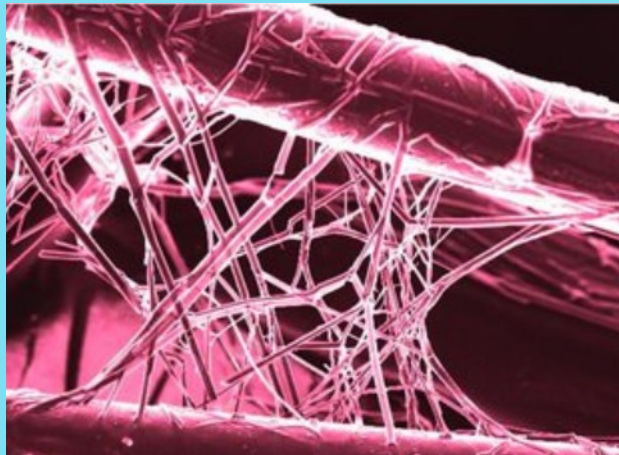


# CYTOLOGIE A MORFOLOGIE PROKARYOT

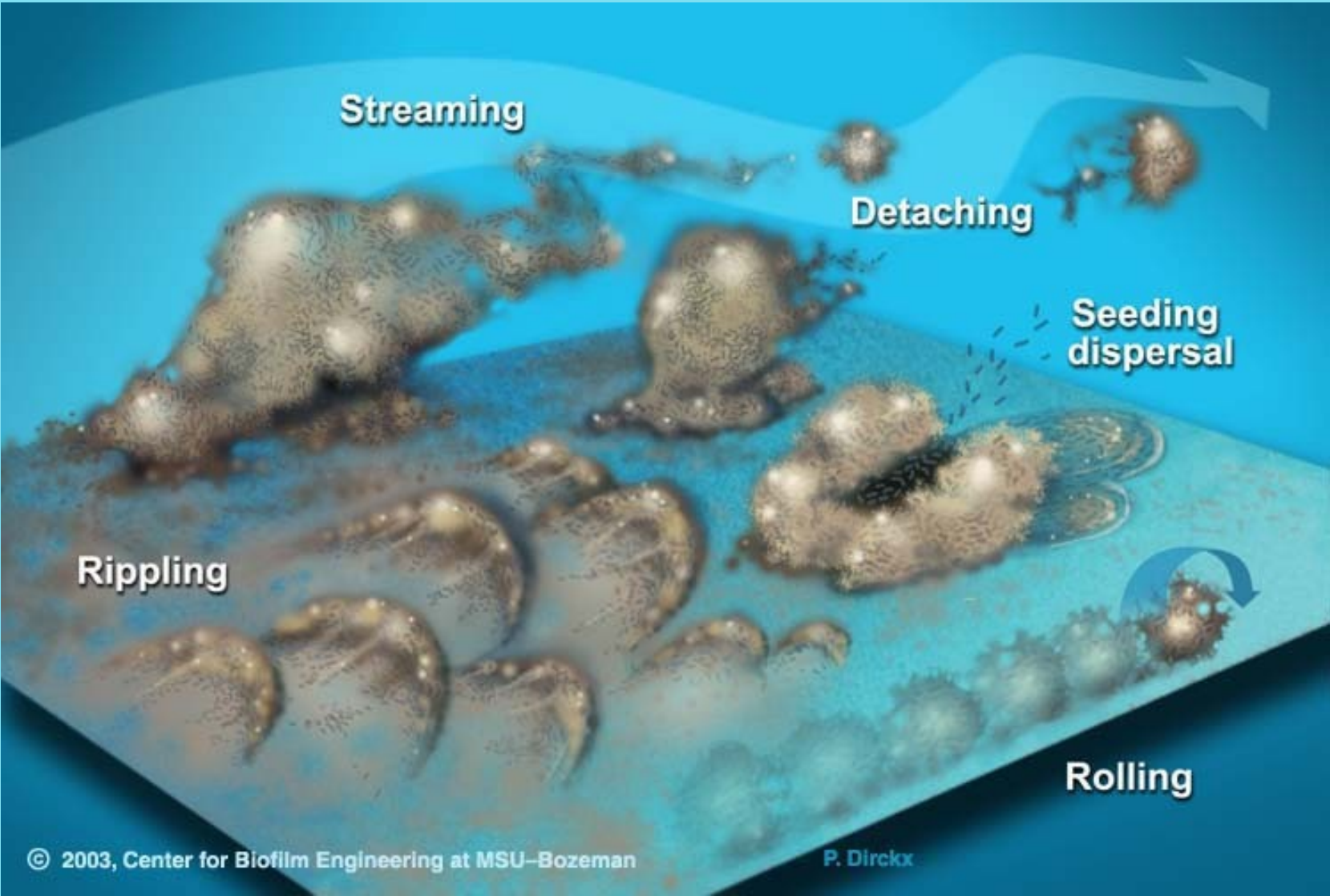
## 8

Růstové cykly bakterií II.

- střídání přisedlé a volné (plovoucí) formy života u prokaryot
- nutná přítomnost vodního prostředí
- mořské i sladkovodní
- tělní tekutiny – sliny, střeva, krev
  
- typický příklad biofilm - *Caulobacter crescentus*, *Sphaerotilus natans*
  
- přizpůsobení přisedlému způsobu života mechanismy adheze k povrchům:
- reverzibilní – van der Waalsovy síly
- irreverzibilní – chemická vazba (elektrostatická, kovalentní, vodíková)

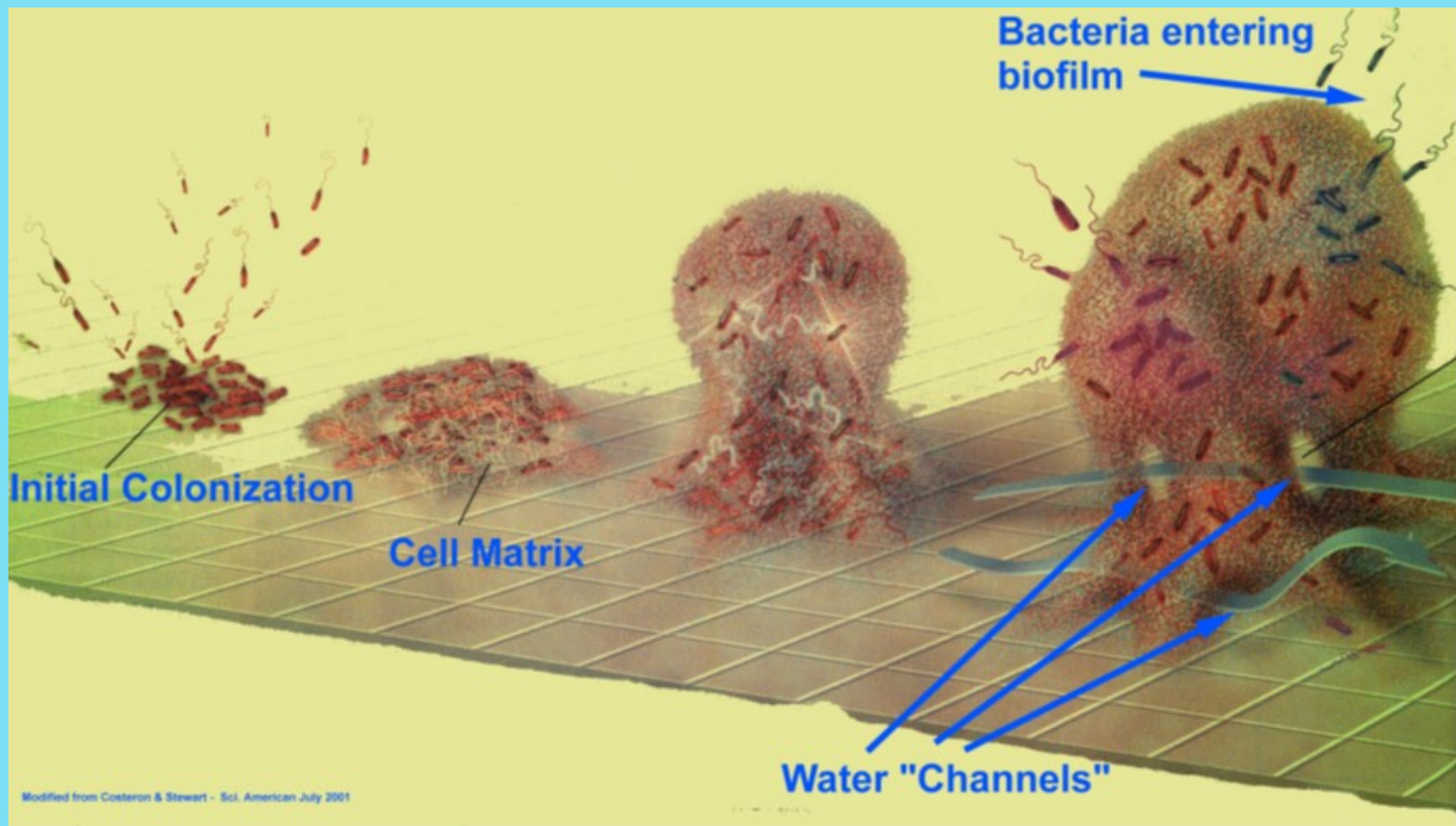


# Biofilm



## Biofilm

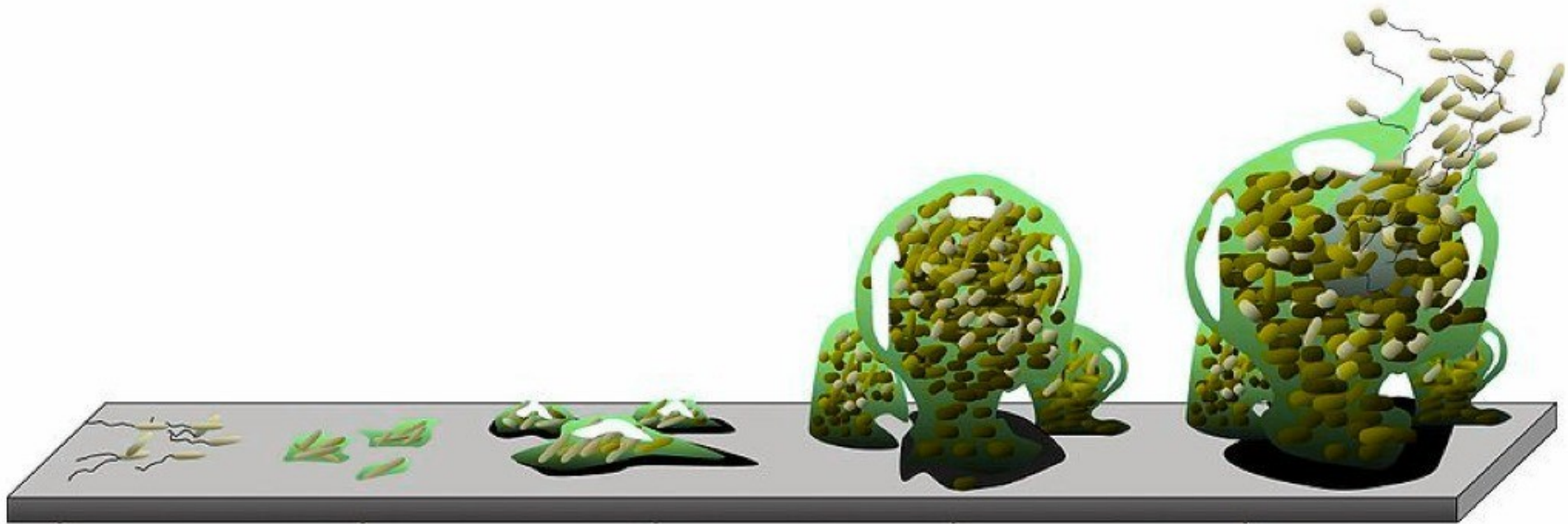
- ...společenství buněk usazených v polysacharidové matrix
- přichycených k povrchu nebo okolním buňkám, se změněným fenotypem růstu
- antony von levenhoek - jako první pozoroval biofilm - na zubech



## Biofilm

- volně plovoucí (planktonické) buňky se usazují na vhodném povrchu
- zahodí bičík a začínají produkovat matrix z polysacharidů
- formují se „hřibovité“ útvary s dutinami a kanálky
- složky biofilmu: bakteriální buňky a jiné organizmy uvnitř hřibovitých shluků propojených kanálky a póry
- jednodruhový biofilm – př: aerob *P. aeruginosa* – bývá mnohem tenčí než vícedruhový
  
