

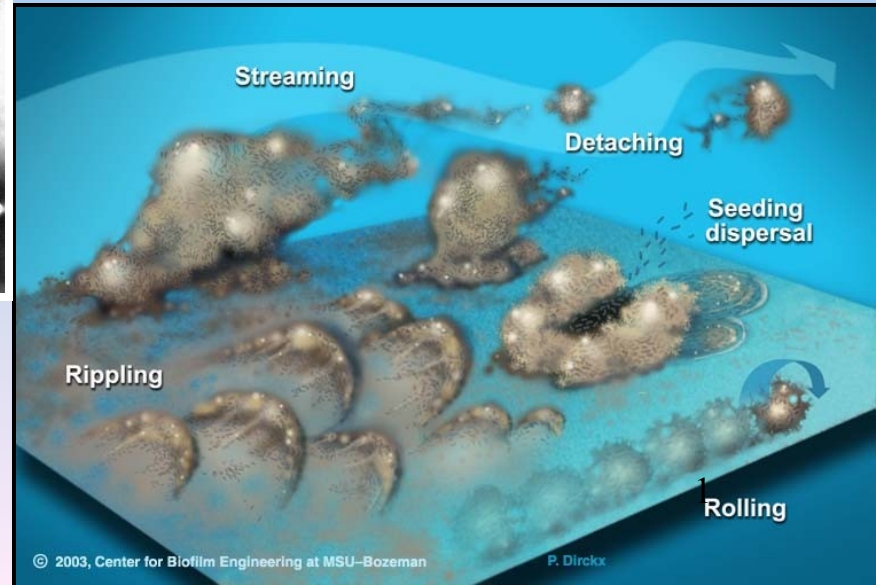
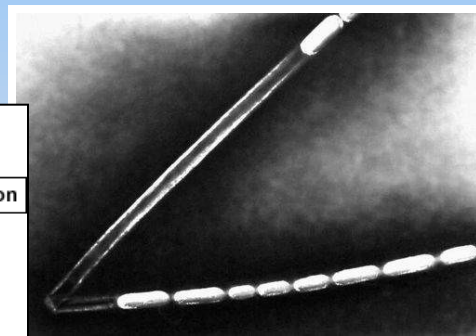
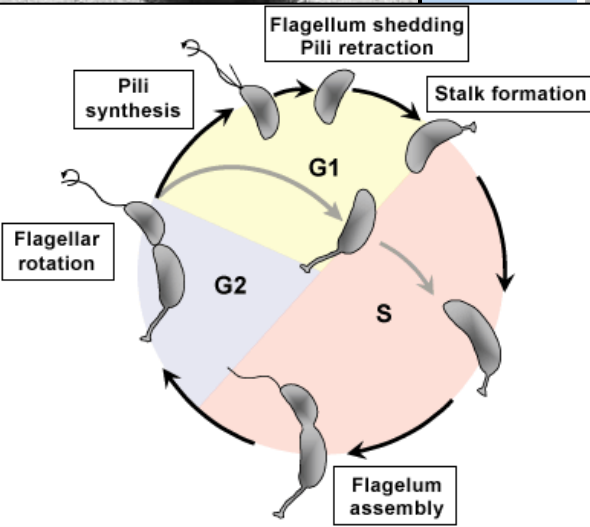
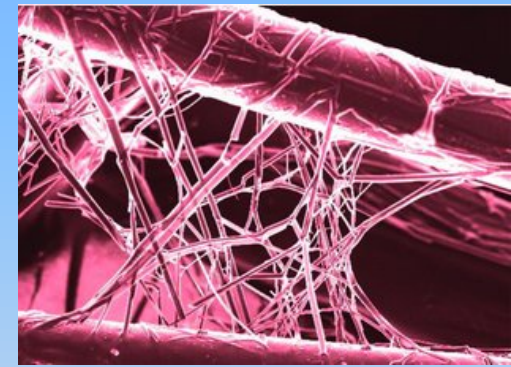
# Růstové cykly bakterií II.

## Střídání přisedlé a volné (plovoucí) formy života u prokaryot

*Caulobacter crescentus*

*Sphaerotilus natans*

Biofilm



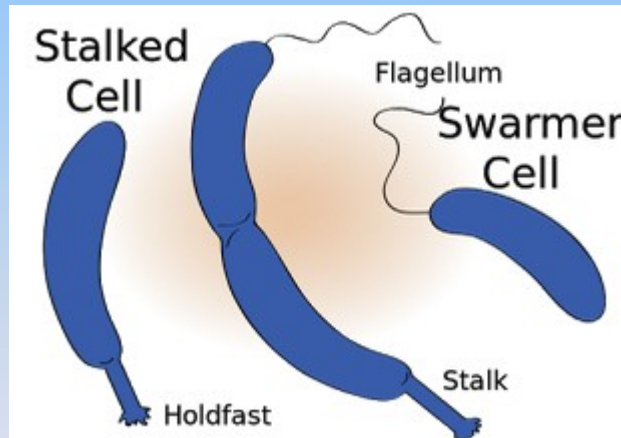
vodní prostředí – mořské i sladkovodní  
tělní tekutiny – sliny, střevo, krev

Přizpůsobení přisedlému způsobu života → mechanismy  
adheze k povrchům:

- reverzibilní – van der Waalsovy síly
- irreverzibilní – chemická vazba (elektrostatická, kovalentní, vodíková)

# Růstový cyklus *Caulobacter crescentus*

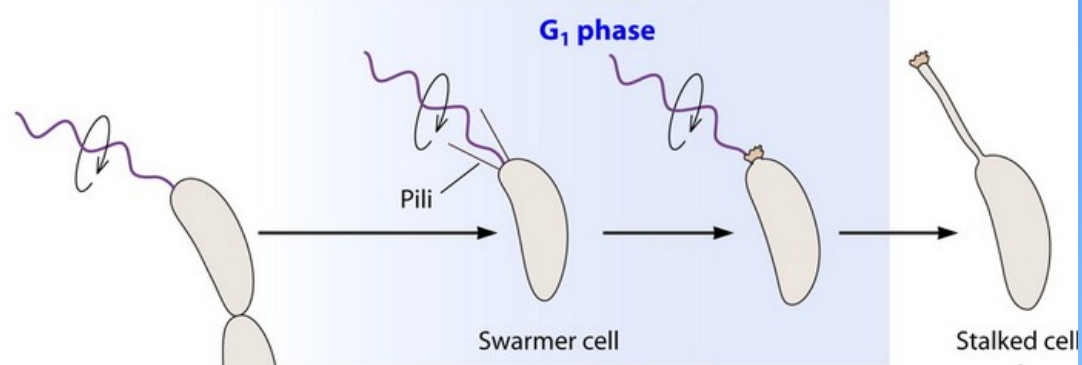
Caulobacter - je modelovým organismem pro studium diferenciace u prokaryot



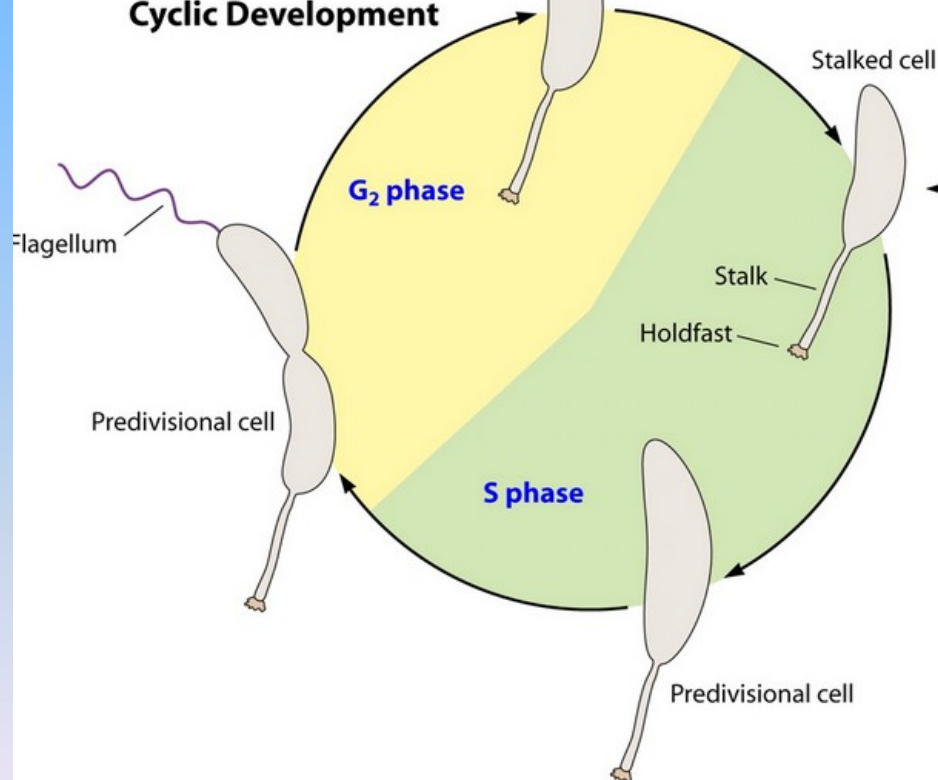
*Caulobacter crescentus* dividing into a stalk daughter cell (top) and a motile daughter cell with a flagellum (bottom). Courtesy of Yves Brun.



## Non-cyclic Development



## Cyclic Development



Getting in the Loop: Regulation of Development in *Caulobacter crescentus*

Patrick D. Curtis and Yves V. Brun\*

# 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

Plovoucí bičíkatá buňka se **nereplikuje**

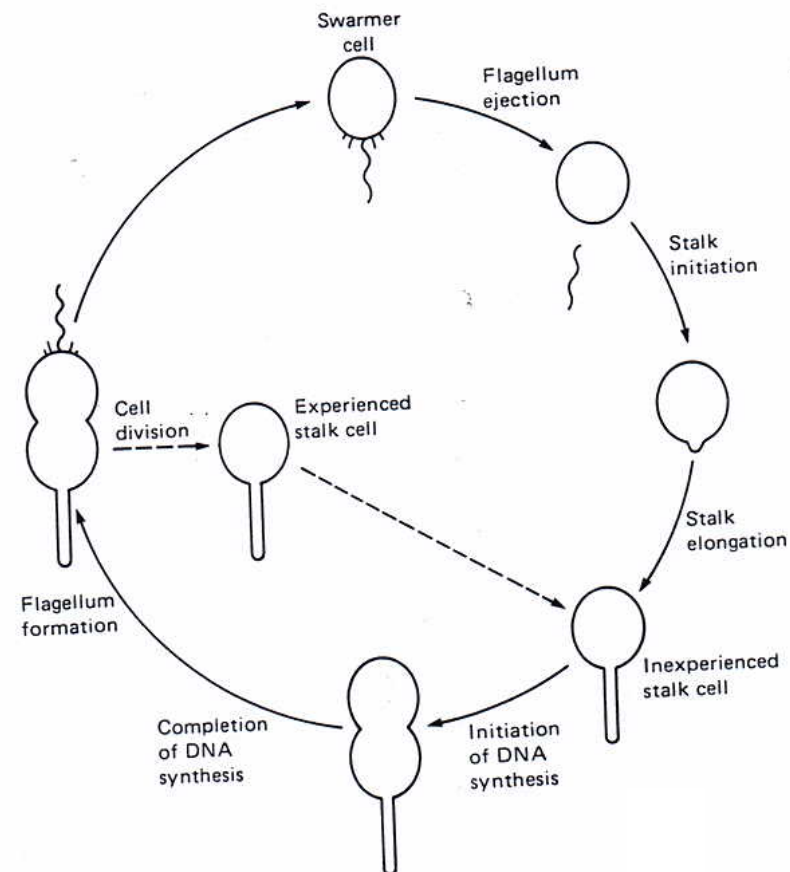
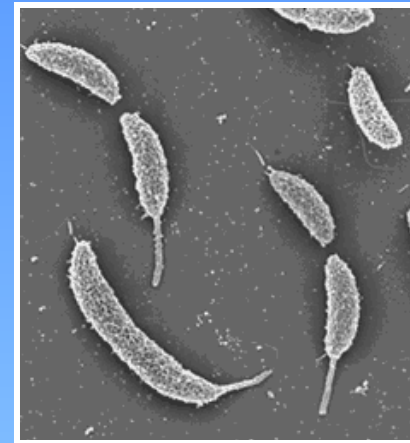
**přisednutí na místo s vhodným  
substrátem a diferenciaci**

