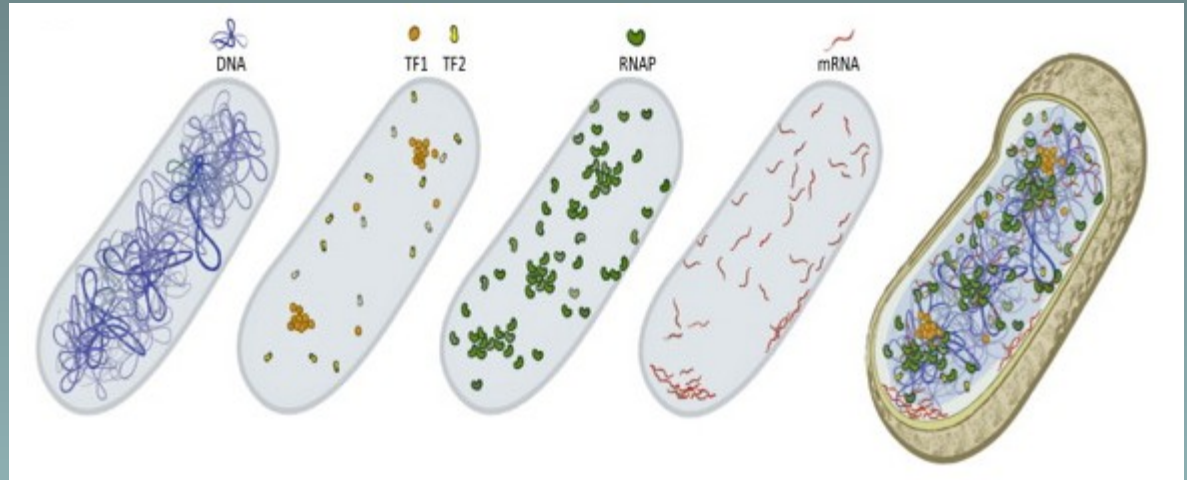
(b) Parts and attachment of a flagellum of a gram-positive bacterium





# Cytoplazma

- Organizovaná
- Difúze či řízené mechanismy



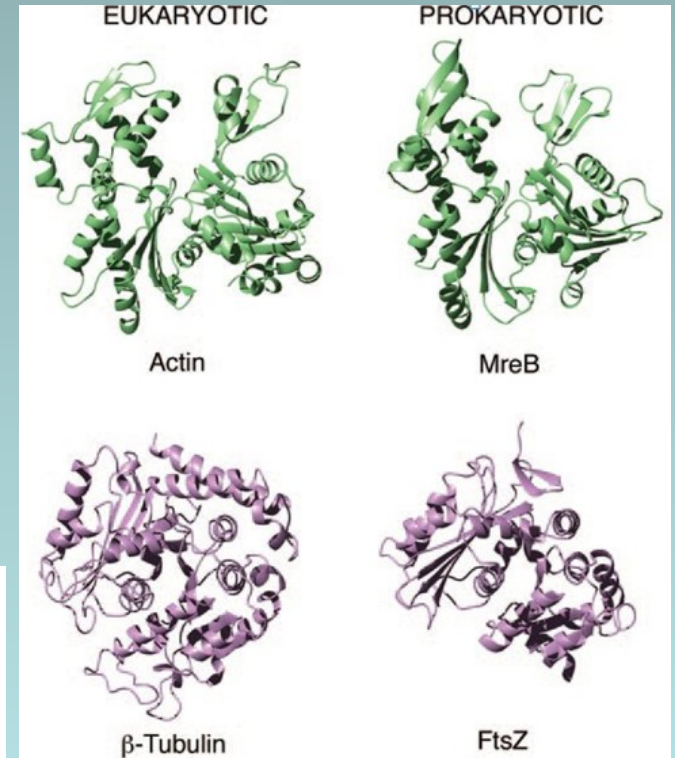
Weng and Xiao; 2014

# 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)*



	Division	Polarity	Shape
Eukaryotes	Tubulin	Actin	Intermediate filaments
Prokaryotes	FtsZ	MreB	CreS



# Bakteriální buňka je polarizovaná

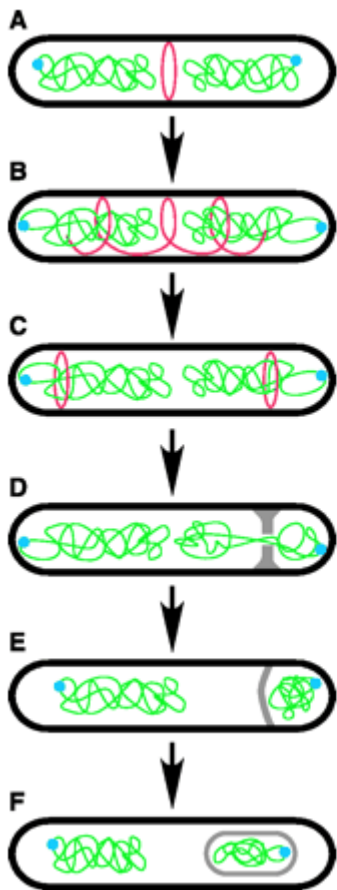
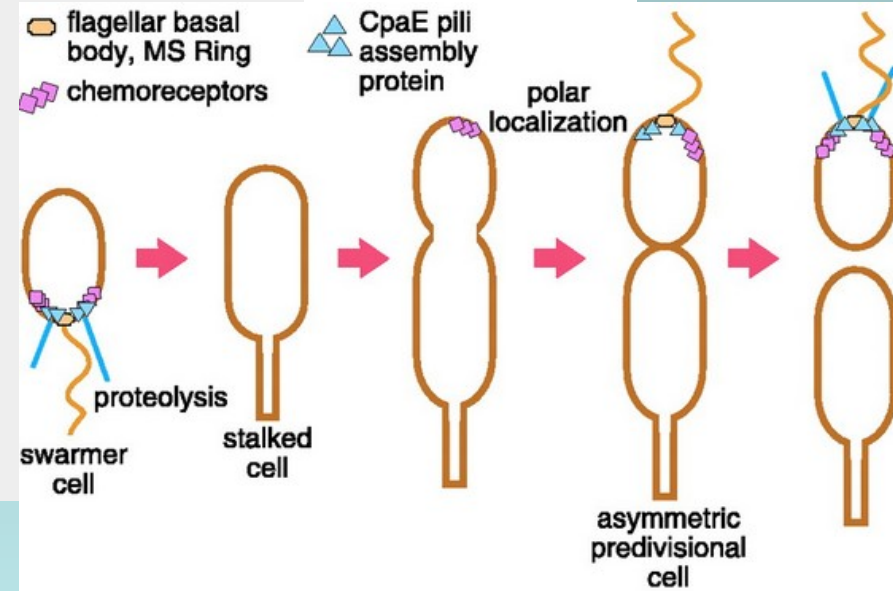


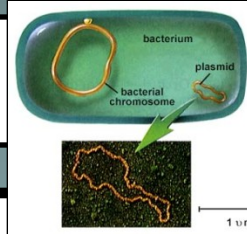
Figure 4.

Polarization during sporulation. (A to C) The origin regions (blue) of the two chromosomes (green) localize to extreme opposite poles while the medial Z ring (red) is redeployed into two polar rings via a helical intermediate. (D) One of the polar Z rings is converted into a polar septum (gray), creating forespore and mother cell compartments and trapping the origin-proximal region of a chromosome in the forespore. The remainder of the chromosome is pumped across the septum. (E and F) The septal membranes migrate around the forespore, engulfing it within the mother cell.

Shapiro; 2002



# Zvláštnosti prokaryotické buňky



- **živý, otevřený systém** schopný **regulace a autoreprodukce**
- **jádro** neodděleno od CPL membránou, větš. kruhová (i lineární) DNA, bez intronů
- **haploidní buňky** (1 alela)
- bez buněčných organel, jediná membrána je **cytoplasmatická**
- **ribosomy** se liší od ribosomů eukaryotních buněk – menší, volně v CPL  
16S rRNA (malá podjednotka), 5S rRNA a 23S rRNA (velká p.)

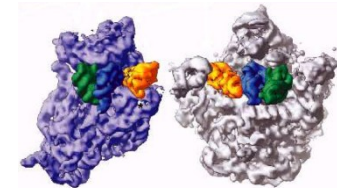
translace začíná N-formylmethioninem

specifické struktury a vlastnosti bakt. buňky:

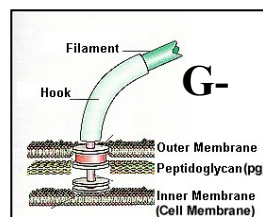
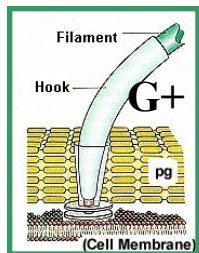
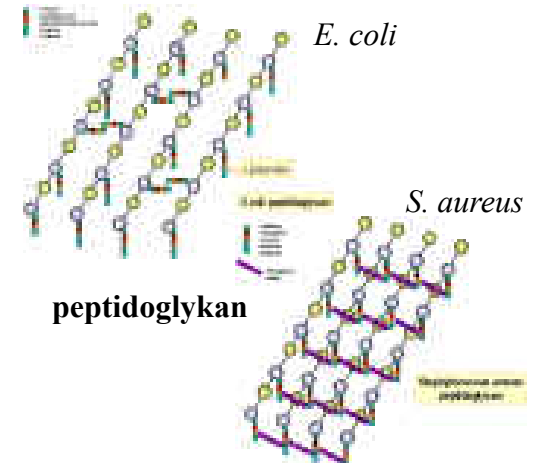
**peptidoglykan** (až na mykoplasmata)

steroly v membránách zcela výjimečně

**bičík** – globul. bílk. flagelin, pohyb rotací



bakteriální ribozom



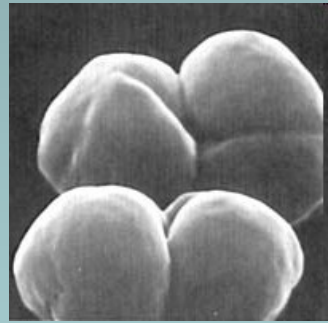
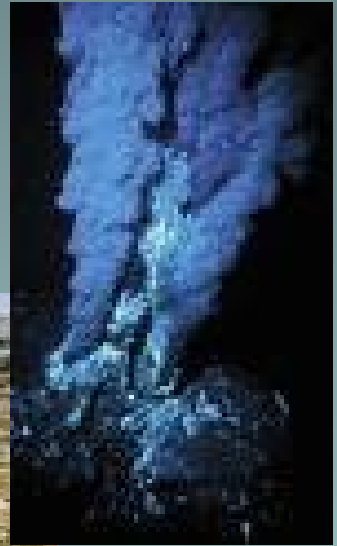
# *Bacteria vs. Archaea !!*



