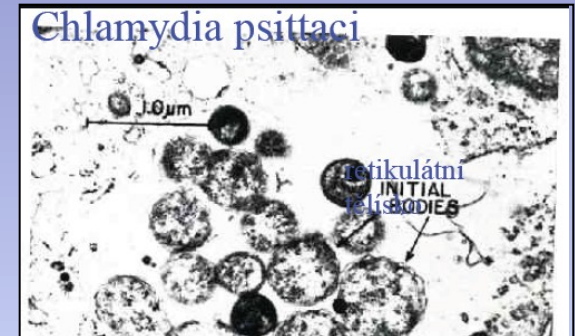
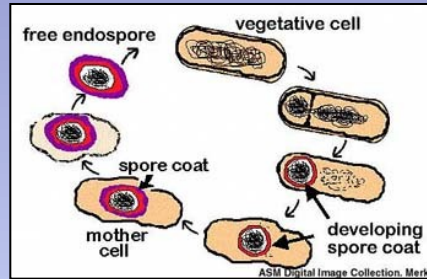
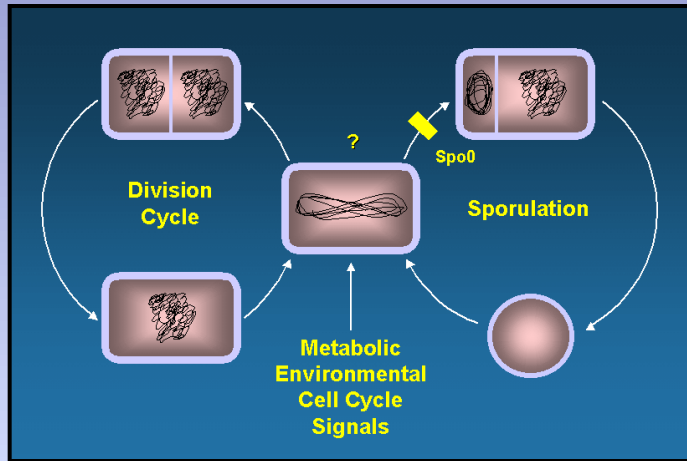
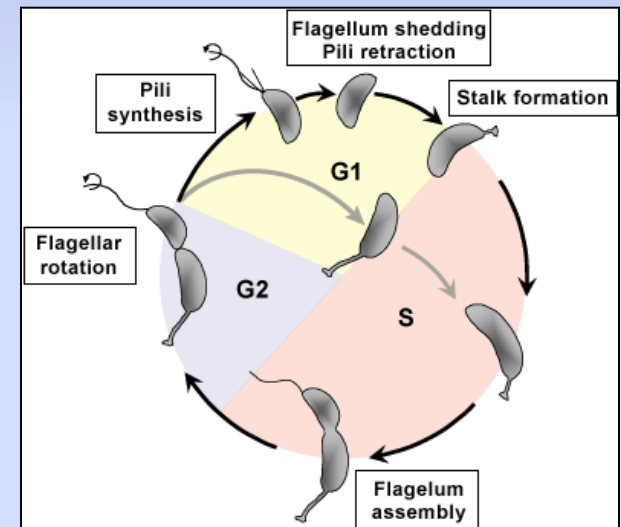


Růstové cykly bakterií

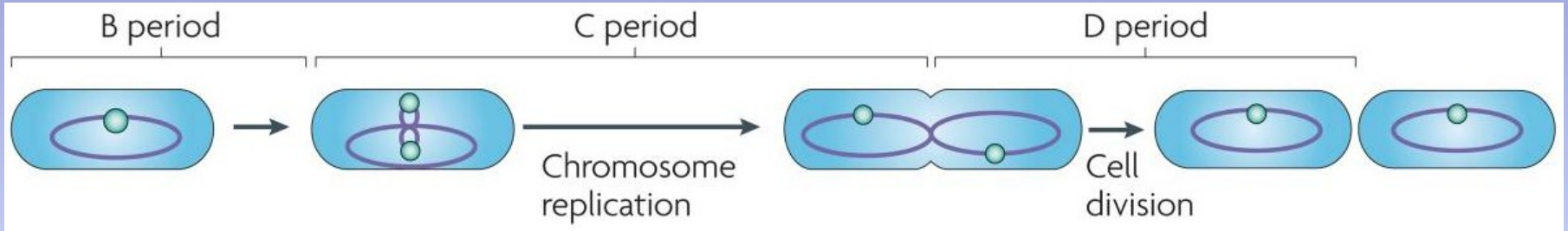


Růstové cykly bakterií

- 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***




- Období mezi „narozením buňky“ a iniciací replikace
- Období replikace
- Období mezi koncem replikace a dokončením buň. dělení

Dělení bakteriálních buněk

- Dělení binární
- Dělení asymetrické
- Dělení vedoucí ke vzniku diferencovaných populací

- Generační doba
 - v optimálních podmínkách 30 minut

Buňka – generační doba

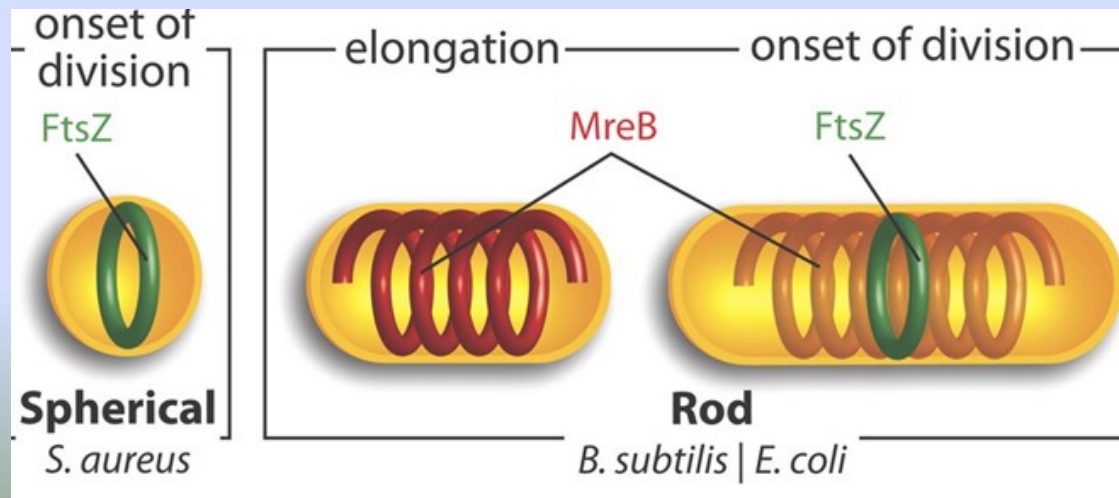
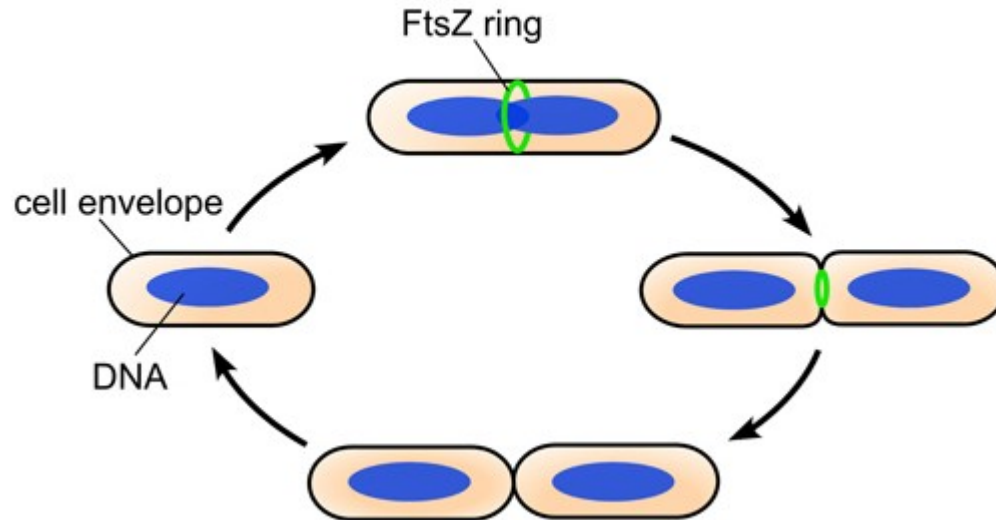
Bakterie	Medium	Generační doba  (minuty)
<i>Escherichia coli</i>	Glucose-salts	17
<i>Bacillus megaterium</i>	Sucrose-salts	25
<i>Streptococcus lactis</i>	Milk	26
<i>Streptococcus lactis</i>	Lactose broth	48
<i>Staphylococcus aureus</i>	Heart infusion broth	27-30
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Milk	66-87
<i>Rhizobium japonicum</i>	Mannitol-salts-yeast extract	344-461
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Synthetic	792-932
<i>Treponema pallidum</i>	Rabbit testes	1980

Reprodukce bakterií

- Binární dělení



BINARY FISSION:



Replikace

- Místa ori (počátek) a ter (konec)
- Prodlužování buňky
- Nová replikace ještě před úplným rozdělením buňky..

Bacterial chromosomes have a single point of origin.

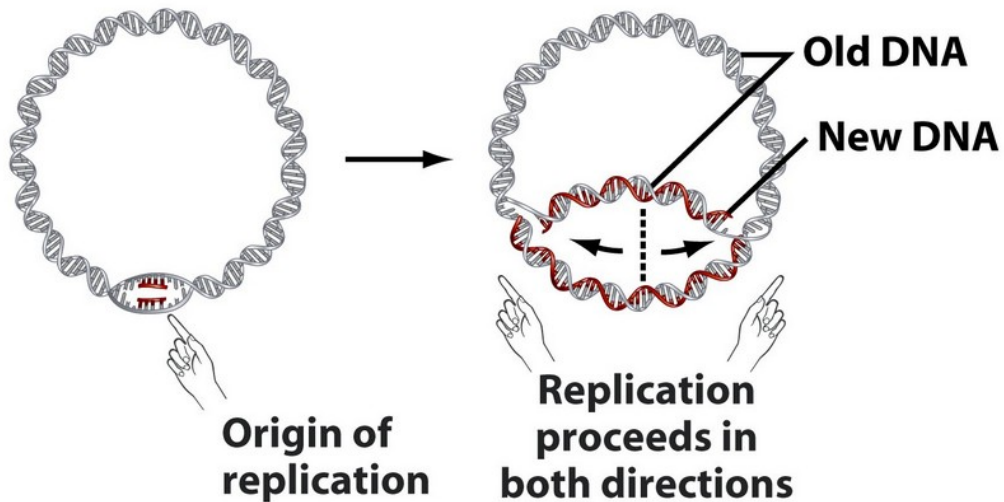
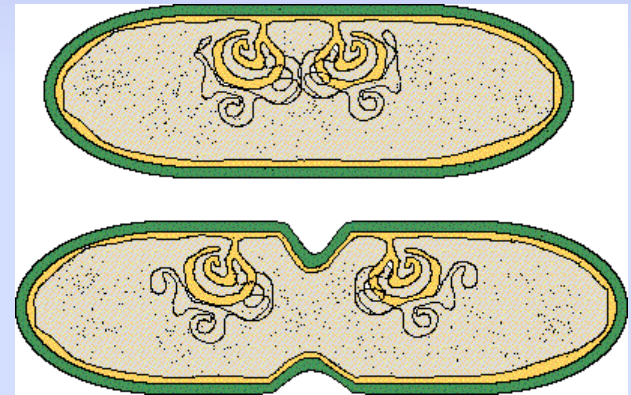
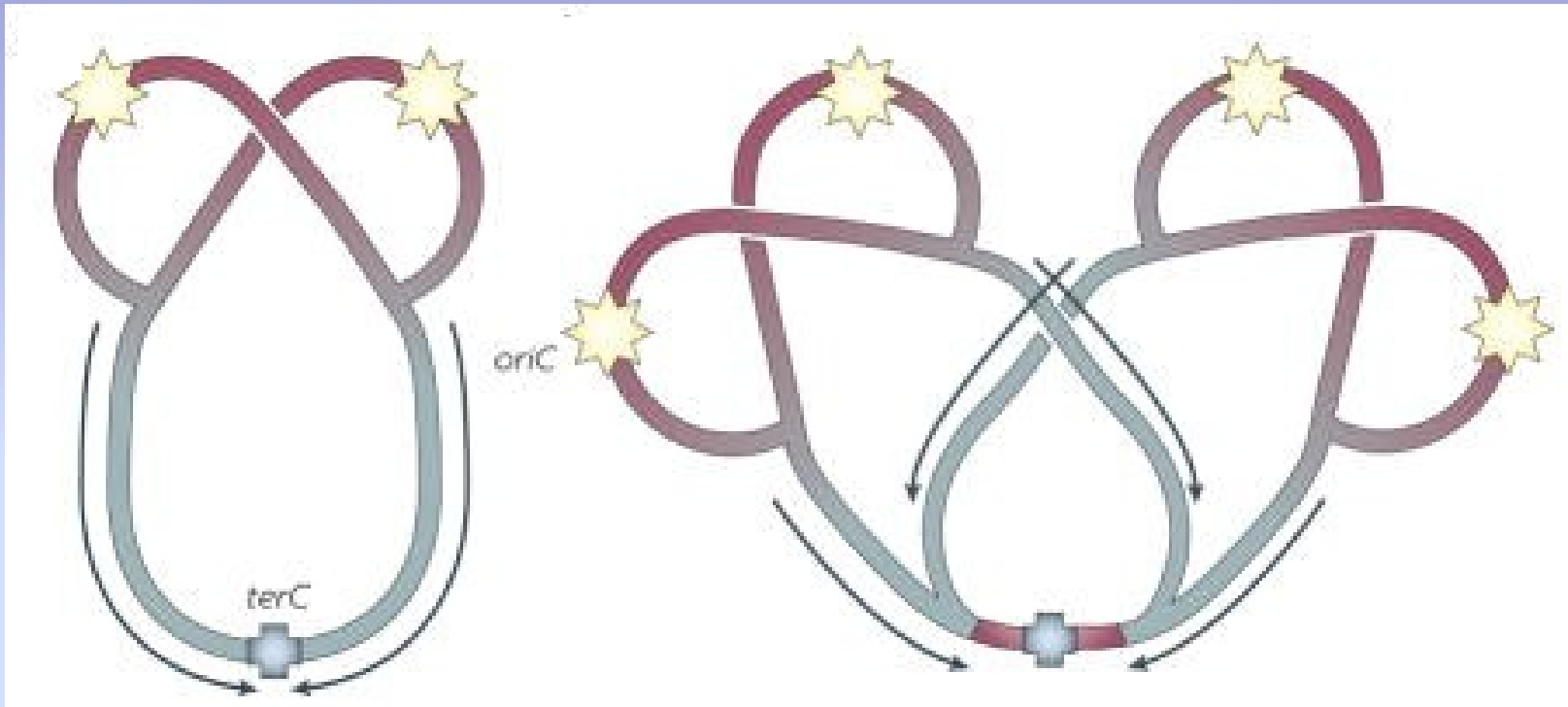


Figure 14-11b Biological Science, 2/e

© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.