**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.



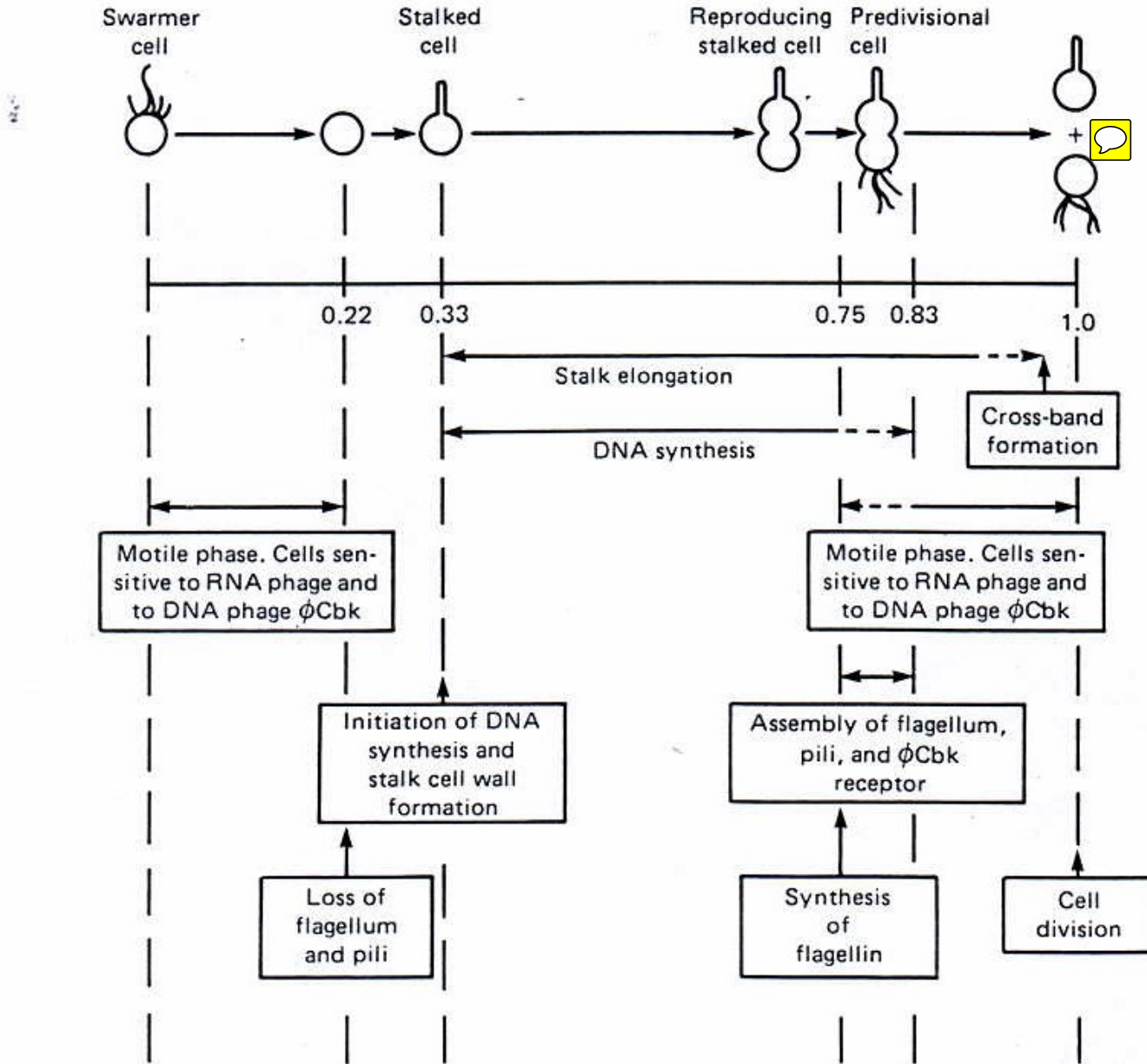
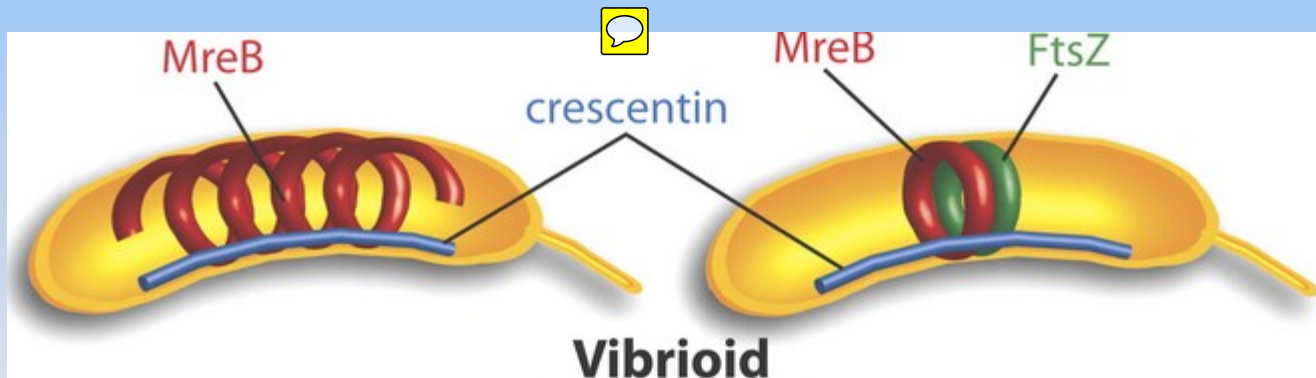


Fig. 13. Schematic diagram illustrating various developmental and biosynthetic events as a function of the cell cycle of *Caulobacter crescentus*. The numbers are fractions of a complete (1.0) cell cycle. (From Dworkin, 1985.)

Strukturální analogy aktinu (MreB) - předurčení tvaru buněk  
*C. crescentus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*

Protein buněčného dělení FtsZ, je protipólem tubulinu

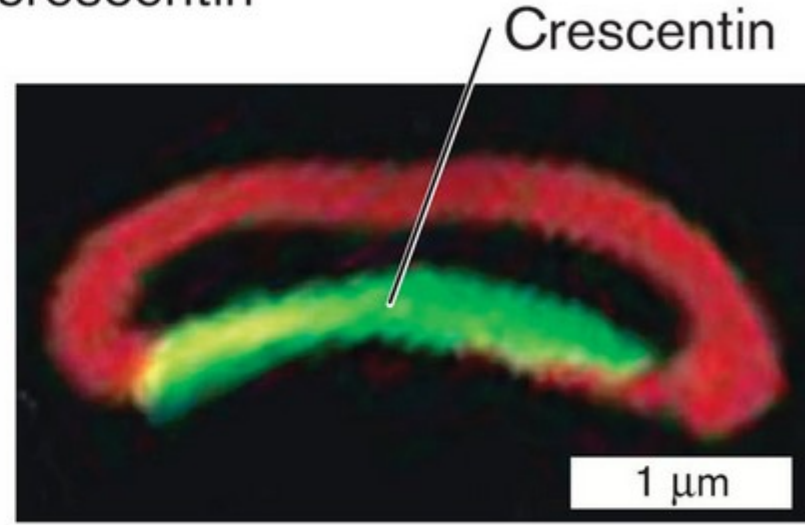
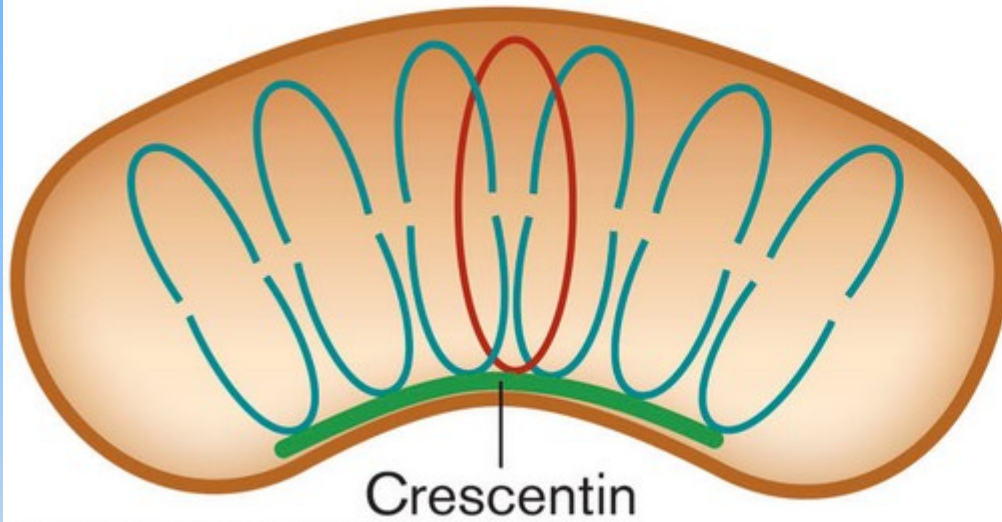
Crescentin – podobný intermediálním filamentům – helixy a zakřivení





Shape-determining proteins

*Caulobacter crescentus*: FtsZ, MreB and crescentin

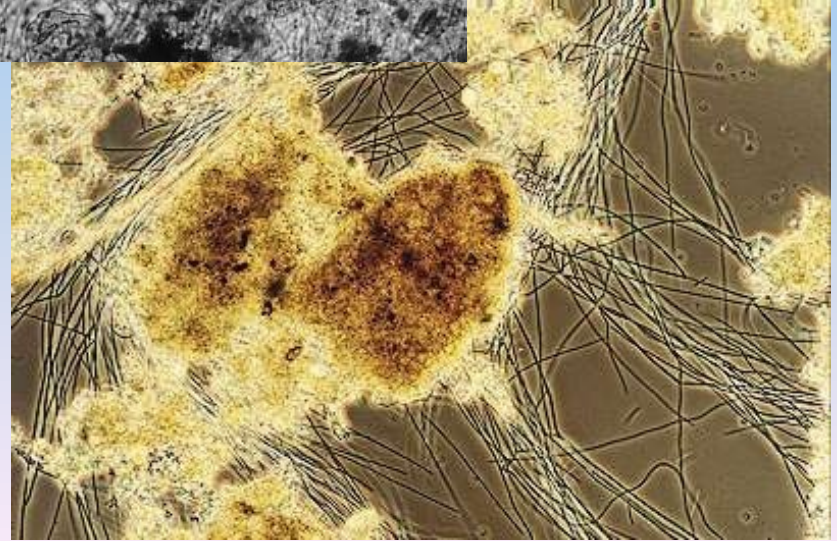
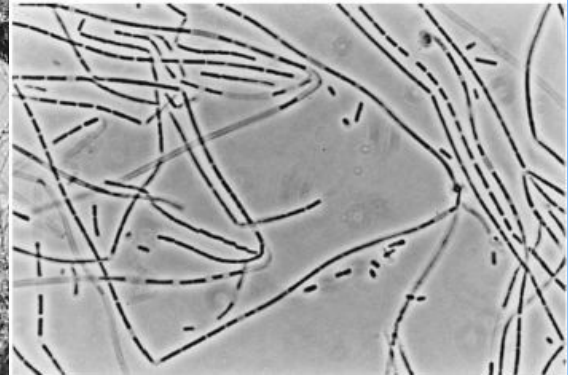
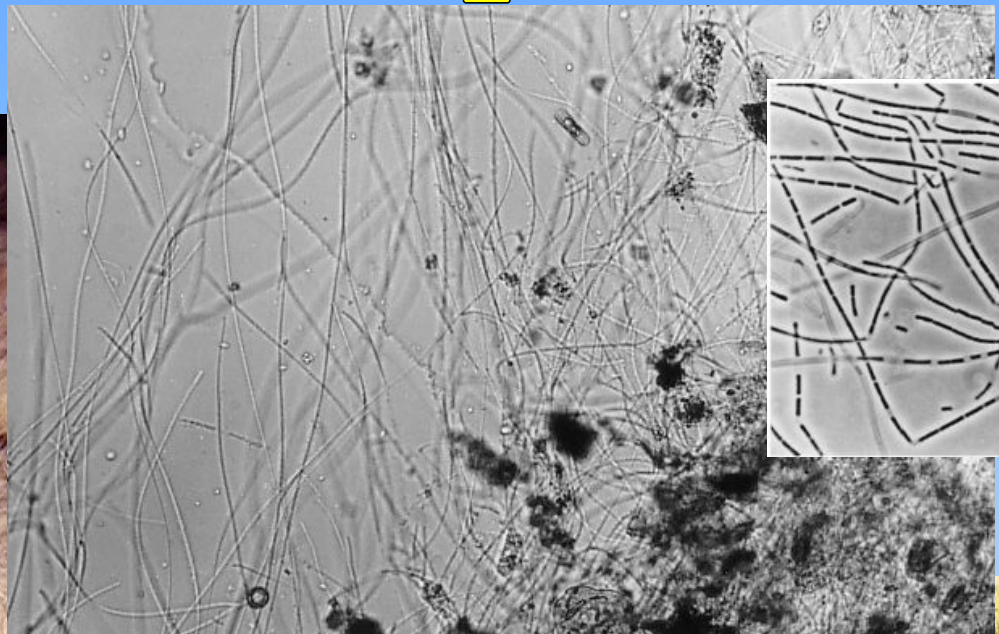
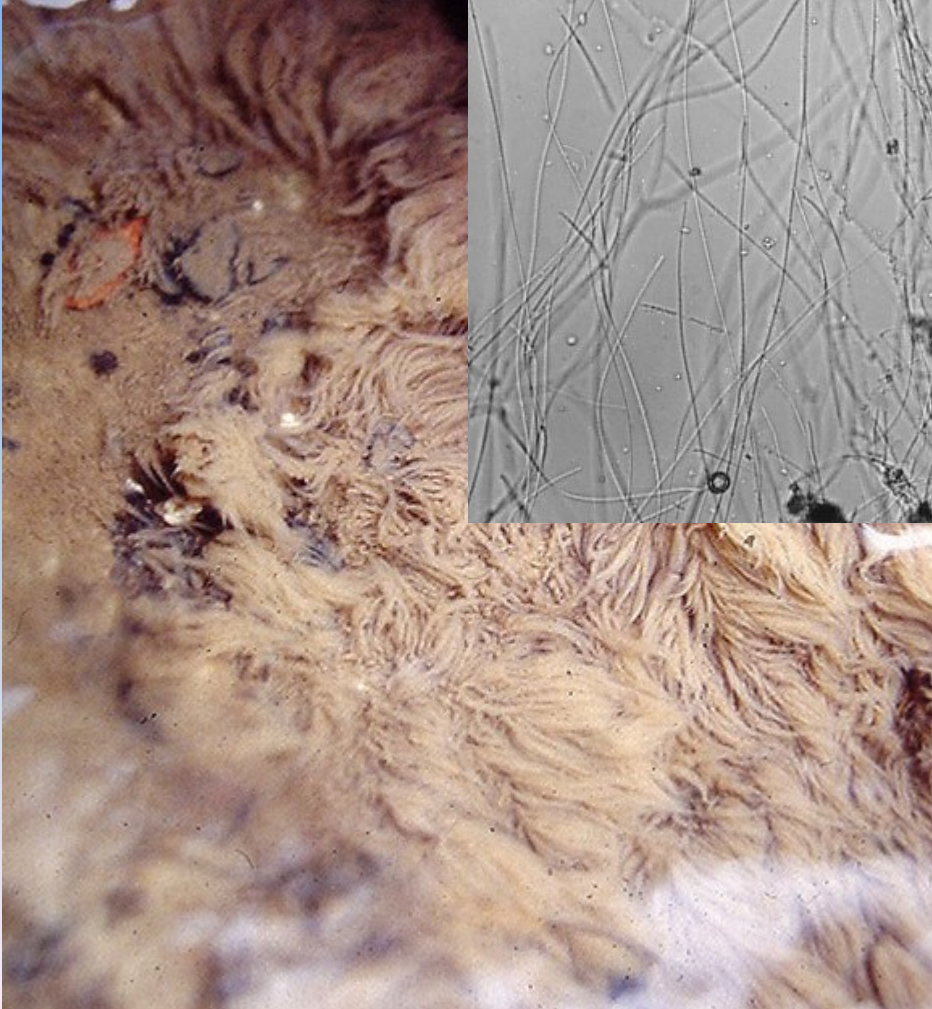


*Microbiology: An Evolving Science*, Third Edition Figure 3.23c  
Copyright © 2014 W. W. Norton & Company, Inc.