## Archea – extrémní podmínky:

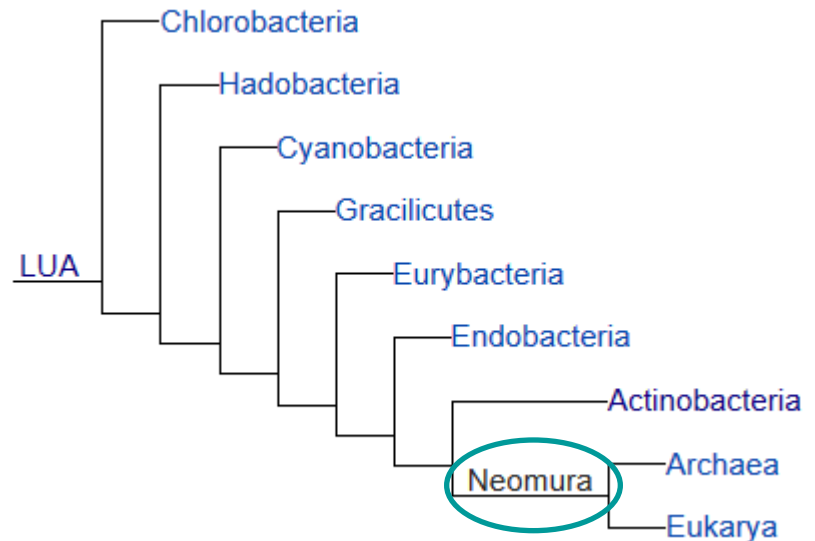
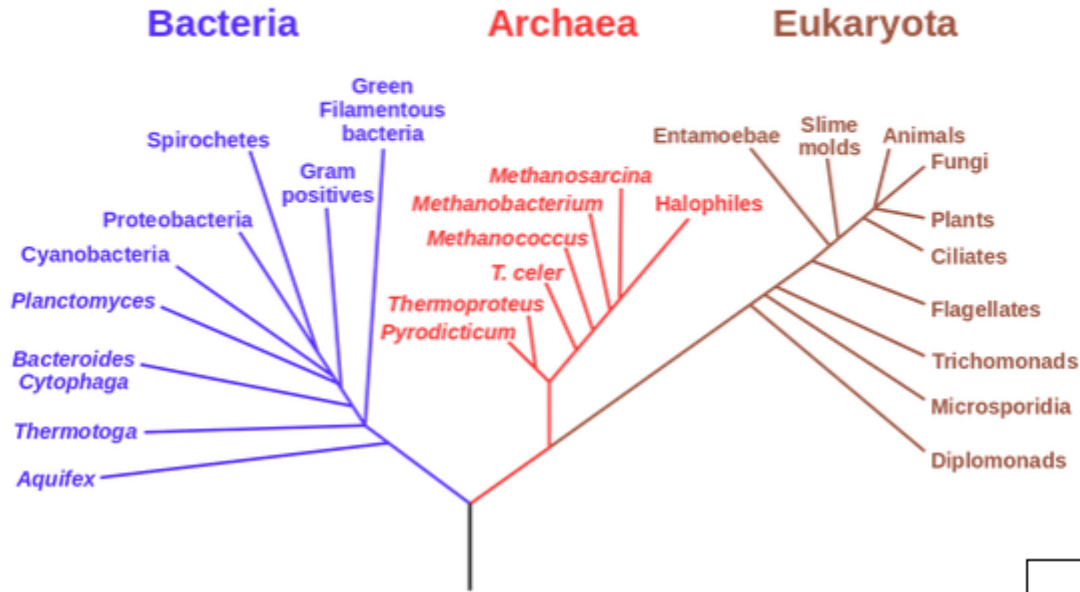
strukturní shody  
ale rozdílné chemické složení

- ---- rozdílná citlivost na ATB



- PEPTIDOGLYKAN
- CM – 1 vrstevná
- tRNA archeí podobná eukaryotické

# Phylogenetic Tree of Life



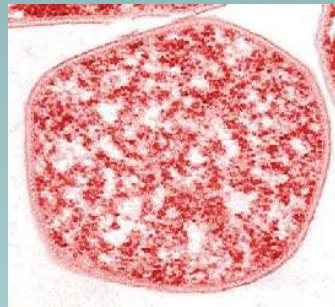
## Cytoplazmatická membrána archeí

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 MK
- (4) větvení isoprenoidu

### **Nepřítomnost sterolů**

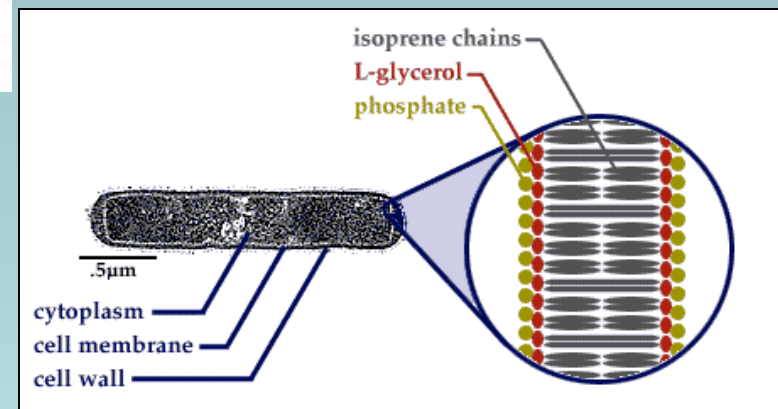
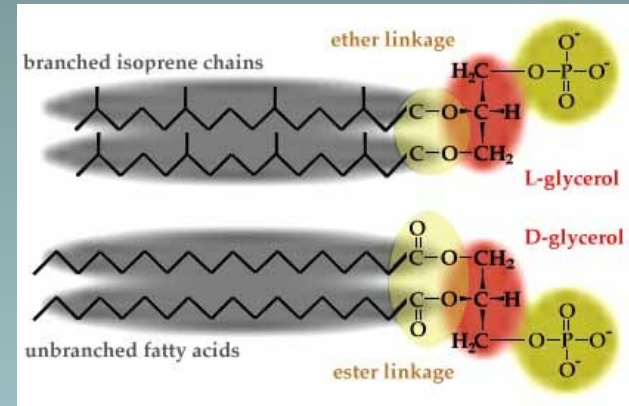


### Často jednovrstevná

glycerolové jednotky na obou koncích MK tvoří 1vrstvu

### Lepší přizpůsobení extrémům

– monolayer rezistentnější k narušení teplem

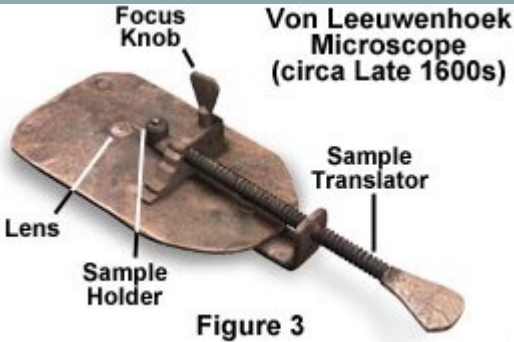


# II. Volba správného typu mikroskopie pro pozorování cytologických a morfologických znaků



The First Compound Microscope

Janssenovi Z 9 x, ~1595

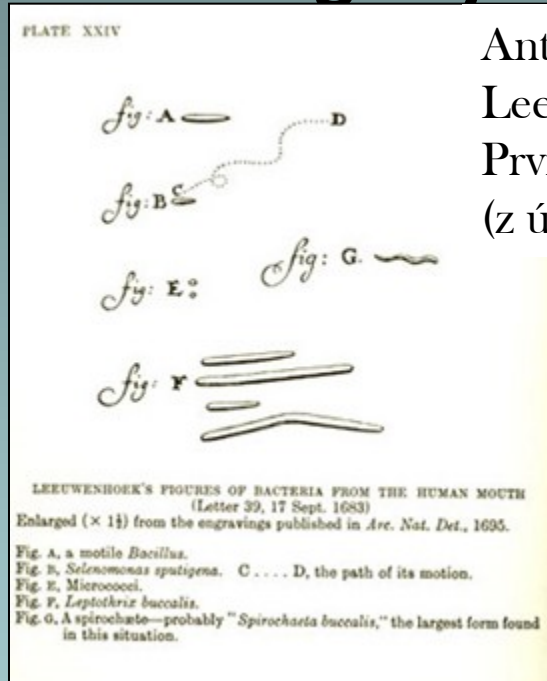


Von Leeuwenhoek Microscope (circa Late 1600s)

Figure 3



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

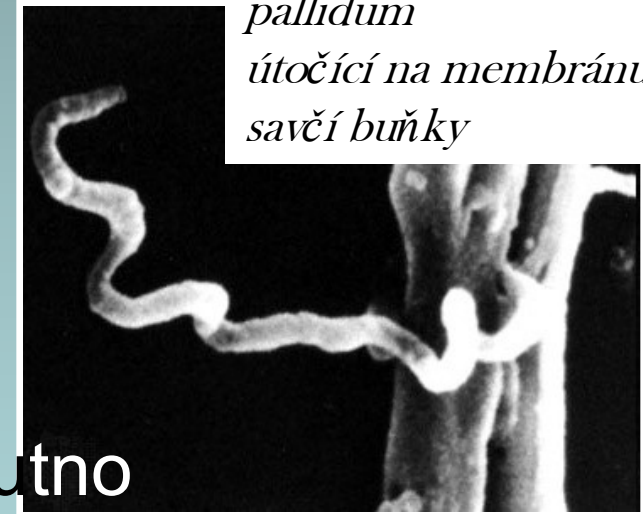


LEEUVENHOEK'S FIGURES OF BACTERIA FROM THE HUMAN MOUTH  
(Letter 39, 17 Sept. 1683)  
Enlarged ( $\times 14$ ) from the engravings published in *Arc. Nat. Det.*, 1695.

Fig. A, a motile Bacillus.  
Fig. B, *Selenomonas spatispina*. C . . . D, the path of its motion.  
Fig. E, Micrococci.  
Fig. F, *Leptothrix buccalis*.  
Fig. G, A spirochete—probably "*Spirochaeta buccalis*," the largest form found in this situation.

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

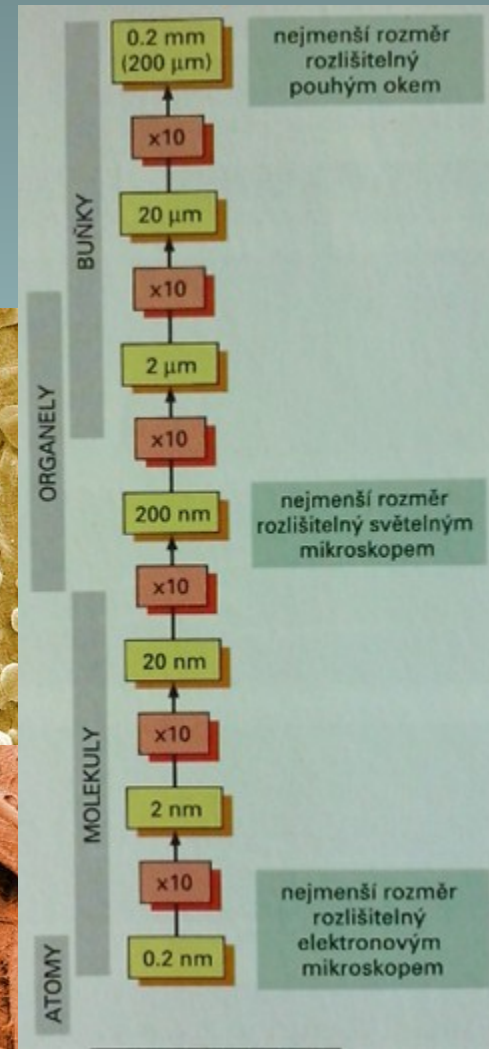
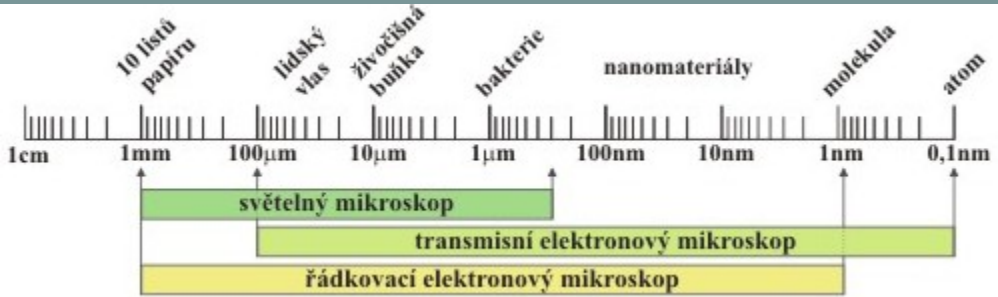
SEM *Treponema pallidum*  
útočící na membránu  
savčí buňky