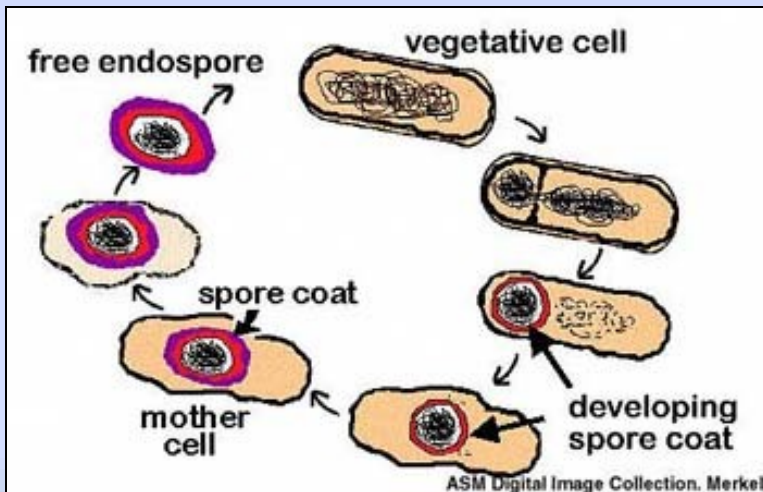


Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle



[Jue D. Wang](#) and [Petra A. Levin](#)

Jednoduché růstové cykly (střídají se dvě stádia)

- Adaptace či příprava (u sporulace) na změny podmínek životního prostředí; nikoli odpověď!
- U parazitů: přechod z prostředí těla vyšších organismů do vnějšího prostředí (např. voda) 



Jaké buněčné formy v doménách *Bacteria* a *Archaea* rozeznáváme?

- vegetativní formy buněk 
- cysty  odolné proti dehydrataci, ne však proti horku - *Azotobacter*, *Myxococcus*, *Sporocytophaga*
- endospory - odolná klidová nereproduktivní stadia
- hl. u G+, vyj. G-
- exospory - rody *Metylosinus* and *Rhodomicrobium*
- konidie - asexuální reprodukční struktury aktinomycet

1) Vegetativní a klidové stadium

Tvorba spor

- Endospory

- převážně G+ bakterie

Bacillus (aerobní tyčky), *Clostridium*, *Thermoactinomyces* a *Desulfotomaculum* (anaerobní tyčky), *Sporosarcina* (aerobní koky), *Sporolactobacillus*, *Oscillospira*, *Thermoactinomyces*

- výjimečně i G– bakterie (*Coxiella burnetii*, původce Q-horečky).

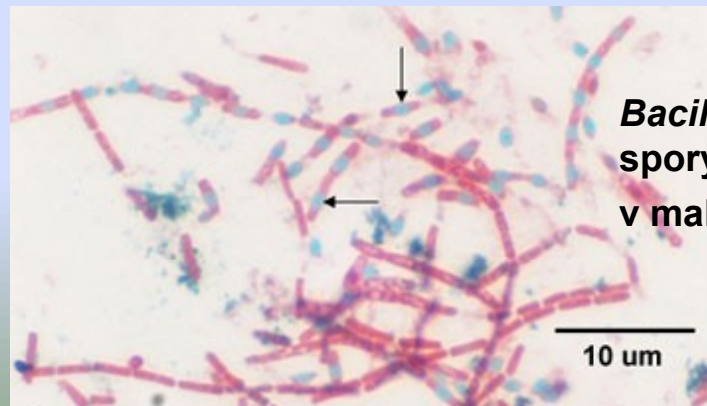
- Cysty

- méně rezistentní, odolné zejm. vůči vysychání

Azotobacter, *Methylosinus*



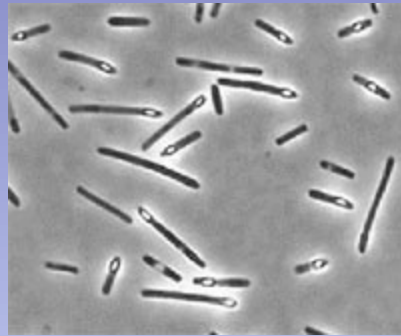
Azotobacter – cysty



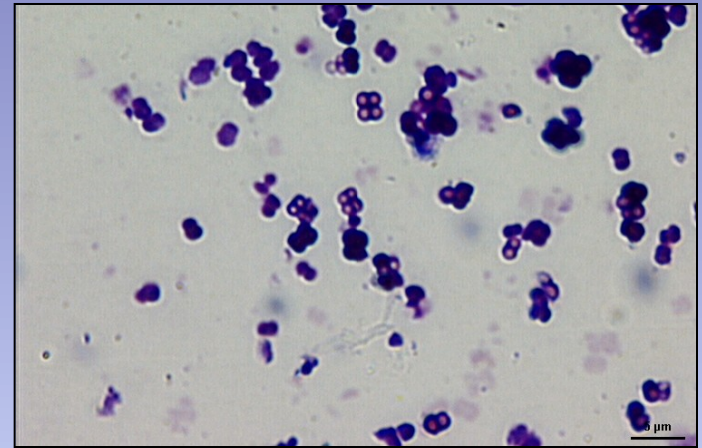
Bacillus megaterium – zelené spory obarvené varem v malachitové zeleni c



Clostridium difficile



C. perfringens



Sporosarcina ureae –
kulaté spory uvnitř
čtveřice (balíčku) buněk



Azotobacter – pouzdra, cysty



Endospora, sporulace



... s několika vyjímečnými charakteristikami...

- Oproti *Eucarya* - pouze **jedna endospora**
- **Peptidoglykan** v kortexu spory je odlišného charakteru než samotné buňky
- Stabilizace makromolekul ve spoře:
 - **specifické bílkoviny**
- Vysoká odolnost napomáhá přečkat podmínky nevhodné pro život i po tisíce let (?); jsou prostředkem šíření bakterií i na značné vzdálenosti a v různém prostředí.
- Tvorba **endospory** však **není odpovědí na prostředí, ale přípravou na nepříznivé podmínky.**

- Odolné k působení UV a γ záření, vysoušení, lysozymu, teplotním změnám, nedostatku živin a působení mnoha dezinfekčních prostředků.

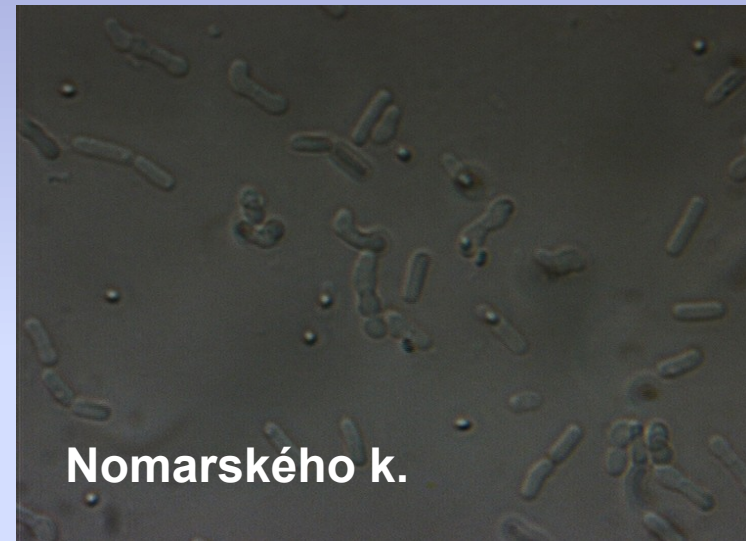


- V ethanolu mohou přežívat několik měsíců.
- **Sporicidní látky:**
ethylenoxid, β -propionlakton, koncentrované louhy a kyseliny, formaldehyd při prodloužené expozici, **kyselina peroctová – Persteril, jodové preparáty, chloramin**

Pozorování endospor

vysoce světlolomné útvary
Nebarví se Gramem

- Pozorovat neobarvené endospory můžeme **fázovým kontrastem** (zářící spory) nebo **Nomarského kontrastem** (plastický povrch buňky)



- **Jednoduchým barvením** nezvýrazníme spory samotné, jen vyklenutí buňky (způsobené jejich přítomností).

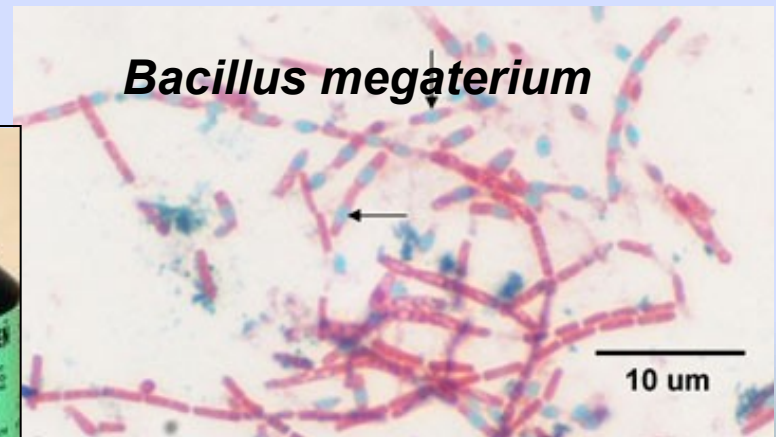
Přímo obarvit endosporu od stadia vzniku kortexu je možné pouze za horka (prospora je pro barvivo ještě propustná!)

Strukturální barvení endospor

- Strukturální barvení spor u suspektních sporulujících druhů zvýrazní:
- **Tvar, velikost a umístění spory v buňce** je dalším charakteristickým **znakem napomáhajícím identifikaci**.
- Příklad: **oválné** spory *B. cereus*, *B. anthracis*, *Cl. botulinum*, **kulaté** spory *Clostridium tetani* či *B. sphaericus*, **cylindrické** či **elipsoidní** spory
- U velikosti spor hodnotíme **zda a kde vyklenuje buňku**.

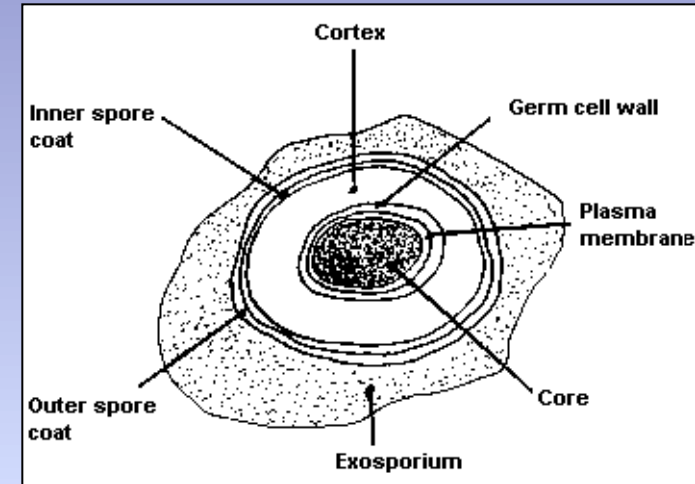


Malachitová zeleň



- Spory se **velmi těžko barví** i po fixaci
silný, špatně prostupný obal

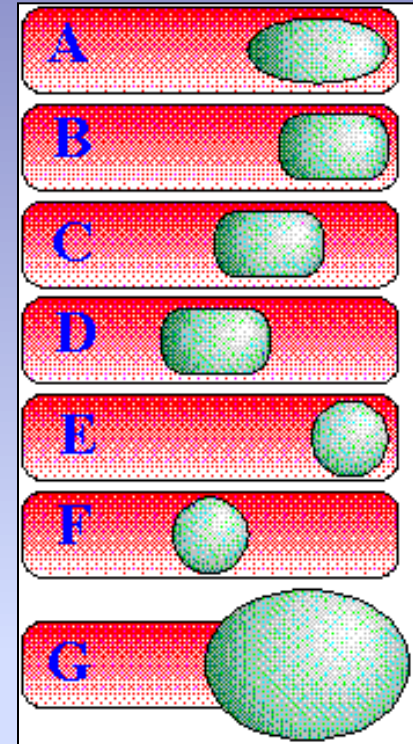
- koncentrovaná barviva
- za tepla
- mořidla



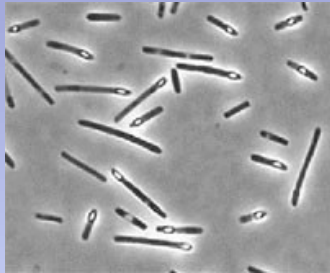
- Takto obarvené spory se těžko odbarvují
- Barvitelnost spor se také (podobně jako u plísňí) zlepší použitím sporulačních médií (s přidavkem manganu nebo ury).

Uložení v buňce:

- terminální = na konci tyčinky
(*C. tetani*, *B. stearothermophilus*)
- centrální (*C. histolyticum*, *C. novyi*,
C. septicum, *B. anthracis*, *B. cereus*)
- subterminální = paracentrálně =
= mezi středem a pólem buňky, nejčastěji
(*C. botulinum*, *C. sporogenes*, *B. brevis*)



- Rozšíření buňky: *C. botulinum*, *C. tetani*, *Bacillus stearothermophilus*



C. perfringens



C. tetani

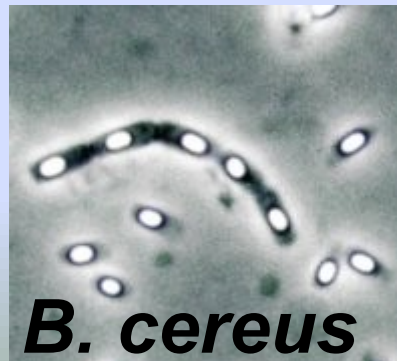


Clostridium botulinum

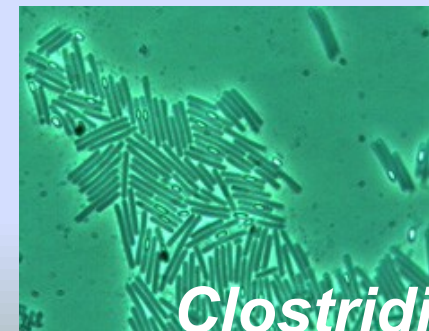
- mírné rozšíření: *C. histolyticum* a *C. novyi*
- U některých druhů spora buňku nezduřuje: *B. anthracis*, *B. cereus*.



B. anthracis



B. cereus



Clostridium difficile

Bacillus sphaericus

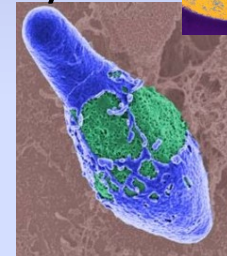


Klinicky významné jsou spory rodů *Bacillus* a *Clostridium*



Clostridium botulinum

- sporulující buňky odolávají 2-6 hodin teplotě 100 °C (oproti nesporulujícím, které hynou po 30' při 70 °C)
- spory inaktivovány po 20' při 121 °C vodní páry při 2 atm (0,2 Mpa) a po 90' - 180' při 160 - 200 °C suchého tepla, vysoce termorezistentní, přežijí až pětihodinový var

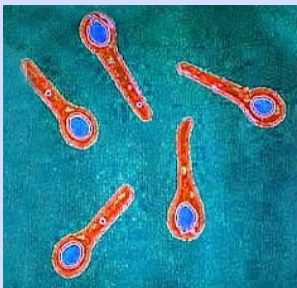
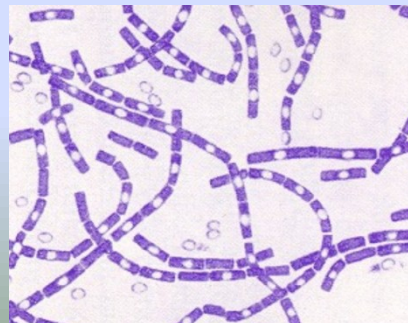


Clostridium tetani

- ke zničení spor nutno působit 100°C po 90 minut.