## Zvláštnosti růstového cyklu

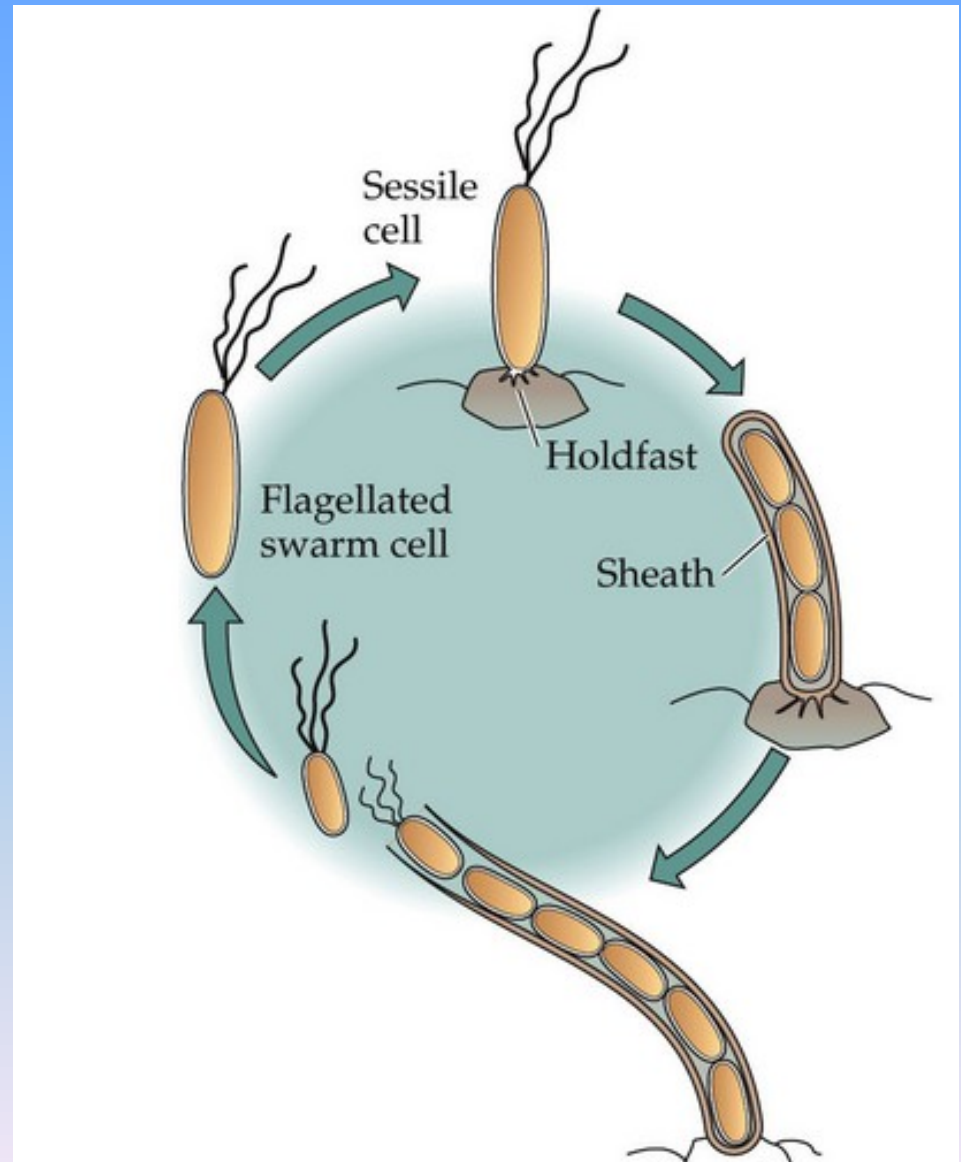
1. růstová stádia se nutně střídají, žádné není alternativou, která se nemusí realizovat (viz klidová stádia)
2. mateřská buňka je v jistém slova smyslu „nesmrtelnou buňkou“, která produkuje velké množství dceřinných buněk (na rozdíl od konvenčního dělení, kde nelze striktně odlišit mateřskou a dceřinnou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

# Růstový cyklus *Sphaerotilus natans*



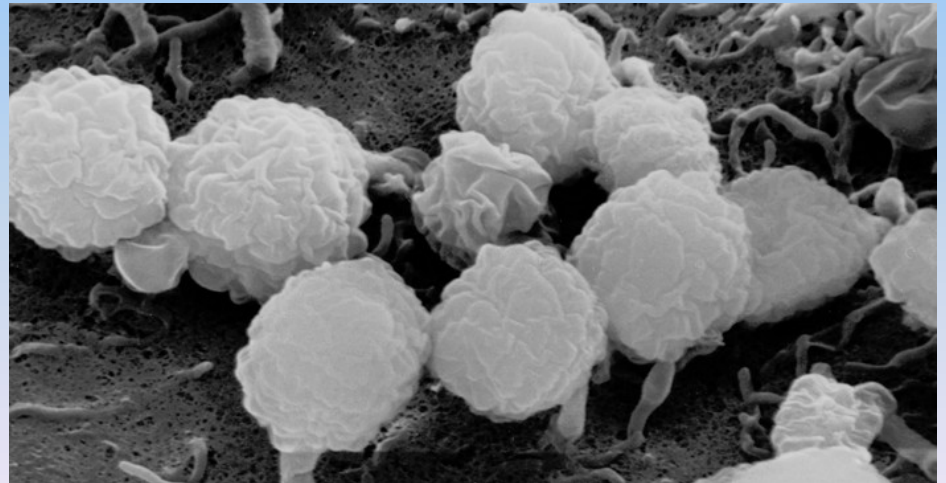


- volné buňky najdou vhodné životní prostředí
- přichytí se k podkladu
- odhodí bičík
- začnou tvořit pochvu
- dělí se uvnitř pochvy
- z pochvy se uvolňují dceřinné pohyblivé buňky



# Střídání volného a přisedlého stadia u *Actinoplanes*

- přisedlé stadium – vegetativní mycelium, množící se
- volné stadium – bičíkaté spory, které se tvoří ve sporangiu (zoospory)

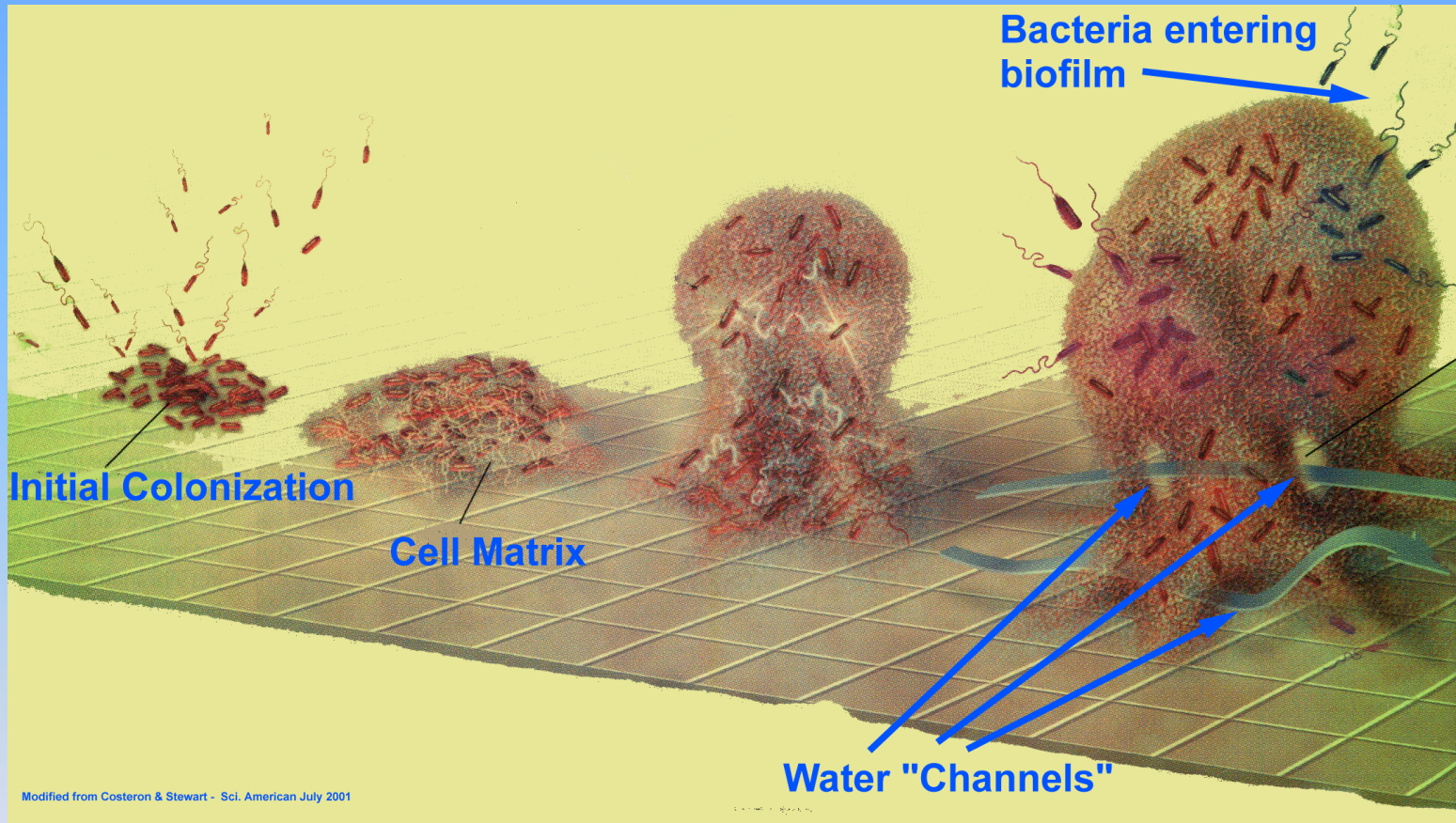


# Biofilm



...společenství buněk usazených v glykokalyx, přichycených k povrchu nebo okolním buňkám, se změněným fenotypem růstu

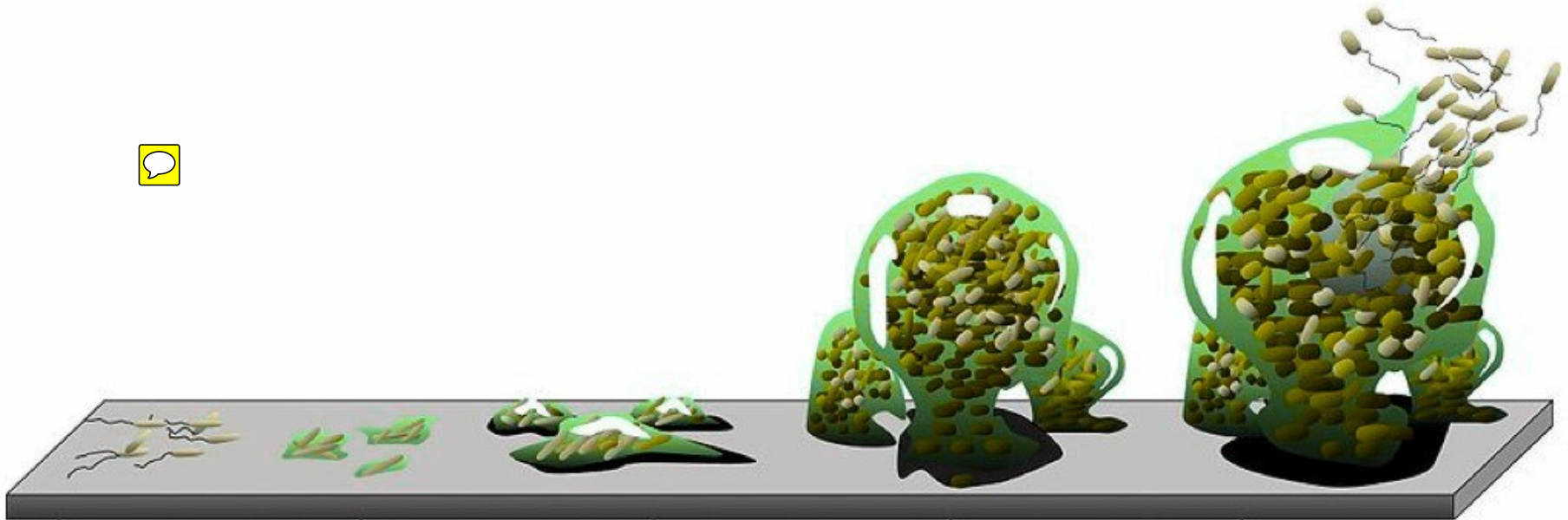
Biofilm ... volně plovoucí (planktonické) buňky usazené (na vhodném povrchu) v matrix z polysacharidů formující „hřibovité“ útvary s dutinkami, kanálky a stopkami.



Složky biofilmu: bakteriální buňky a jiné organizmy uvnitř hřibovitých shluků propojených kanálky a póry.

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

# Vznik biofilmu



**1.**  
Planktonic (free floating) pathogens stick to solid surfaces by means of van der.

**2.**  
Within minutes changes in gene expression transform the pathogen into sessile (biofilm) form.

**3.**  
Sessile pathogens excrete a slimy extracellular polysaccharide substance which encases and anchors them to the surface.

**4.**  
Rapid multiplication of pathogens takes place within the "safe" confines of the biofilm community. Biofilm pathogens are up to 100 times more virulent than planktonic pathogens.

**5.**  
Vast numbers of pathogens are released back into the water flow to infect soil and plants. Plants can tolerate small doses of pathogens, but when biofilms release pathogens en-masse, infection is inevitable.