- odolnější vůči patogenům
- vyšší odolnost v biofilmu vůči imunitnímu systému hostitele !!!!!
- biofilm se v přírodním prostředí většinou vyskytuje jako multidruhový
- různé ekologické vztahy - kompetice o živiny, symbioza, syntrofie
- adheziny jsou zásadité nebo neutrální...
- extracel. polysacharidy jsou kyselé





**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

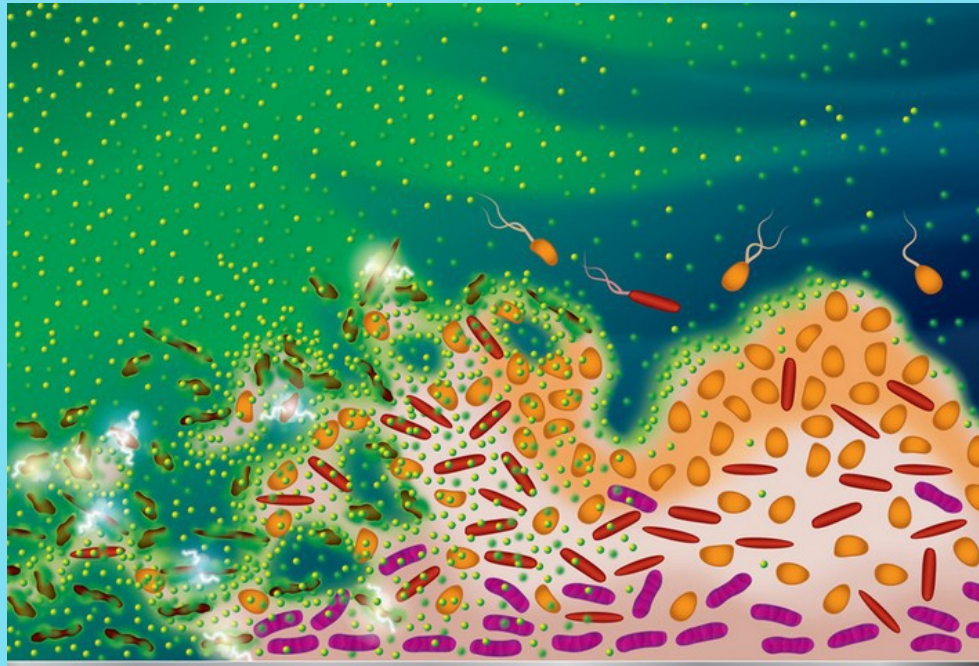
- přizpůsobení přisedlému způsobu života
- mechanismy adheze: adhesiny, fimbrie – curli, glykokalyx
- reverzibilní – van der Waalsovy síly – slabé vazby
- Irreverzibilní – chemická vazba (kovalentní, vodíková)
- přítomnost extracelulárních polymerů
- změna fenotypu - ustává syntéza bičků, mukózní látky

### Spouštěcí podněty:

- osmotický tlak
  - snížený obsah kyslíku
  - rostoucí hustota poulace - quorum sensing
  - např: acyl-homoserin lakton (G-), malé peptidy (G+)
- 
- adheze - buňka produkuje více adhezinu - potom extracelul.matrix ...
  - bičík slouží k tomu aby se buňka k povrchu dostala -po přisednutí bičík odpadá

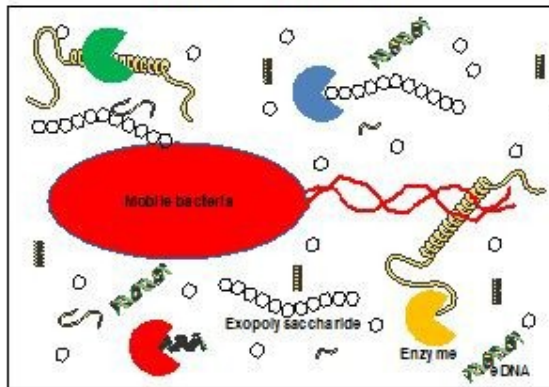
## Po přichycení změna vlastností bakterií

- zprvu na úrovni regulace genů
- po přisednutí - změna produkce bílkovin – vyrábí se ty, které se účastní se tvorby matrix
- 1/3 bílkovin se produkuje v rozdílném poměru
- více tvořeny bílkoviny pórů, transportní a proteiny syntetizující mimobuněčnou hmotu
- po přichycení je nutno vytvořit matici z polysacharidu
- př: *P. aeruginosa* - alginát, již 15 minut po přisednutí

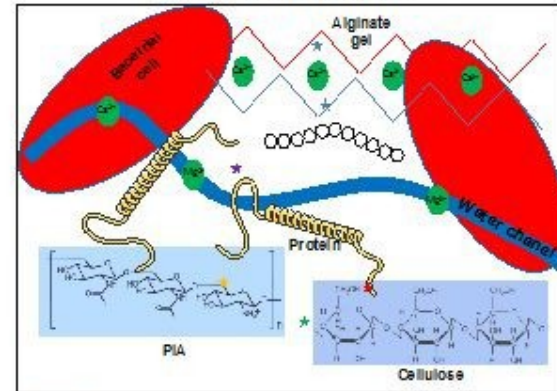




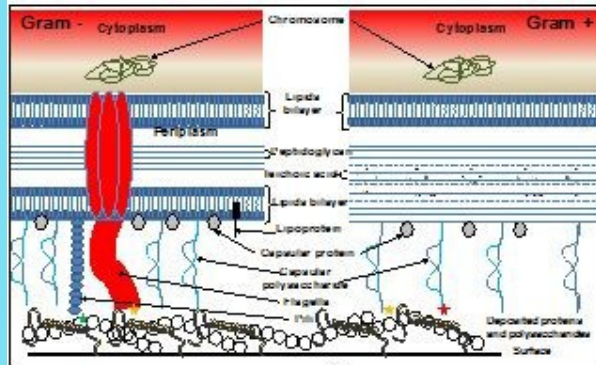
### Detachment area



### Core of Biofilm

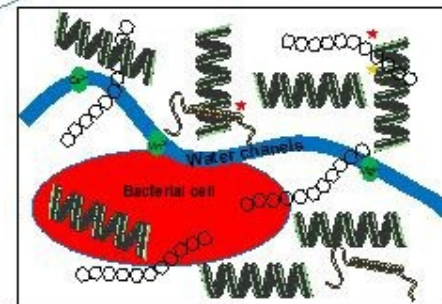


### Adhesion area

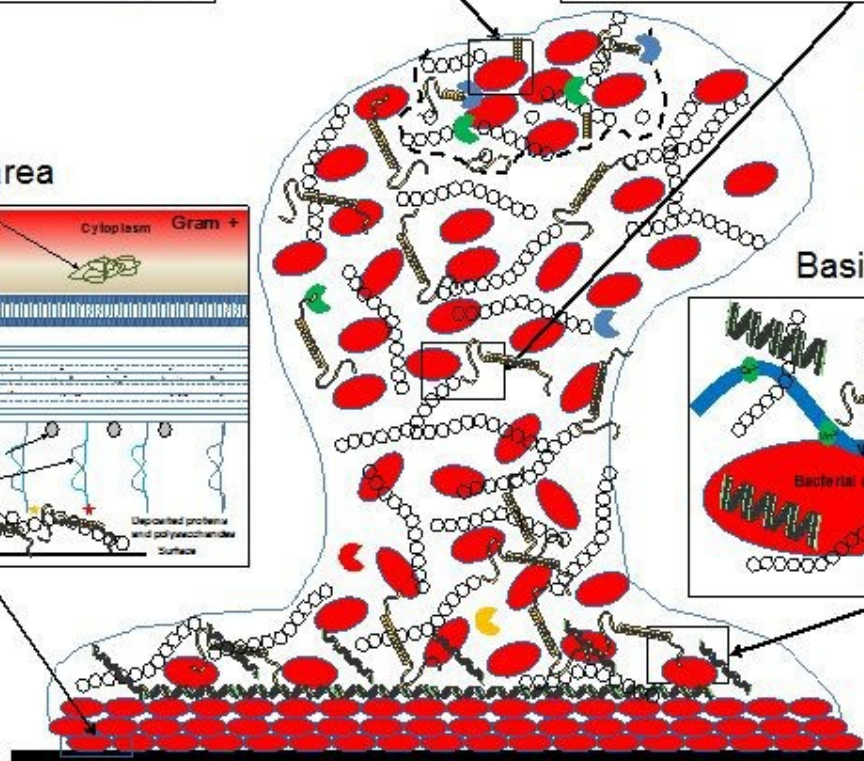


- ★ Ionic attractive forces
- ★ Electrostatic attractive forces
- ★ Van der Waals interactions
- ★ Hydrogen bonding
- ★ Repulsive forces

### Basis of Biofilm



### Surface



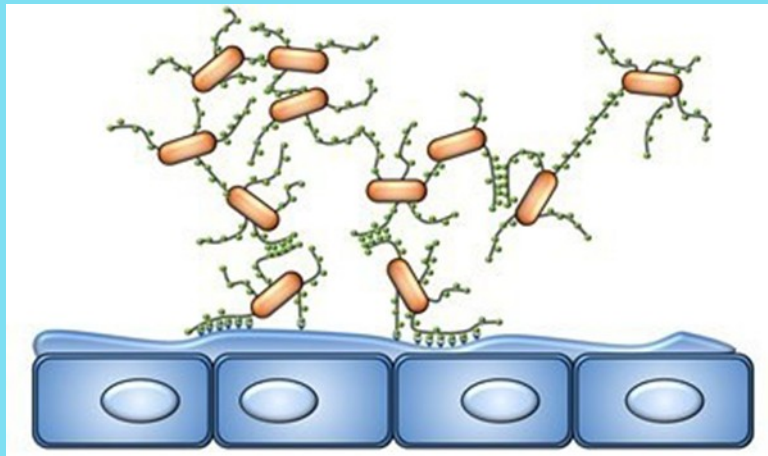
Adheze buněk k povrchu je ovlivněna:

### 1) povrch

- hrubost, chemickým složením, povrchovou úpravou
- buňka je schopna kolonizovat jakýkoli povrch, dává ale přednost hrubým, drsným povrchům - lépe se přichytí

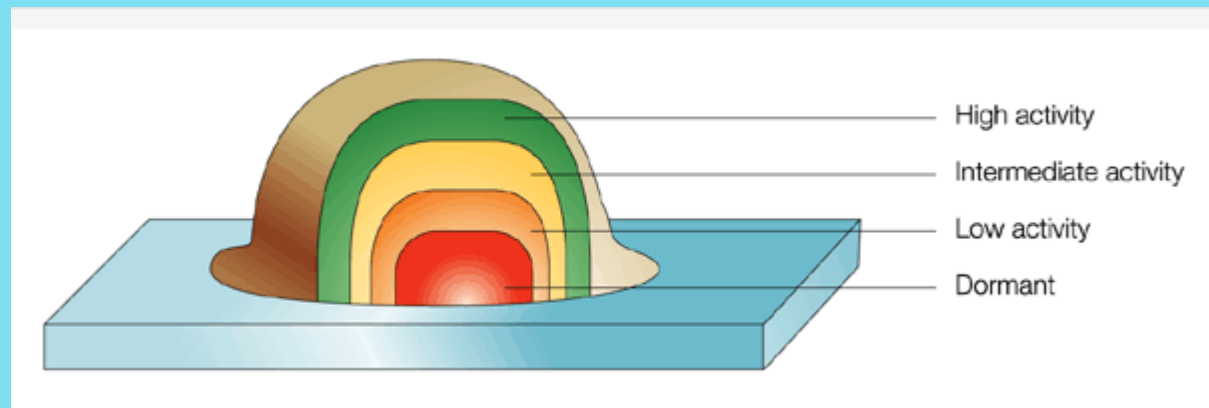
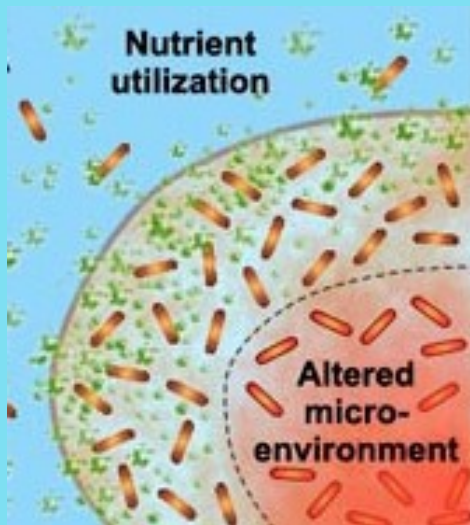
### 2) hydrodynamické vlivy