Bacillus anthracis

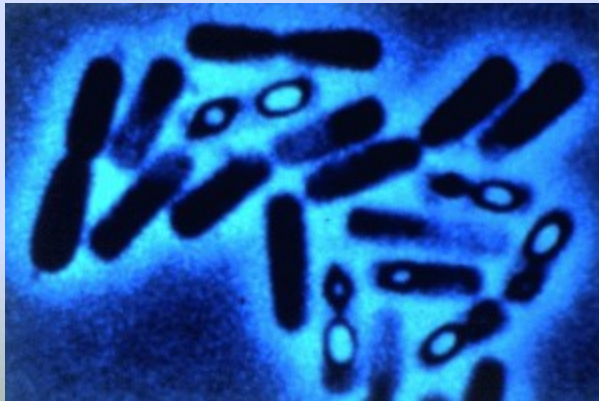
- biologická zbraň, anthrax



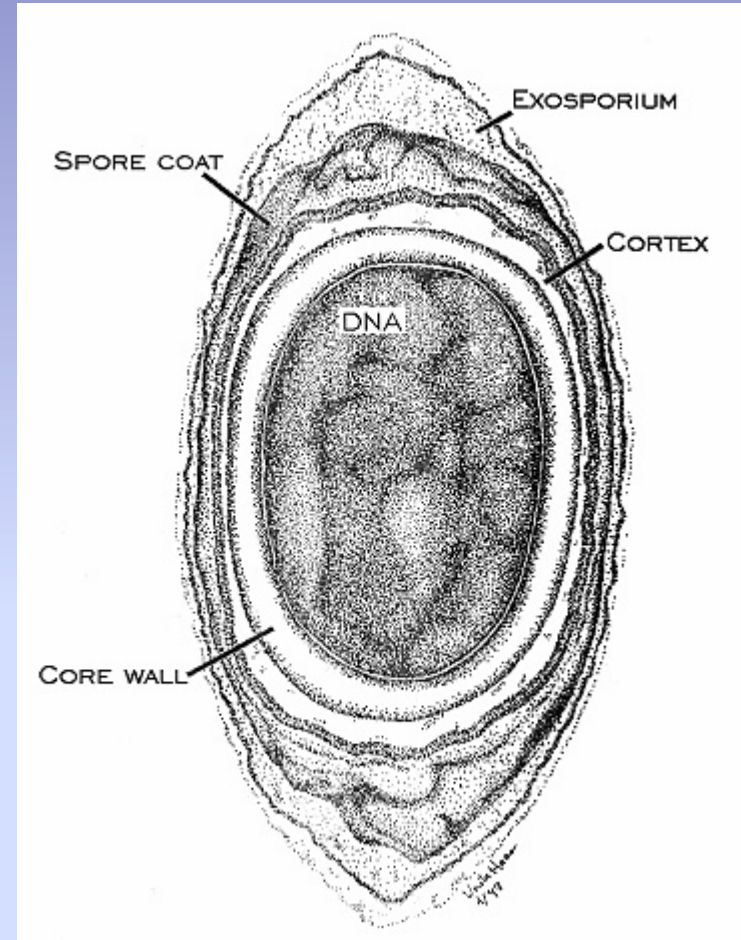
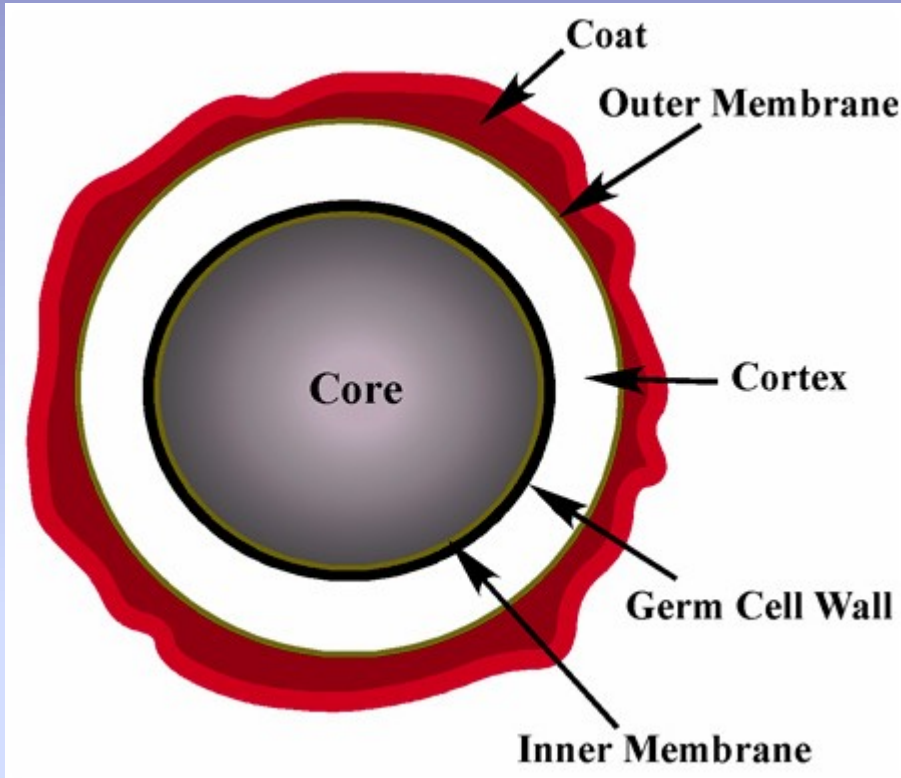


Biopesticidy:

Bacillus thuringiensis var. israelensis

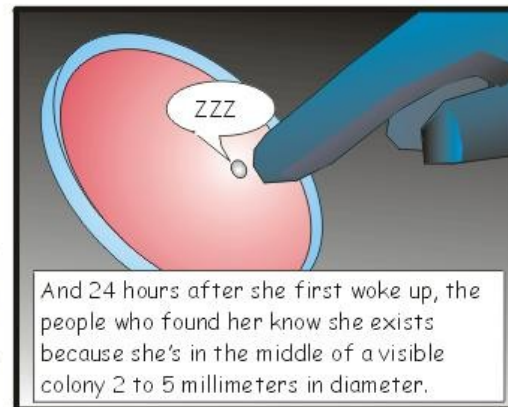
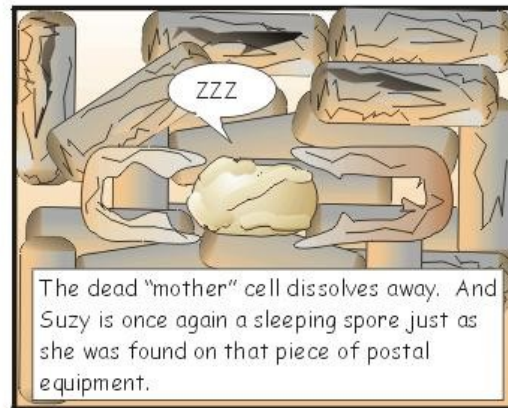
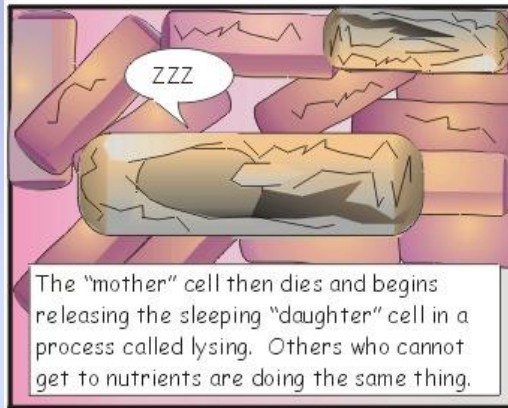
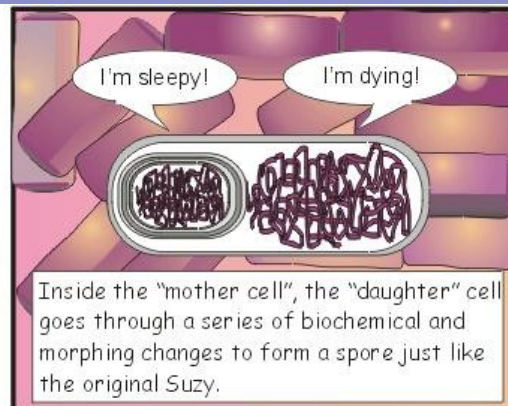


Stavba zralé bakteriální spory



Kortex je tvořen peptidoglykany - 20-30 % peptidoglykanových jednotek je shodných s jednotkami peptidoglykanu buněčné stěny, zbylých 50-60 % jednotek představuje N-acetylmuramovou kyselinu modifikovanou na N-acetylmuramyl-laktam, dalších 18-20 % kyseliny N-acetylmuramové je spojeno s L-alaninem namísto tetrapeptidu.

Jedinečné a charakteristické struktury spory



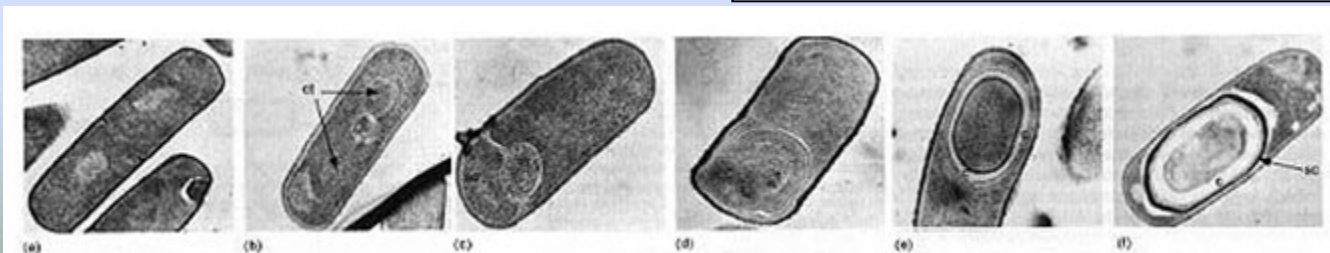
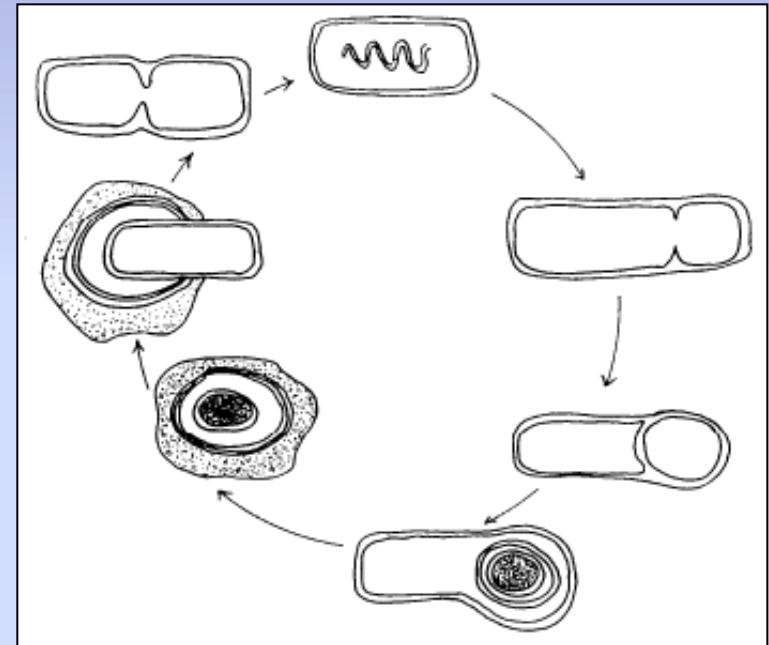
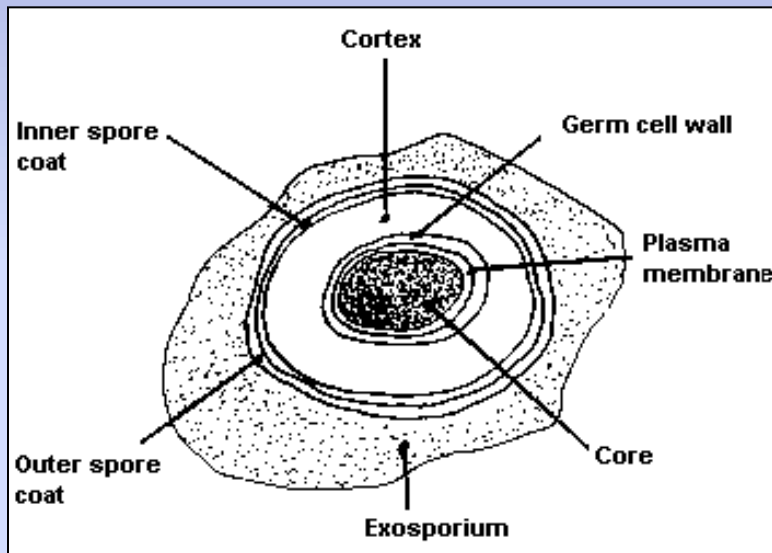
- Kalcium dipikolinát
- Proteiny stabilizující DNA (SASPs)
- Kortex
- DNA reparační enzymy v procesu germinace

Proces sporulace

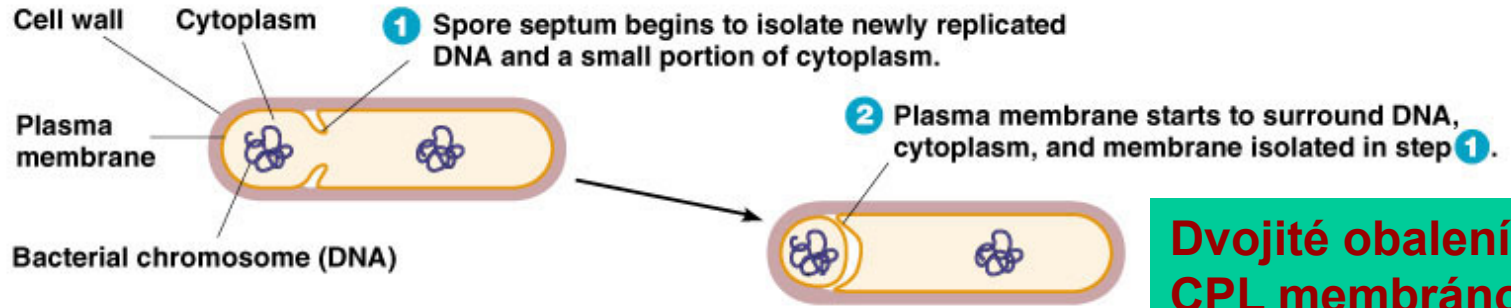
- Začíná ve fázi G1 přechodem od binárního k asymetrickému dělení
- probíhá i při dostatku živin, hlavně však ve stacionární fázi



Ke studiu sporulace je používáno bakterií rodu *Bacillus*, hlavně *B. subtilis*

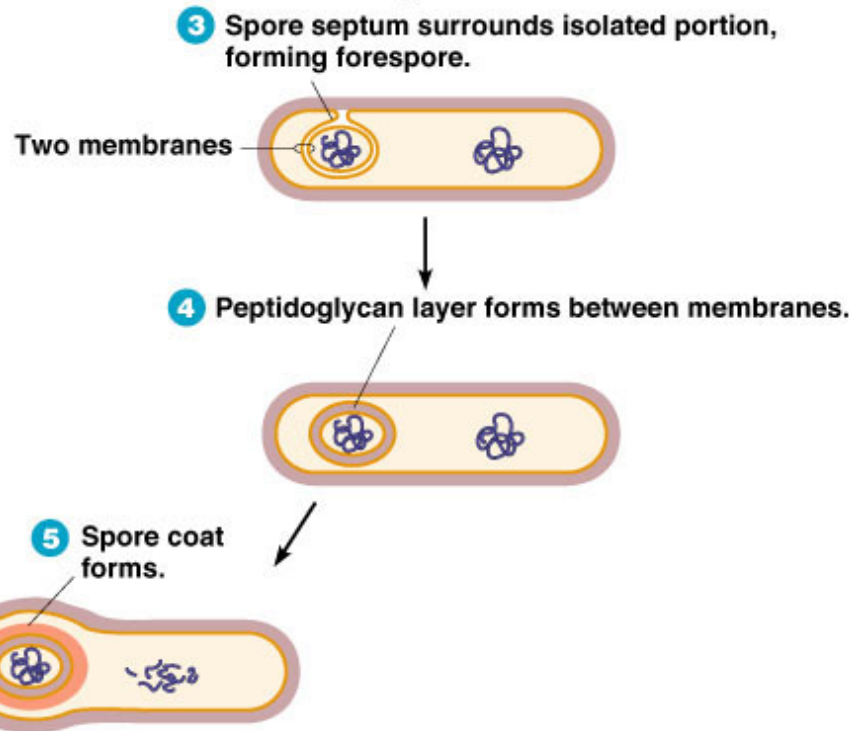
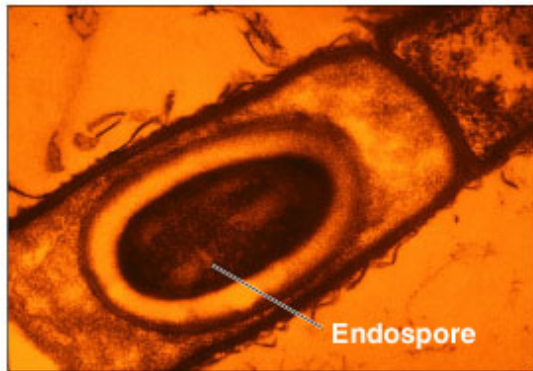


Obrázek: fáze sporulace bakteriální buňky rodu *Bacillus*. Zdroj: Pasteur Institut.