# Vznik biofilmu

– přizpůsobení přisedlému způsobu života




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

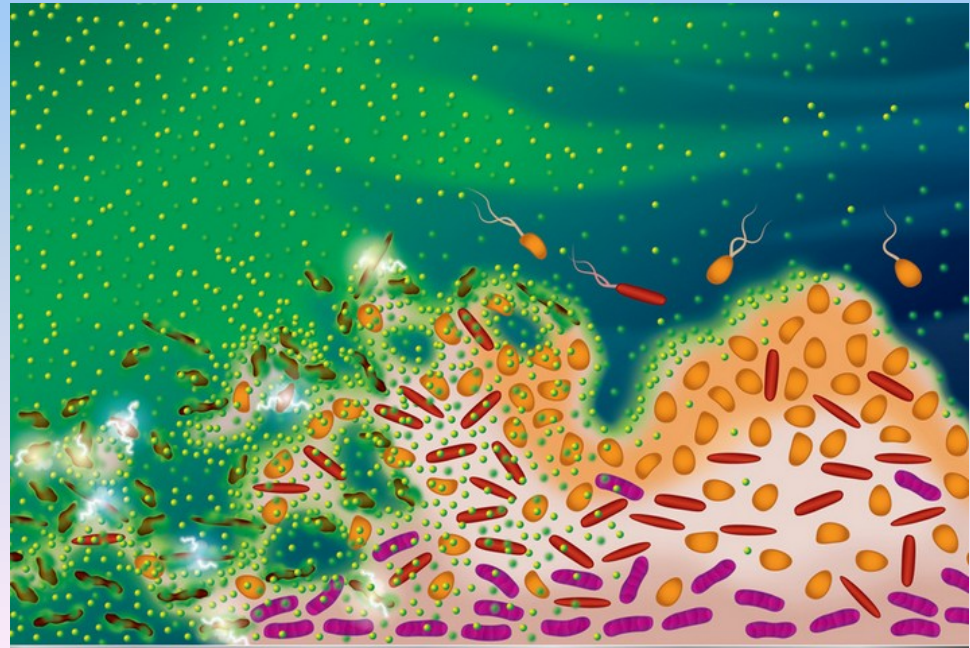
- **Reverzibilní** – van der Waalsovy síly – slabé vazby
- **Irreverzibilní** – chemická vazba (kovalentní, vodíková)  
- přítomnost extracelulárních polymerů

**Změna fenotypu - ustává syntéza bičíků, mukózní látky**

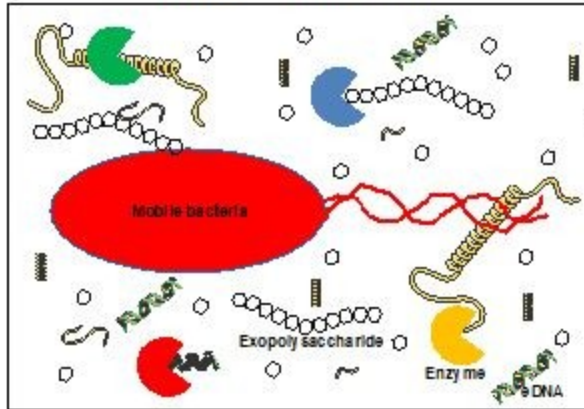
**Spouštěcí podněty:**

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

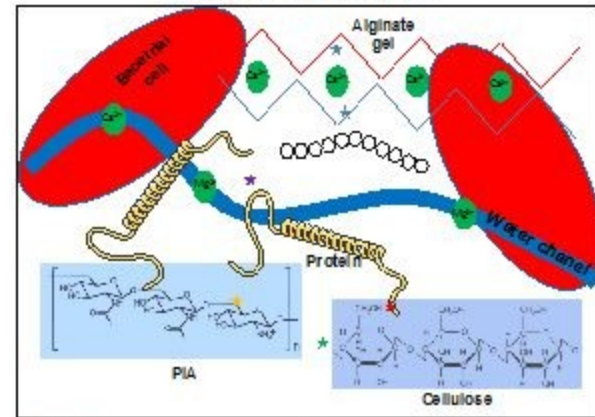
- Po přichycení změna vlastností: 
  - zprvu na úrovni regulace genů
  - 1/3 bílkovin se produkuje v rozdílném poměru, více tvořeny bílkoviny
    - 1) pórů
    - 2) transportní
    - 3) syntetizující mimobuněčnou hmotu
- Po přichycení nutno vytvořit matici z polysacharidu
  - př: *P. aeruginosa* - alginát, již 15 minut po přisednutí



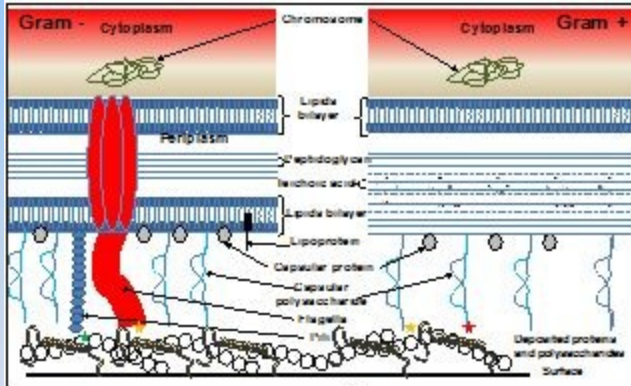
## Detachment area



## Core of Biofilm



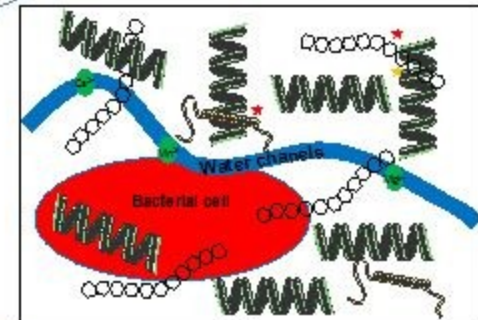
## Adhesion area



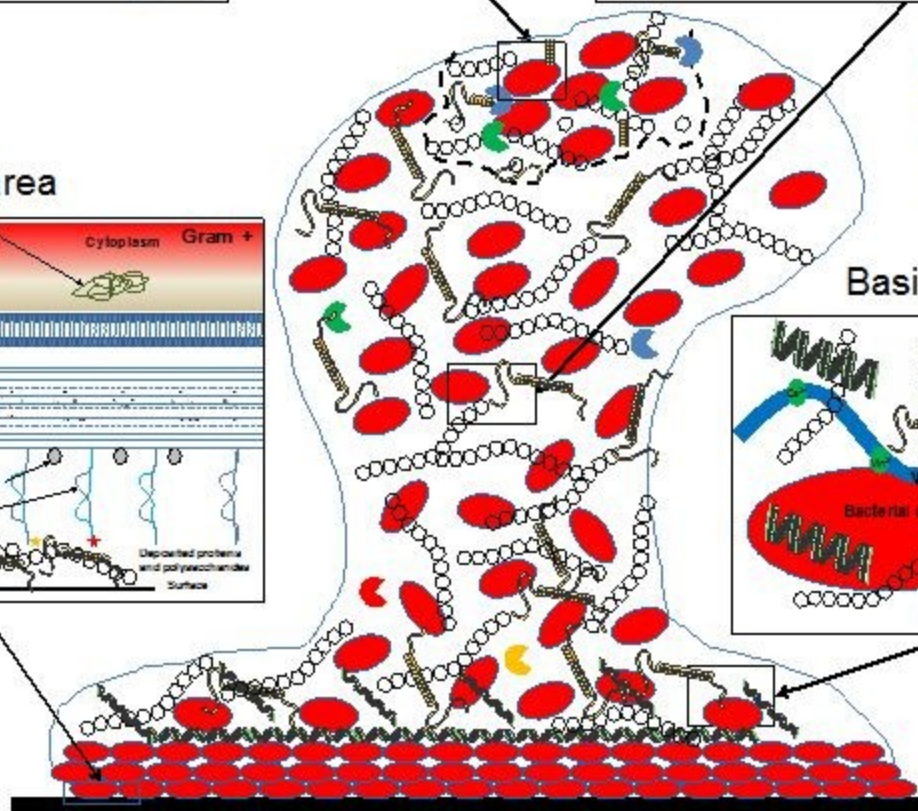
- ★ Ionic attractive forces
- ★ Electrostatic attractive forces
- ★ Van der Waals interactions
- ★ Hydrogen bonding
- ★ Repulsive forces

- ★ Ionic attractive forces
- ★ Electrostatic attractive forces
- ★ Van der Waals interactions
- ★ Hydrogen bonding
- ★ Repulsive forces

## Basis of Biofilm



## Surface



# Fáze vzniku biofilmu: přilnutí k povrchu

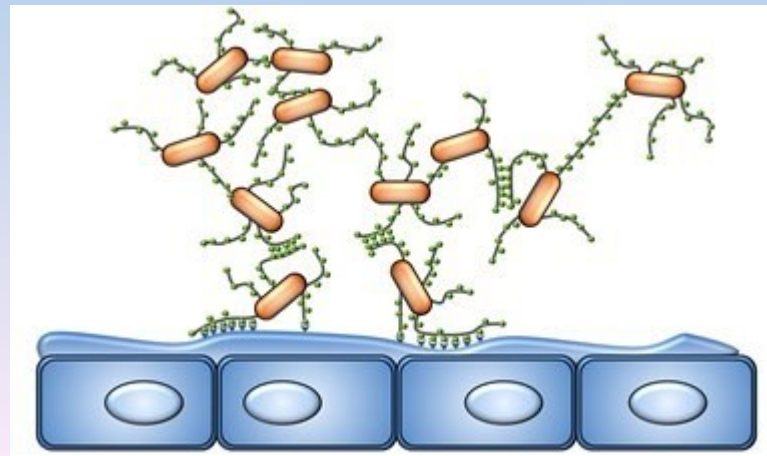
buněčné povrchy x povrchy podkladu

Buněčný náboj

Adheze buňky

Prostředí

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



# Povrch substrátu

Adheze buněk k povrchu je ovlivněna:

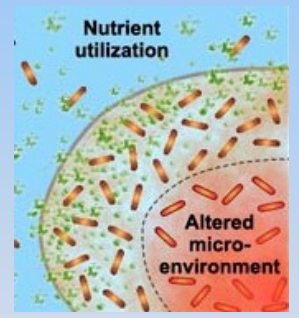
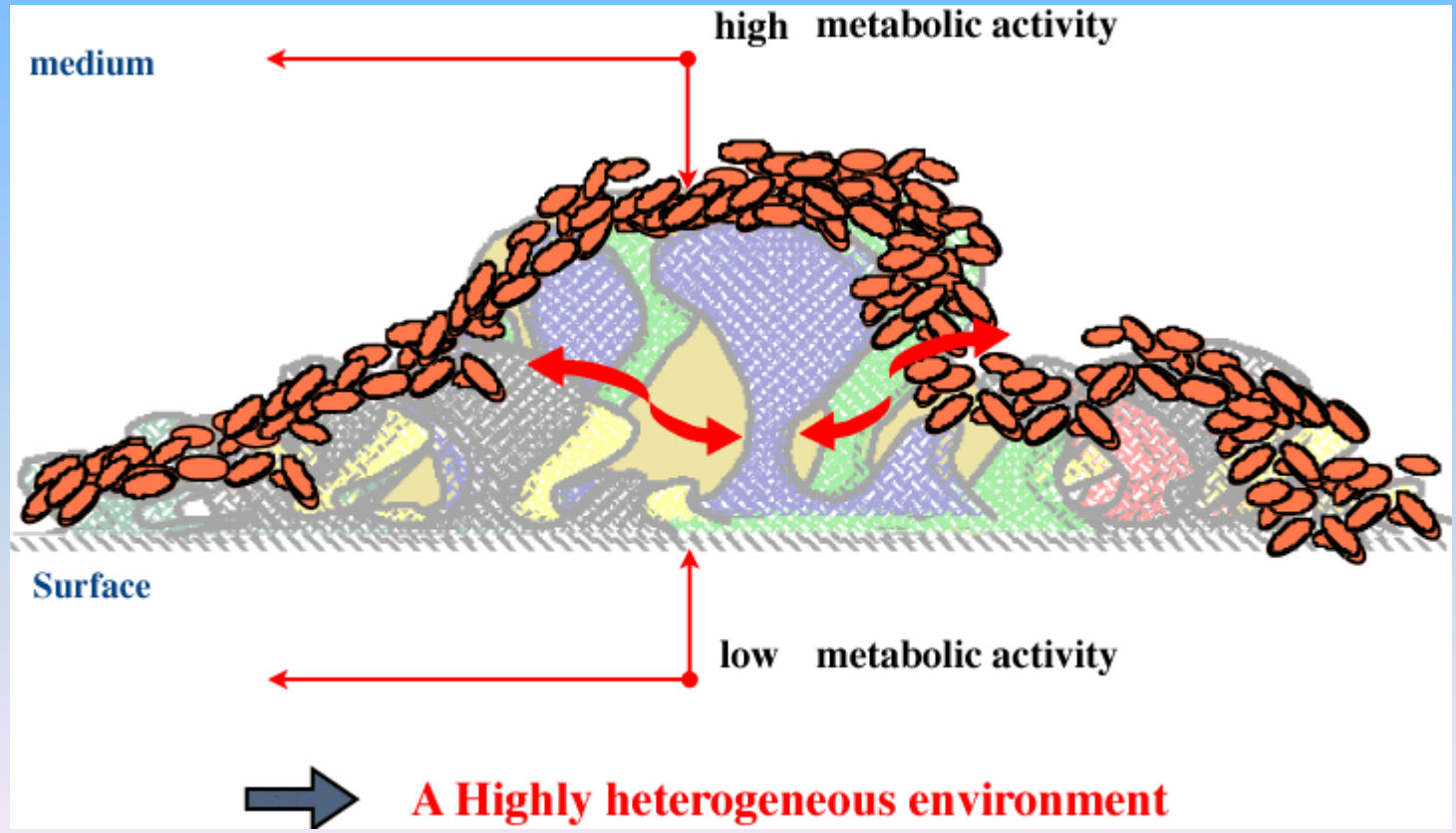
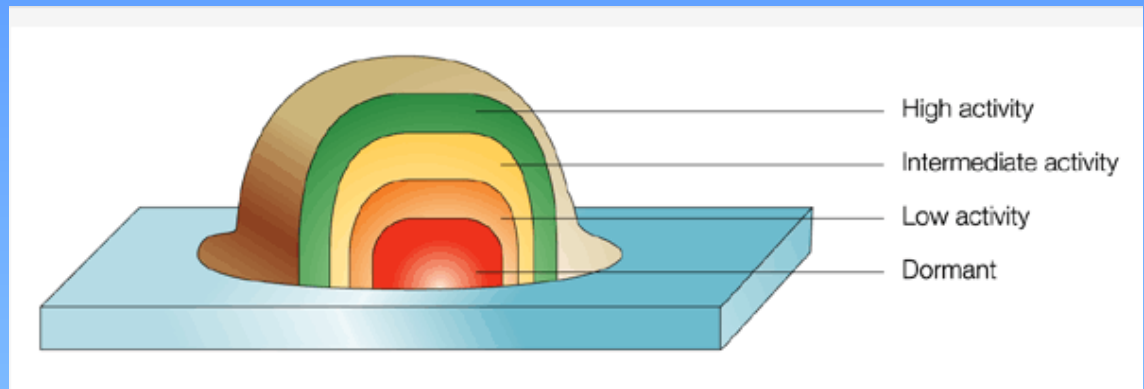
- hrubostí
- chemickým složením
- povrchovou úpravou