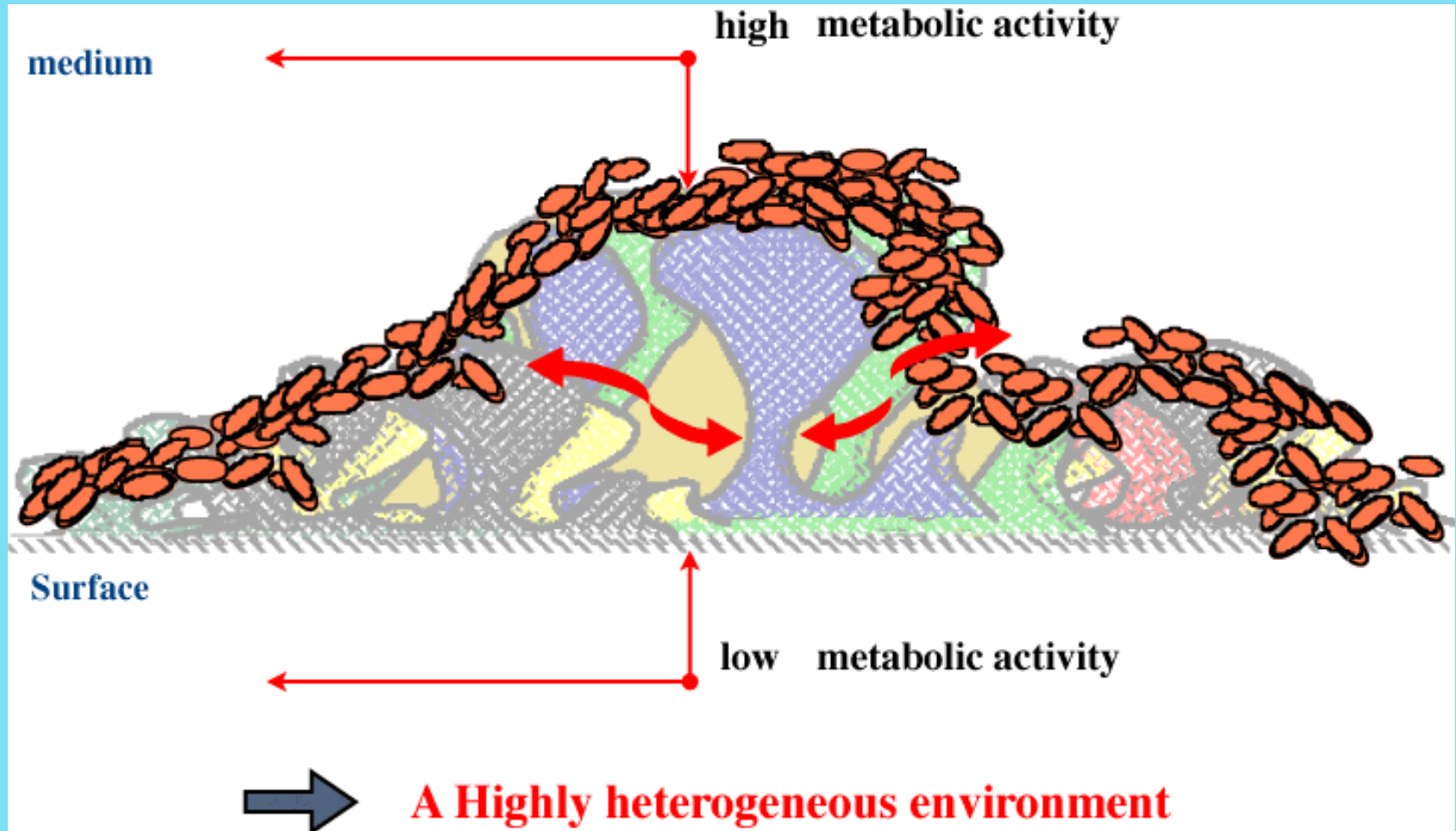
- biofilmy vznikající v pomalu proudící tekutině izotropní struktury
- biofilmy vznikající v rychleji a jednosměrně proudící tekutině jsou vláknité, zřetelně nasměrované útvary buněk
- růst biofilmu záleží na toku (jednosměrný, obousměrný), proudící/stojatá



## Dostupnost živin

- živiny se dostávají k buňkám biofilmu pomocí kanálků
- pokud kapalina proudí je zdrojem čerstvých živin
- kapalina stojí (pak živiny putují díkymolekulární difuzi)
- metabolity odváděny kanály ven
- buňky na povrchu jsou na tom nejlíp s přístupem živin
- jsou aktivnější, často v log fázi
- buňky u báze v biofilmu jsou ve fázi až stacionární
- díky změnám v dostupnosti živin i kyslíku, vznik heterogenních lokalit v jednom biofilmu
- př. možná přítomnost anaerobních mikrohabitátů v jinak aerobním zralém biofilmu





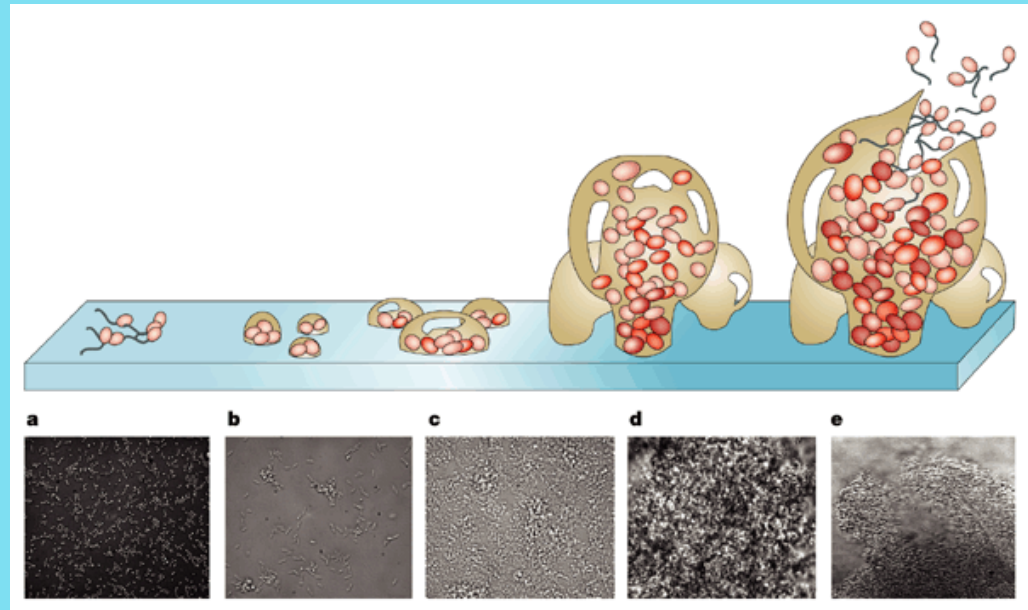


## Stabilita biofilmu

- 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 ho mají

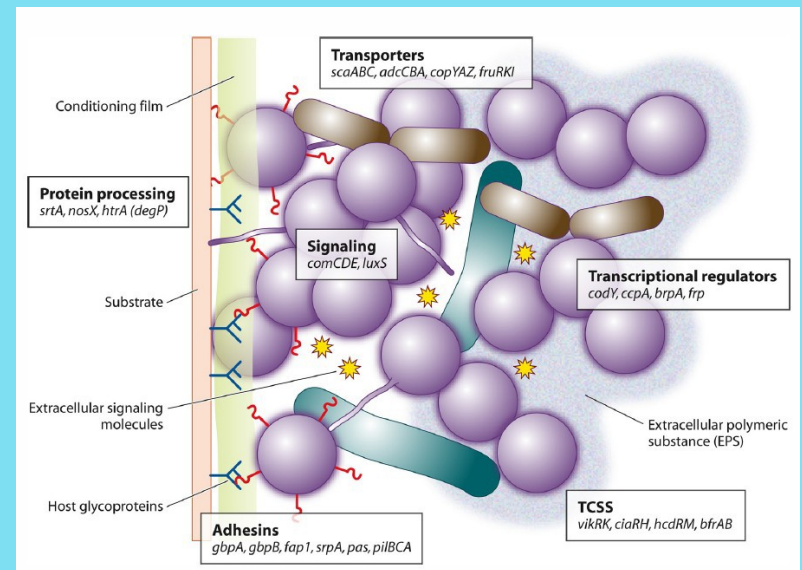
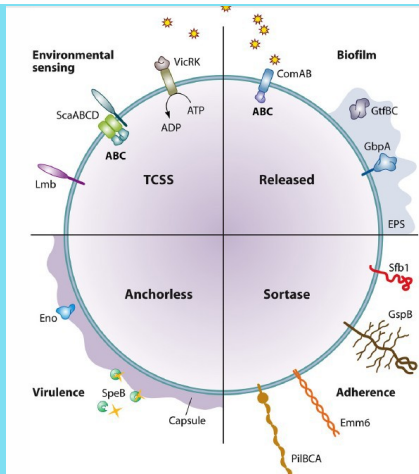
Roli hrají:

- 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
- streptokok – vytváří velmi odolné biofilmy...proč???
- na biofilmu se nepodílí jen polysacharidy, ale taky složky pouzdra

### *Streptococcus* Adherence and Colonization

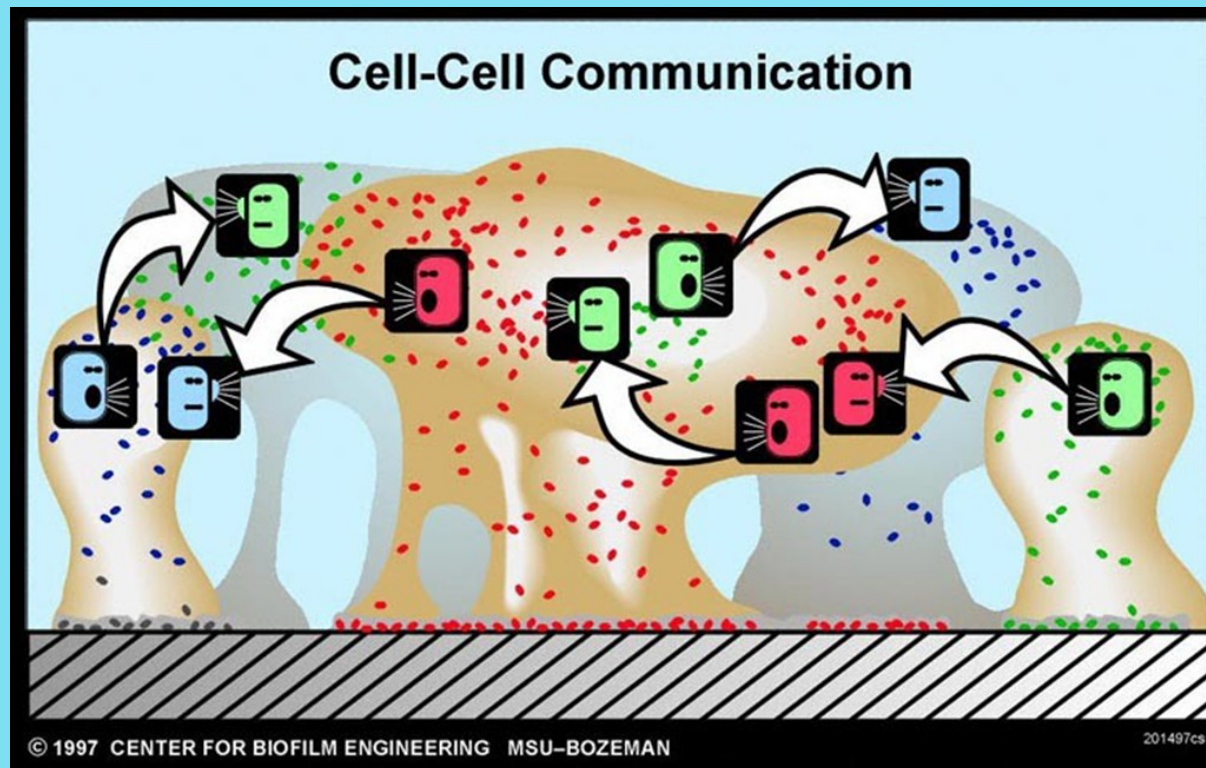
Angela H. Nobbs,<sup>1</sup> Richard J. Lamont,<sup>2</sup> and Howard F. Jenkinson<sup>1\*</sup>