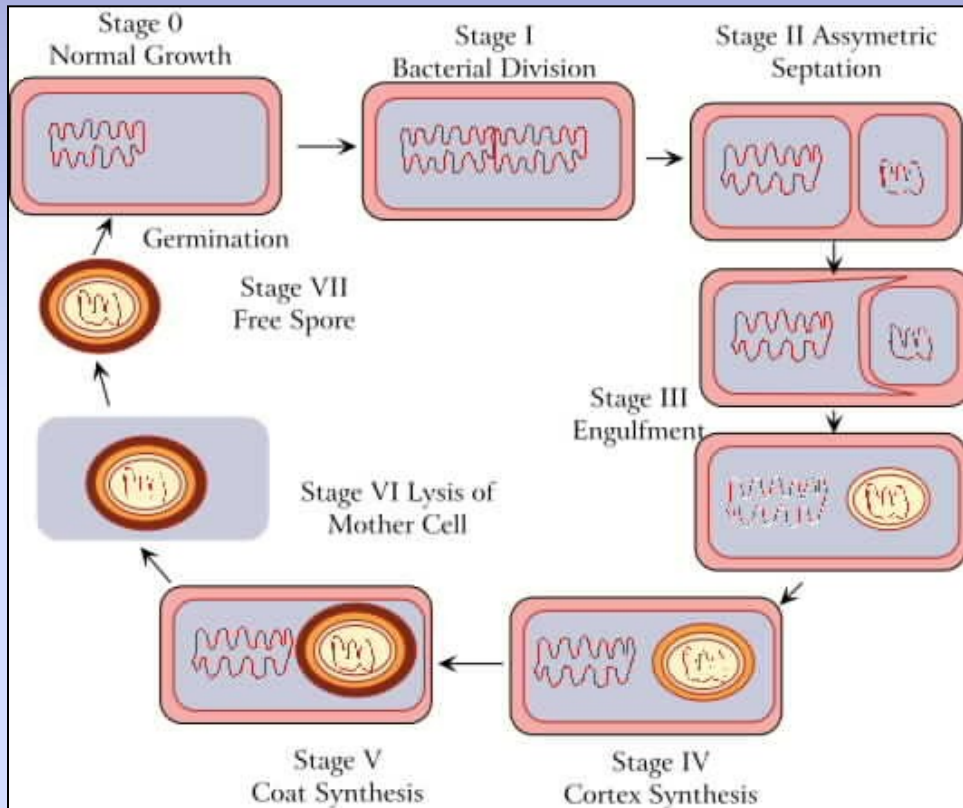
Dvojité obalení spory CPL membránou

(a) Sporulation, the process of endospore formation



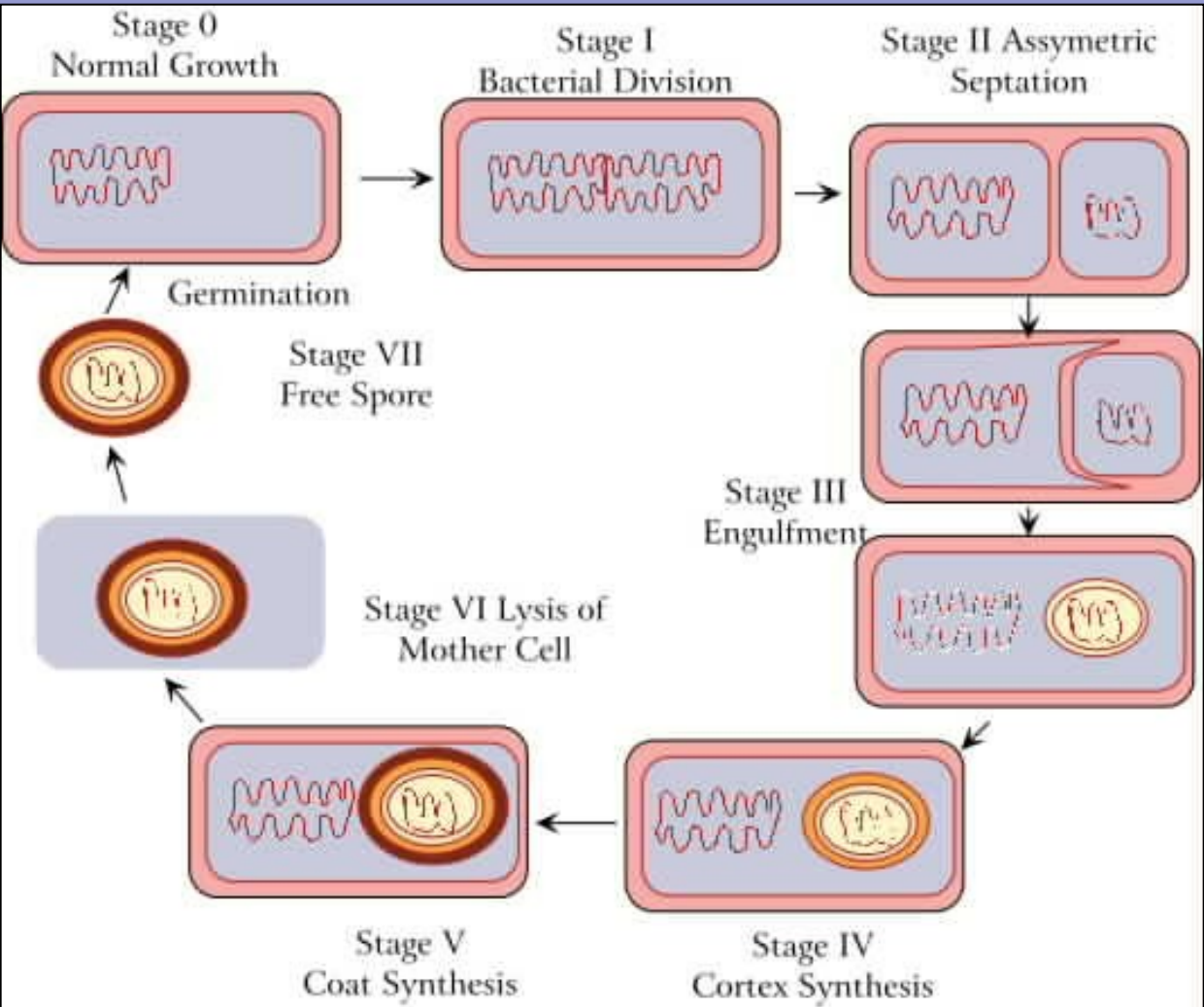
(b) An endospore in *Bacillus anthracis*

Během sporulace *B. subtilis* můžeme rozlišit 7 fází (I –VII)



Fáze 0

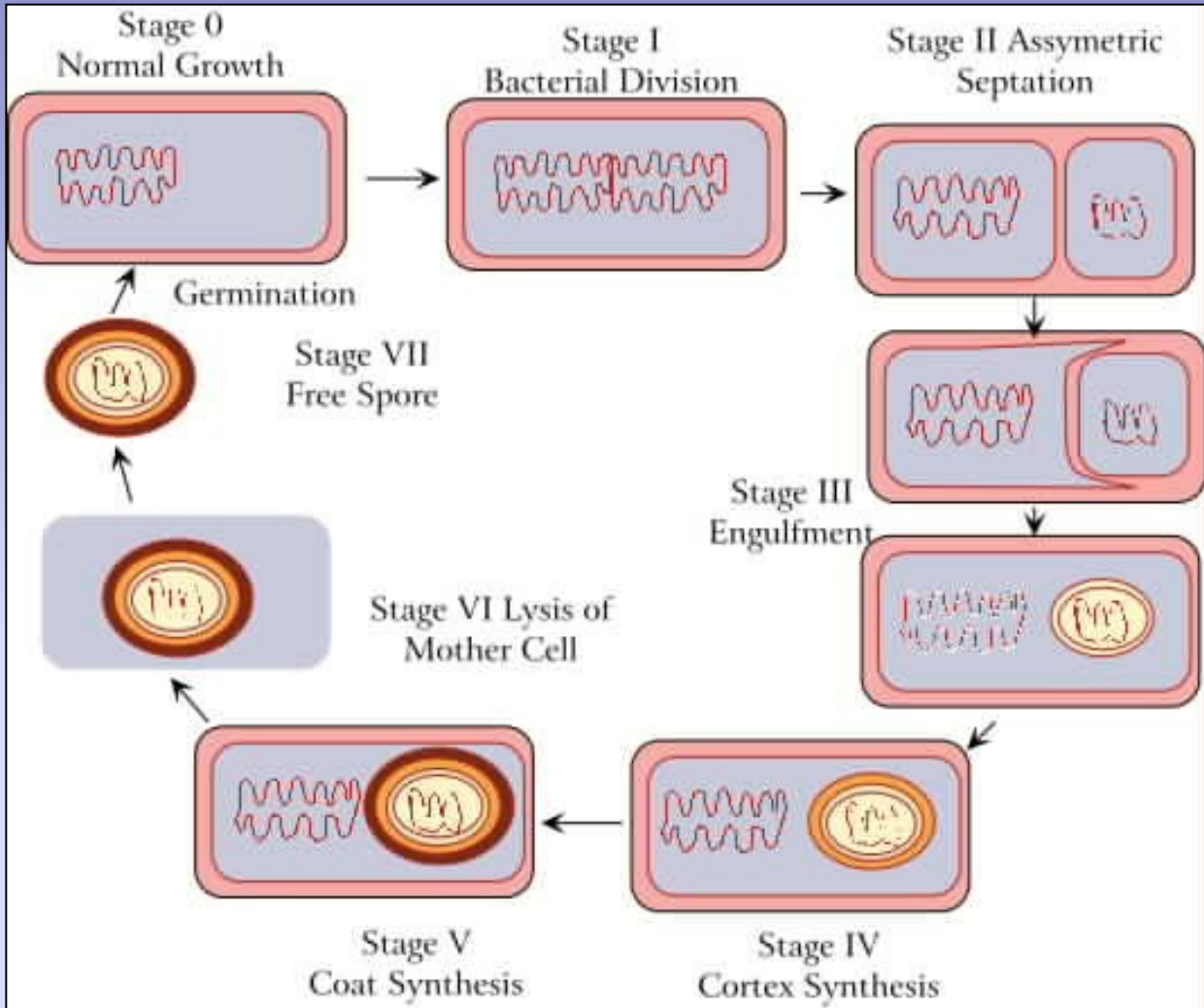




Fáze I

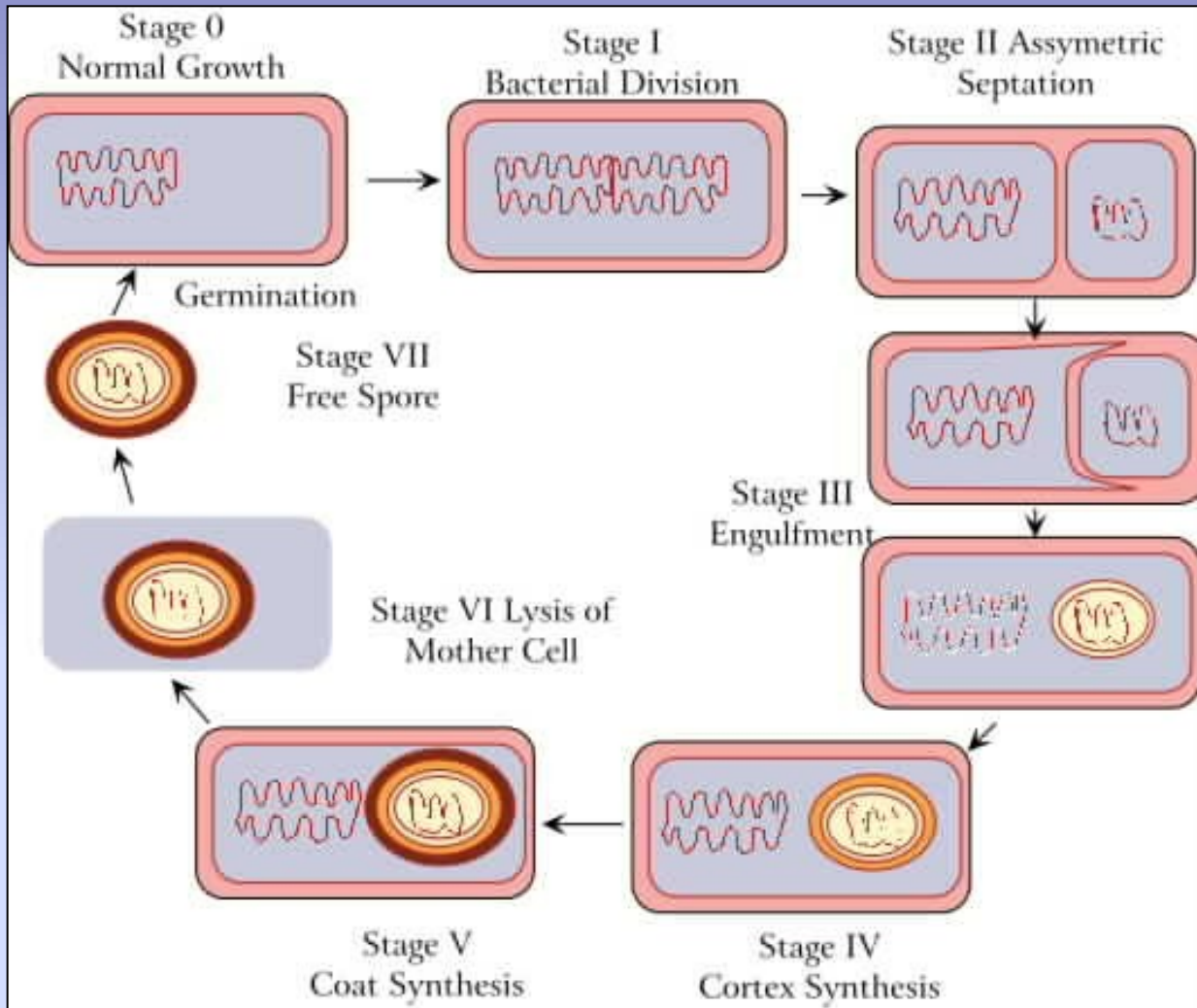
Jeden z prvních signálů sporulace: vznik kvanta volutinu

Druhým signálem - zvýšení množství enzymů Krebsova cyklu a hydroláz, spotřeby acetátu



