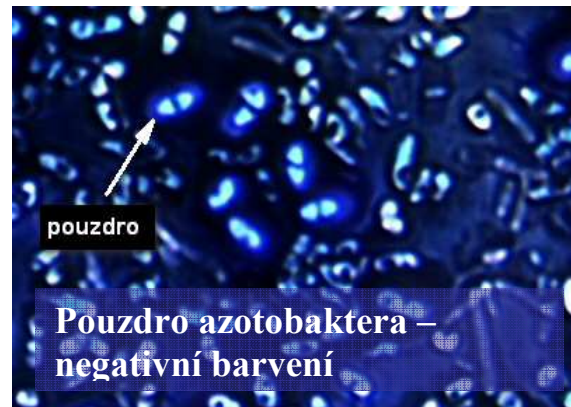
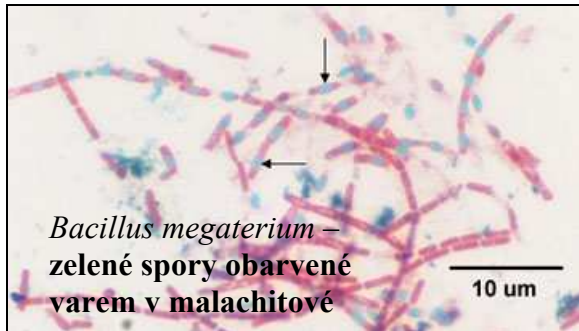


Cvičení 7

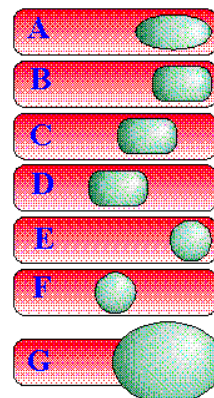
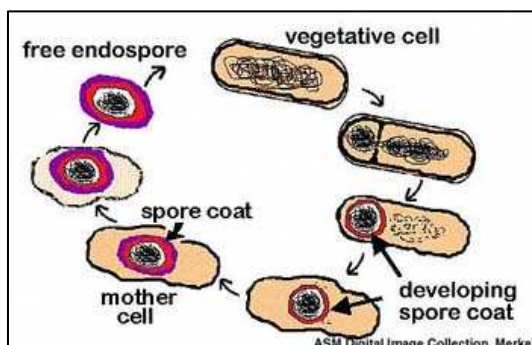
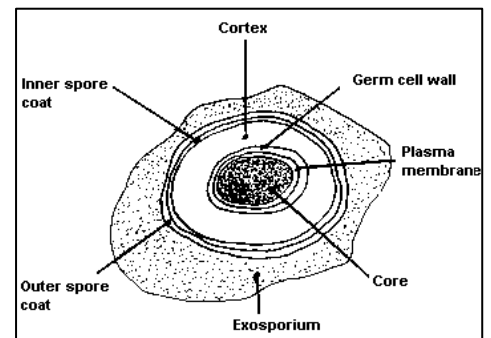
Strukturální barvení bakteriálních pouzder a endospor

V tomto cvičení využijeme dvou typů barvení. Bakteriální spory špatně přijímají barvivo (vzhledem k rigidnímu špatně propustnému obalu), proto se obarví až během varu v daném barvivu (stejně jako např. acidorezistentní bakterie – *Mycobacterium*, které bychom Gramovým barvením neobarvili vzhledem k obsahu lipolytických látek mykolových kyselin). Bakteriální pouzdra zase v okolí buněčné stěny zvýrazníme tím, že negativním barvením obarvíme okolí buněk, nikoli buňky samotné a tím získáme i zvýraznění pouzder. Samotná pouzdra lze barvit horkým karbolfuchsinem.



Bakteriální spory:

- termorezistentní endospory jsou klidová (tedy nereproduktivní) stadia převážně grampozitivních bakterií; jsou velmi odolné a charakteristické minimálním obsahem vody a minimálním metabolismem
- sporulují i gramnegativní bakterie, poté se spory nazývají exospory (a vznikají jiným způsobem. Vyjimečně tvoří endospory i gramnegativní bakterie, např. *Coxiella burnetti*, původce Q-horečky
- důvodem sporulace je adaptace či příprava na změny podmínek životního prostředí (nikoli odpověď na ně)



Umístění endospory v buňce

Proces vzniku endospory asymetrickým dělením buňky

Endospory kromě námi izolovaného rodu *Clostridium* vytváří i např. *Bacillus* (aerobní tyčky), *Desulfotomaculum* (anaerobní tyčky), *Sporosarcina* (aerobní koky), *Sporolactobacillus*, *Oscillospira*, *Thermoactinomyces*.