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



## Quorum – sensing

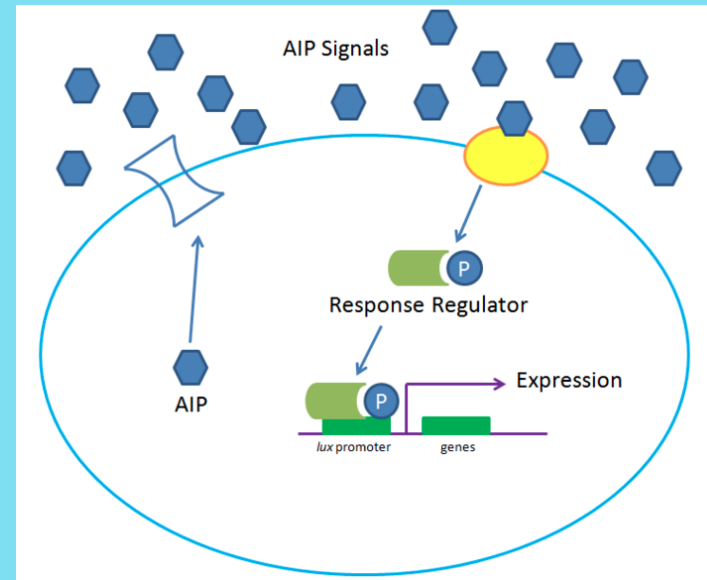
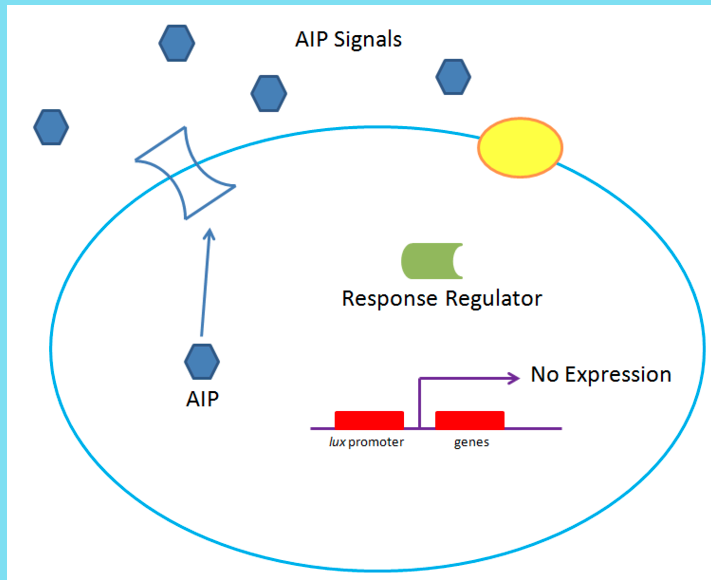
- soustava malých organických molekul, které jsou buňkou tvořeny v závislosti na koncentraci jich samotných v prostředí
- buňka tak reaguje na hustotu populace
- kaskáda reakcí po vazbě na receptor spouští syntézu sekundárních metabolitů a komunikaci v rámci bakt. společenstva
- vnitrodruhová organizace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

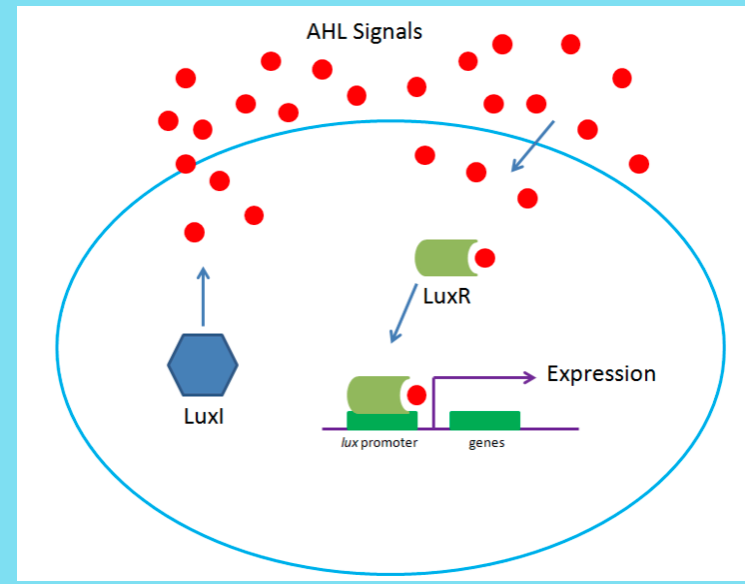
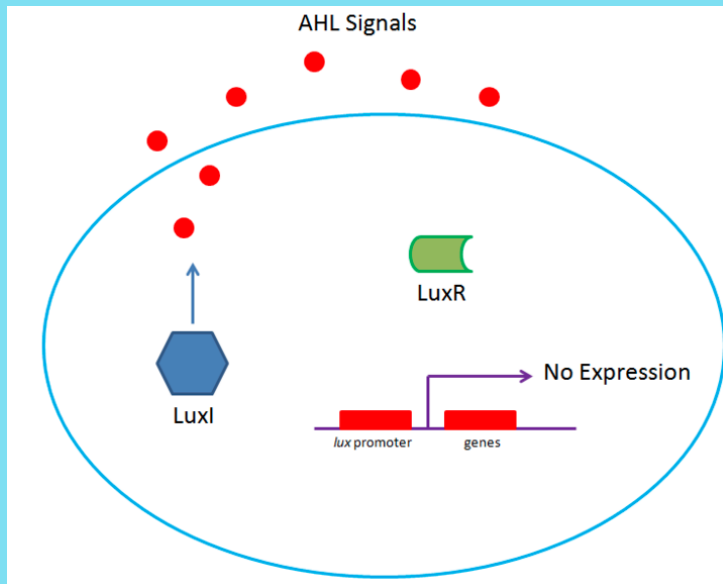
G+

- induktory se vážou na receptor
- ten pak aktivuje regulátor odpovědi
- pak spustí regulaci genu...receptor je stále aktivován - dochází k expresi molekul



G-

- malé molekuly prochází přímo přes membránu. ..

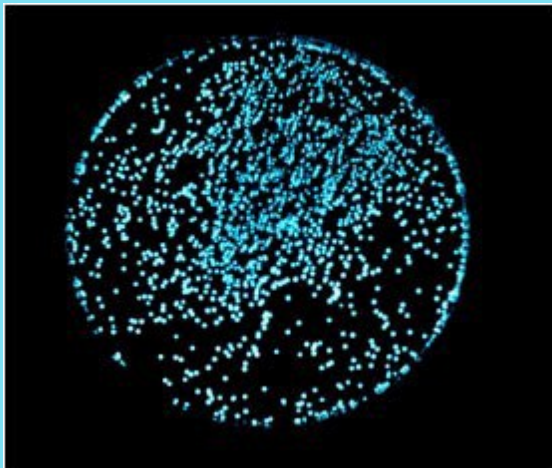
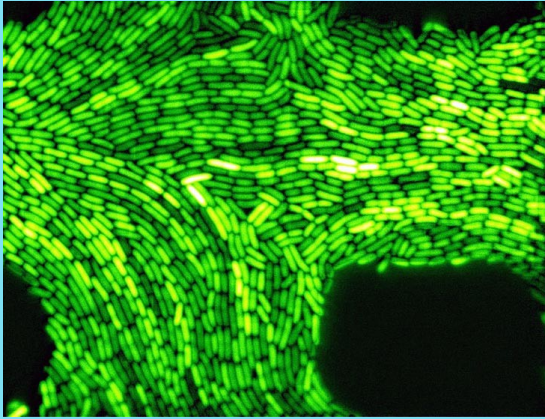




Quorum – sensing

regulace luminiscence u *Vibrio fischeri*

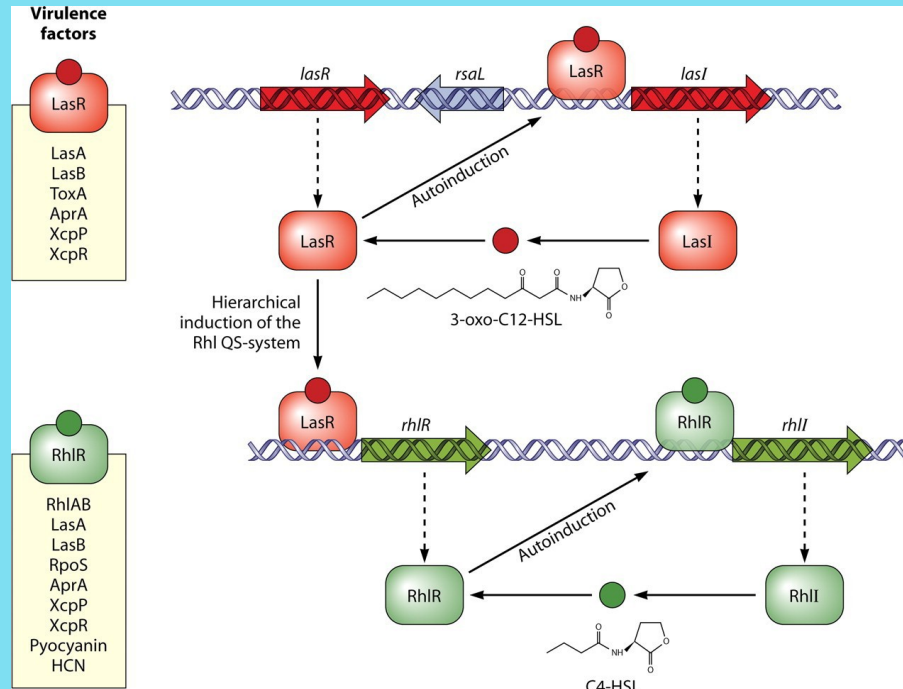
- LuxI produkuje autoinduktor N-(3-oxohexanoyl)-homoserinelactone



- 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)
- jeden systém ovládá geny las - indukuje tvorbu genu RHL
- RHL potom indukují geny virulence

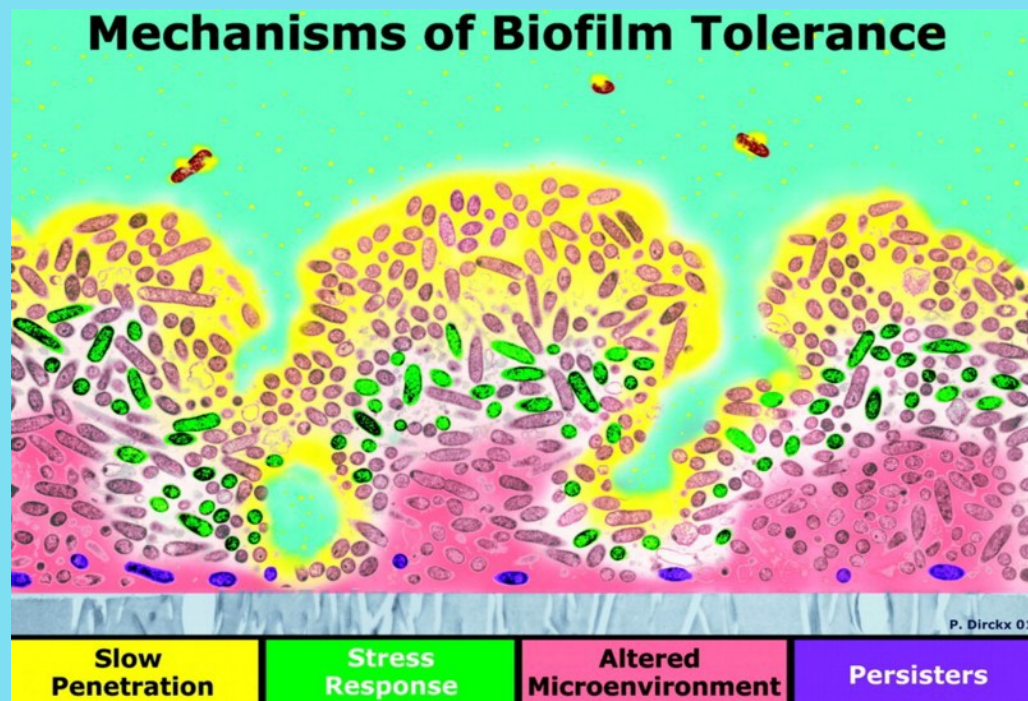


## Rezistence k ATB

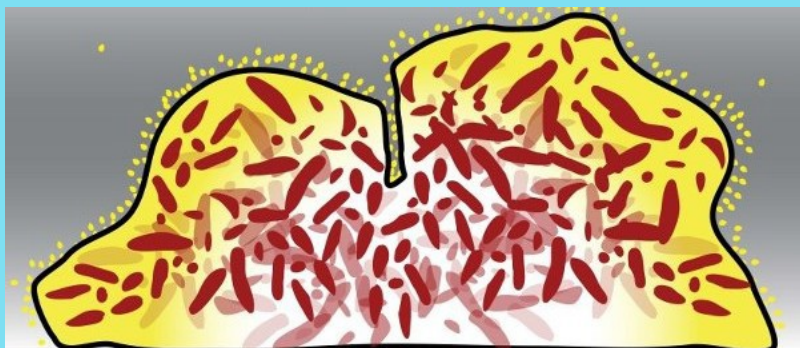
- vnitřní mechanismy rezistence: omezená difuze antibiotik biofilmem
- metabolická aktivita bakterií v biofilmu
- perzistentní buňky
- u biofilmu je az 1000x větší než u planktonního organismu.... protože je tam hodně bakterií, mají různou metabolickou aktivitu
- taky dochází k tvorbě perzistentních buněk... proto ta rezistence k ATB