**Mikroskopie** – nutno zvolit vhodný typ techniky dle sledované struktury



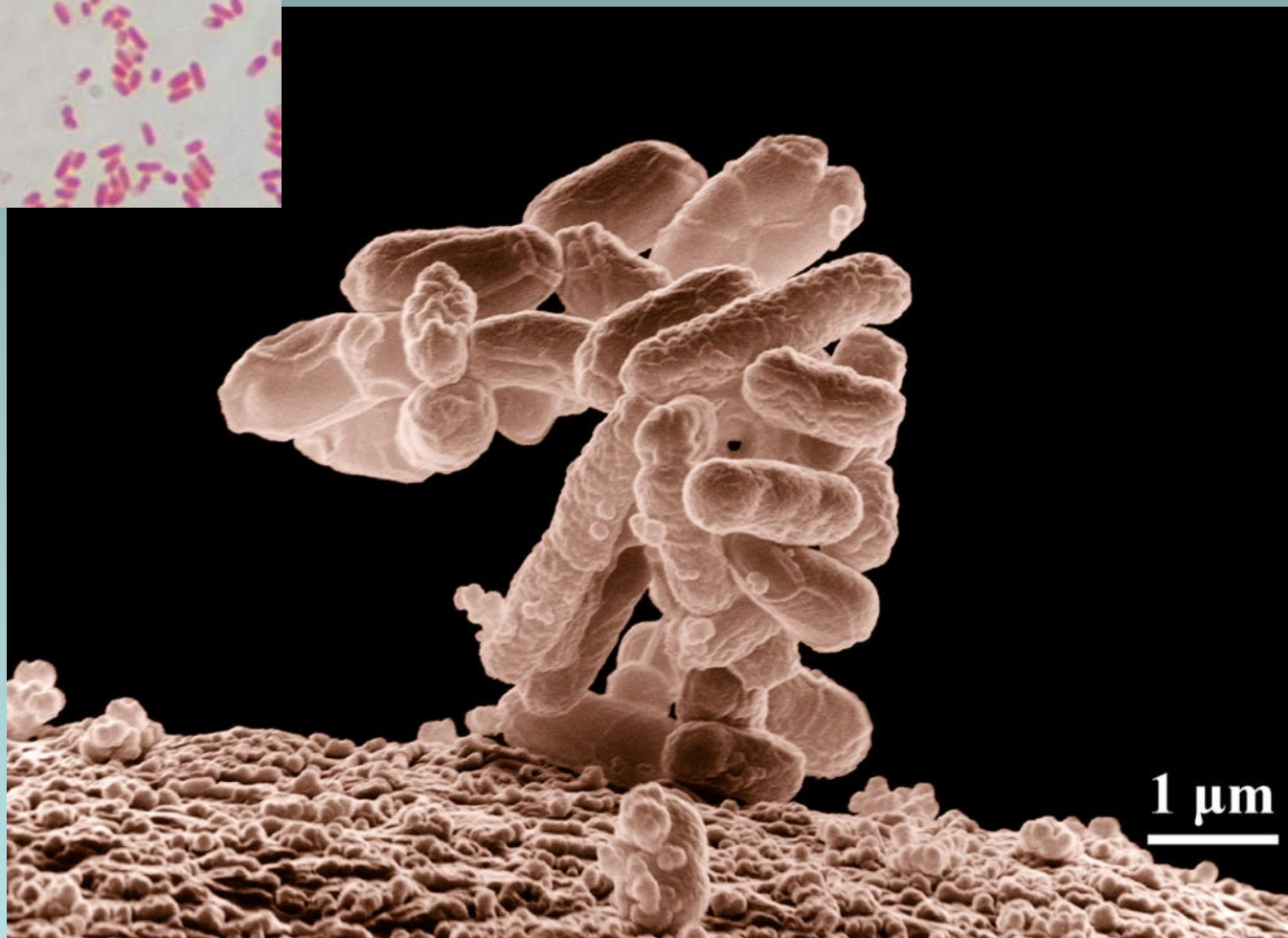
# Světelný mikroskop (1000x) vs. Elektronový (100 000x)



Světelný mikroskop - Jasné pole



Jasné pole,  
1000x



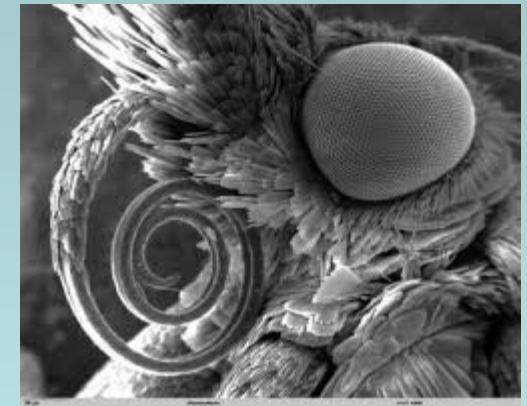
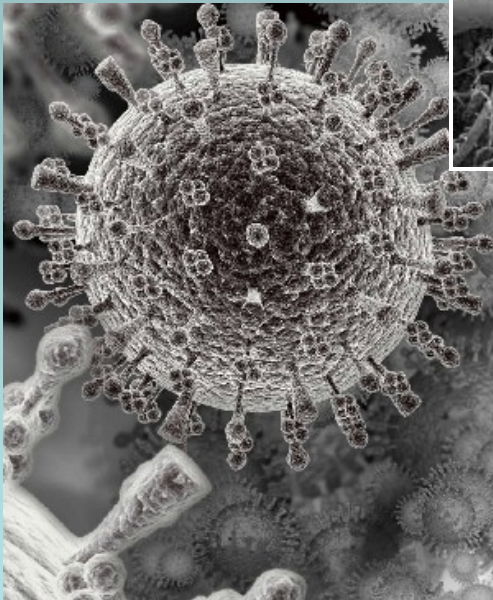
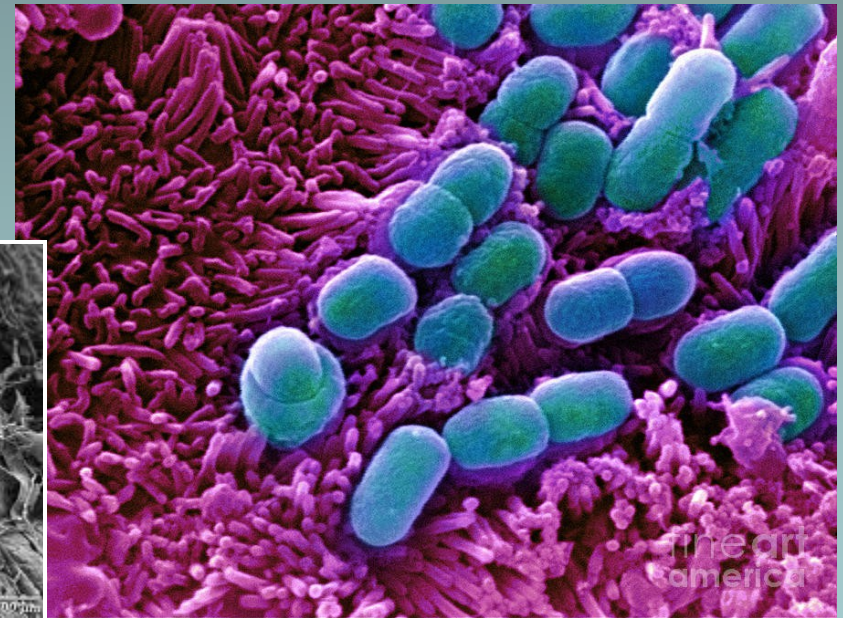
Rastrovací  
elektronová  
mikroskopie



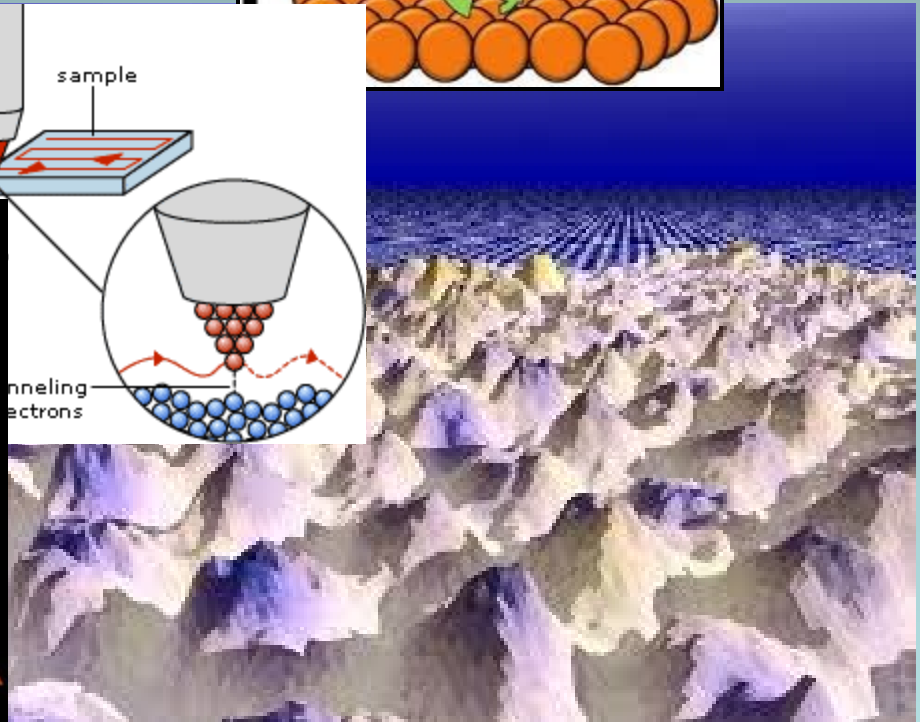
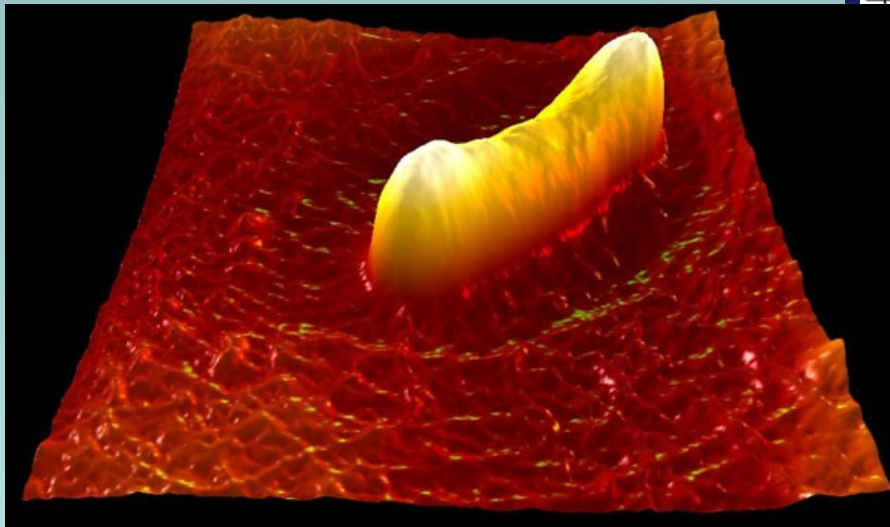
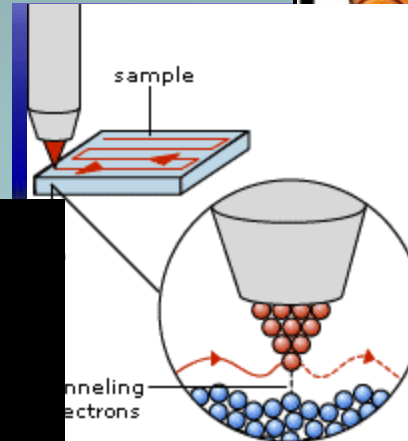
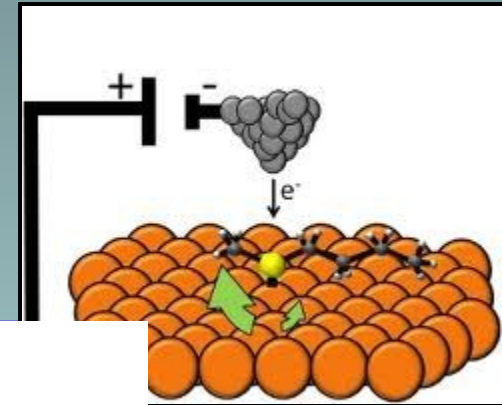
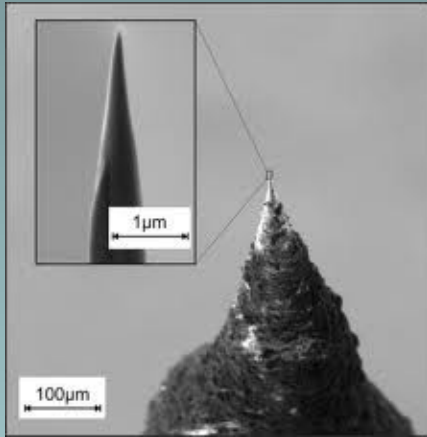
# Rastrovací elektronová mikroskopie