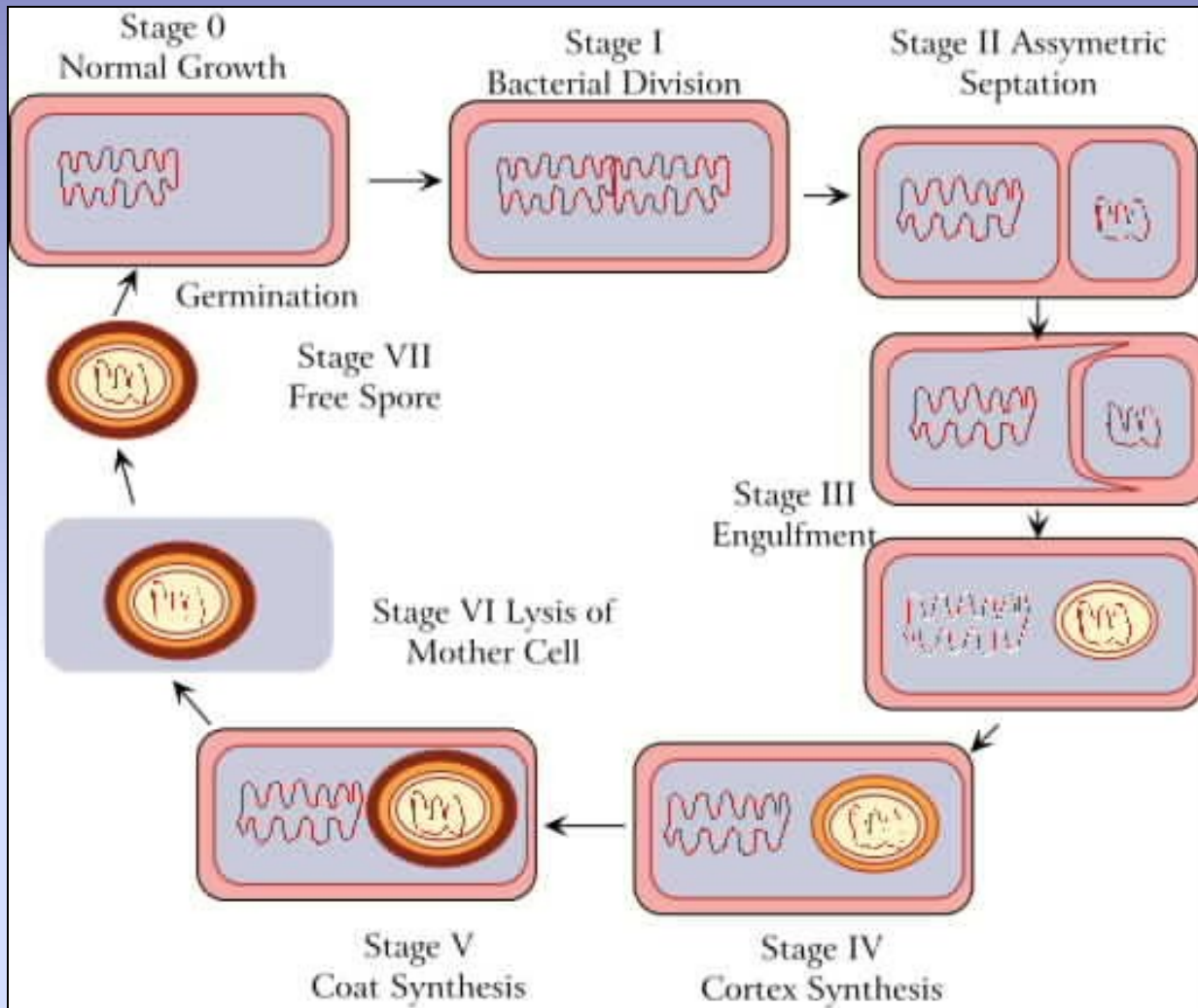
Fáze II

V místě přepážky se dvojité vchlípí cytoplazmatická membrána



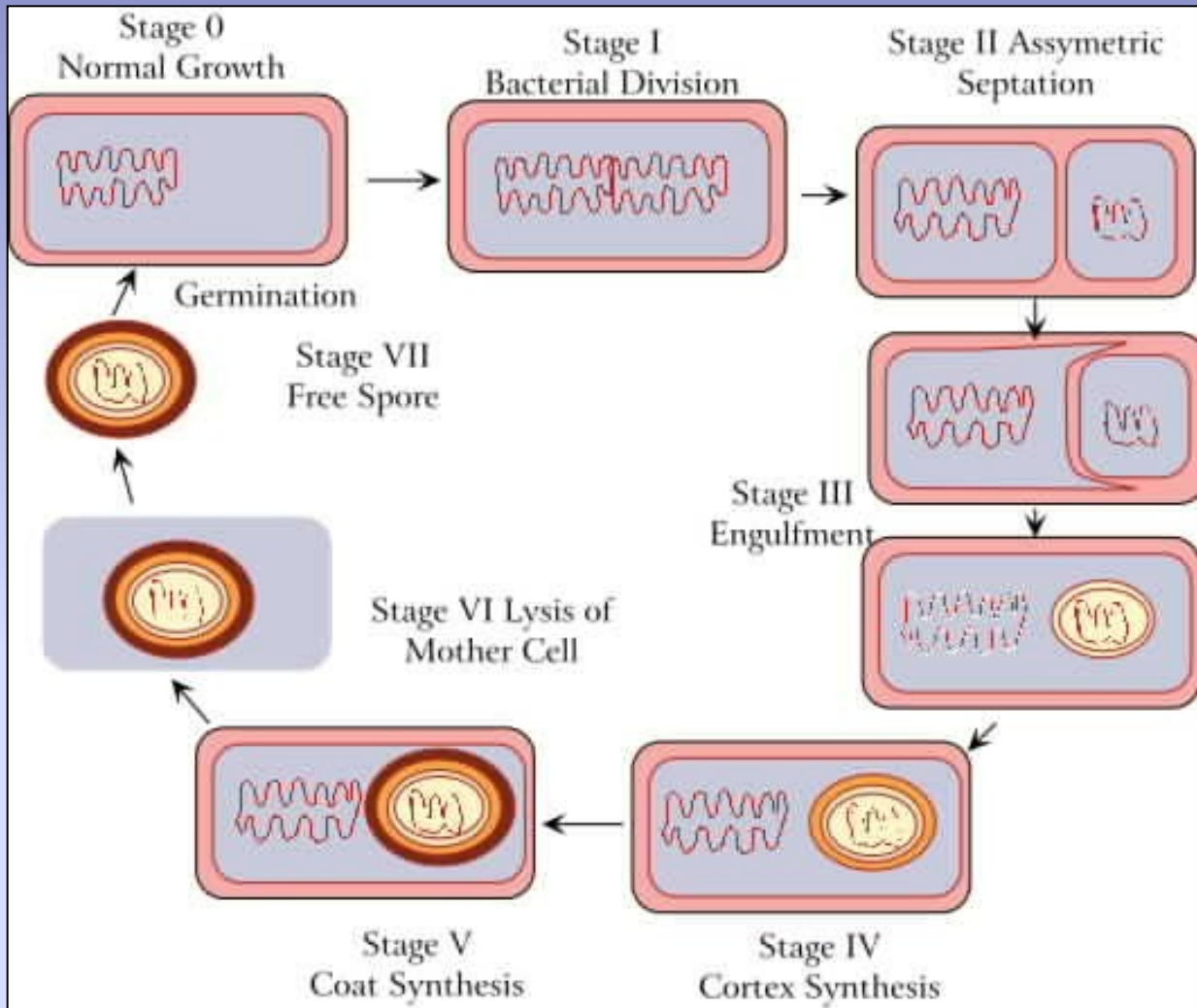
Fáze III

Spora ještě nesvíí při mikroskopii ve fázovém kontrastu (není dosud světlolomná)



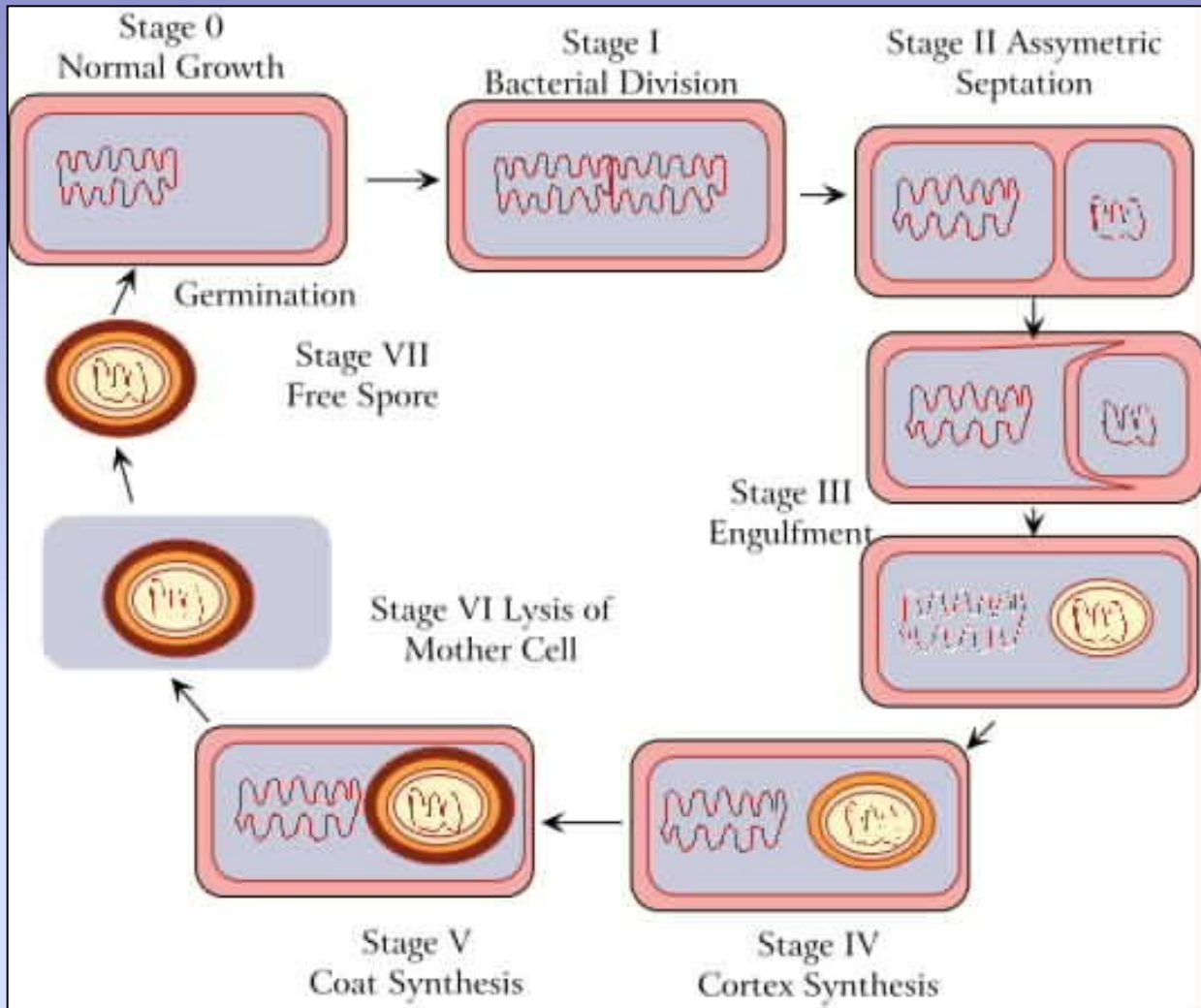
Fáze IV

*Endospora je již
světlolomná –
Nomarského a fázový
kontrast.*

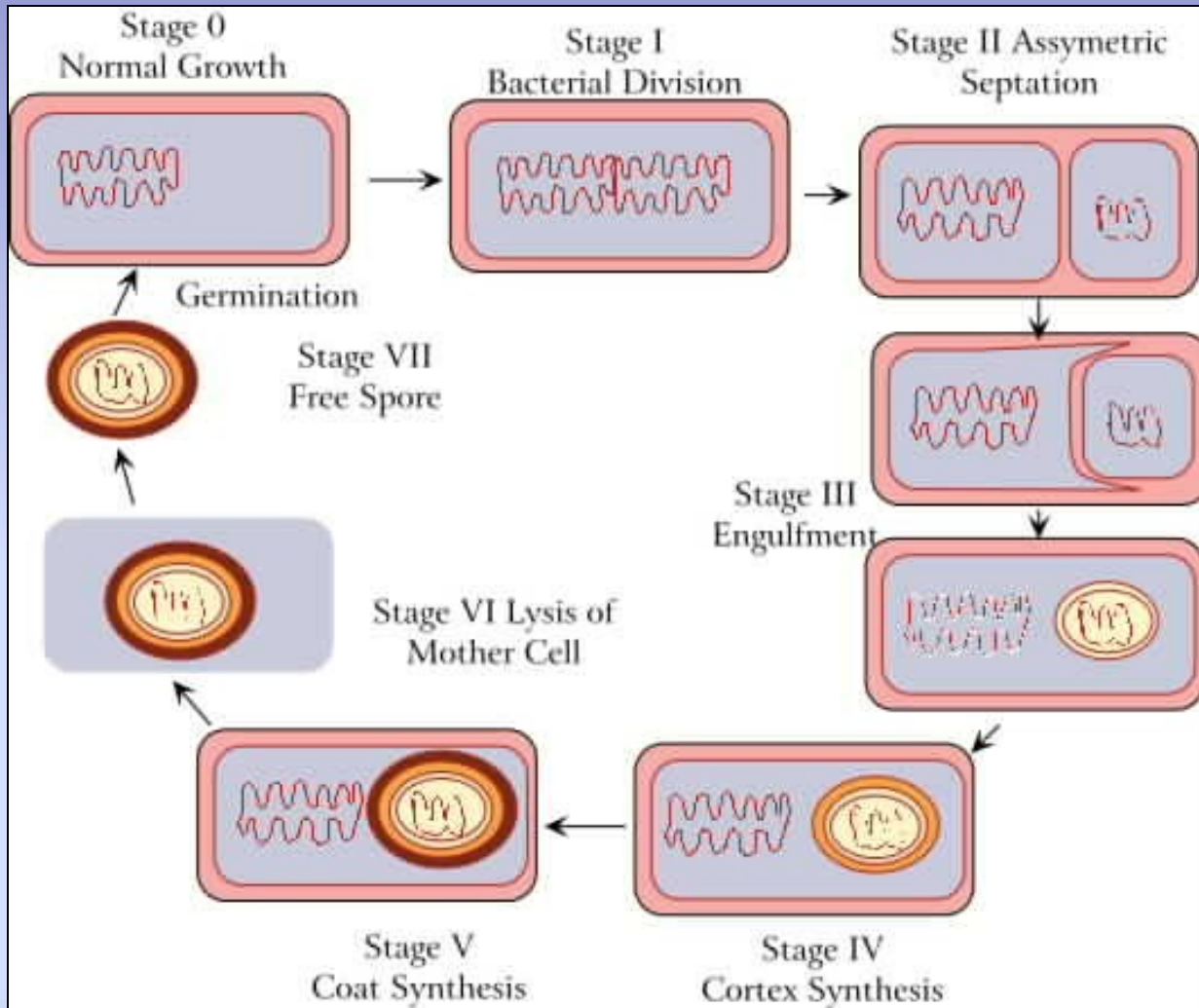


Fáze V

*Chemotaxonomie –
unikátní bílkoviny pláště*



Fáze VI



Fáze VII

- III fáze - odstartovaný proces sporulace již nejde zastavit – regulace v uzlových bodech
- Asporulační medium - glukóza

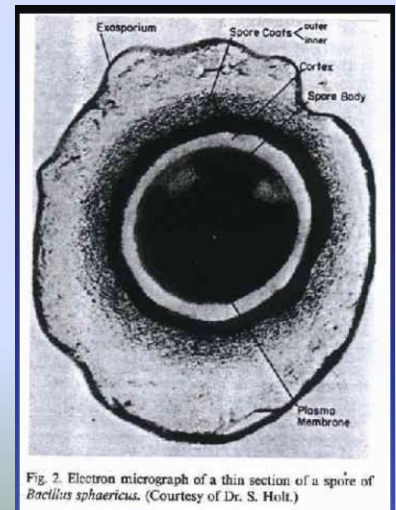


Fig. 2. Electron micrograph of a thin section of a spore of *Bacillus sphaericus*. (Courtesy of Dr. S. Holt.)