A Three-Dimensional Computer Model of Four Hypothetical Mechanisms Protecting Biofilms from Antimicrobials

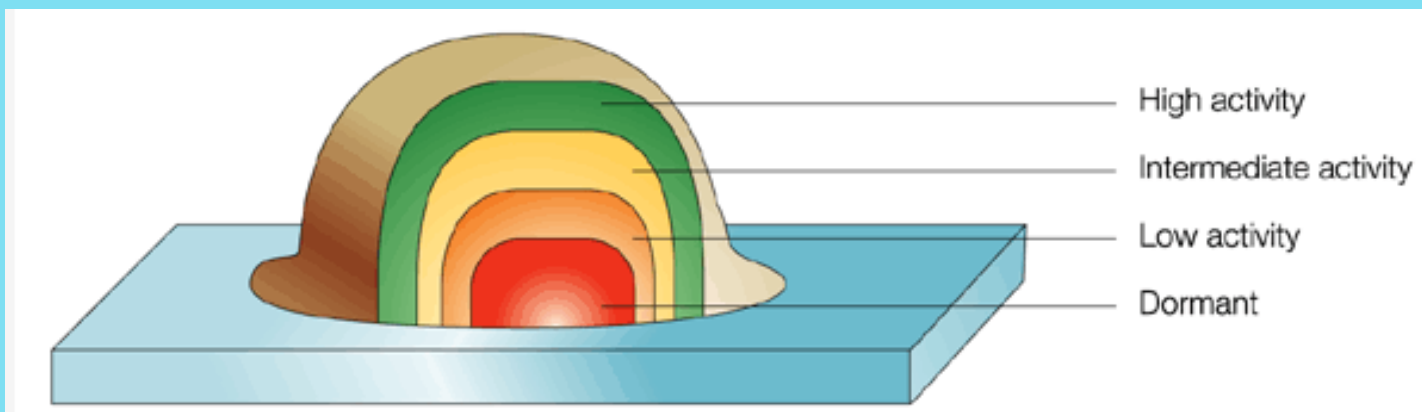
Jason D. Chambless, Stephen M. Hunt and Philip S. Stewart\*



- omezená difuze antibiotik biofilmem

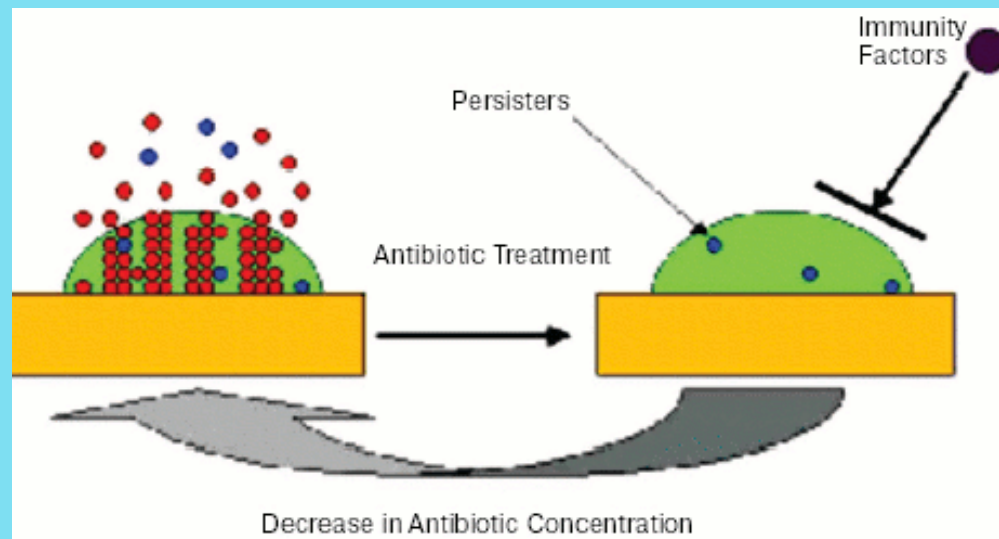


- metabolická aktivita bakterií v biofilmu



## Perzistentní buňky

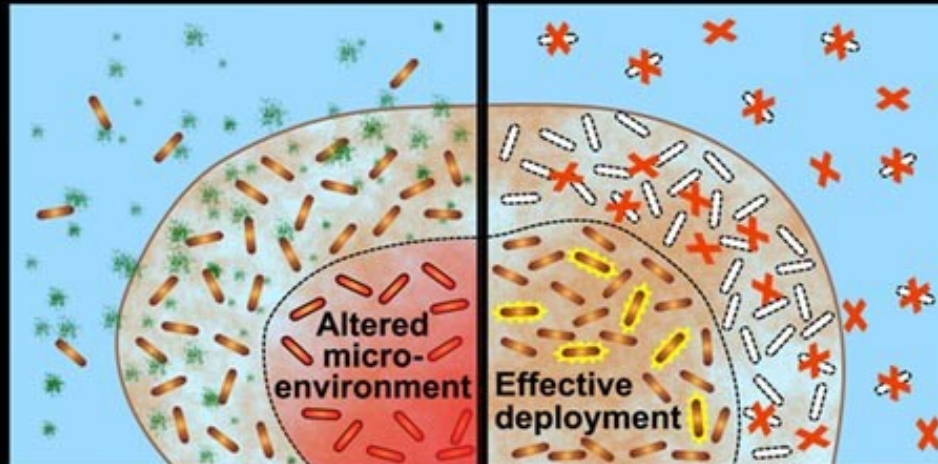
- podle teorie perzistentních buněk („persisters“) přežívá malá subpopulace bakterií i radikální léčbu antibiotiky poté, co tyto buňky přechází do dormantního stádia podobného sporám
- jsou schopny přejít do dormantního stadia...způsobují problém při léčbě atb...
- protože unikají ATBiotikům a taky imunitnímu systému...
- unikají asi proto, že spustí antistresové faktory
- uměle sníží replikaci dna, transkr, transl
- přečkají nevhodné podmínky... po zlepšení zase obnoví svoji aktivitu





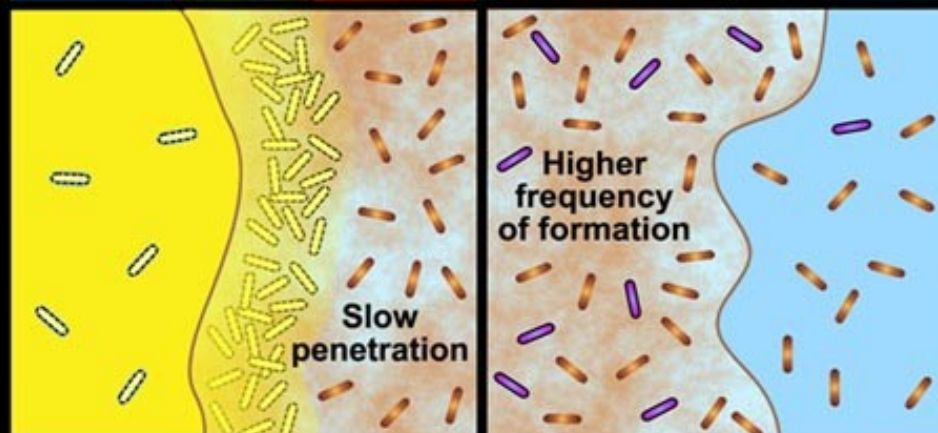
# Biofilm multicellularity results in better bacterial defenses

Nutrient depletion creates zones of altered activity.



Inner layers of biofilm cells have more time to initiate stress response.

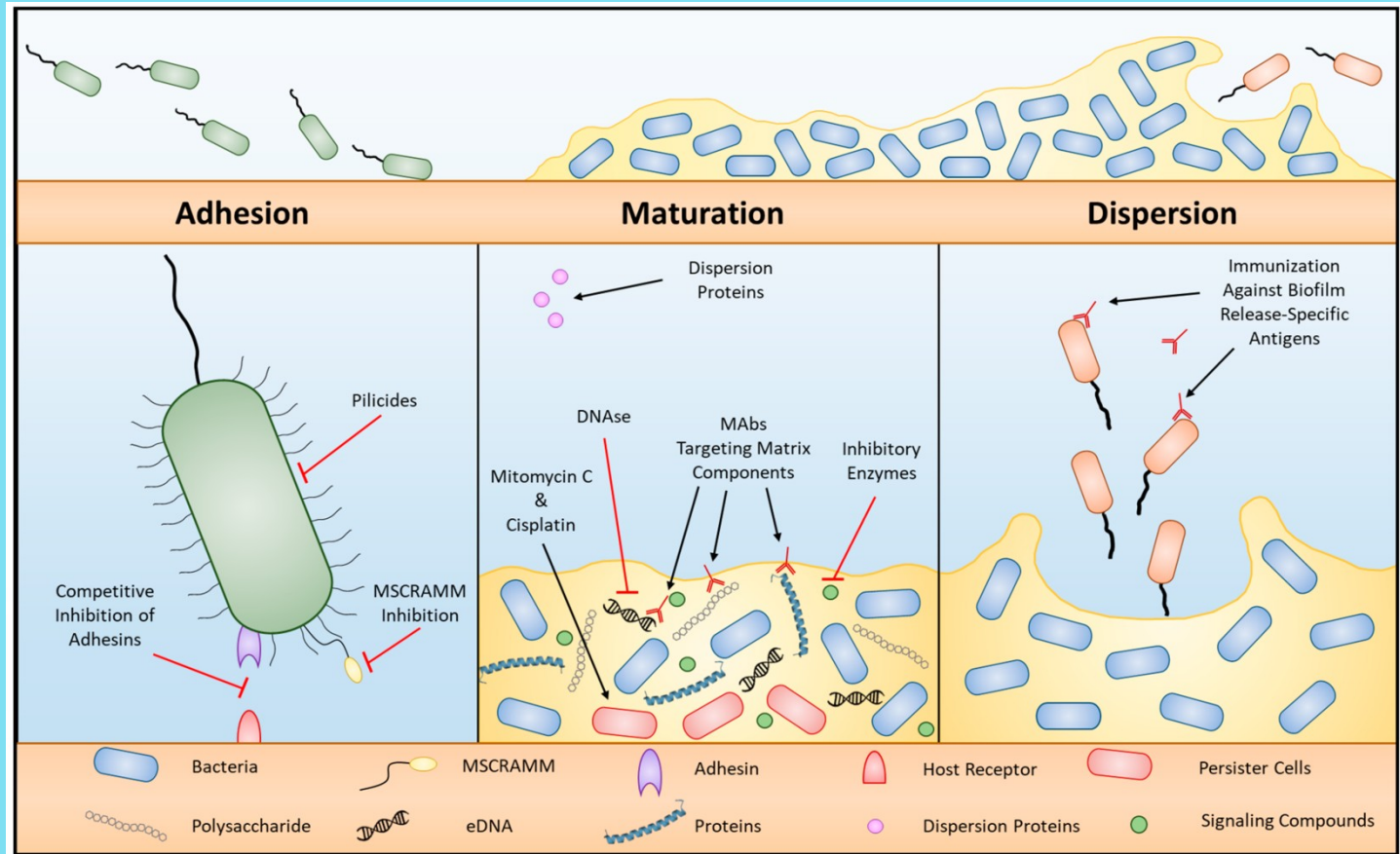
Outer layers of biofilm cells absorb damage.



“Persister” cells may be present in higher numbers.