(skenovací, řádkovací, Scanning Electron Microscope - SEM)

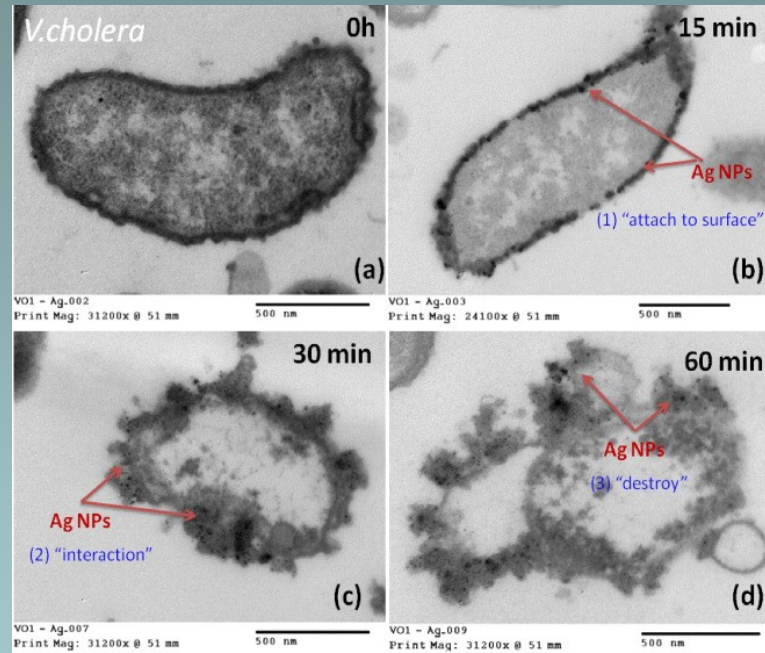
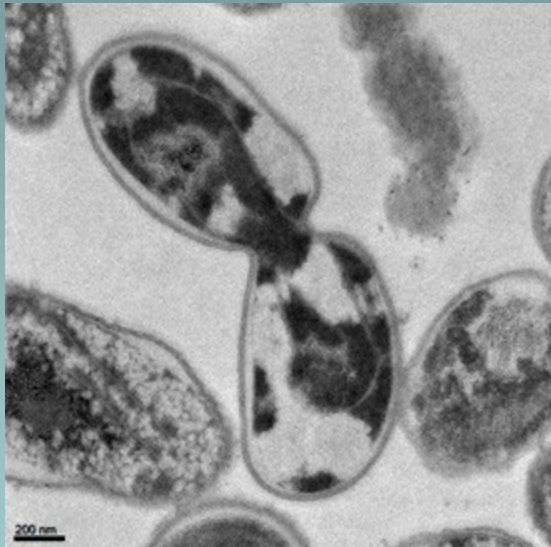
Popularita SEM pramení z možnosti získat obrázky povrchů širokého spektra objektů



# 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**.

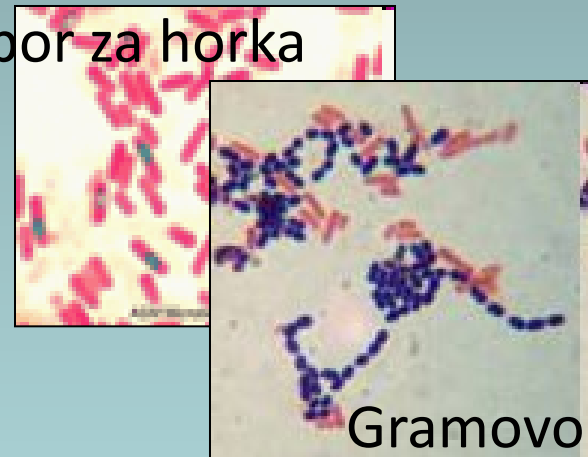
# Cytologie a morfologie buňky

- **PREPARÁT** pro světelnou mikroskopii
  - co chceme vidět? – podle toho příprava preparátu
  - tvar buňky** – fázový kontrast, barvený fixovaný prep.

## **a struktur**



barvení buněk a  
spor za horka



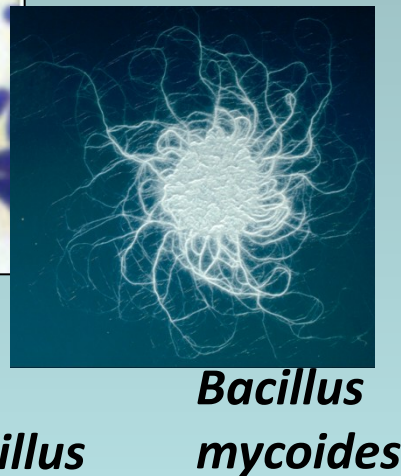
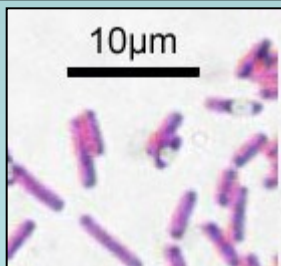
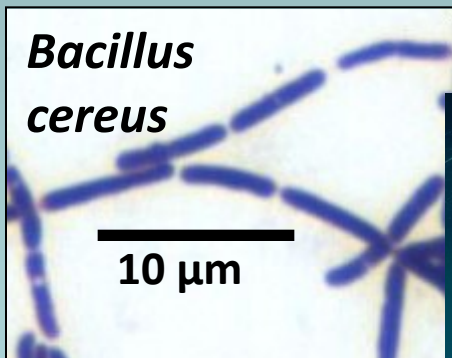
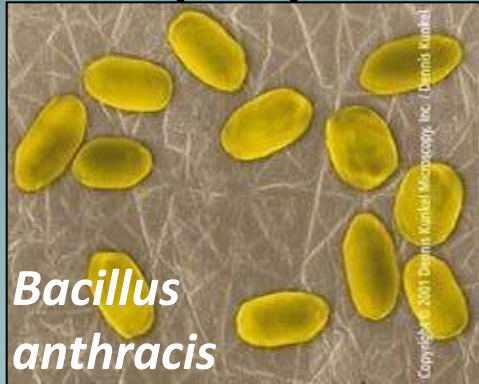
**pohyb buňky** – fázový kontrast, fluorescence

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

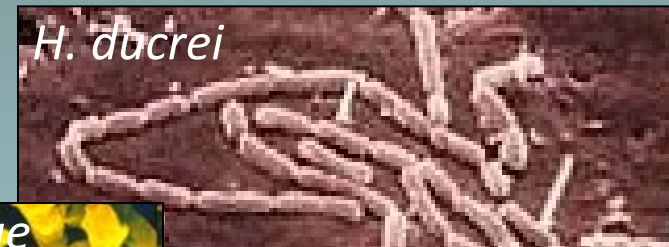
**typ buněčné stěny** – Gramovo a acidorezistentní b.

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

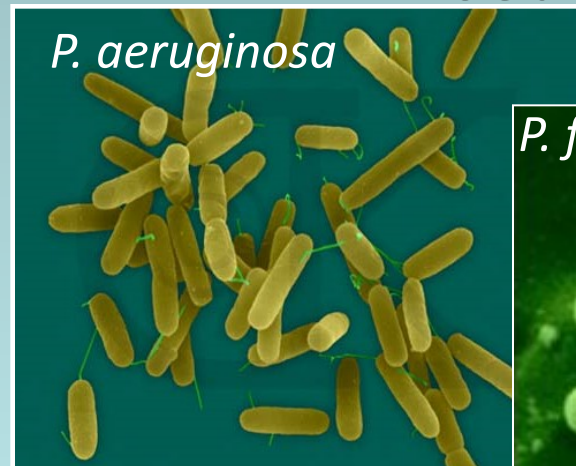
- Př: tyčky bacilů



- *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, lancetovitě

- diplokoky, streptokoky, tetrády, sarciny, stafylokoky

Tyčinky – rovné, zakřivené, větvcí se, palisády pleomorfní

Kokobacily

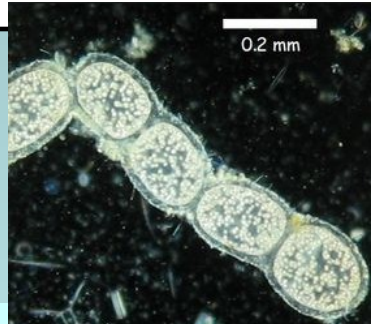
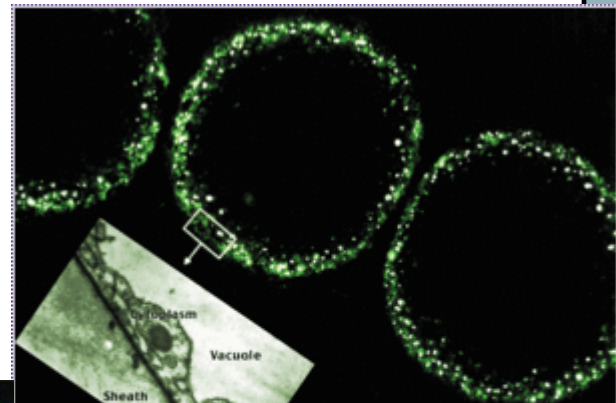
Pupeny

Prostéky

Spirily

Hvězdice

Mycelia



Cell from a string of *Thiomargarita namibiensis*. The inset demonstrates the outer cell wall, the thin layer of cytoplasm lining it, and the large liquid vacuole within the cell. Image from [Woods Hole Oceanographic Institution](#).