## Hydrodynamické vlivy

- biofilmy vznikající v pomalu proudící tekutině → izotropní struktury
- biofilmy vznikající v rychleji a jednosměrně proudící tekutině → vláknité zřetelně nasměrované útvary buněk

# Dostupnost živin

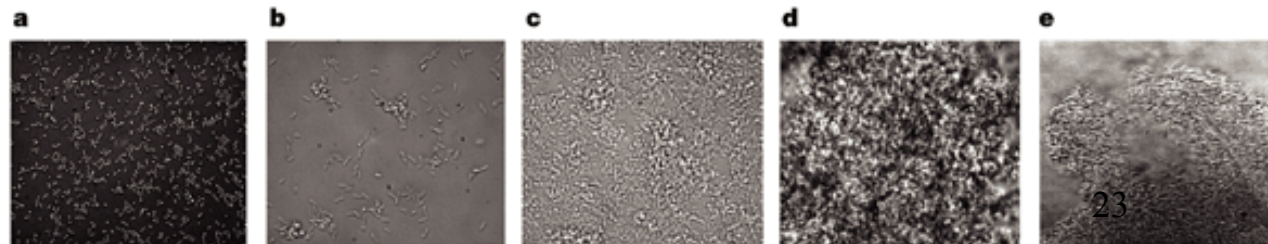
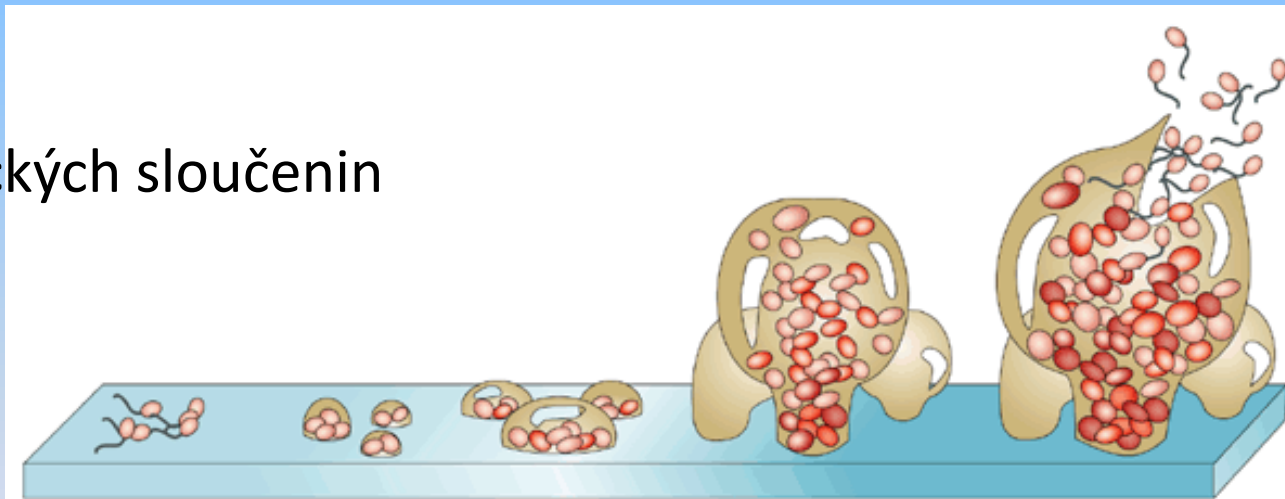


# Stabilita biofilmu

mechanismy vazby buněk - EPS, DNA, bílkoviny, fimbrie, bičíky, fágy

disperzi biofilmu ovlivňují:

- dostupnost živin
- množství kyslíku
- pH
- přítomnost chemických sloučenin
- proudění tekutiny



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

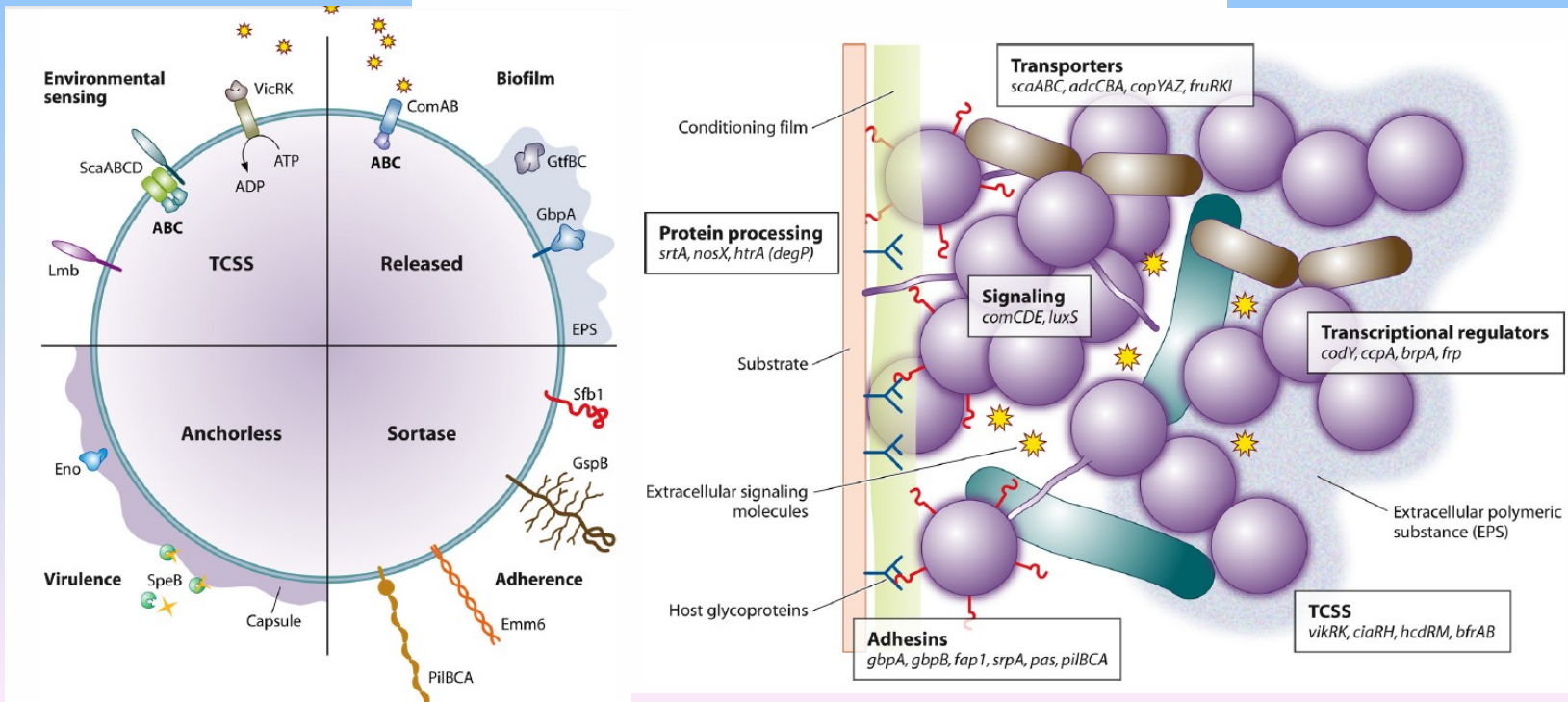


- Roli hrají:
  - vhodné receptory a kompatibilita s cílovou molekulou (*C. diphtheriae* - epitel hrdla; *S. salivarius* – zub, chlopně...)
  - hydrofobicita buněčného povrchu
- Interakce buňky s povrchem indukuje změnu exprese genů buněčné morfologie, motility a adheze

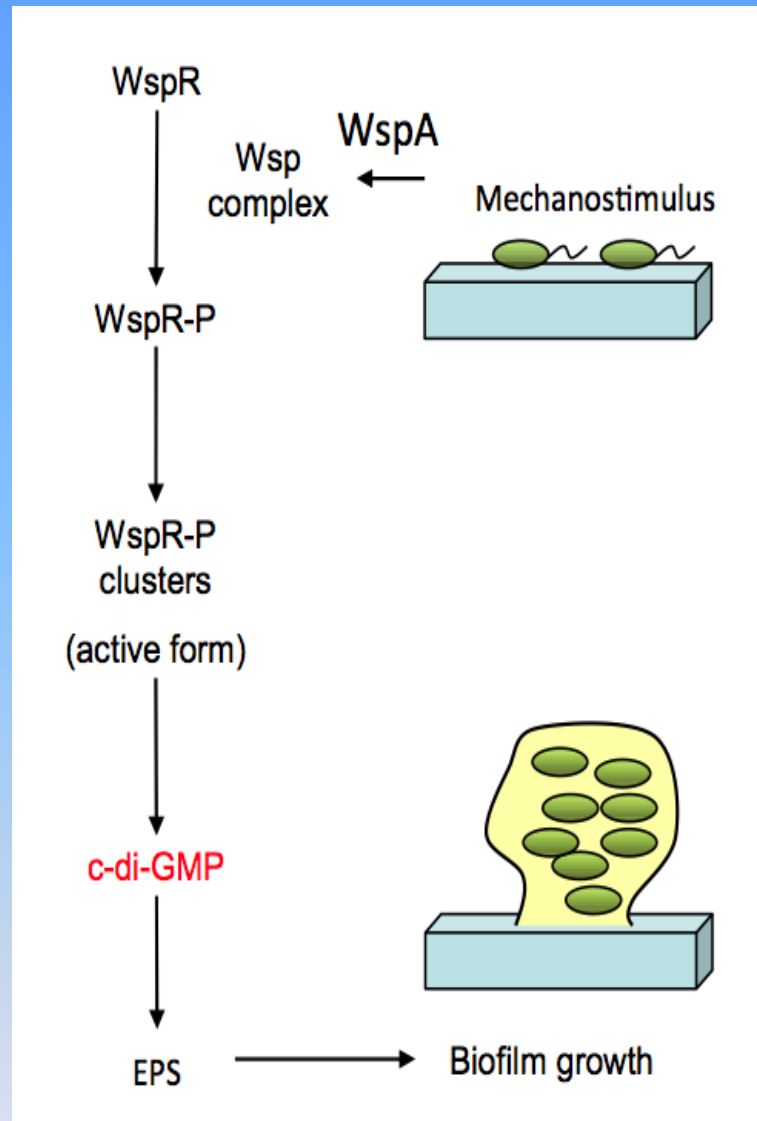
### *Streptococcus* Adherence and Colonization

Angela H. Nobbs,<sup>1</sup> Richard J. Lamont,<sup>2</sup> and Howard F. Jenkinson<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Oral Microbiology Unit, Department of Oral and Dental Science, University of Bristol, Bristol BS1 2LY, United Kingdom, and  
<sup>2</sup>Department of Oral Biology, University of Florida, Gainesville, Florida 32610-0424







*Pseudomonas aeruginosa*

# Fáze vzniku biofilmu: Quorum – sensing



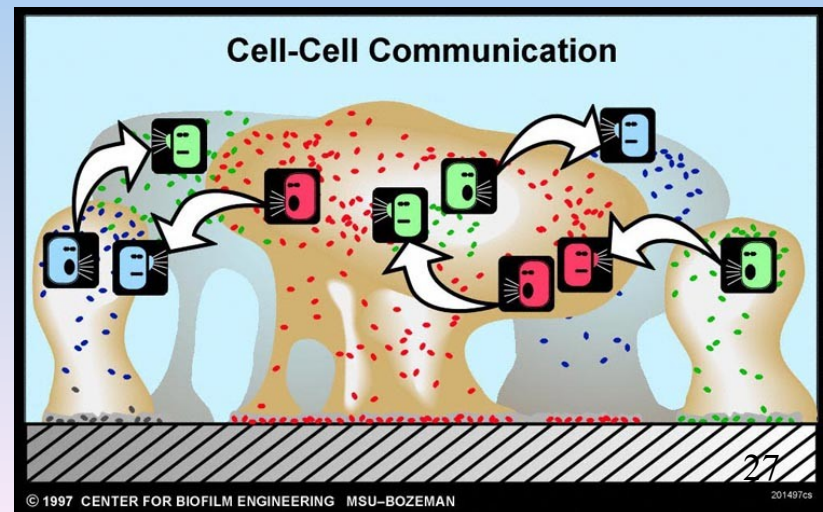
Signalizace mezi buňkami podmíněná jejich koncentrací.