## Početná populace....

- přenos genů až 1000x úspěšněji než u buněk planktonických
- fenotyp buněk se rytmicky mění
- po odplavení si zachovávají urč. dobu vlatnosti jako v biofilmu
- odplavení díky aktivaci genu pro syntézu enzymu štěpícího matici



## Studium struktury biofilmu

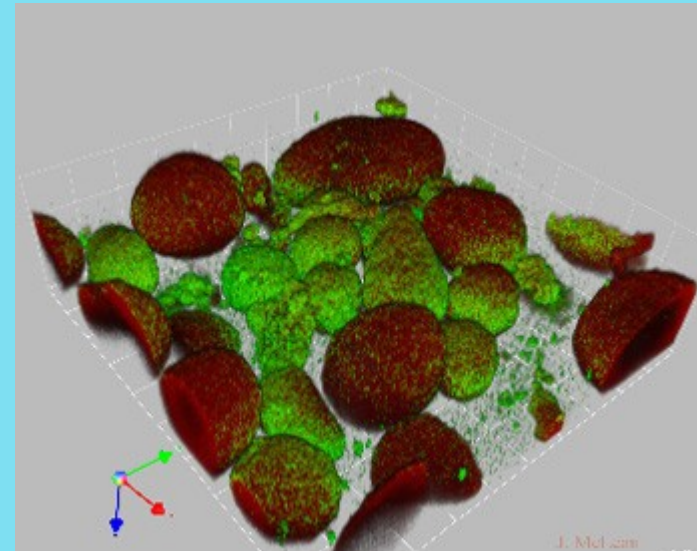
- větš. u G-
- polysacharidová glykokalyx

mikroskopie:

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

studium složení

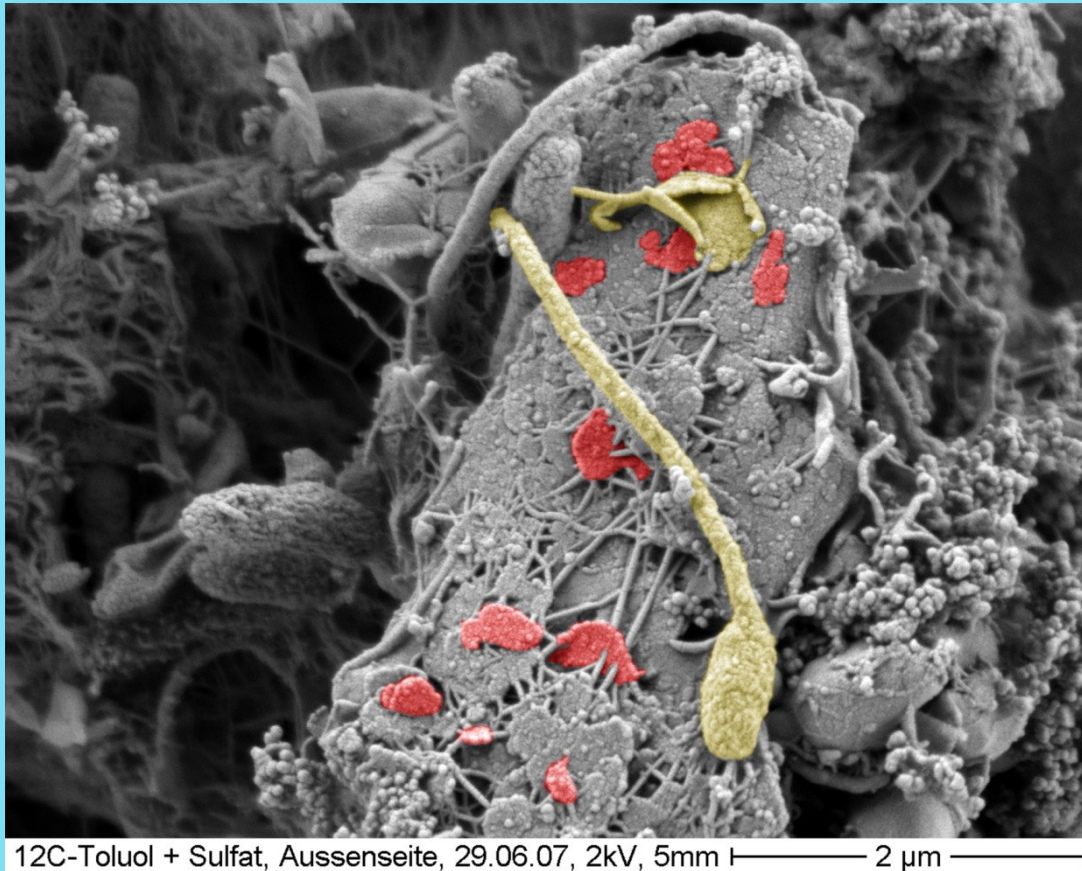
- studium přítomnosti genů/látek souvisejících s tvorbou biofilmu
- mikrotitrační destičky, mikročipy, sondy,
- PCR, hmotnostní spektrometrie....
  
- *Shewanella* biofilm – konf.mikr.





## Horniny a bakterie – koevoluce

- složení minerálů ovlivňuje počet a diverzitu mikrobů
- síru oxidující bakterie silně okyselují prostředí a tvoří póry
- potenciální vliv hornin na složení a tvorbu biofilmu

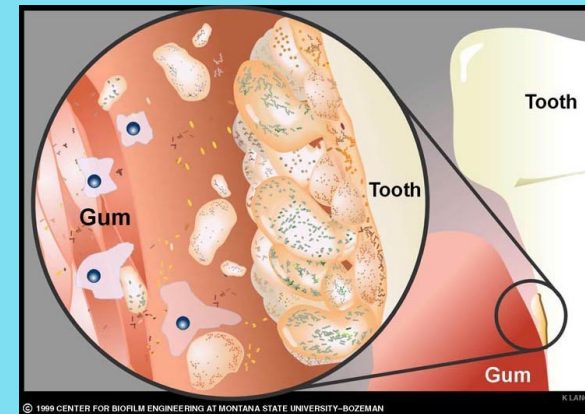
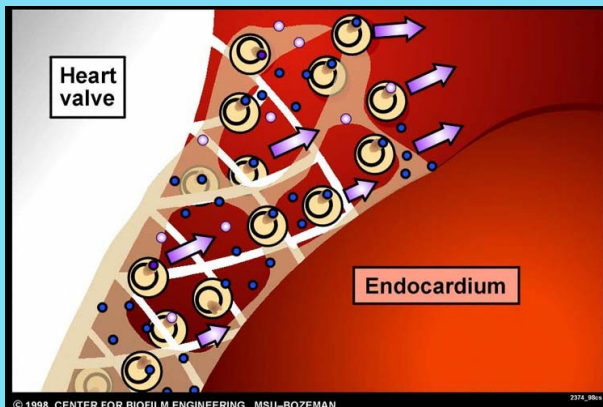
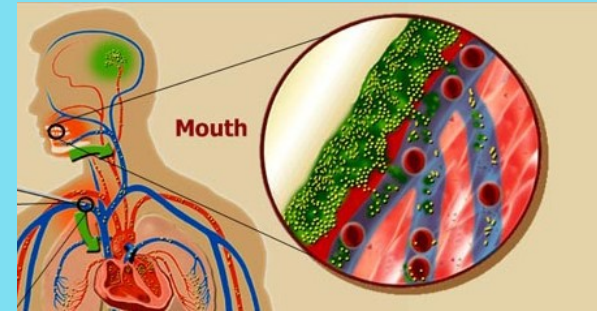


## Biofilm v lidském těle

- zubní povlak
- střevní sliznice

chronické infekce:

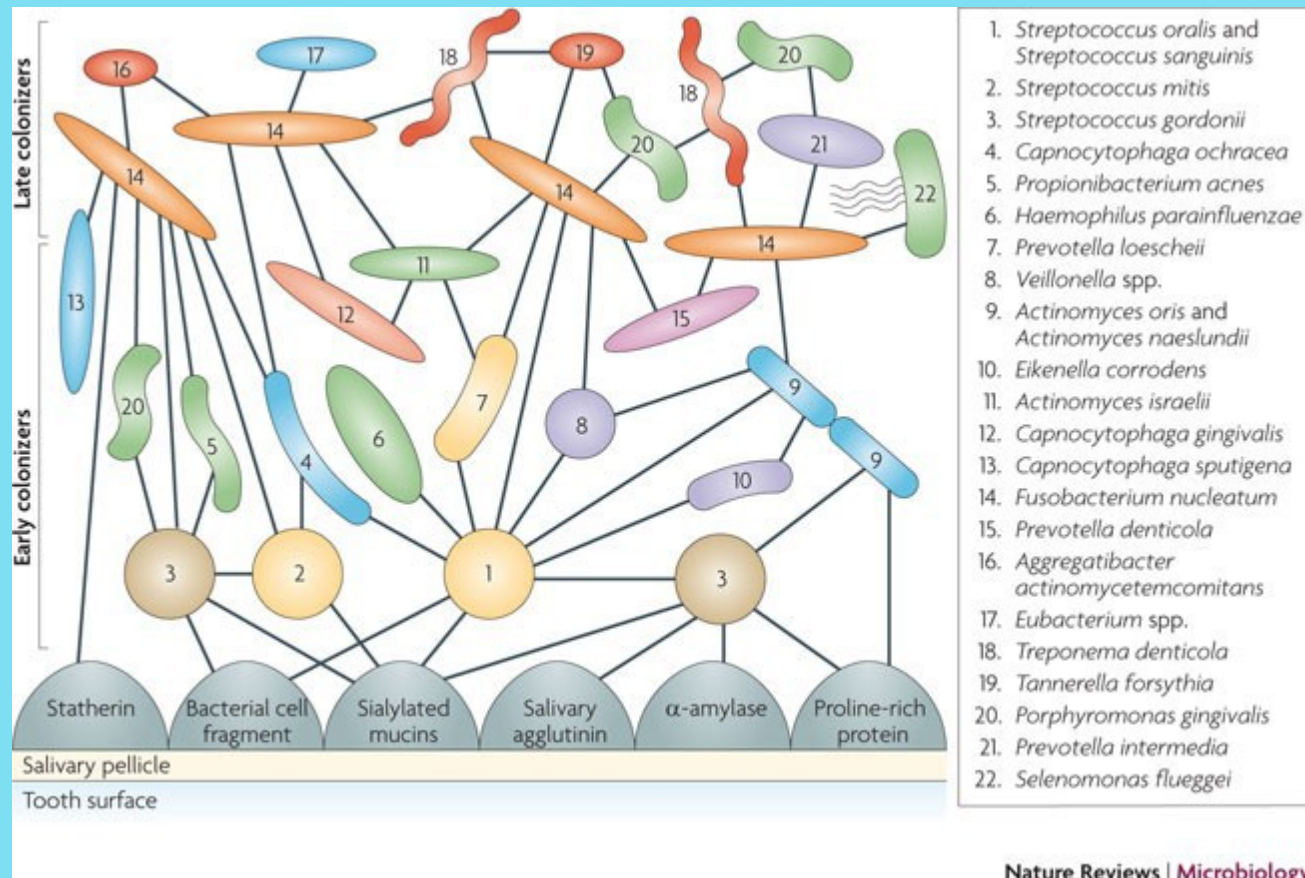
- dýchací cesty
- ušní infekce
- močové cesty
- chronický zánět prostaty
- sliznice nebo uvnitř tkáně
- endokarditida
- rány; bércové vředy; spáleniny





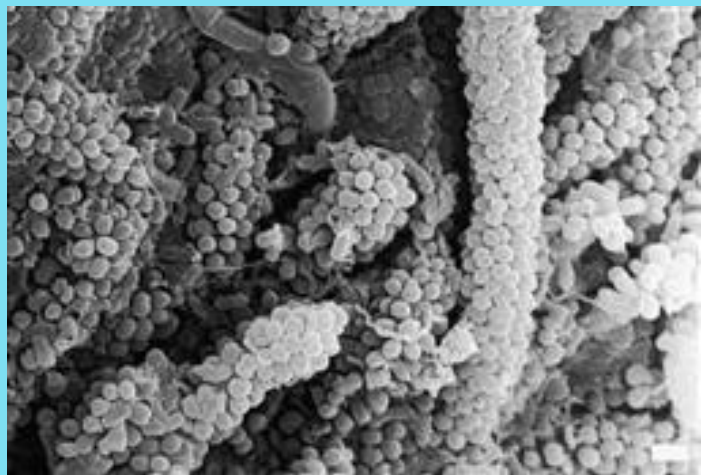
## Biofilm skloviný

- 700 kmenů z 18ti rodů
- mezibuněčný kontakt – role adhezínů (lektiny) a receptorů (sacharidy)
- kontakt s povrchem zubu – pelikula proteinů, lektiny... (Rickert et al. 2003) 41