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

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

## Bacterial Morphology

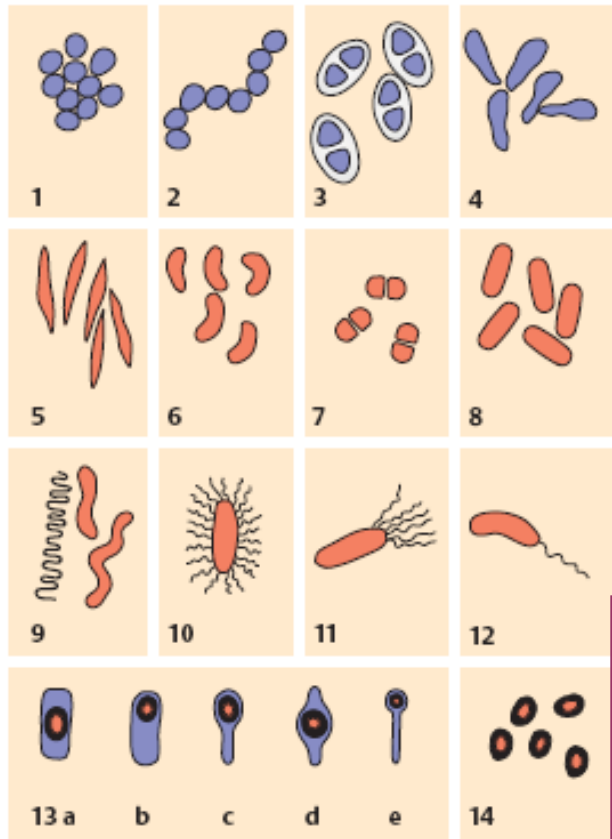
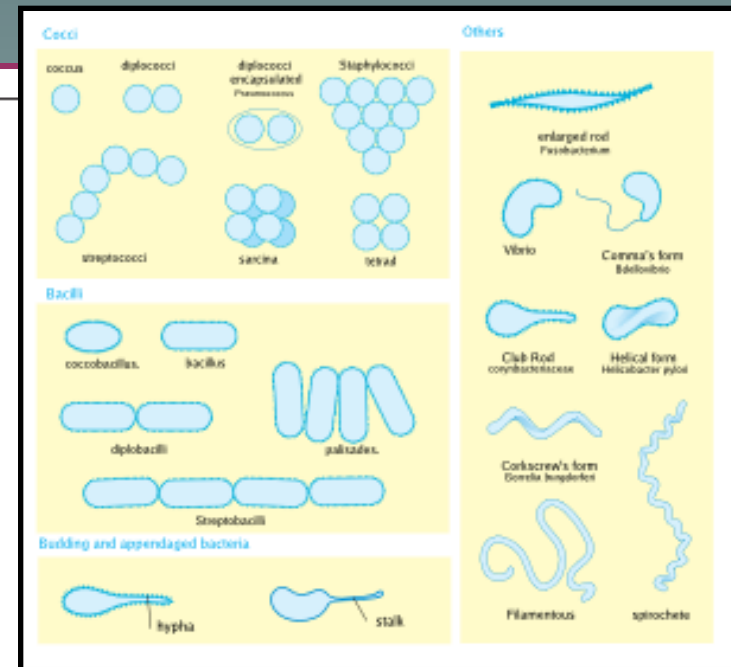
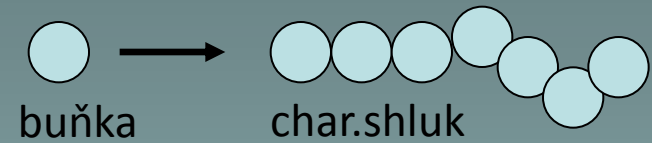


Fig. 3.1

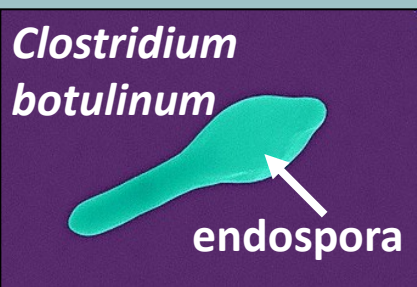
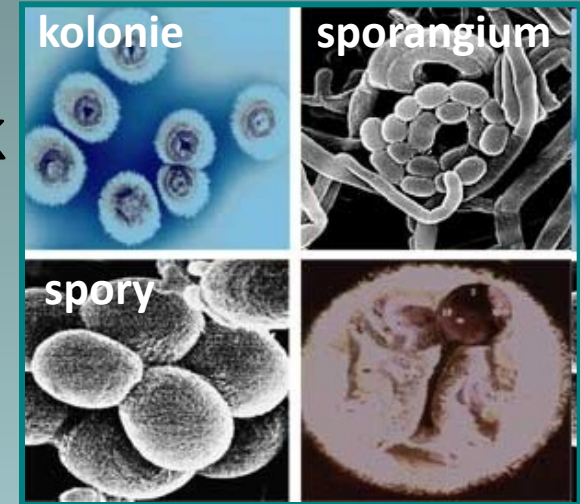


1. Gram-positive cocci in grape-like clusters (staphylococci)
2. Gram-positive cocci in chains (streptococci)
3. Gram-positive cocci with capsules (pneumococci)
4. Gram-positive, club-shaped, pleomorphic rods (corynebacteria)
5. Gram-negative rods with pointed ends (fusobacteria)
6. Gram-negative curved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

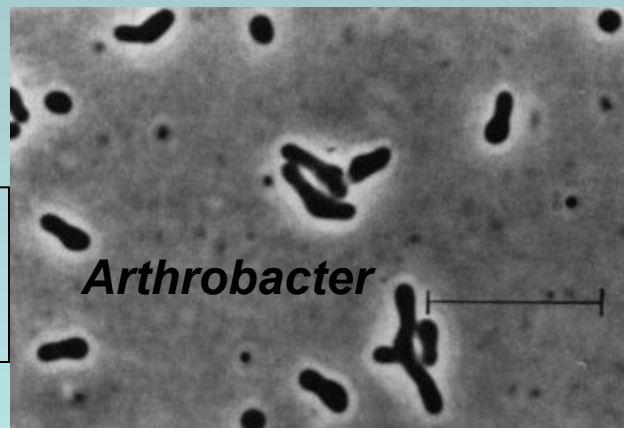


- Buňky
- Charakteristických shluků buněk
- Buněčných útvarů (spory, konidie, sporangia, pouzdra..)
- Bakteriální kolonie

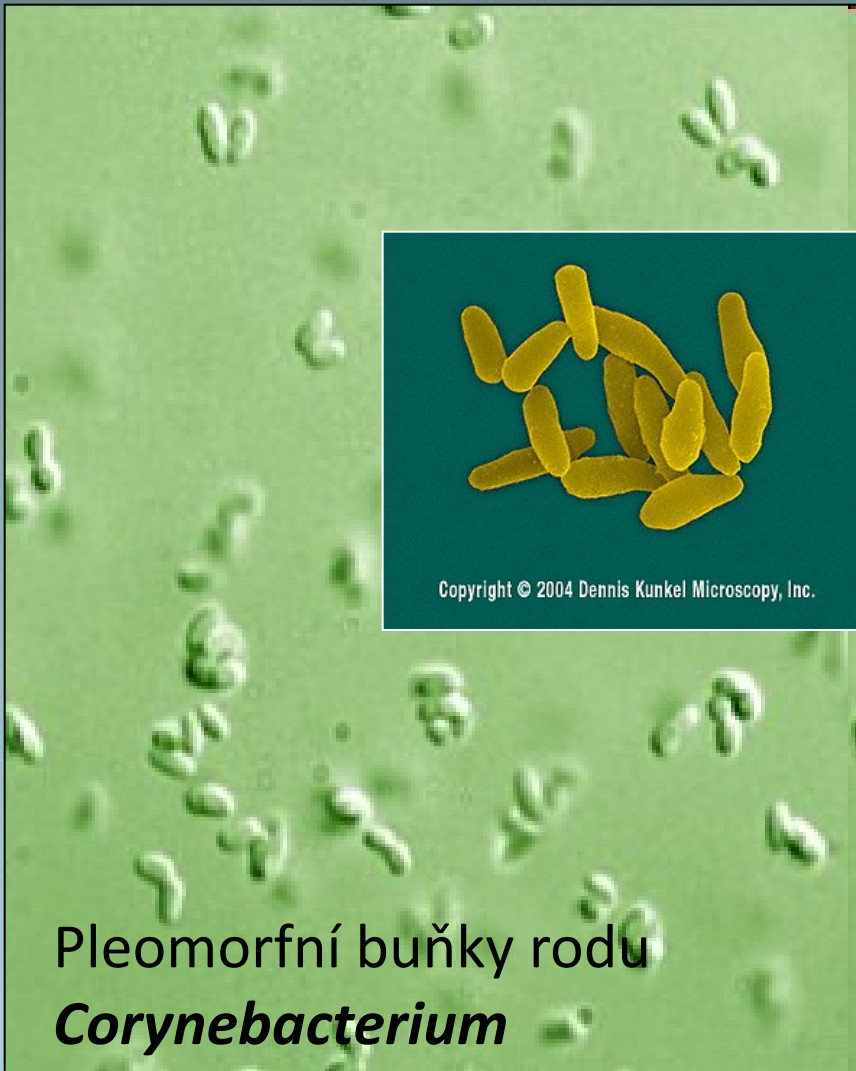


Většinou druhově charakteristické  
= identifikační znak

Pozor na: stáří kultury a  
pleomorfní buňky







Copyright © 2004 Dennis Kunkel Microscopy, Inc.

Pleomorfní buňky rodu  
***Corynebacterium***

Acidorezistentní buňky:

Odmítají Gramovo barvení

Odmítají se po nabarvení odbarvit  
ethanolem

i kyselinou. Příklad: *Nocardia*...

Morfologie pleomorfních buněk.

Další potíže:

Jsou barvitelné Gramem?

*Haemophilus* – ano

Bez b.s.

Mykobakteria, mykoplazmata - nikoli

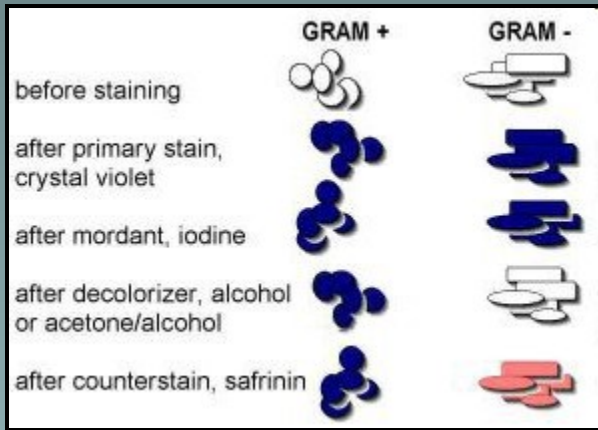
Mykologické kys

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*  
Ziehl-Neelsonovo barvení (červeně)



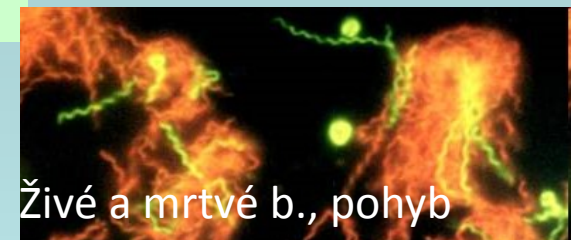
S barevným filtrem

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

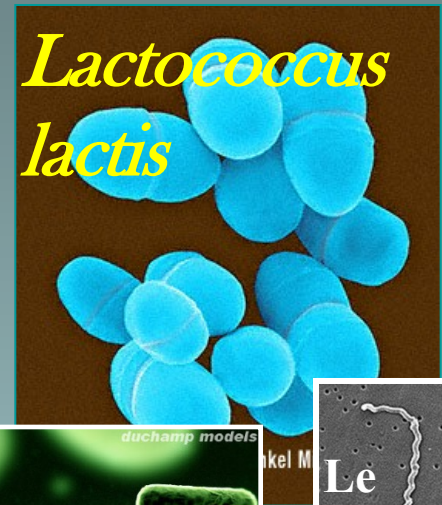
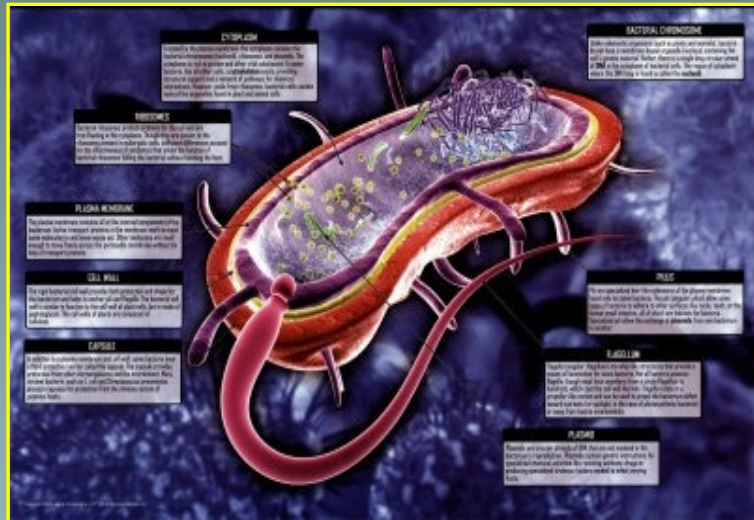


Fixov. prep. – tvar a typ b.