Germinace spory – terminální, centrální



- rychlý proces klíčení spory
- spontánní aktivace spory
- **Aktivace** – působením teploty 70-85 °C po 5 – 10 min
další aktivátory: malé organické molekuly, L-Ala, Ado a Ino, vyšší obsah bazí

V laboratoři??

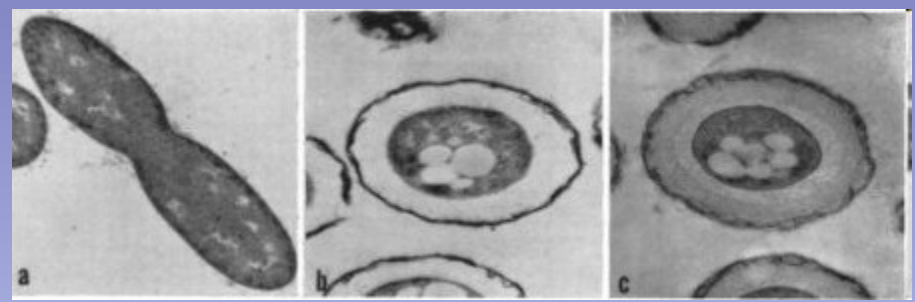
- Aktivovaná spora přijímá vodu a ztrácí rezistenci – bílkoviny se začínají rozkládat





- Destabilizace pláště, rozklad extiny
- Lytický enzym: p68 => p29 (kortikohydroláza) – depolymerizuje kortex pro nástupný průnik vody.
- Po 2h po germinaci spory
 - dělení vegetativní buňky
- Inhibice klíčení: D-Ala, MgCl₂, PMSF

Exospory = cysty



- Nejsou tolik rezistentní vůči teplu
- Rezistentní vůči vysychání
- Granula PHB – typická pro cysty
- Odlišné obaly – algináty, různé polysacharidy
- Nejpodrobněji popsány u *Azotobacter vinelandii*,
- mnohohvrstevný obal (vnější části vyšší hustota), unikátní lipidy
- Za příznivých podmínek cysty klíčí
a mění se ve vegetativní buňky

Cysta *Azotobacter vinelandii*



Růstový cyklus *Azotobacter vinelandii*

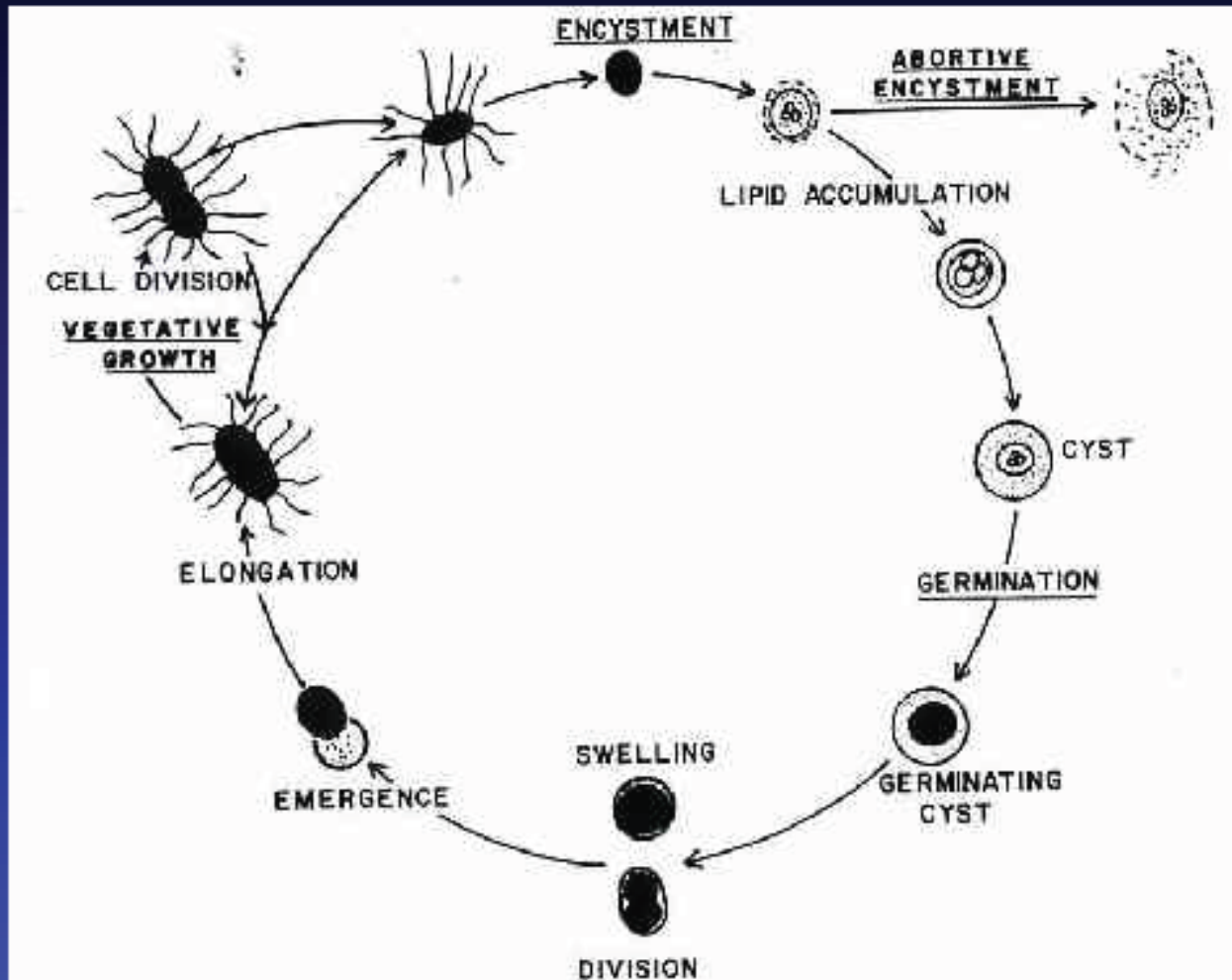


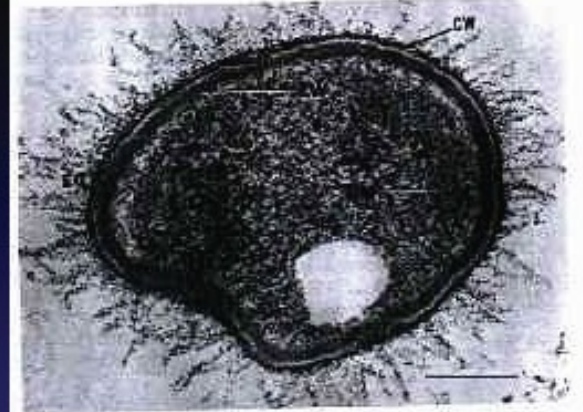
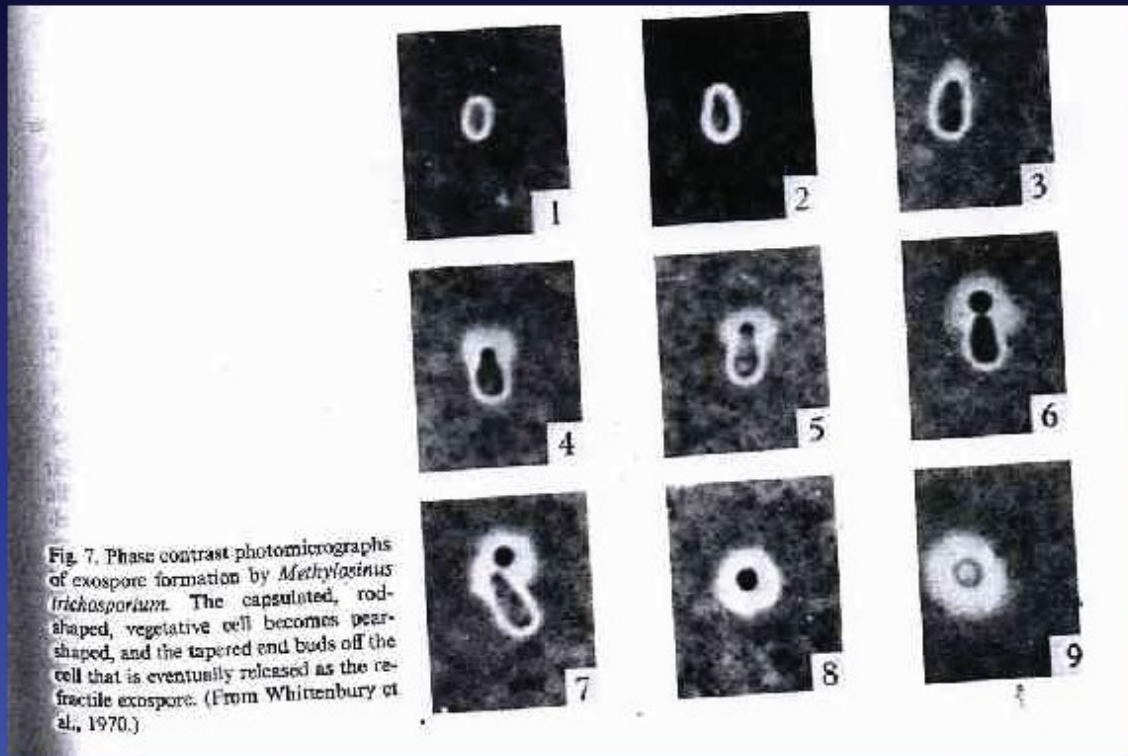
Fig. 4. Schematic diagram of the life cycle of *Azotobacter vinelandii*. (From Sudoff, 1975.)

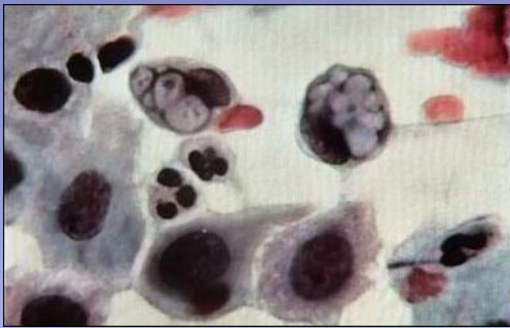
Nepohyblivé
stadium se
encystuje



Akumulace lipidů
i uvnitř buňky

Tvorba exospory u *Methylosinus trichosporium*

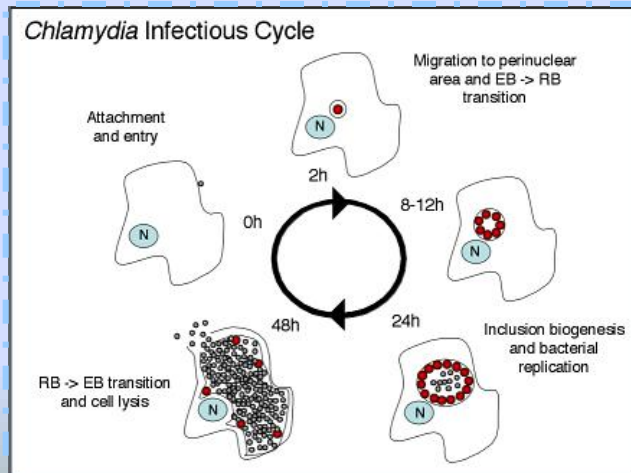




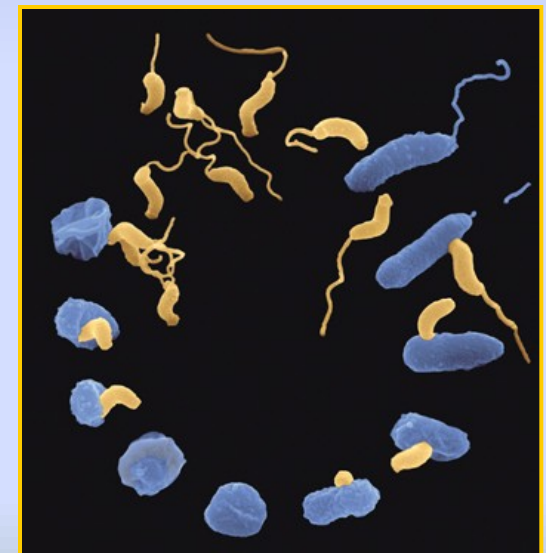
Chlamydia trachomatis



2) Střídání extracelulárního, infekčního stádia, a intracelulárního, reprodukčního stádia



Bdellovibrio
Chlamydia



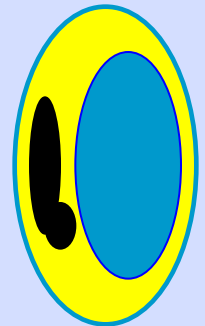
Bdellovibrio bacteriovorus
(žluté buňky)

Bdellovibrio

„prohnutá pijavka“ 



- drobné aerobní G- bakterie 0,3-0,5 x 0,5-2,4 μm
- všudypřítomné v moř., sladkovodní, odpad.vodě, půdě
- obligátní (primárně) intracelulární parazité **G- bakterií**
- nemnožící se stádium – **pohybliví predátoři**, polární bičík, **extracelulární**. Až 100 $\mu\text{m/s}$. = „**Útočná fáze**“
- reprodukční stádium – nepohyblivé, žije v **periplazmatickém prostoru** hostitelské buňky.
= „**Růstová fáze**“



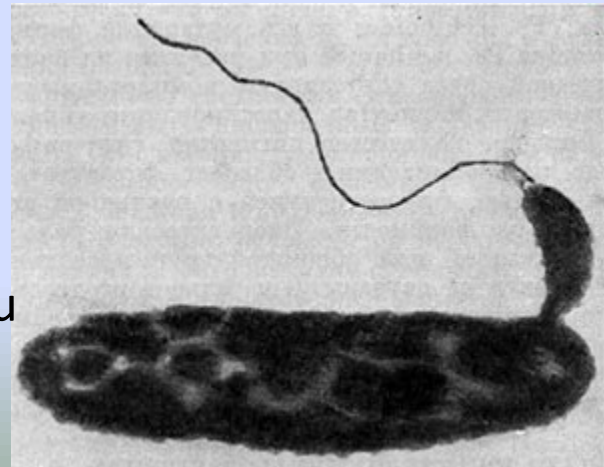
Poprvé popsáno *Bdellovibrio bacteriovorus* (Stolp and Starr in 1963).
Bdellovibrio starrii a *Bdellovibrio stolpii* → rod *Bacteriovorax*

- Popsány 3 druhy
- Analyzován jeho neobvykle velký genom – 3,7 mil.bazí
- Schopno syntetizovat jen 11 AMK
- Popsány dva jejich viry:
 - Kentucky: sférický, 70nm, 1sDNA
 - Praha: 2sDNA, hlavička 40nm, bičík 200nm

Pohyblivá extracelulární forma

- protáhlý konec buňky slouží jako „příchytká“, holdfast
- na protilehlém konci je umístěn polární bičík – obalený pochvou, která je tvořena vnější membránou, odlišnou od CM
- kontakt s hostitelem – pravděpodobně **není založen na chemotaxi** – reverzibilní a irreverzibilní stádium
- biosynteticky neaktivní –
- bez proteosyntézy

bdellovibrio začíná leptat stěnu kořisti, po kontaktu se aktivují *pil* geny pro syntézu fimbrií