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

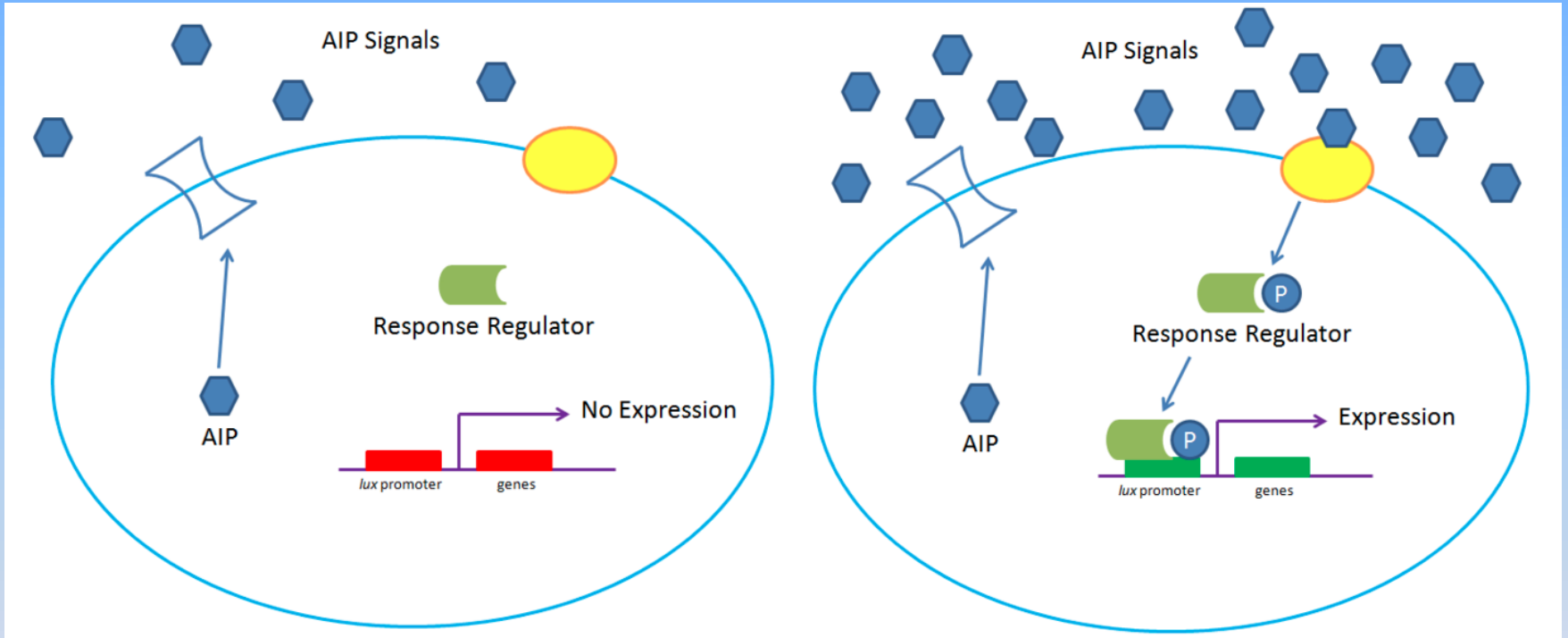
- Soustava malých organických molekul, které jsou buňkou tvořeny v závislosti na koncentraci jich samotných v prostředí
- Buňka tak reaguje na hustotu populace
- Kaskáda reakcí po vazbě na receptor spouští syntézu sekundárních metabolitů a komunikaci v rámci bakt. společenstva
- Vnitrodruhová organizace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



- U planktonních bakteriálních populací může upozorňovat na stres a jako ochranu zahájit tvorbu biofilmu, který je vůči němu odolnější.
- Může kontrolovat velikost a hustotu biofilmu a případně podněcovat disperzi nebo rozklad buněčných subpopulací.
- Může působit na chování buněk v biofilmu a indukovat nebo potlačovat např. sekreci EPS a adhezinů či pohyblivost jednotlivých skupin buněk, což ovlivňuje strukturu biofilmu.

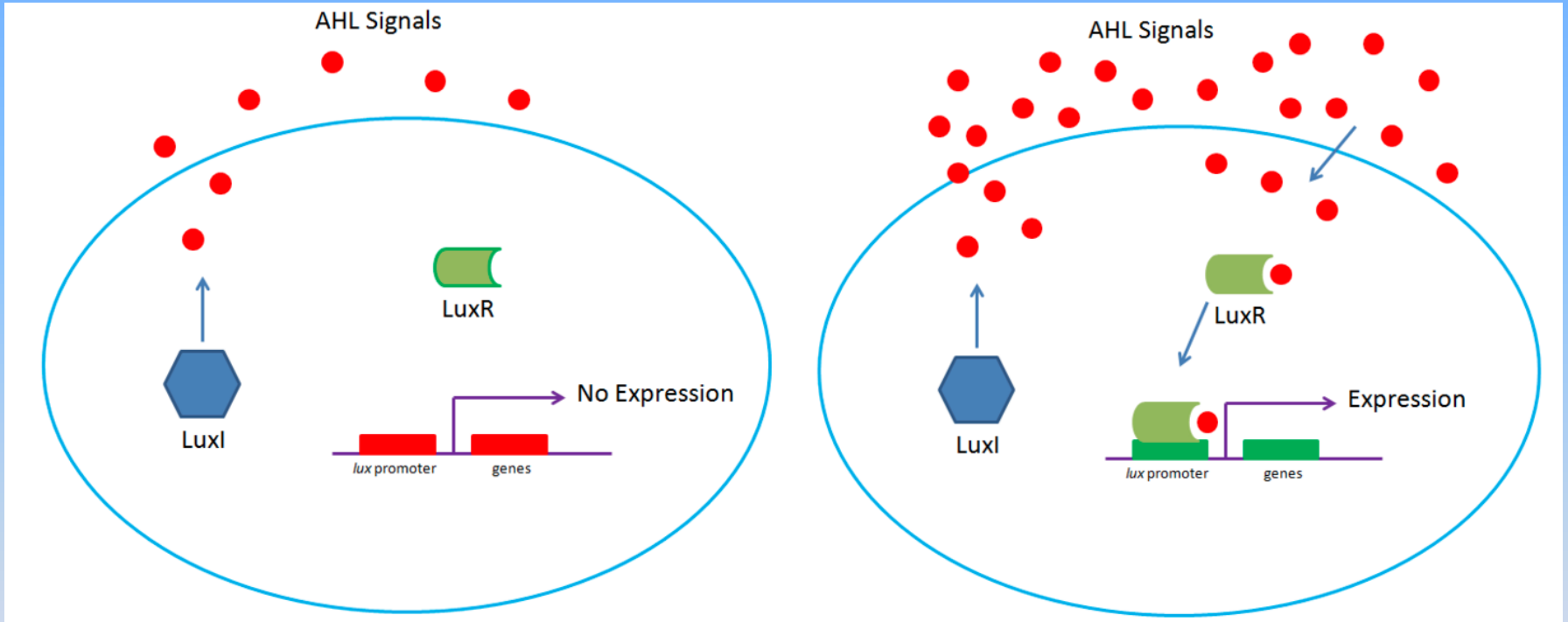


# G+

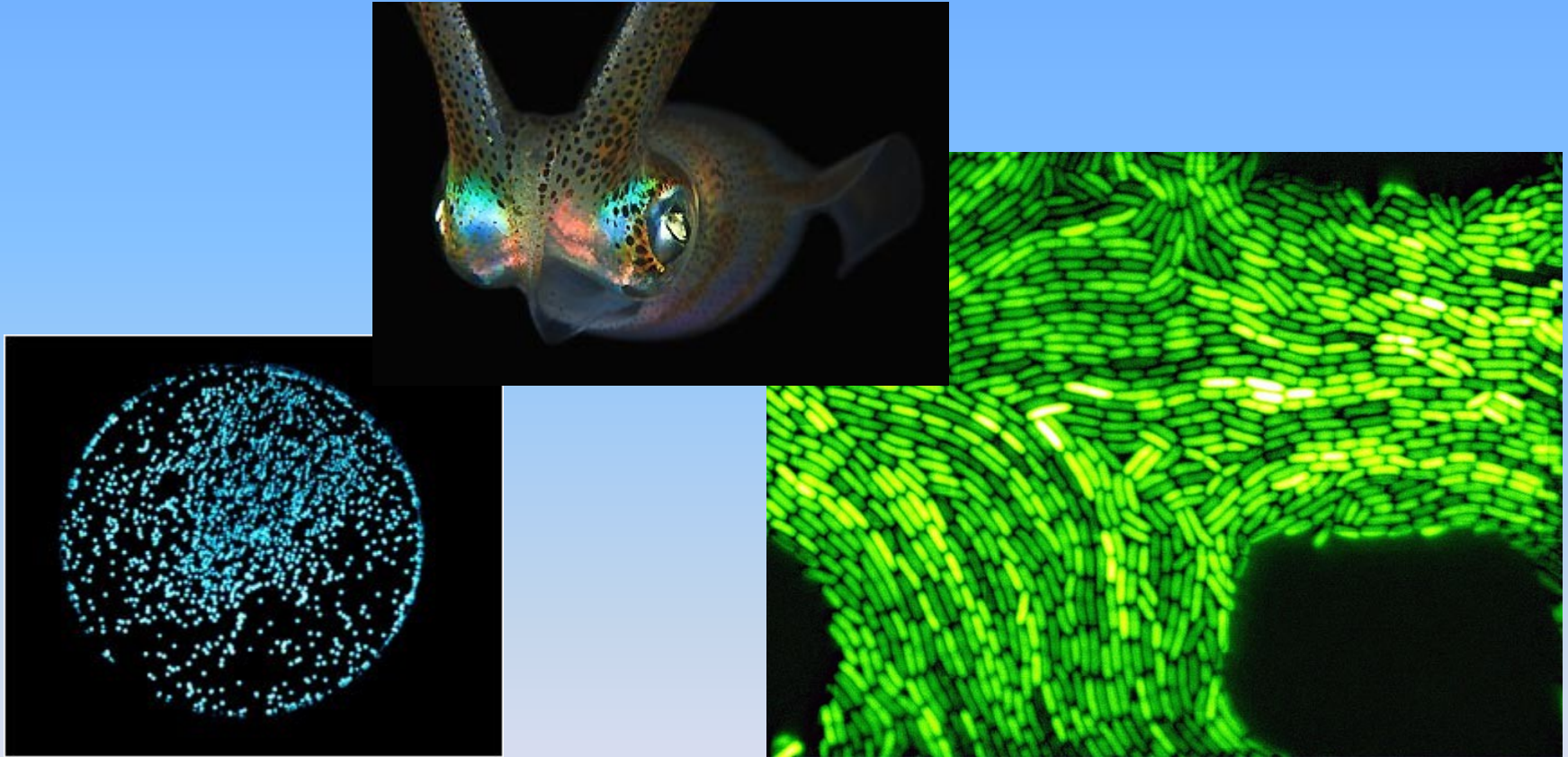




G-



# Quorum – sensing - regulace luminiscence u *Vibrio fischeri*



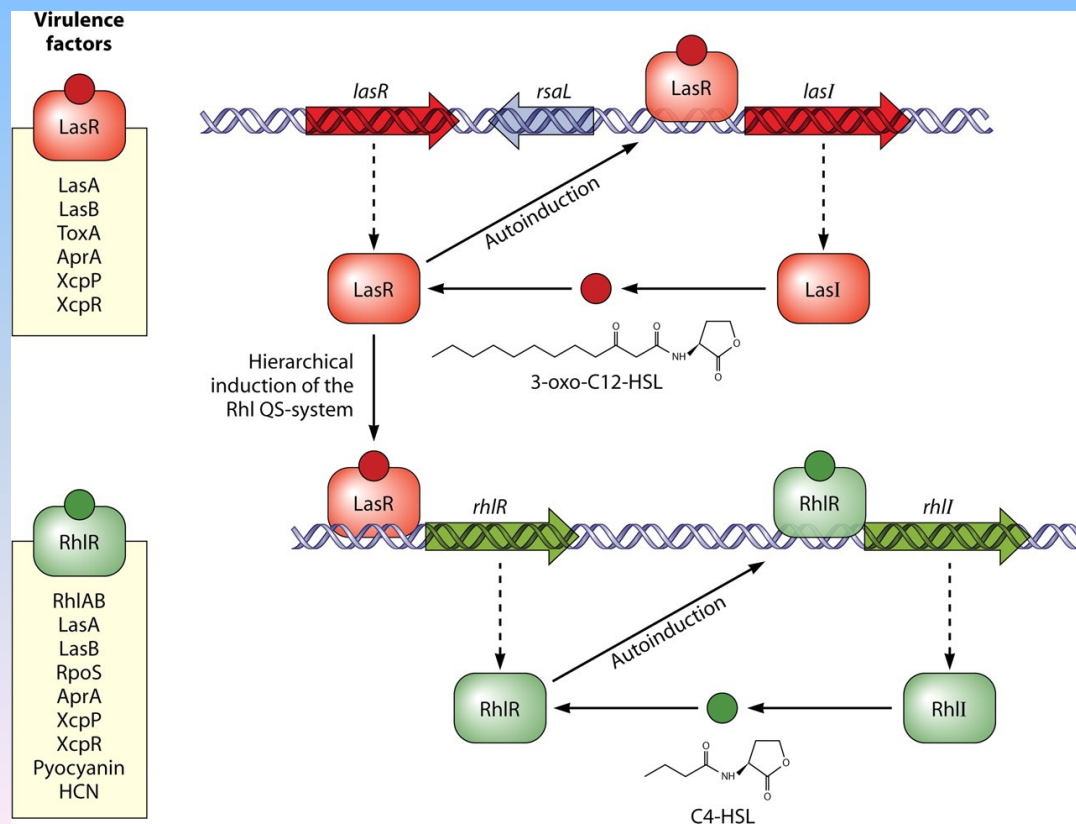
LuxI produkuje autoinduktor N-(3-oxohexanoil)-homoserinelactone

# Quorum – sensing - regulace luminiscence u *Pseudomonas aeruginosa*

- 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
- Dva QS systémy –

Las (indukce Rhl)

Rhl (indukce genů virulence)