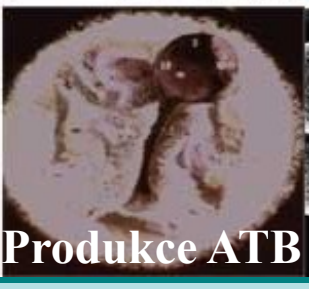
Živý (nativní) preparát bez fixace – vidíme nedeformovaný tvar buňky, spory, morfologii seskupení buněk, pohyb buněk



Živé a mrtvé b., pohyb



Struktury G- buňky



# III.

## Buněčná stadia

Cytologické a morfologické proměny

Struktury a jejich konformace závisí.....

při dělení buňky



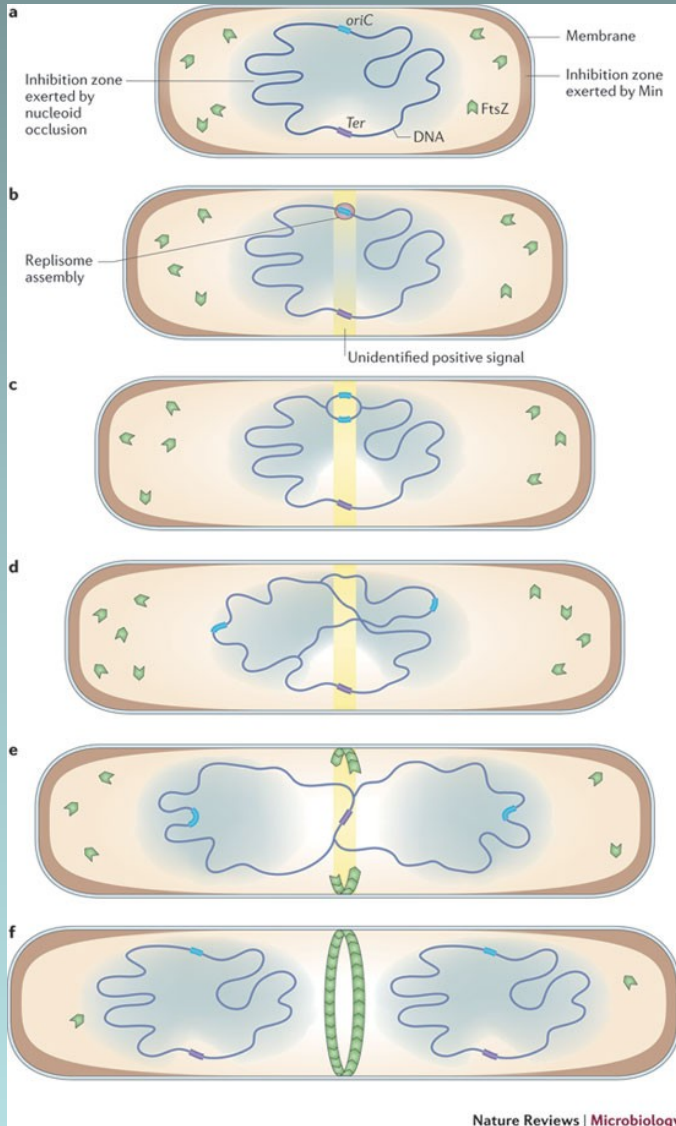
vstup parazitické, patogenní fáze do buňky

(př: remodelace proteinů listerií)

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

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

# Binární dělení bakteriálních buněk



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

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

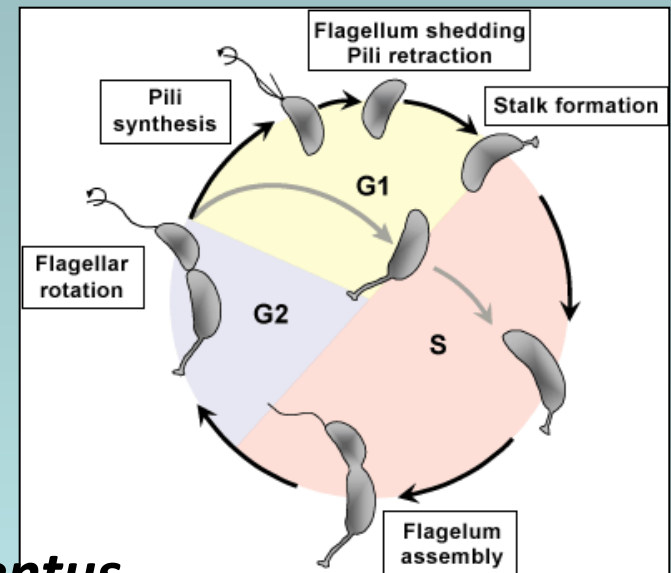
### 1) Prochází sledovaný druh růstovým cyklem?

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

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

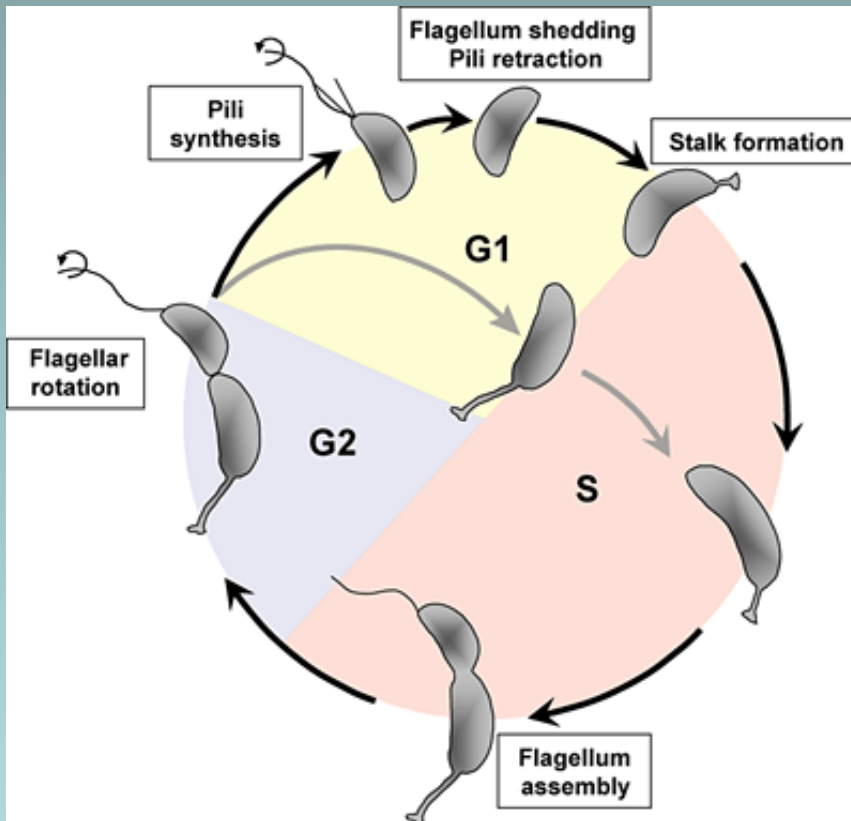
Mění se nejen vzhled buňky, ale buňka v cyklech prochází typickou změnou vnitřních struktur.

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

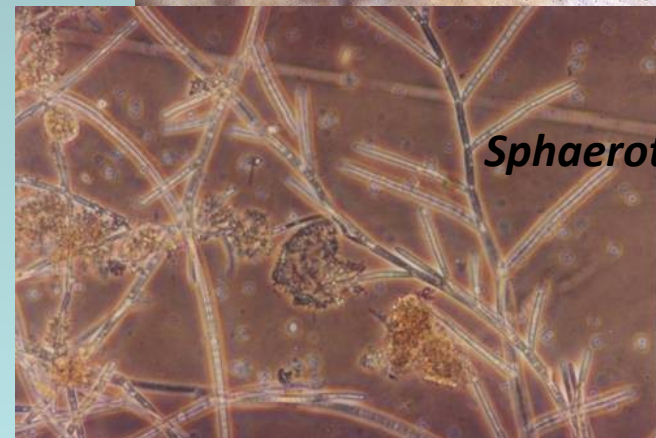


# Jiné životní cykly než binární dělení

## Střídání přisedlého a volného stadia



*Caulobacter*

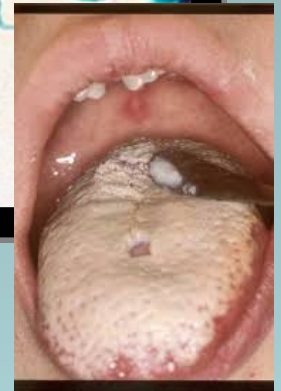
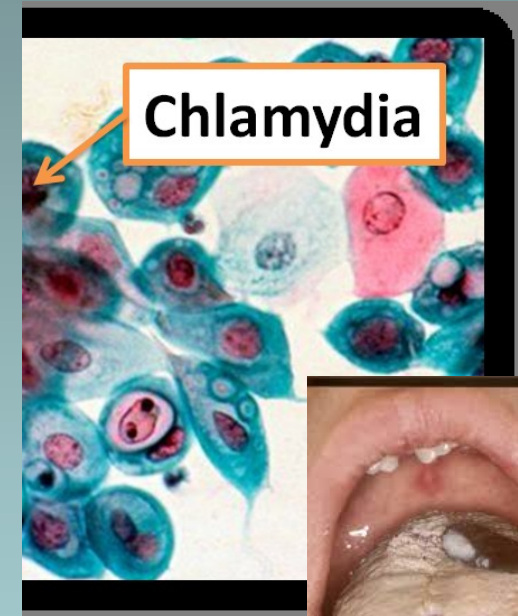
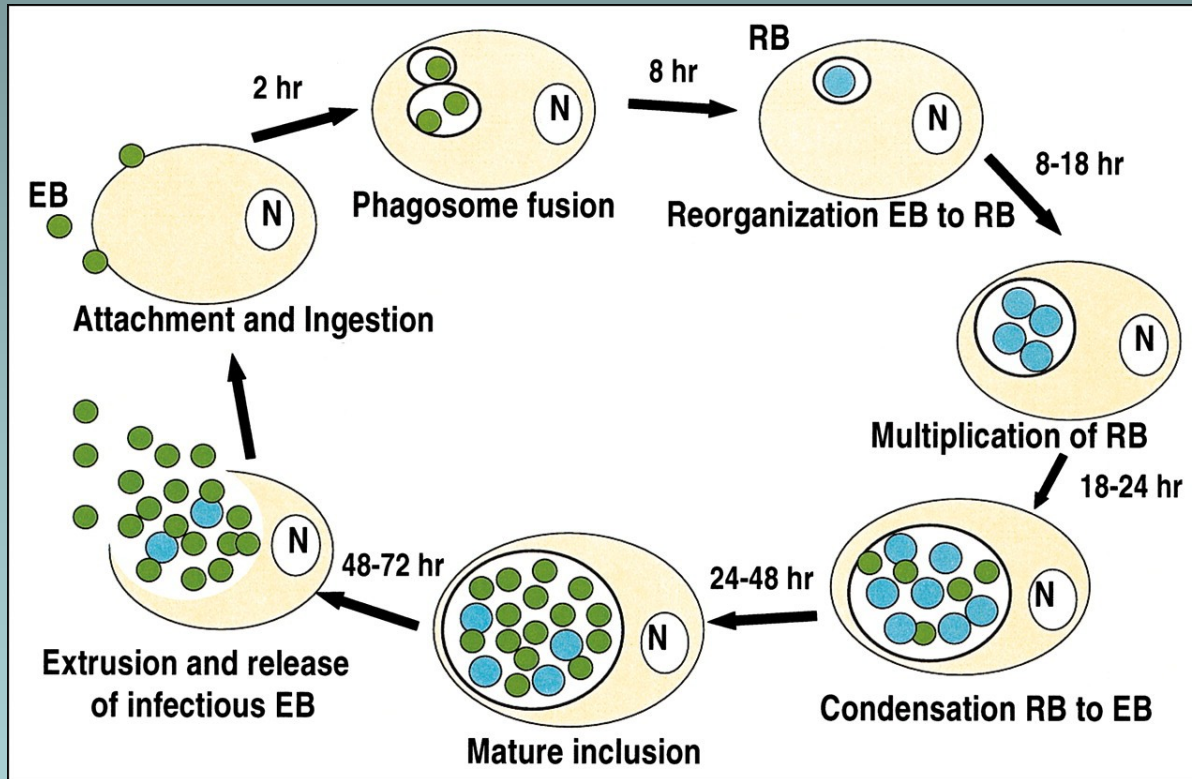