Vhodný
hostitel

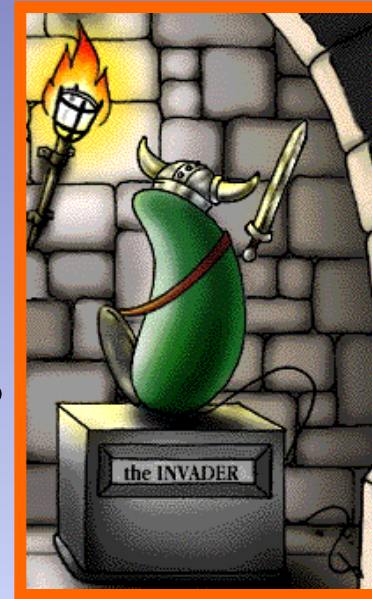
Infekce hostitelské buňky

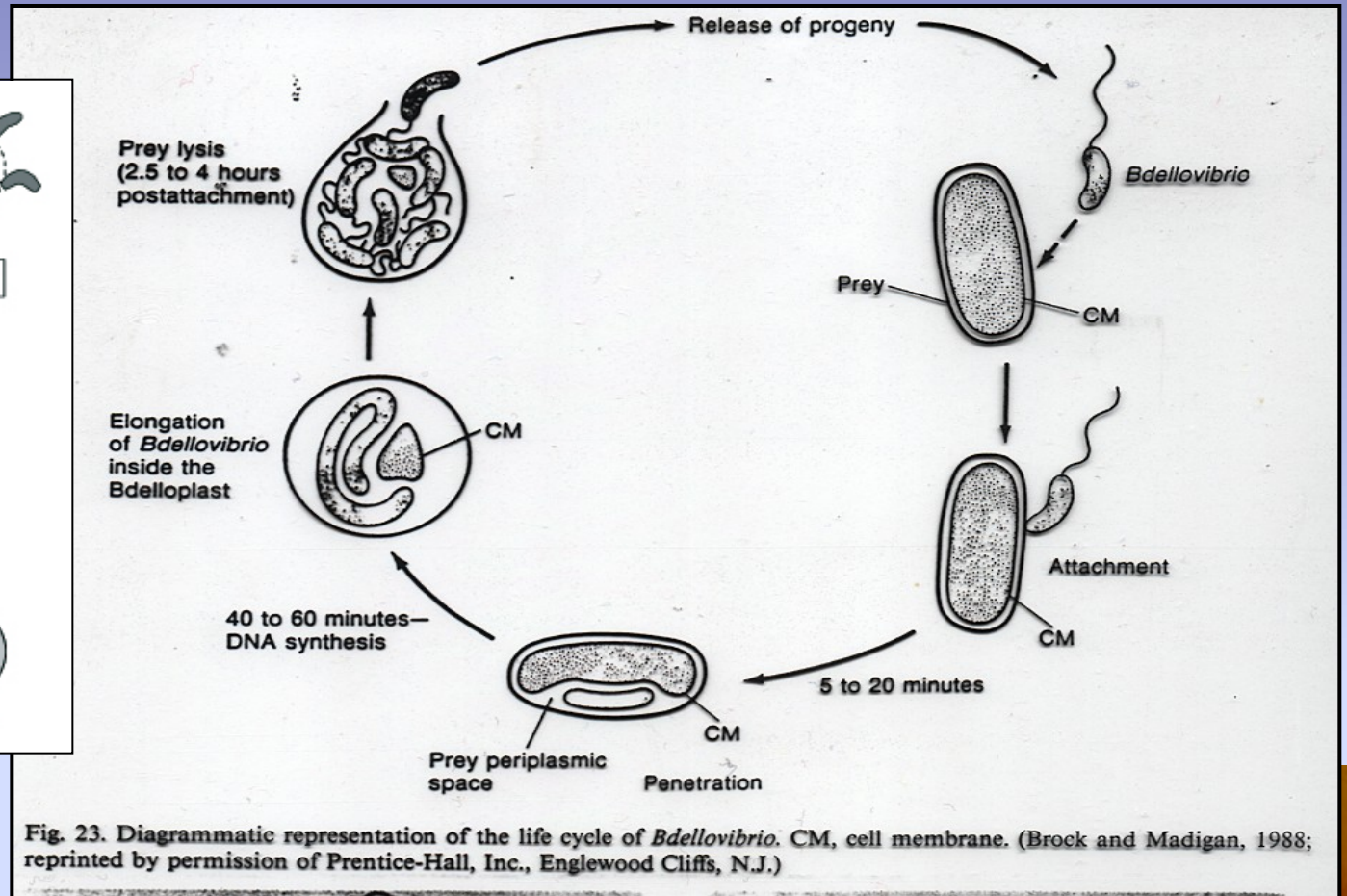
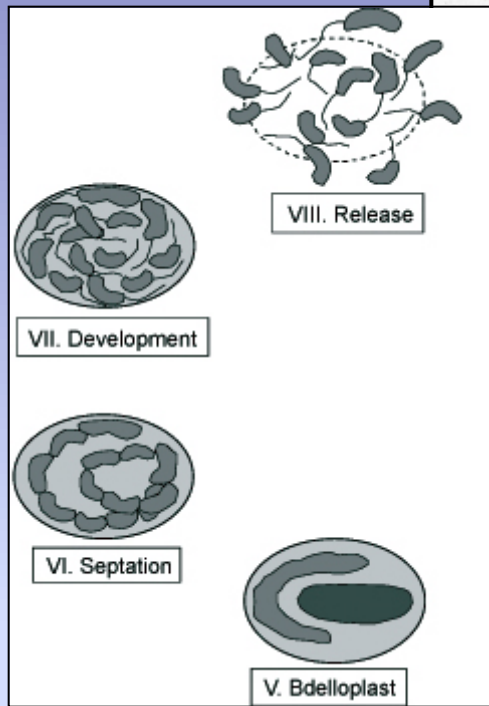
Kolize s hostitelem: 160 $\mu\text{m/s}$

- Penetrace vnější membránou – rotace 100ot/s
- Ztráta bičíku
- Usídlení v periplazmatickém prostoru, mezi peptidoglykanovou vrstvou a vnější membránou, přeměna ve vegetativní buňku, replikace DNA
- Přeměna hostitele ve ^{bdelloplast} sféroplast. Hydrolytické enzymy.
- Elongace, vyrůstá septované vlákno
- Po vyčerpání živin fragmentace vlákna (ještě před lyzí) fragmentací vznikají pohyblivé, infekční buňky
- Lyze hostitelské buňky

Životní cyklus: 1-3h

Produkce až 15ti nových predátorů





Přesné řízení buněčného cyklu, aby se v potřebném sledu aktivovaly četné geny pro degrad. enzymy

Mohou se buňky replikovat bez parazitické fáze?

- Za určitých podmínek – s extraktem z host.buněk jsou bdellovibria schopna replikace



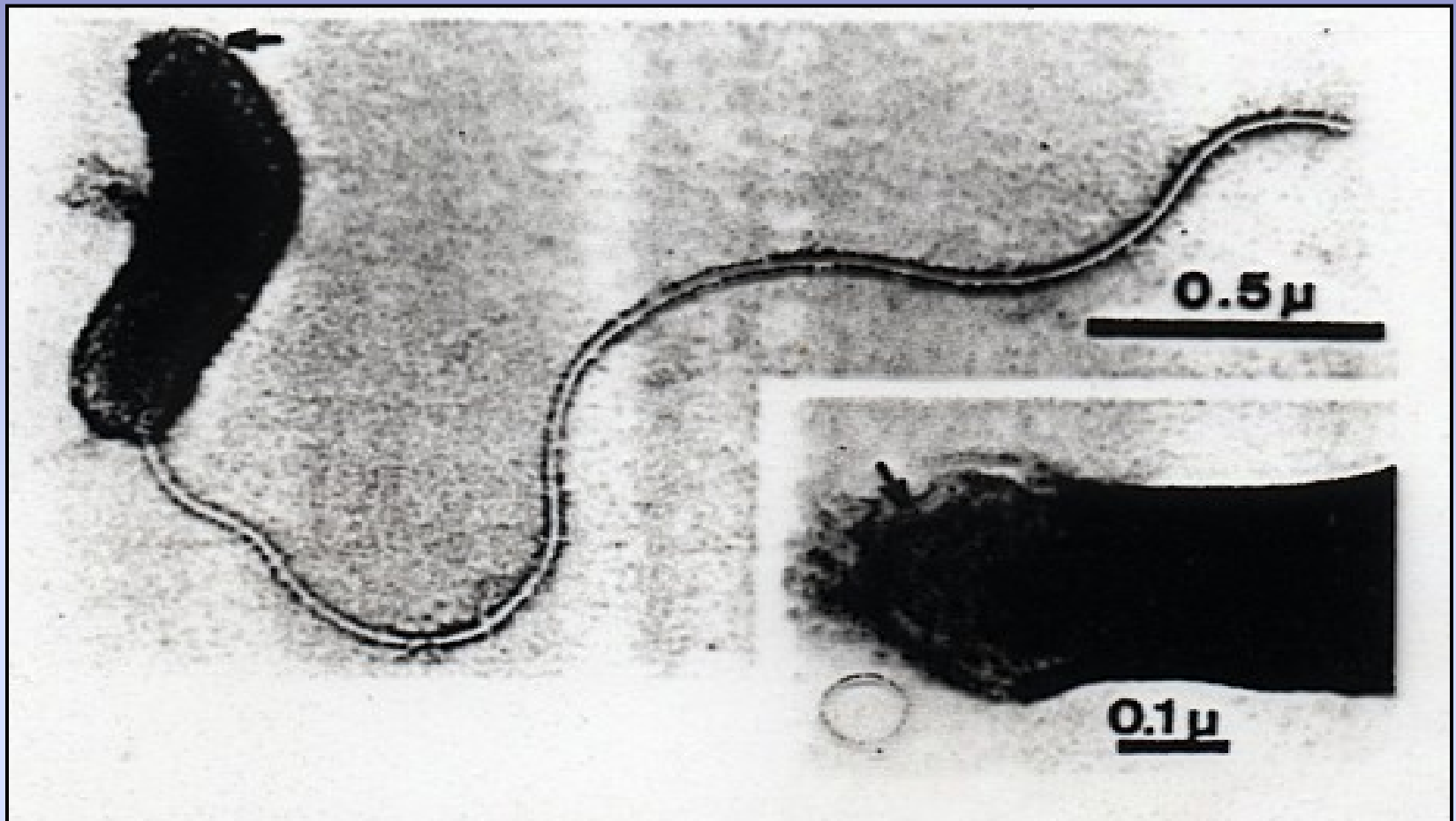
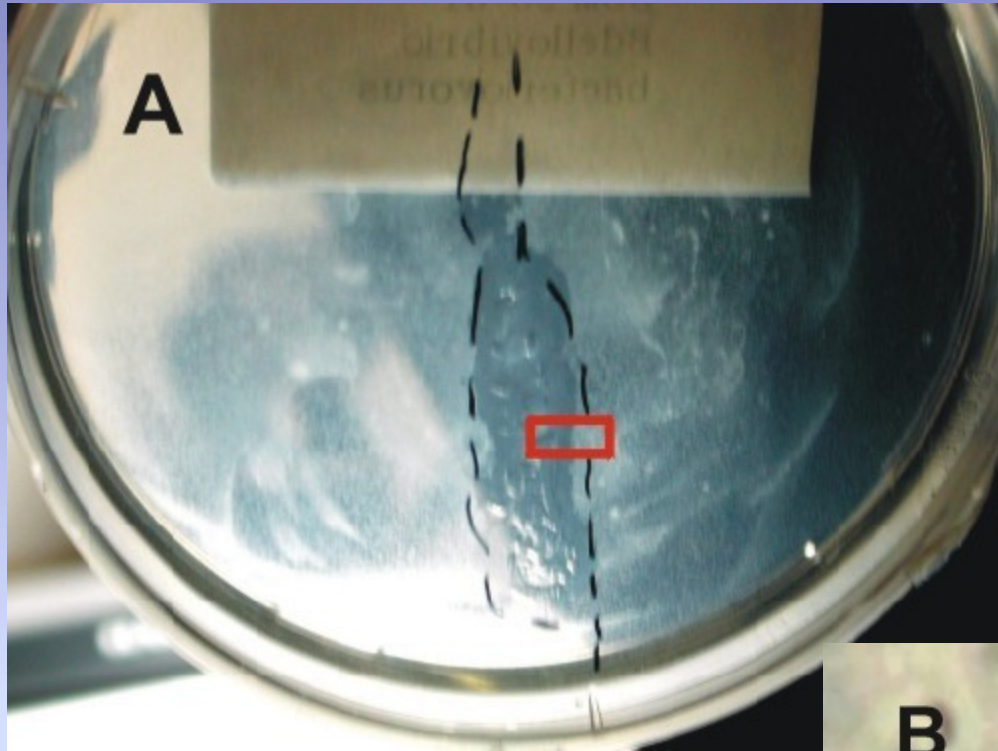


Fig. 19. Electron micrograph of negatively stained cell of *Bdellovibrio bacteriovorus* showing the thick, polar flagellum



Plaka na mediu 257

***Bdellovibrio bacteriovorus* DSM 50701**

Hostitelská buňka několik bdelovibrií



Ekofyziologie

- **výskyt** – půda, odpad, voda
- specifická metabolická přizpůsobení parazitickému životu – reprodukční stadium **metabolizuje vysokomolekulární látky obsažené v hostitelské buňce**
- efektivita metabolismu až **65%** materiálu hostitelské buňky **přemění na vlastní buněčný materiál**
- uvnitř hostitele je buňka **rezistentní** k záření, fágům a environmentálním polutantům
- některé kmeny tvoří tzv. **bdelocysty = 3. klidové stadium**, které se za vhodných podmínek mění na infekční stadium

Další predátoři

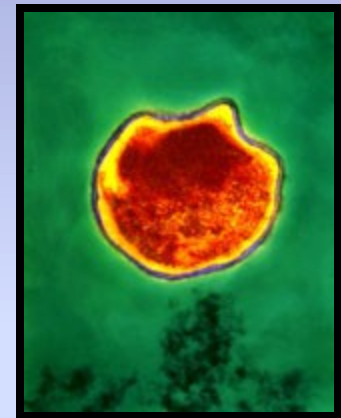
- Více než 12 podobných mikroorganismů
- Obligátní nebo příležitostní parazité
- Nitrobuněční nebo na povrchu buňky
- **Myxokoky** a **lysobactery** se kořisti zmocňují kolektivně, když dosáhnou potřebného quora, „strategie vlčí smečky“
- **Mycovibria** a **vampirokoky** zůstávají na povrchu
- **Daptobactery** pronikají přímo do cytoplazmy



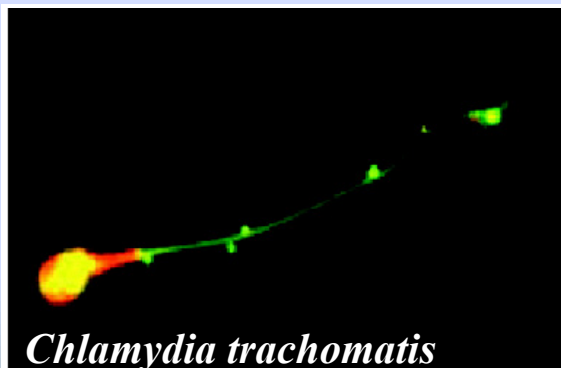
Chlamydie

obligátní parazité buněk vyšších organismů

- *Chlamydia trachomatis*
- *Chlamydophila pneumoniae*
- *Chlamydophila psittaci*
- *Parachlamydia acanthamoebae*



Chlamydia pneumoniae

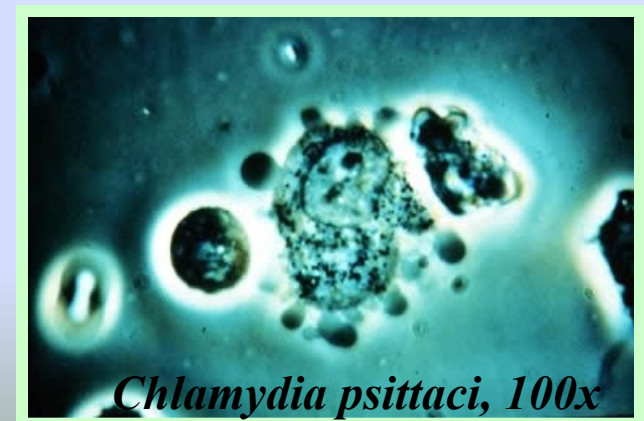


Chlamydia trachomatis

Elementární tělíska útočící na spermii
Courtney S. Hossenzadeh



Chlamydia psittaci

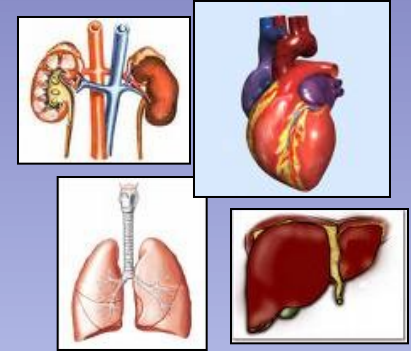


Chlamydia psittaci, 100x

Dr. Jean Sander

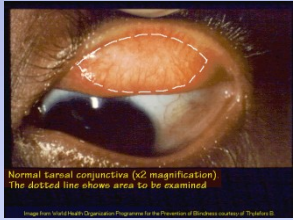


Chlamydiové infekce



Chlamydophila psittaci → Ornitóza (psitakóza)

Chlamydia trachomatis



trachom

okulogenitální
onemocnění
dospělých

lymphogranuloma
venerum

perinatální
infekce

reaktivní
artitida

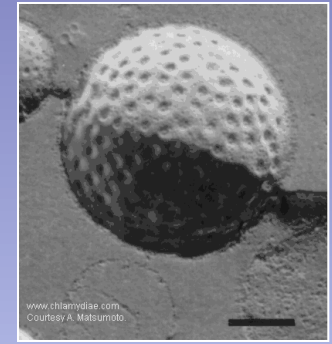
Promořeno 8% populace

Chlamydophila pneumoniae – 10% komunitních pneumonií.