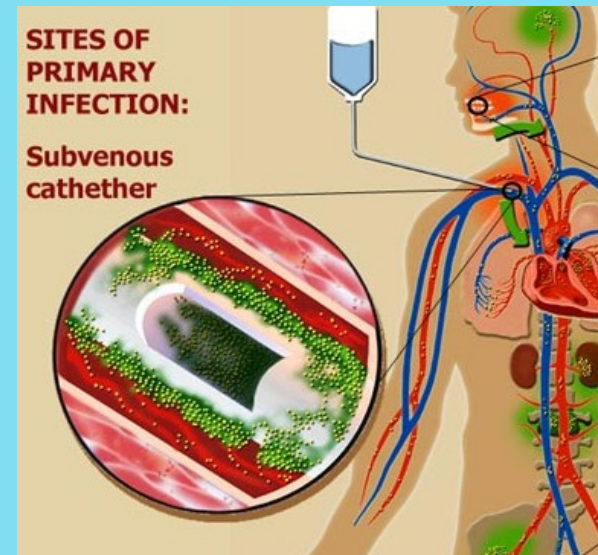
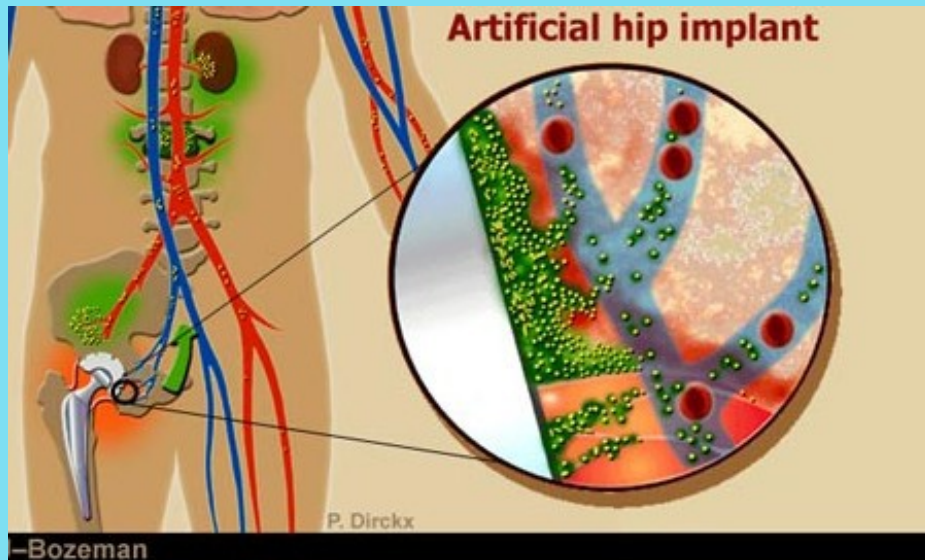
## Morfologické struktury orálního biofilmu

- “corncobs” – koky koagregující s vláknitými bakteriemi
- “rosette” - 1 kok koagregující s koky jiného typu



## Biofilm a medicína

- cévky – 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 přisedlých stadií:

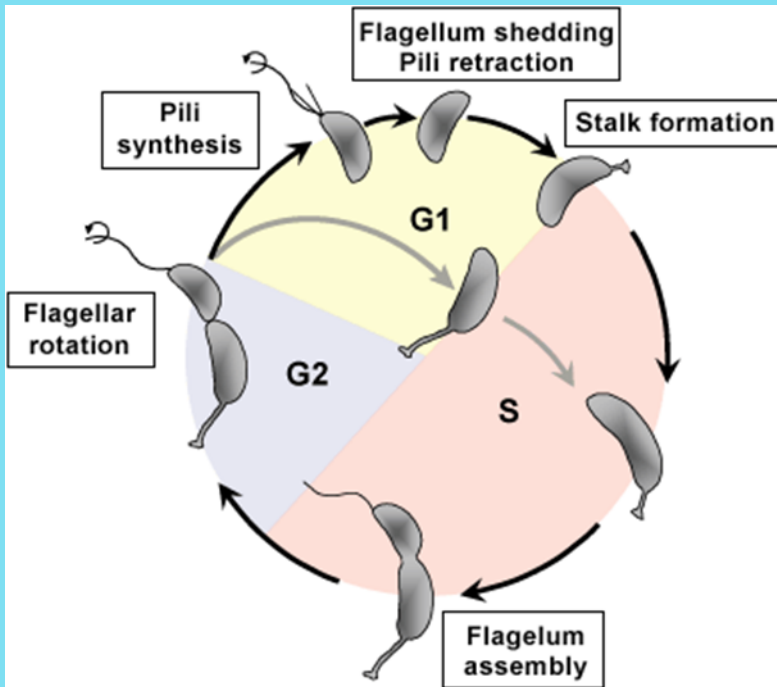
- lepší dostupnost a využitelnost substrátu
- adsorpce makromolekul a malých hydrofobních molekul na povrch
- lepší využitelnost koncentrovaných živin
- ochrana před inhibičními účinky antibakteriálních látek (antibiotika, chlor, těžké kovy)
- ochrana před bakteriofágy a parazitickými bakteriemi

### Nevýhody přisedlých stadií:

- sedimentace, vyčerpání živin a
- neschopnost kolonizovat nové, vhodnější prostředí
- konzumace substrátu (částic) zooplanktonem
- vznik gradientů v biofilmů od povrchu k podkladu – snižují se živiny, kyslík

## Růstový cyklus *Caulobacter crescentus*

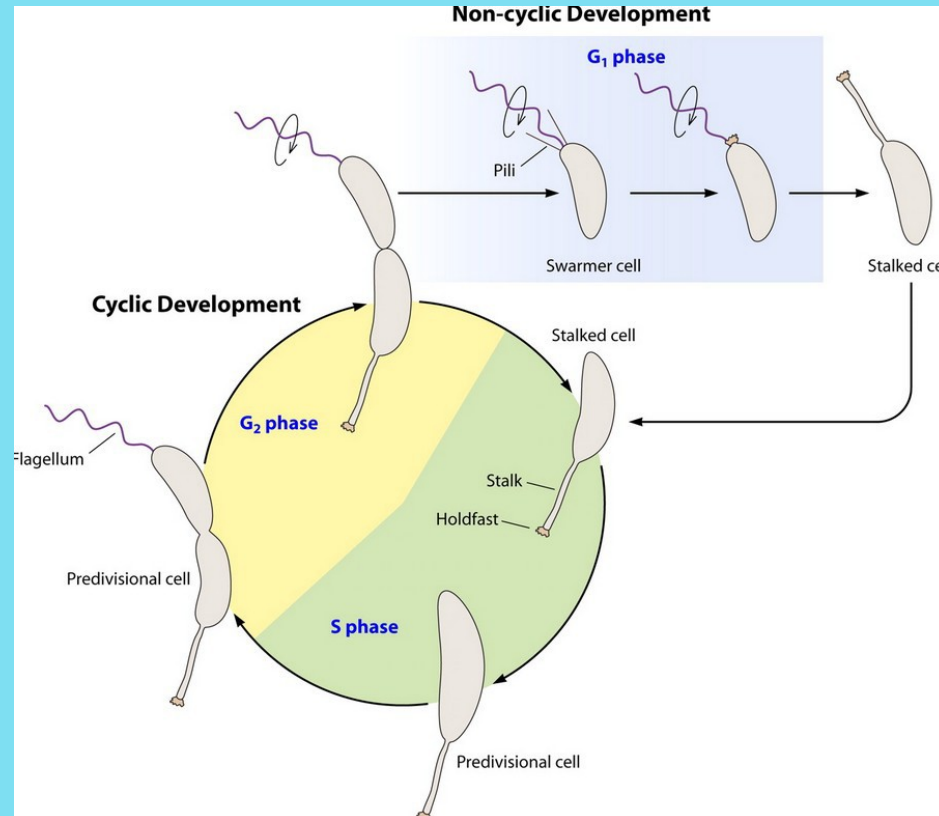
- *Caulobacter* - je modelovým organismem pro studium diferenciaci u prokaryot
- má asymetrické dělení
- G- oligotrofni bakterie, ve vodách chudých na živiny
- má přes 3000 genů - to mu umožňuje přežít v nepříznivých podmínkách
- kolonizuje všechny půdní prostředí..... stopkatá buňka - velice silná adheze!!!
- využití v biologických lepidlech



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



- dva typy vývoje - cyklický a necyklický
- cyklický - začíná v G fázi buňky - přechází do S fáze (dochází k replikaci DNA)
- b. roste --> dělení --> vzniknou dvě buňky (jedna je stále stopkatá, druhá má bičík!!)...
- po rozdělení buněčného obsahu bičík rotuje --> oddělení buněk --> vytvoří se pilli.... jedna b. teda stále přilnuta k povrchu, druhá je volná (v této neprobíhá replikace dna)..... potom se z ní stane stopkatá b. - přilne k podkladu a probíhá opět cyklický vývoj



## Stádia růstového cyklu

### 1. bičíkaté, volné stádium (swarmer cell)

- nerostoucí, nepodléhá dělení
- bičíkatá dceřiná buňka

### 2. stélkaté přisedlé stádium – reprodukční

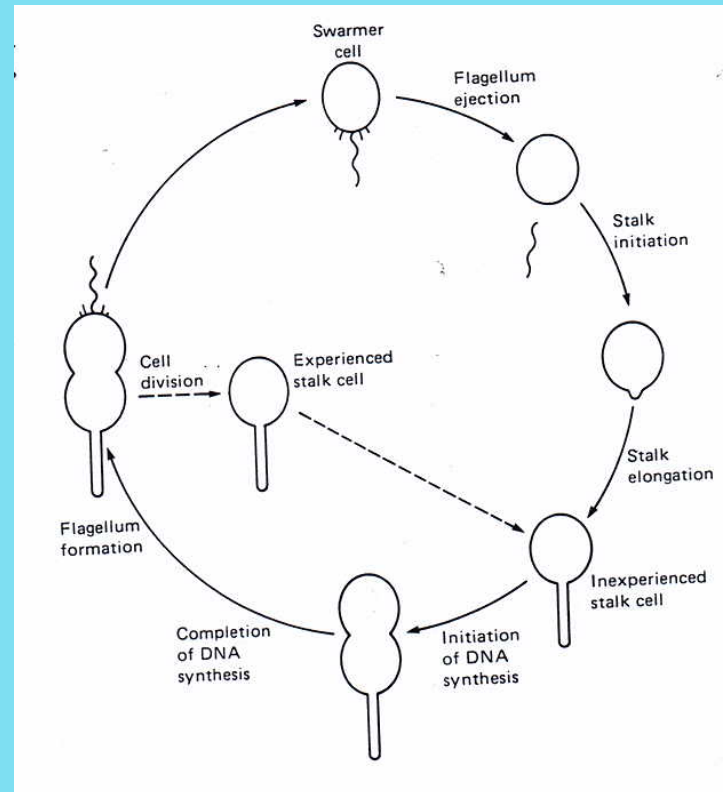
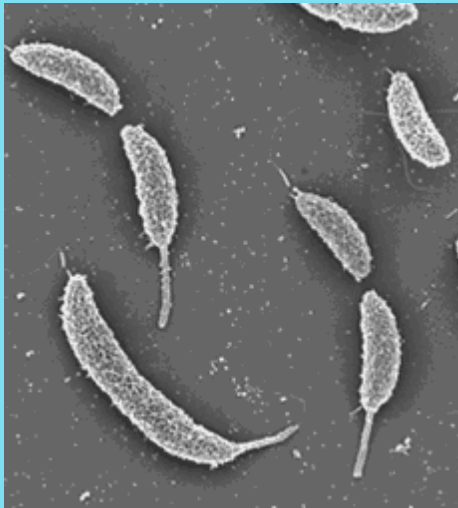
- „nezkušená buňka“ – ještě se nedělila
- „zkušená buňka“ – již „vyprodukovala“ dceřinnou pohyblivou buňku

## Zvláštnosti růstového cyklu

### 1. růstová stádia se nutně střídají, žádné není alternativou, která se nemusí realizovat (viz klid. stádia)

- 2. mateřská buňka je v jistém slova smyslu „nesmrtelnou buňkou“, produkuje velké množství dceřiných buněk
- (na rozdíl od konvenčního dělení, kde nelze striktně odlišit mateřskou a dceřinou buňku)

- plovoucí bičíkatá buňka se nereplikuje
- odhození a nahrazení bičíku a pilusů polární stélkou, která přichytí buňku k podkladu
- nezralá stélkatá buňka se prodlužuje
- přisednutí na místo s vhodným substrátem a diferenciaci
- poté iniciace replikace DNA
- reproduktivní stélkatá buňka replikuje DNA, vznik dceřinné buňky
- syntéza nového bičíku na pólu proti stélce