*Sphaerotilus*



# Jiné životní cykly než binární dělení

## Střídání infekčního a reprodukčního stadia

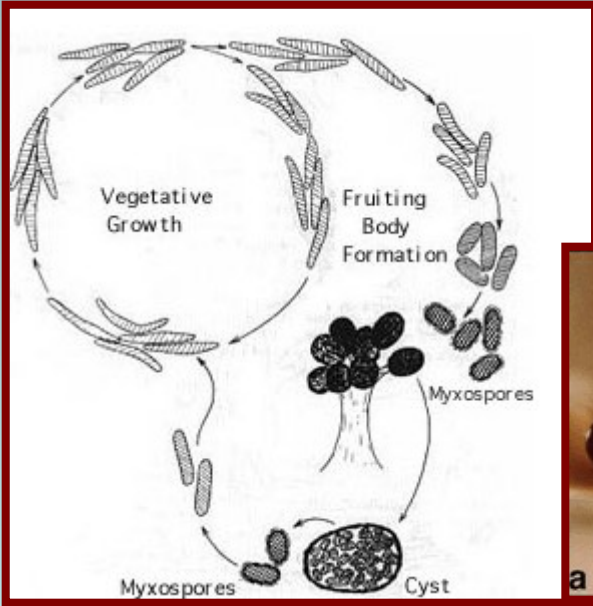
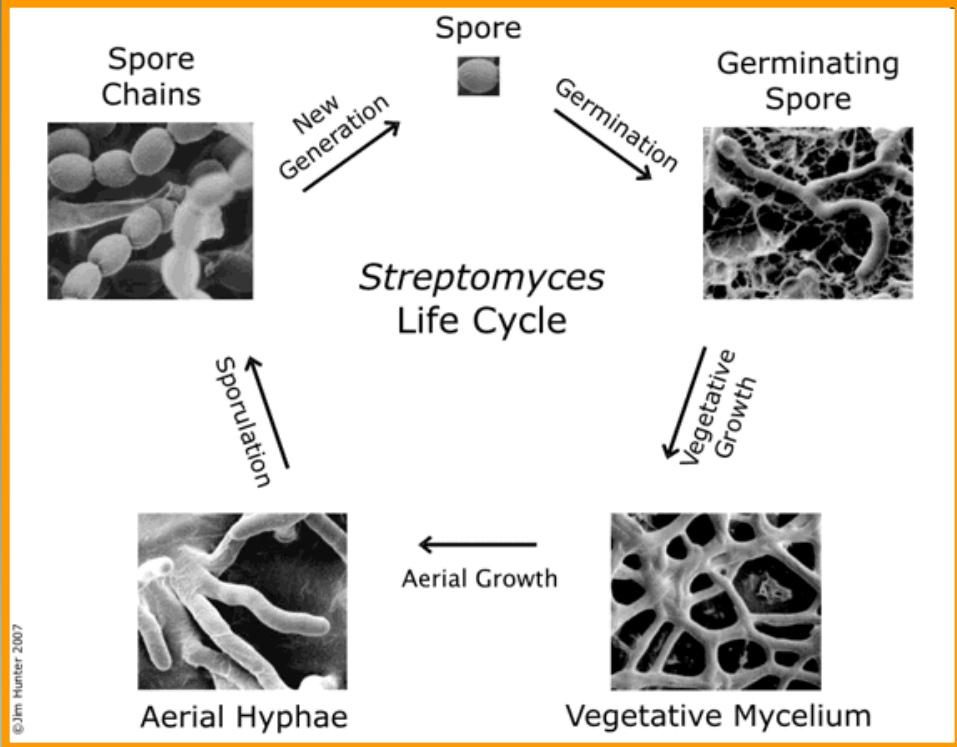


CHLAMYDIA (Reiter's conjunctivitis)

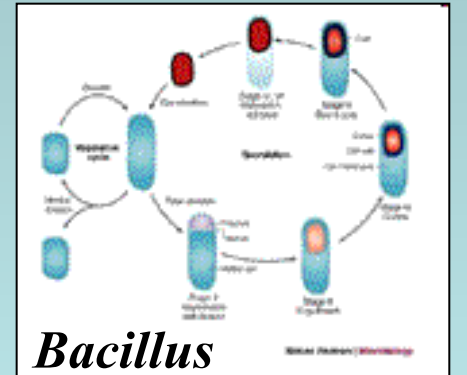
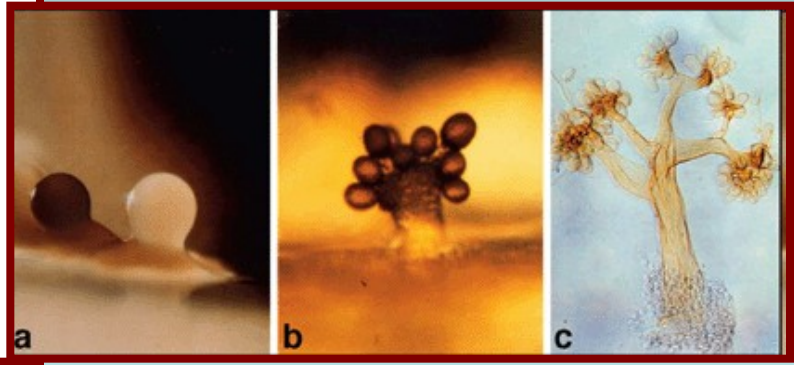


Chlamydial complication  
Reiter's conjunctivitis

Chlamydie – **retikulární** a **elementární** tělíska

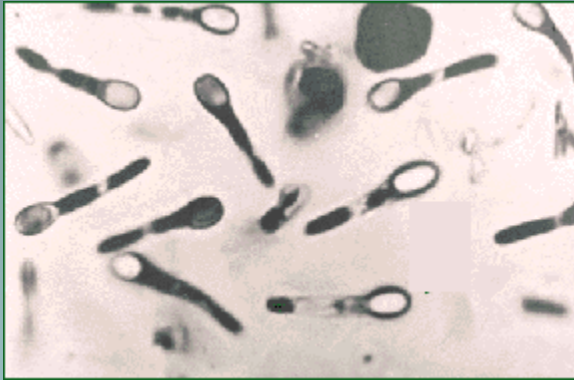


**Myxobakterie**

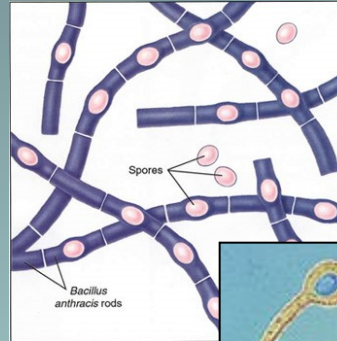


## 2) Vytváří posuzovaný druh endospory?

- v preparátu pak mohou měnit tvar buněk!



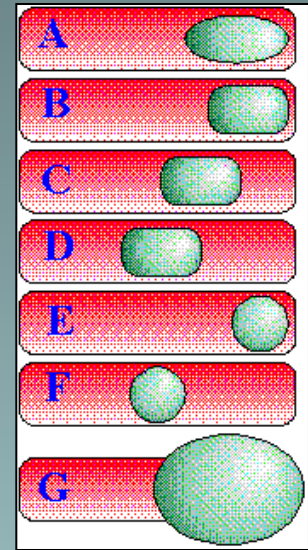
*Clostridium difficile*



*Bacillus anthracis*



*Clostridium tetani*



„Voják umírající na tetanus“

Sir Charles Bell

lukovité prohnutí zad (opisthotonus)

křečovitý výraz

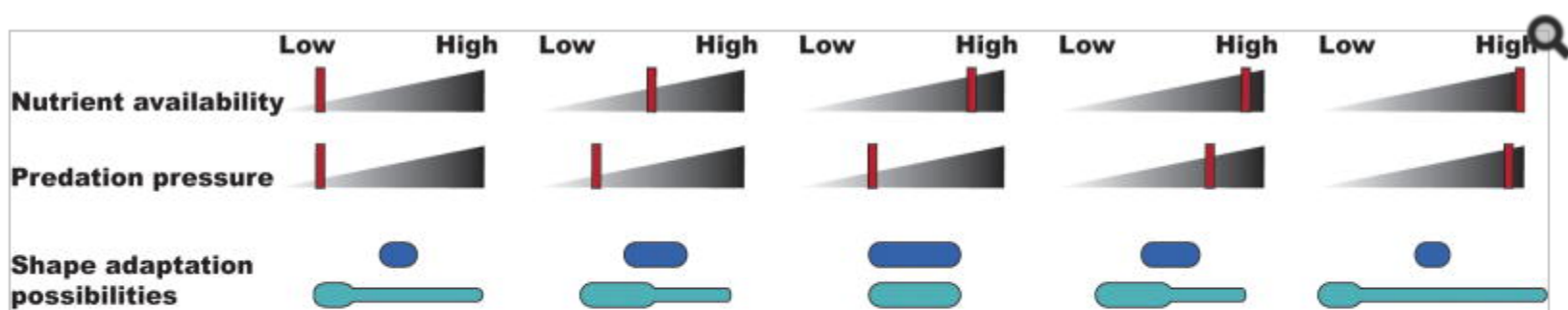
Originál je k vidění:

Royal College of Surgeons  
of Edinburgh, Scotland.

3) Stárnutím mění buňky tvar

4) Závislost tvaru buňky na vnějším prostředí

- živiny, tlak, osmolarita...



Example of simple shape adaptations triggered by selective pressures. The upper two rows of “slider bars” represent: 1) the quantity of available nutrients (from Low to High), and 2) the numbers of nearby predators (from Low to High). As these two environmental conditions change, bacteria may respond with morphological adaptations, two of which are illustrated beneath the sliders. As described in the text, one cell (dark blue) elongates or becomes smaller, while the other (light blue) modifies the length of its prostheca. Intermediate conditions may evoke intermediate responses.

Curr Opin Microbiol. Author manuscript; available in PMC 2008 Dec 1.