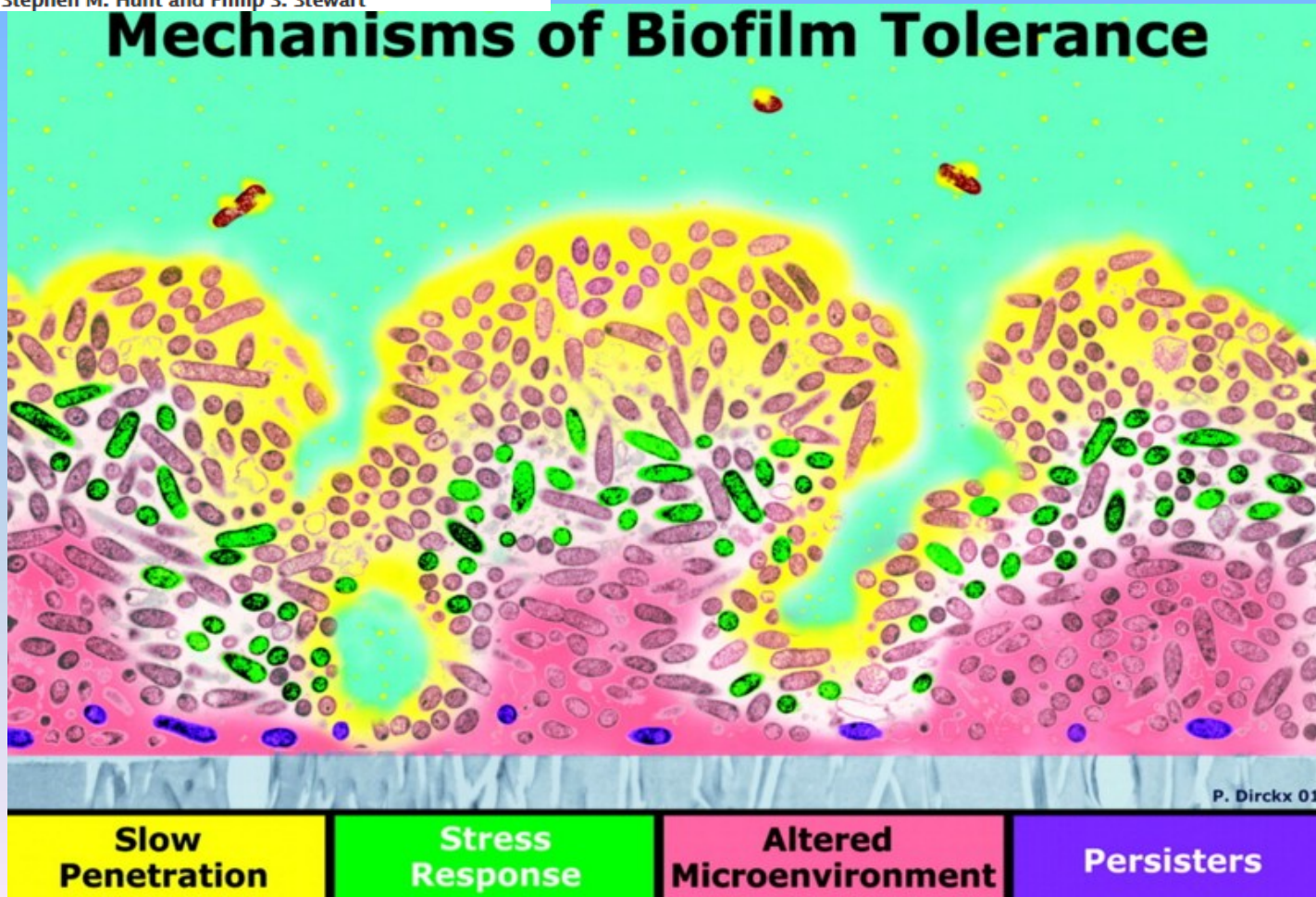




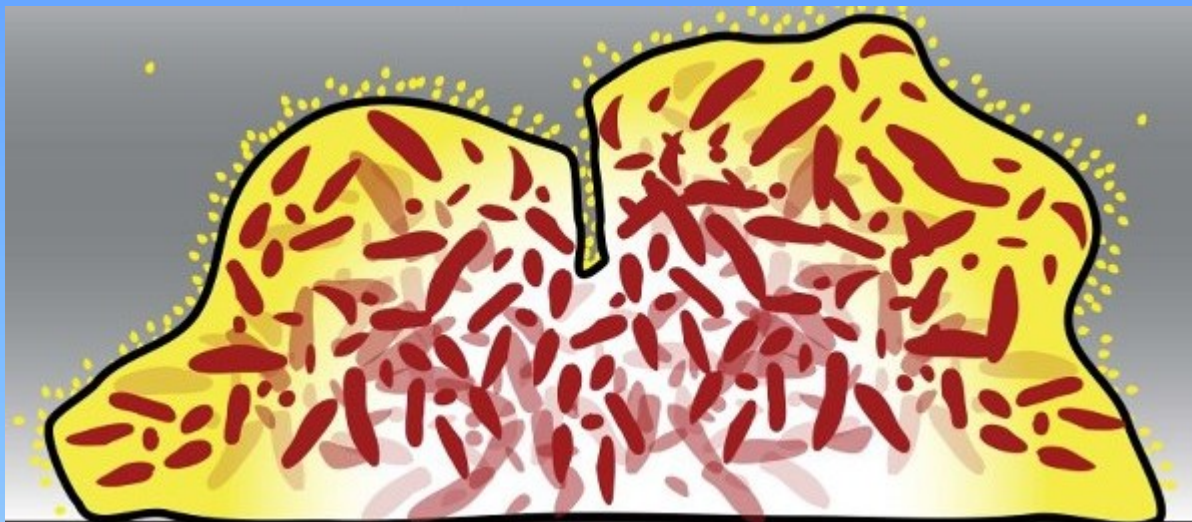
# Rezistence k ATB

Vnitřní mechanismy rezistence: omezená difuze antibiotik biofilmem  
metabolická aktivita bakterií v biofilmu  
perzistentní buňky

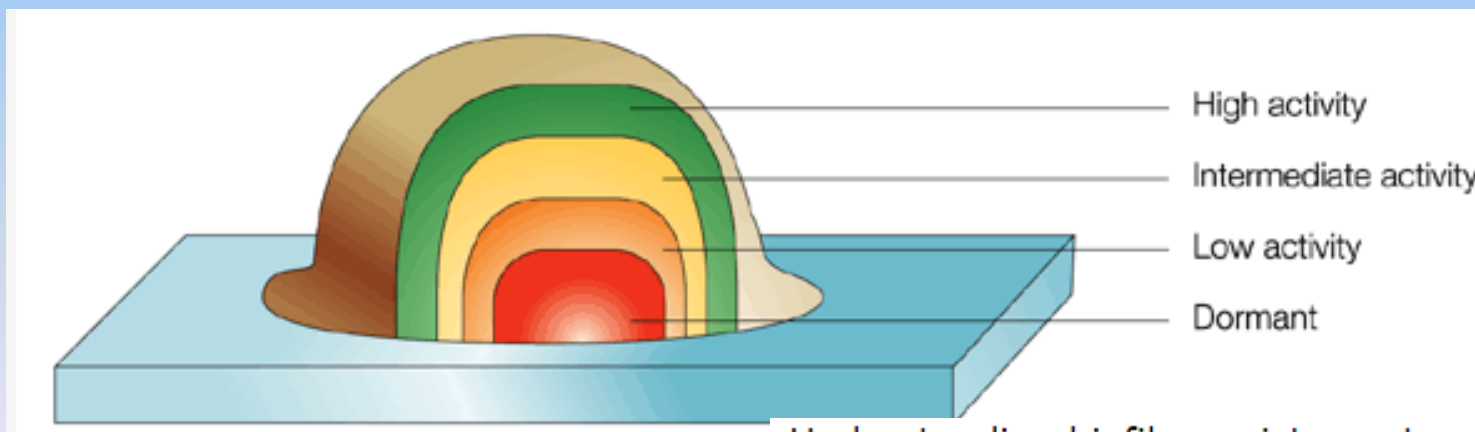
A Three-Dimensional Computer Model of Four Hypothetical Mechanisms Protecting Biofilms from Antimicrobials  
Jason D. Chambless, Stephen M. Hunt and Philip S. Stewart\*



## Omezená difuze antibiotik biofilmem



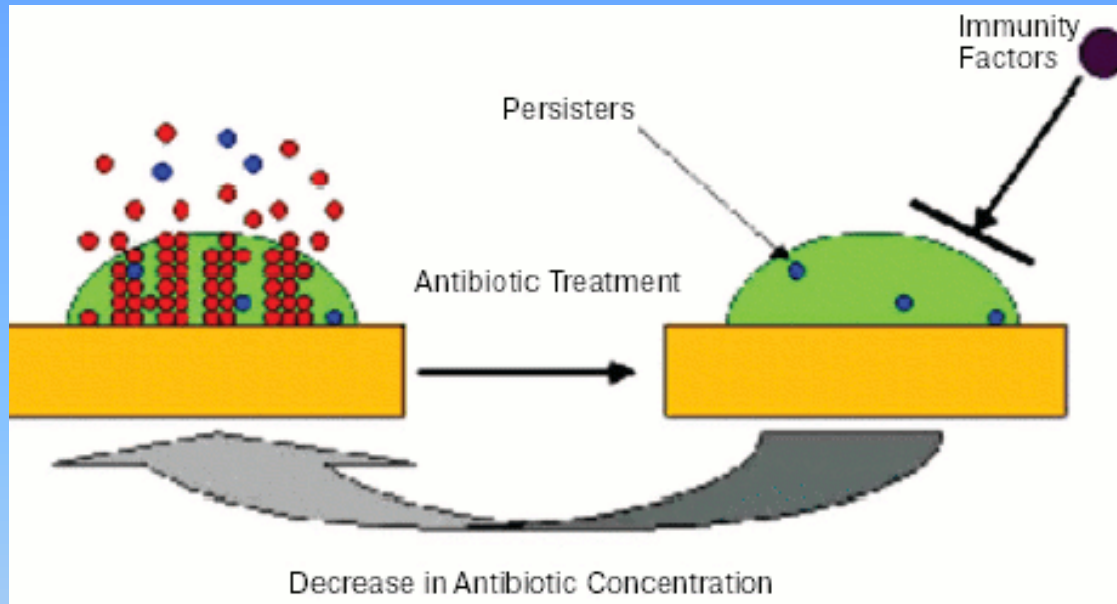
## Metabolická aktivita bakterií v biofilmu



Understanding biofilm resistance to antibacterial agents

David Davies

# Perzistentní buňky



Podle teorie perzistentních buněk („perzisters“) přežívá malá subpopulace bakterií i radikální léčbu antibiotiky poté, co tyto buňky přechází do dormantního stádia podobného sporám.

# Početná populace....

- Přenos genů
  - až 1000x úspěšněji než u buněk planktonických
- Fenotyp buněk
  - rytmicky se mění
  - po odplavení si zachovají urč. dobu vlatnosti jako v biofilmu (R)
- Odplavení
  - aktivace genu pro syntézu enzymu štěpícího matrici

# 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?

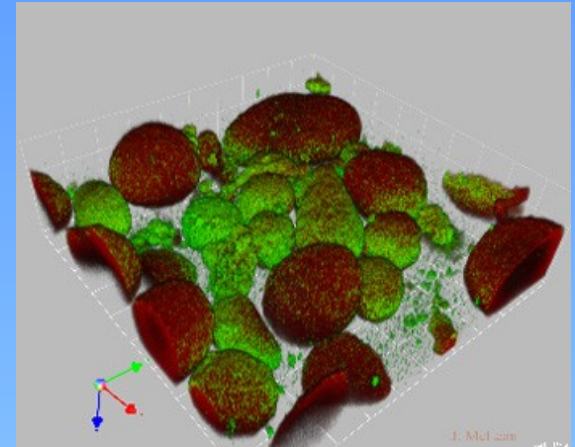
# Studium biofilmu

Studium struktury – větš. u G-

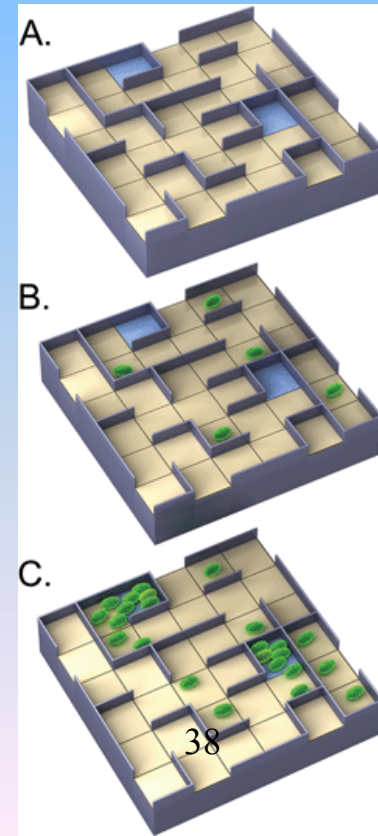
- polysacharidová glykokalyx
- mikroskopie:
  - světelný mikroskop: obtížné
  - elektronový: nepracuje se živými buňkami
  - konfokální: - plochy ve zvolené hloubce
    - z řezů skládána struktura
  - řádkovací elektronoptická technika...

Studium složení

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



*Shewanella* biofilm – konf.mikr.



# Horniny a bakterie - koevoluce



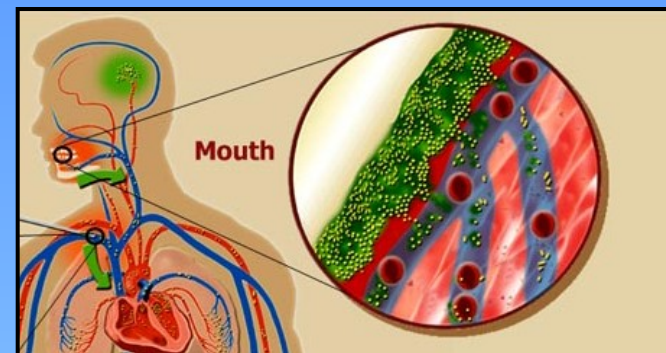
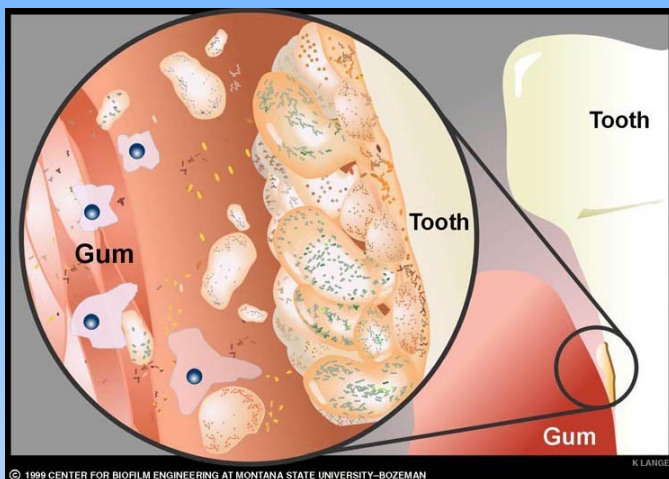
- Složení minerálů ovlivňuje počet a diverzitu mikrobů
- Síru oxidující bakterie silně okyselují prostředí a tvoří póry
- Závisí tvorba biofilmu hornin na jejich složení?