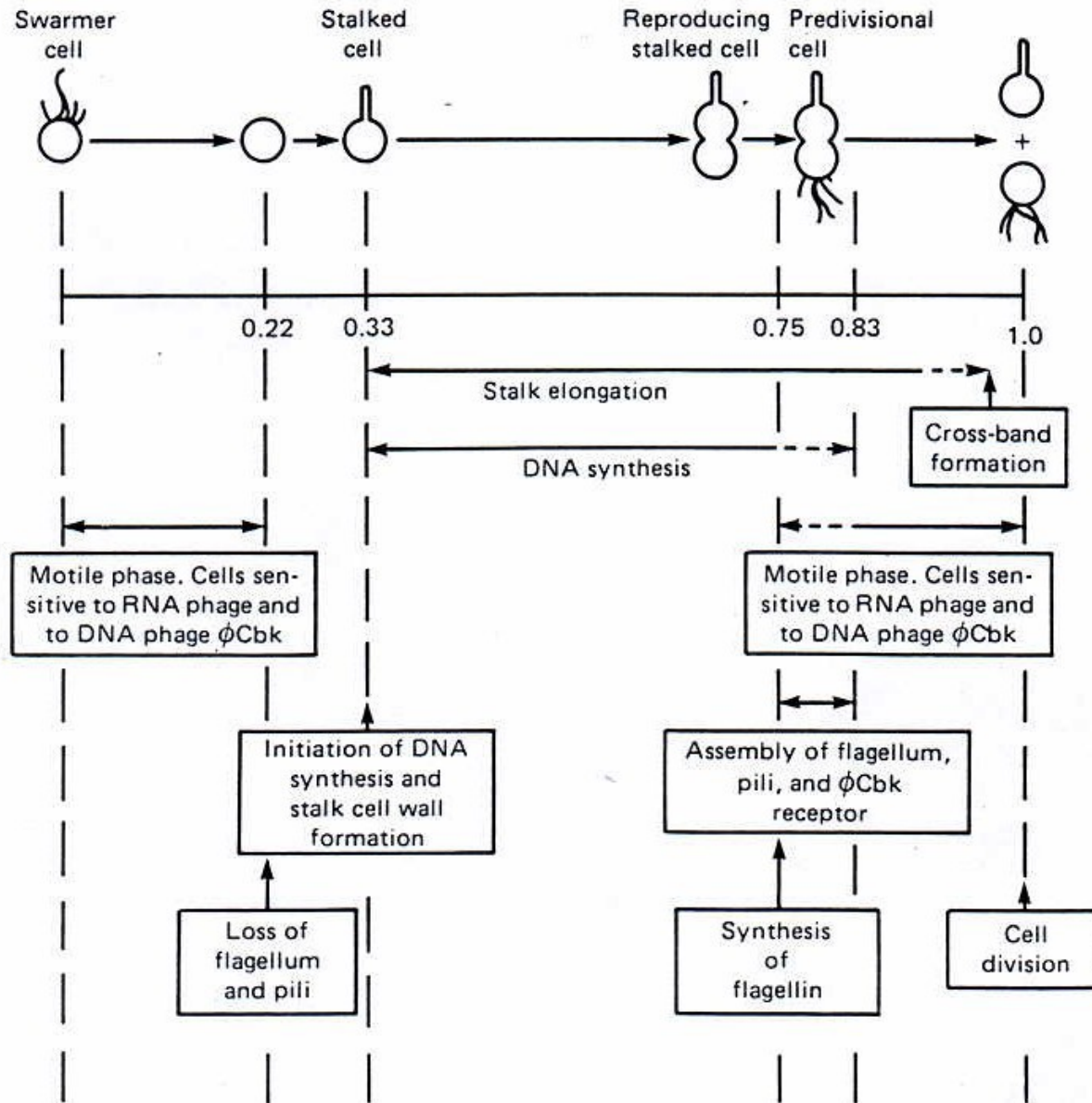
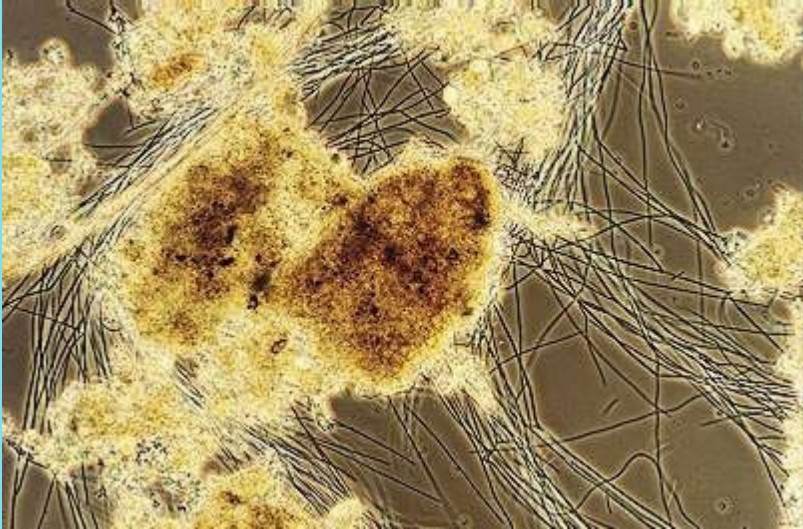


Fig. 13. Schematic diagram illustrating various developmental and biosynthetic events as a function of the cell cycle of *Caulobacter crescentus*. The numbers are fractions of a complete (1.0) cell cycle. (From Dworkin, 1985.)

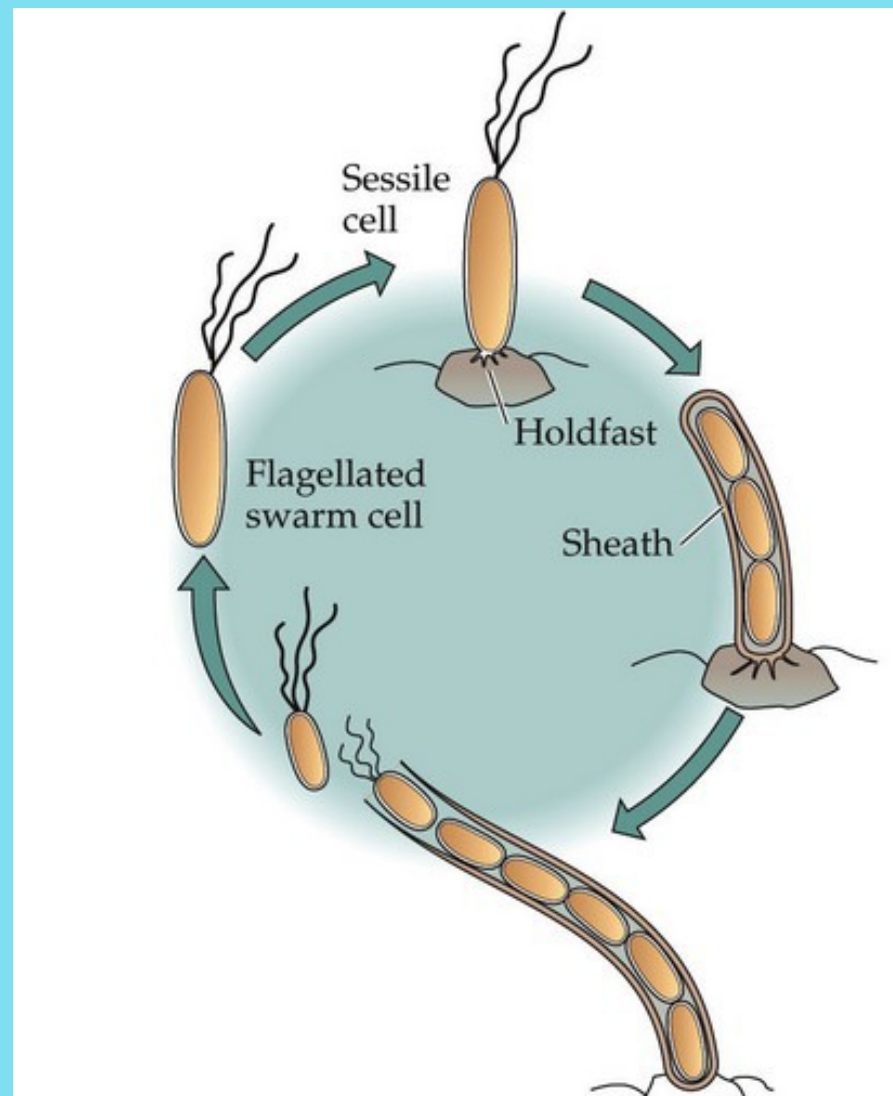
## Růstový cyklus *Sphaerotilus natans*

- žije v organicky znečištěných vodách, ale dobře prokysličených.. schopna fixovat polyalkoholy, polysacharidy...
- ráda se vyskytuje v čističkách vod (problémy!!!)



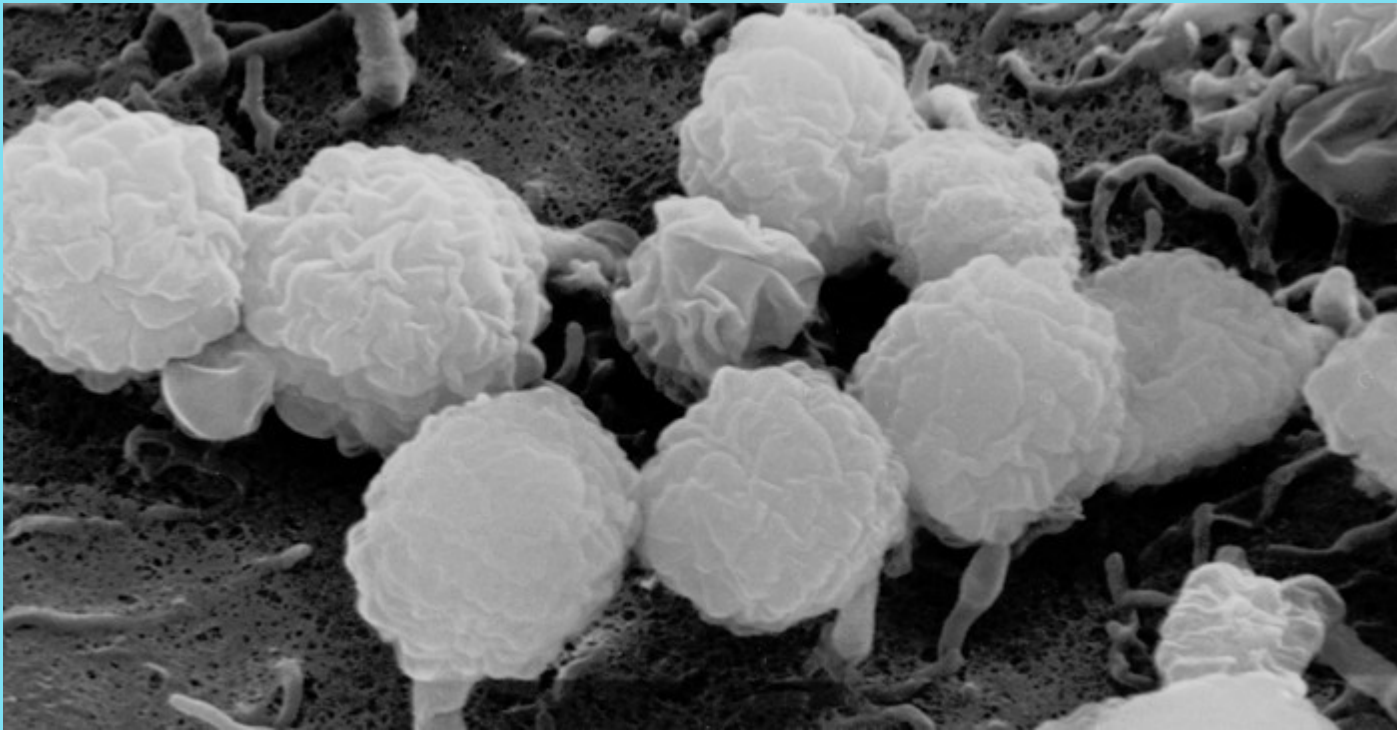


- volné buňky najdou vhodné životní prostředí
  - přichytí se k podkladu
  - odhodí bičík
  - začnou tvořit pochvu
  - dělí se uvnitř pochvy
  - z pochvy se uvolňují dceřiné pohyblivé buňky
- 
- volné buňky = G- tyčky ...
  - když je třeba, odhodí bičík
  - vzniká přisedlé stadium
  - tvoří pochvy (přichycení, obalu a získání živin)
  - obsahují Fe a Mn .... taky jako ochrana proti predátorům



## Střídání volného a přisedlého stadia u *Actinoplanes*

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



DĚKUJI ZA POZORNOST