Published in final edited form as:

[Curr Opin Microbiol. 2007 Dec; 10\(6\): 596–600.](#)

Published online 2007 Nov 5. doi: [10.1016/j.mib.2007.09.009](#)

**Bacterial morphology: Why have different shapes?**

[Kevin D. Young](#)

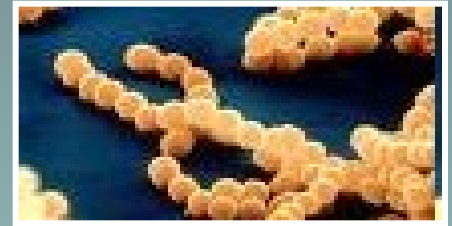
5) pleomorfní buňky – př. rody

*Mycobacterium*, *Corynebacterium*,  
*Haemophilus*, *Mycoplasma*

# Morfologie charakteristických shluků buněk

- typické shluky napomáhají identifikaci

řetízky koků: *Streptococcus*



*Streptococcus*

řetízky bacilů: *Bacillus*



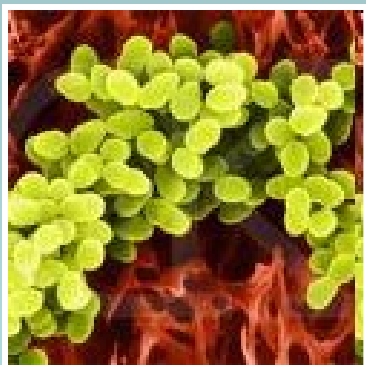
*Bacillus*

palisády: *Corynebacterium*

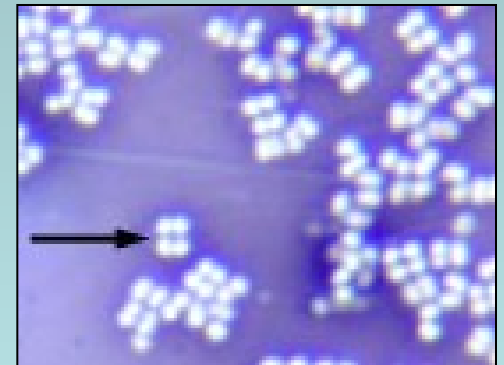
tetrády koků: *Micrococcus*

balíčky = sarciny *Sarcina* hrozníčky:

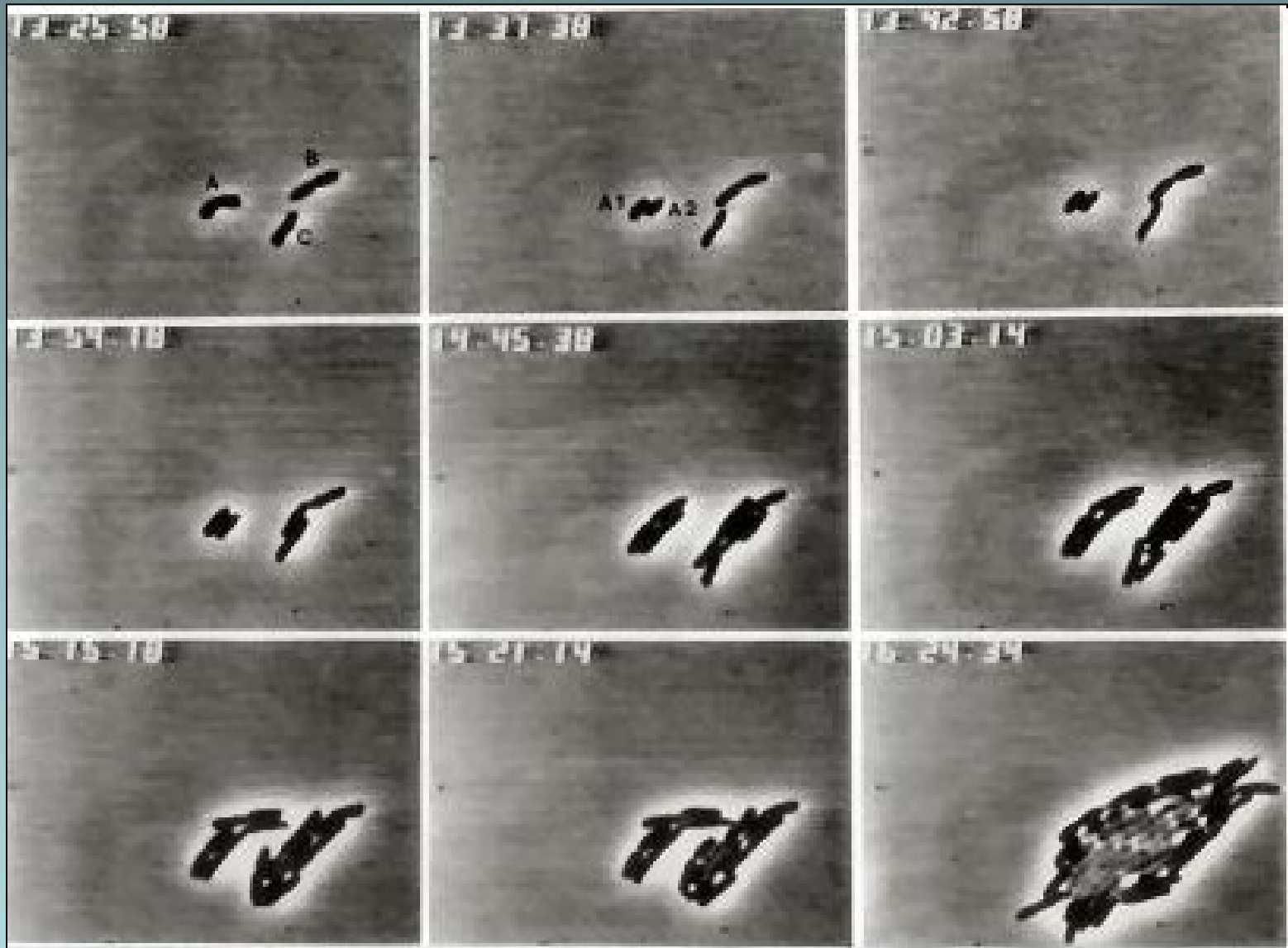
*Staphylococcus*



*Staphylococcus*



*Micrococcus*



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

# Morfologie bakt. kolonií

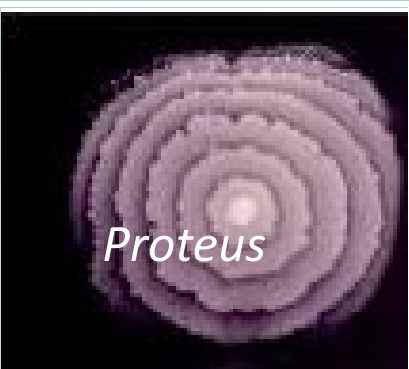
- potřeba zvážit typ media, na kterém kolonie hodnotíme!  
kultivace - zda vůbec kultivovatelné?? - sledování typu kolonií
- stáří kultury

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*)

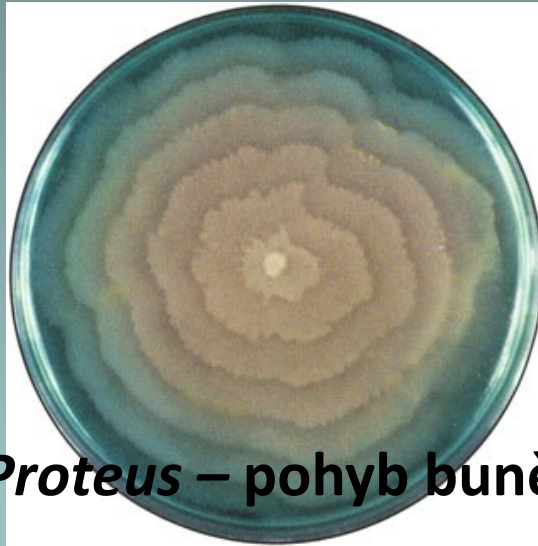


# Morfologie bakteriálních kolonií

## I. na základních půdách



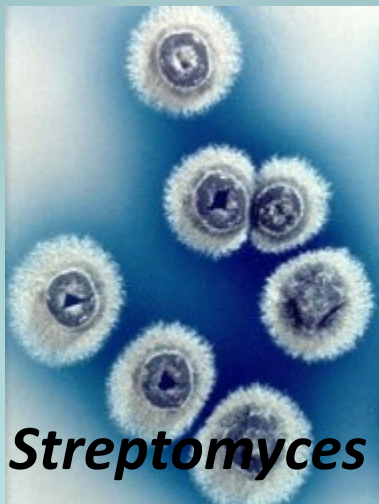
*Nocardia*



*Proteus* – pohyb buněk



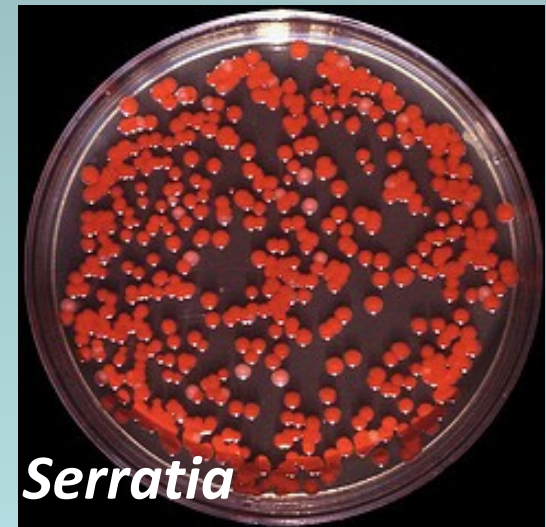
*Bacillus mycooides*



*Streptomyces*



*Streptomyces*



*Serratia marcescens*



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

Bakteriální kolonie na  
II. diagnost. půdách



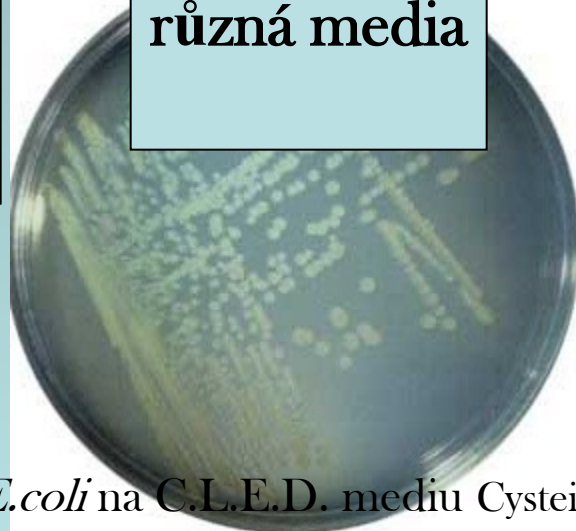
Jeden druh  
bakterie  
různá media



*E.coli* na krevním agaru

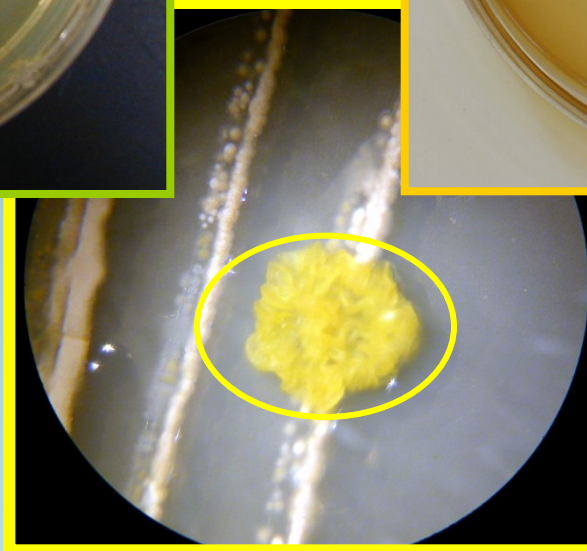


*E.coli* na MacConkey agaru



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

# Kontaminace na misce!



# Sylabus cvičení

- 24.9. – úvod, práce s programem Nis – Elements, rozdělení do pracovních skupin
- 1.10. – ukázka elektronové mikroskopie
- 8. a 15.10 – Gramovo barvení, negativní barvení, nativní preparát
- 22. a 29.10. – struktury buňky
- 5. a 12.11. – pohyb buněk
- 19. a 26.11. – acidorezistentní barvení
- 3. a 10.12. – zaočkování sklíčkových kultur; fluorescence
- v týdnu 14. – 18. 12. 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 otvírat co nejméně  
a po práci správně zavřít

Nemluvit při očkování mikroorganismů

Sterilní práce - žihání kličky v plameni kahanu..

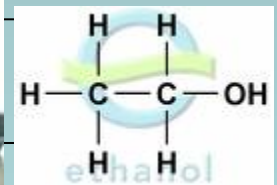
!!



:



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