# Biofilm v lidském těle

Zubní povlak

Střevní sliznice

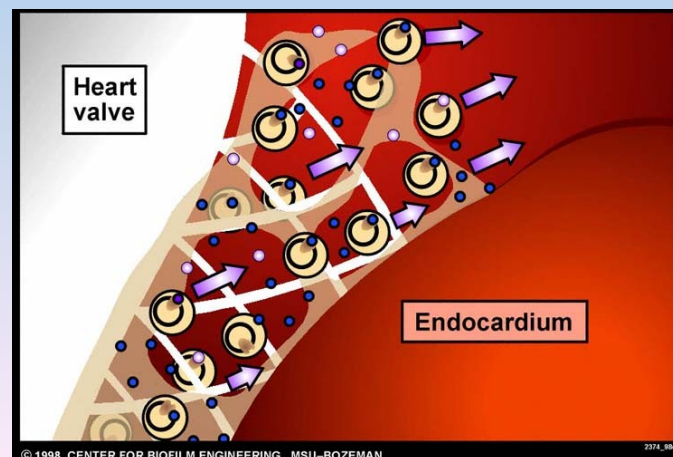


## Infekce

- sliznice nebo uvnitř tkáně
- endokarditida
- rány; bércové vředy; spáleniny

## Chronické infekce

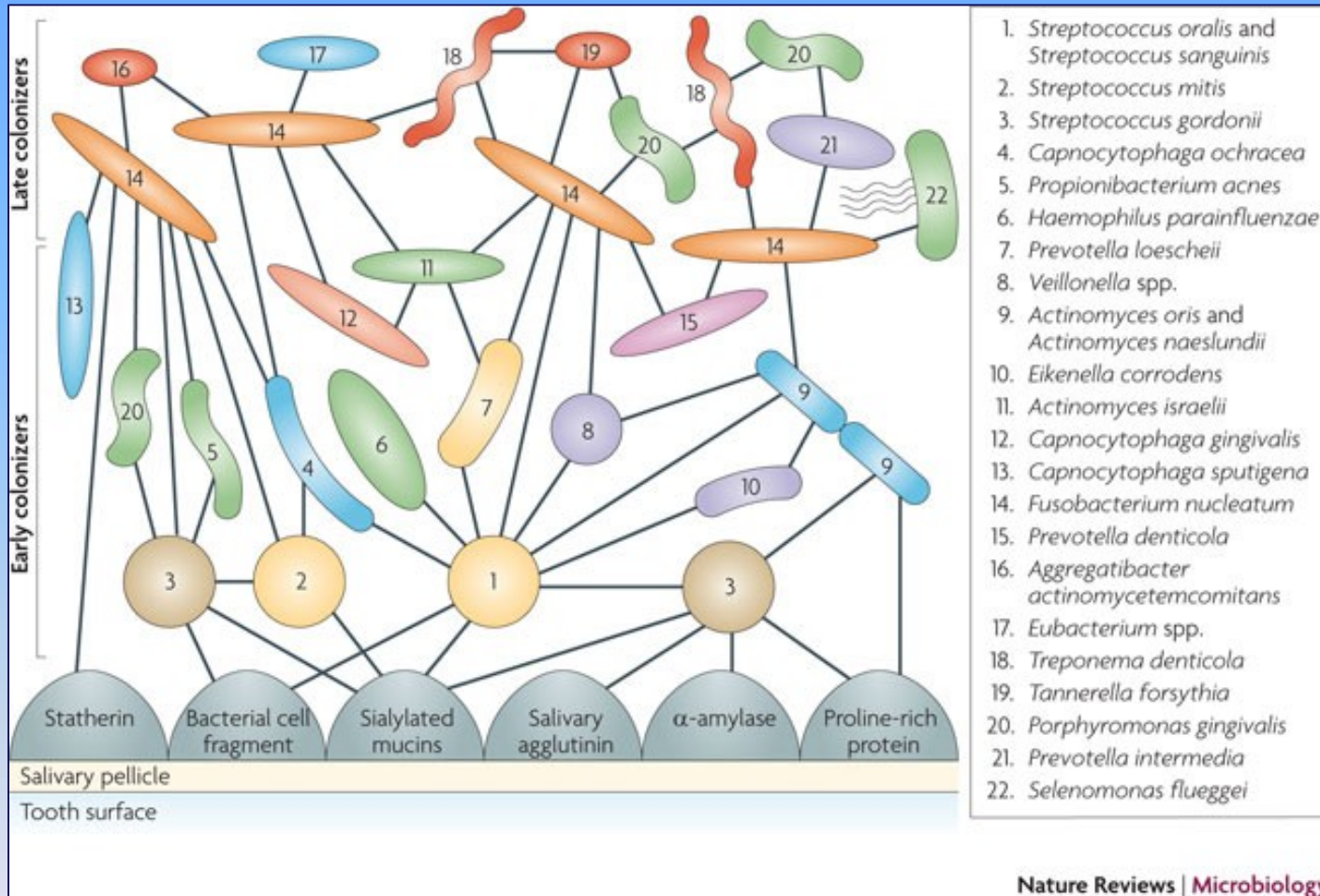
- dýchací cesty
- ušní infekce
- močové cesty
- chronický zánět prostaty





# Biofilm skloviny

700 kmenů z 18ti rodů

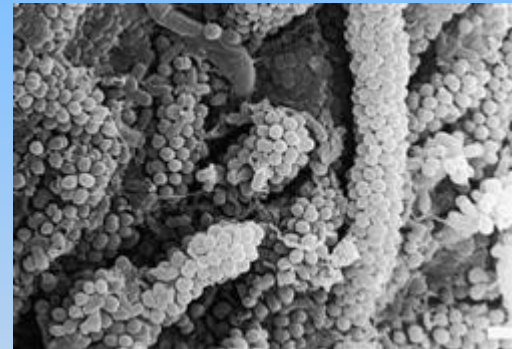
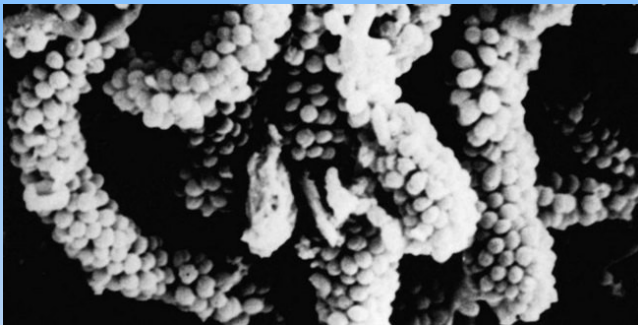


Mezibuněčný kontakt – role adhezinů (lektiny) a receptorů (sacharidy)

Kontakt s povrchem zubu – pelikula proteinů, lektiny... (Rickert et al. 2003)

## Morfologické struktury orálního biofilmu

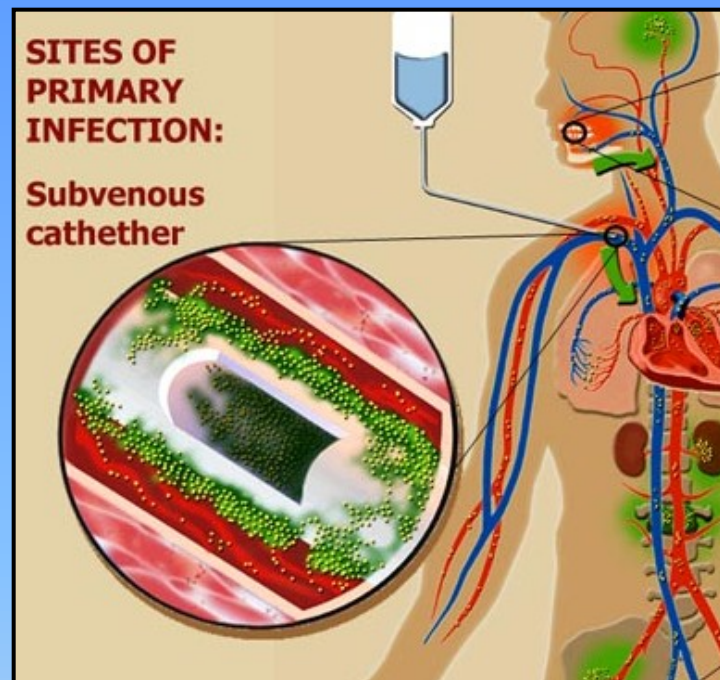
“corncobs” – koky koagregující s vláknitými bakteriemi



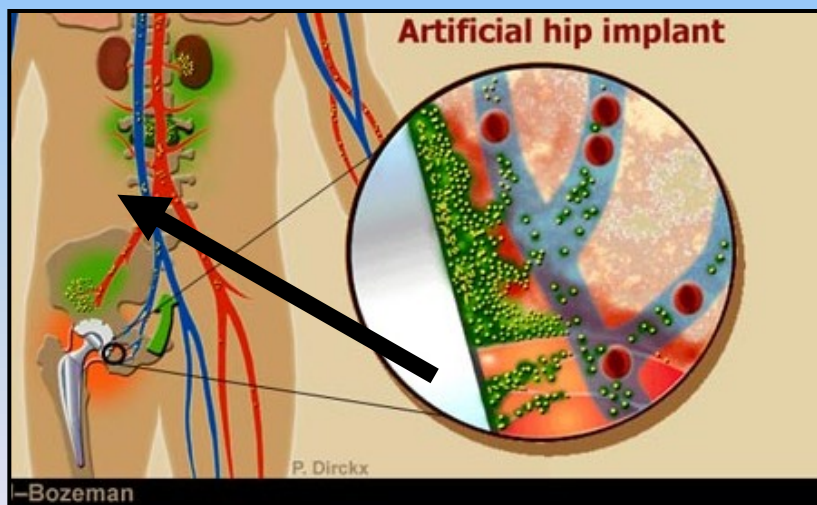
“rosette” - 1 kok koagregující s koky jiného typu

# Biofilm a medicína

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



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



Vytrvalá syntéza a uvolňování toxinů...

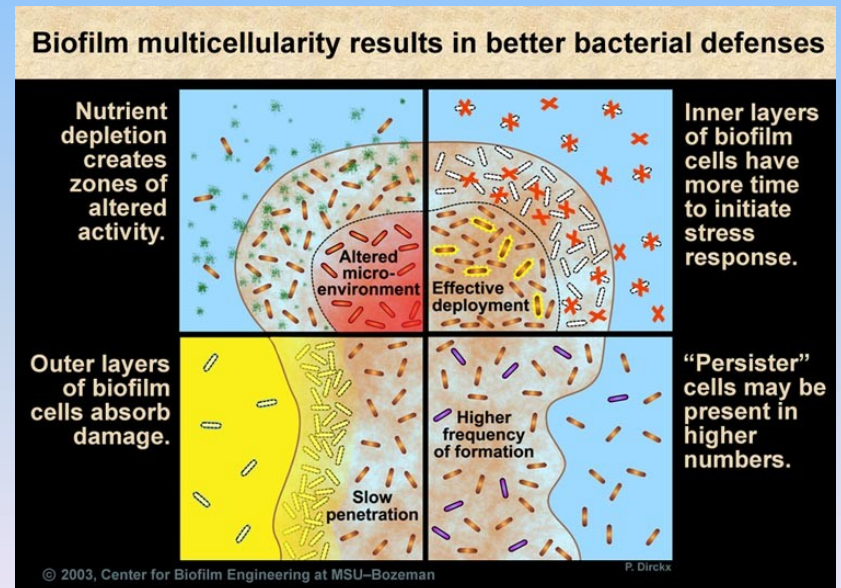
Nemusí být kontakt s vnějškem! - kovové náhrady kloubů

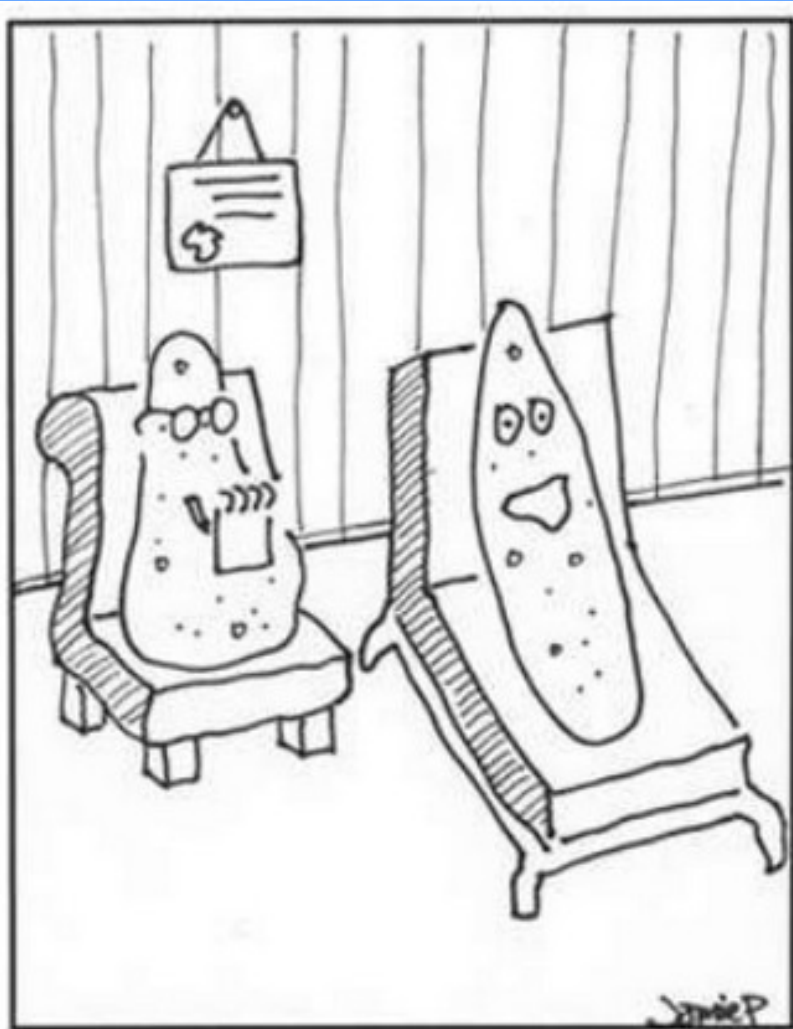
## Výhody přisedých stadií:

- 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

## Nevýhody přisedých stadií:

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





I just can't go with the flow anymore.  
I've been thinking about joining a biofilm.