Druh popsán 1983; u dospělých protilátky v 60 – 70%

makrolidy, tetracykliny

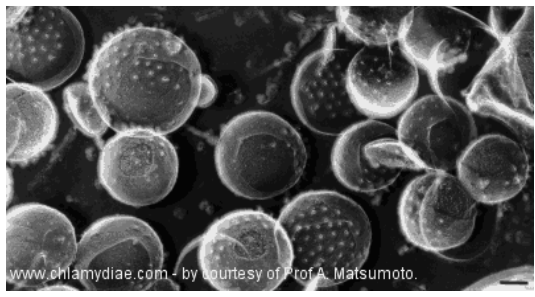
Dvě fáze reprodukčního cyklu chlamydií



- **elementární tělíska (EB)** – klidová stádia, rezistentní a vysoce infekční. Přizpůsobeny pro přežití ve vnějším prostředí.
- **retikulátní tělíska (RB)** – větší, ve fagozomu, reprodukční stádium, obsahuje ribozomy a využívá biosyntetický aparát hostitelské buňky

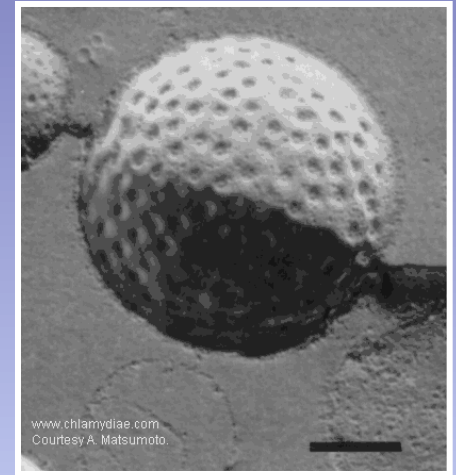
4 elementární tělíska obklopená retikulárním, které je produkuje.





EB

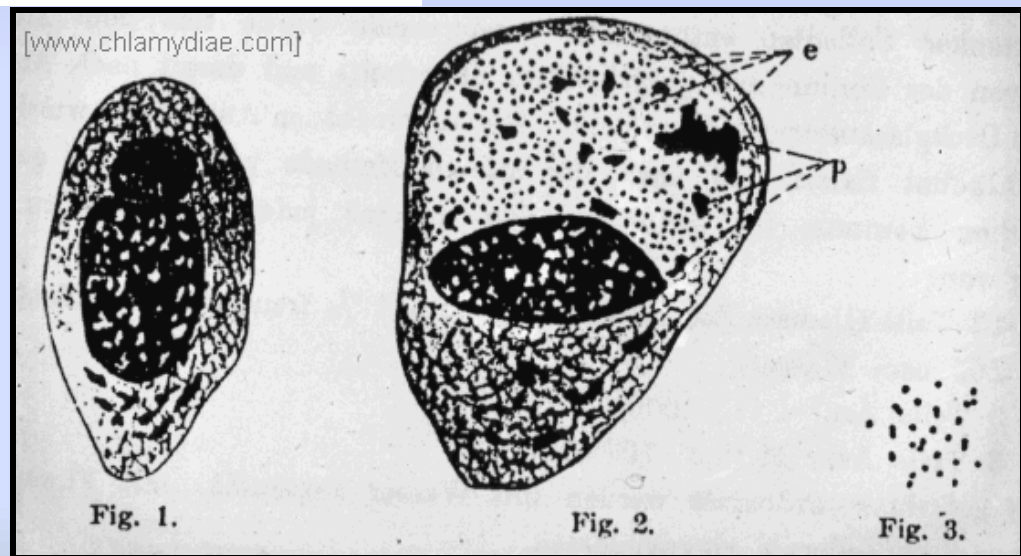
elementární tělíska



- malá, 0,3mm
- pevná BS – disulfidické můstky – proteiny bohaté na cystein
 - neprokázán peptidoglykan, nicméně geny pro jeho syntézu jsou přítomny
 - vliv b-laktamových atb
- kompaktní genom – histon-like proteiny
- infekční - adheziny



Chlamydial elementary bodies.
Courtesy of Dr A. Matsumoto
www.chlamydiae.com



[www.chlamydiae.com]

Fig.2 infikovaná buňka spojivky,
Fig.3 chlamydiové částice

RB

retikulární tělíska 1 μ m

- VM – pouze málo propojení, osmotická nestabilita
- Metabolicky aktivní, mnoho ribozomů
- relaxovaná DNA – difúzní a vláknitá, mizí histon-like proteiny, objevuje se mRNA a velké množství ribozómů

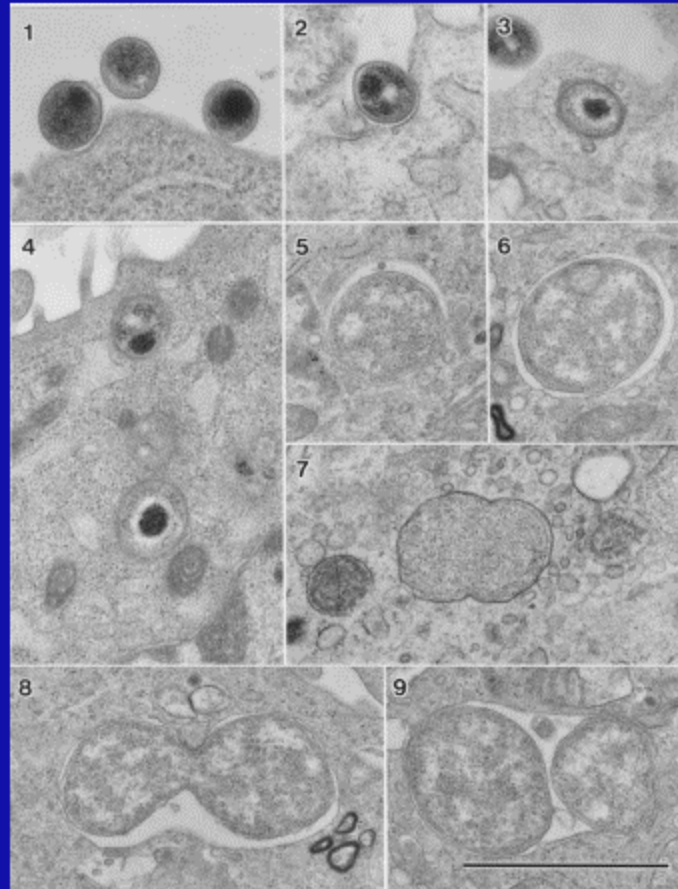
Vstup do hostitelské buňky



- endocytóza – receptor mediated
- endozom postrádá normální markery, proto není fusogenní
- blokována maturace
- blokován vznik fagolyzozomu
- přesun do perinukleárního prostoru



Attachment and early development

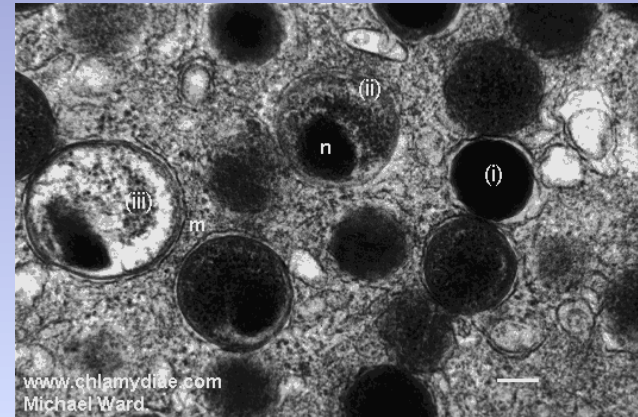


Images by
A. Matsumoto,
Reference 1

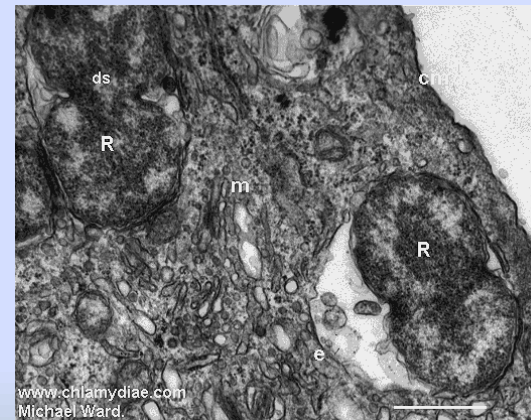
- Vazba na povrch buňky, tvorba endocytických vakuol, diferenciace v RB, binární dělení RB.

Změny provázející diferenciaci EB v RB

- změny BS
- relaxace DNA
- ztráta denzity cytoplazmy



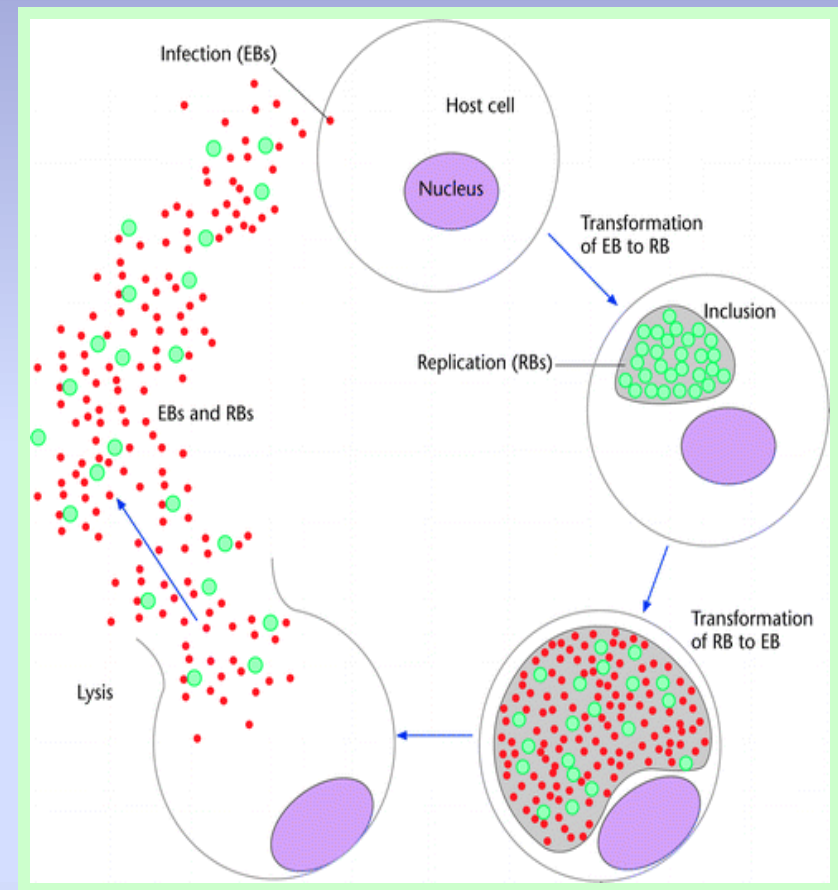
3h



9h – retikul. tělísko

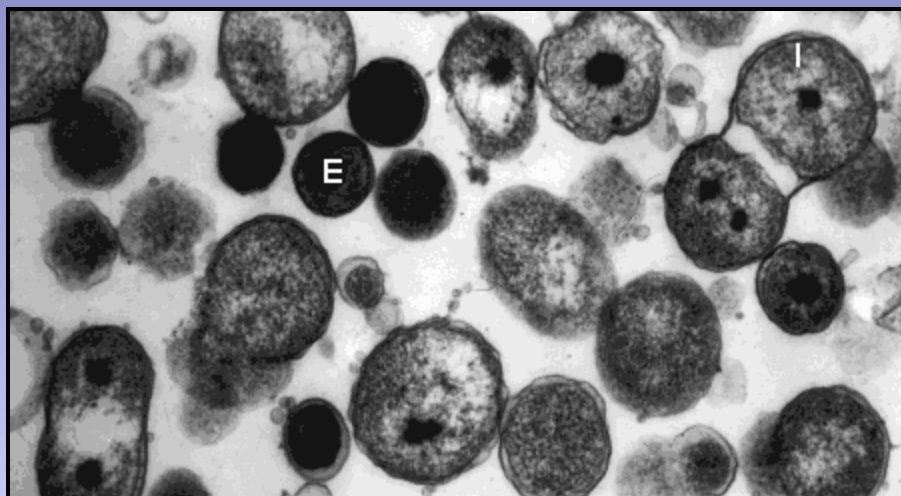
- 1. elementární tělísko **infikuje** **hostitelskou buňku**
 - specifická interakce, fagocytóza, fagozóm, narušení obrany
- 2. elementární tělísko **se mění v** **retikulární tělísko**, inkluze
 - 10 – 15h – syntéza ribozómů, reorganizace DNA, vytvoření nové buněčné stěny, dělení
- 3. retikulární tělíska **se dělí až do úplného naplnění fagozómu**
- 4. retikulární tělíska **se mění v** **elementární tělíska**, **lyze buňku**, **uvolnění**

Životní cyklus





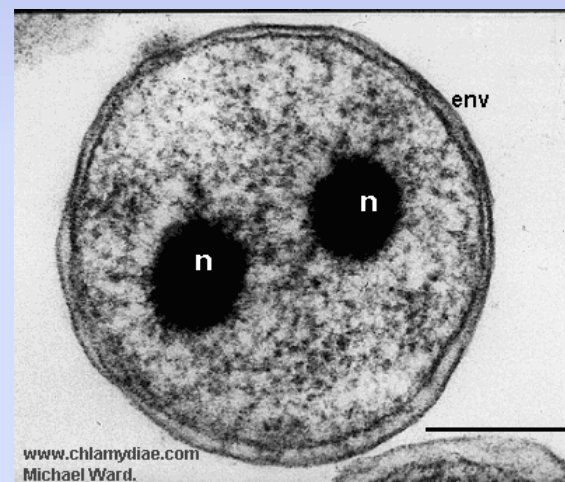
- ❖ **Inkluze** chlamydií 15h po infekci.
- ❖ Mnoho retikulárních tělísek (R).
- ❖ Membrána endozomu (EM).
- ❖ Bublínky membrán (mb)
- ❖ **Lipopolysacharid** chlamydií exportovaný z R je důležitý pro některé imunologické testy – **detekce antigenu**



Po 18-22 h po infekci,
retikulární tělíska se začínají
diferencovat v elementární.
University of Southampton
School of Medicine.



30 h po infekci



www.chlamydiae.com
Michael Ward.

chronické infekce - blokována diferenciace RB v EB –
např. interferon gama