Pouzdro - kapsula

- je silně hydratovanou strukturou vně buněčné stěny buňky, složenou většinou z polysacharidů a zřetelně odděluje buňku
- jeho tvorba je ovlivněna složením média – velikost tedy není geneticky kódována, záleží na vnějším prostředí
- v prostředí slouží jako ochranná vrstva proti vysychání a detergentů, dále např. proti bakteriofágům fágům. Slouží i k vazbě na povrch předmětů, tvorbě biofilmu
- u klinicky významných druhů působí proti protilátkám a fagocytóze, proti první vlně imunitní odpovědi
- skládá se z mikrokapsuly (do 0,2nm, bílkoviny, lipidy, polysacharidy; průkaz není možný mikroskopicky) a makrokapsuly (polysacharidy nebo bílkoviny, celulóza; minimálně dvakrát tlustší než buňka)

Materiál a použité mikroorganismy:

- vlastní izoláty vykultivované za cvičení Izolace bakterií z půdy (*Azotobacter*, *Clostridium*)
- *Bacillus cereus* CCM 2010
- podložní a krycí skla, bakteriologická klička
- stříčka s vodou
- filtrační papír
- Pasteurovy pipety
- pinzeta
- sterilní voda
- Negativní barvení (pouzdra): kongo červen, nigrosin, karbolfuchsin, 1% HCl, methylenová modř
- Barvení endospor: malachitová zeleň, safranin

Postup:

Strukturální barvení se používá k identifikaci a studiu struktury bakterií. Př: barvení endospor, pouzder a bičíku (flagely).

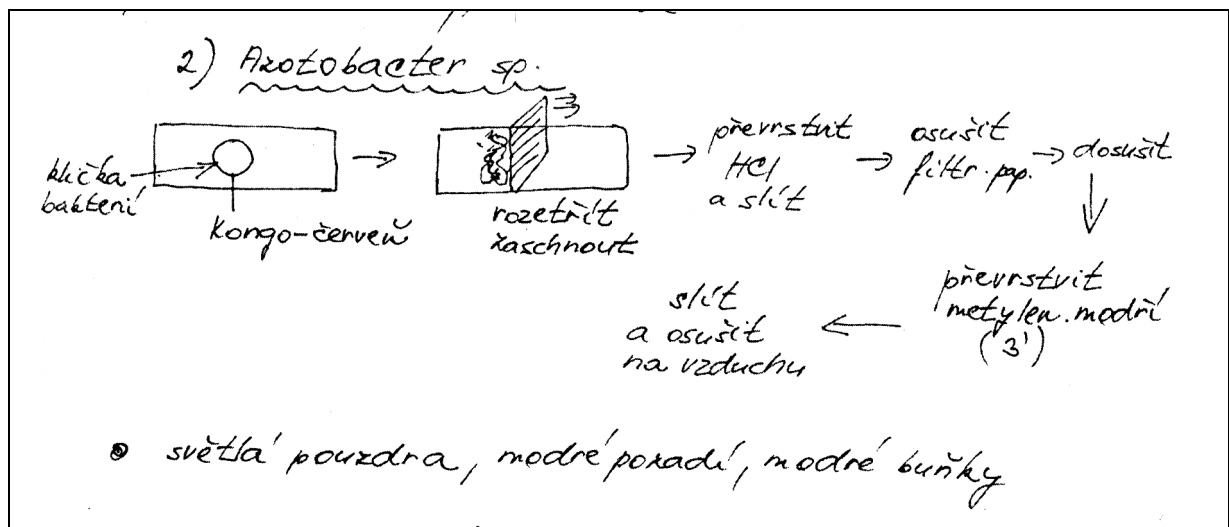
A. Barvení spor malachitovou zelení - Schaefferova-Fultonova metoda

- Uschlý nátěr buněk na sklíčko fixujeme trojím protažením v plameni
- Převrstvíme malachitovou zelení, překryjeme filtračním papírem
- Zahříváme 5 minut do výstupu par, doplňujeme barvivo
- Opláchneme vodou
- Dobarvíme kontrastním barvivem - safraninem nebo kongo – červení (převrstvením 30s)
- Opláchnout vodou, usušit, pozorujeme pod imerzí, Z 1000x
- Pozorování: Spory jsou zelené, ostatní buněčný obsah červený.

B. „Barvení pouzder“ – negativní barvení = zvýraznění pozadí kongo červení

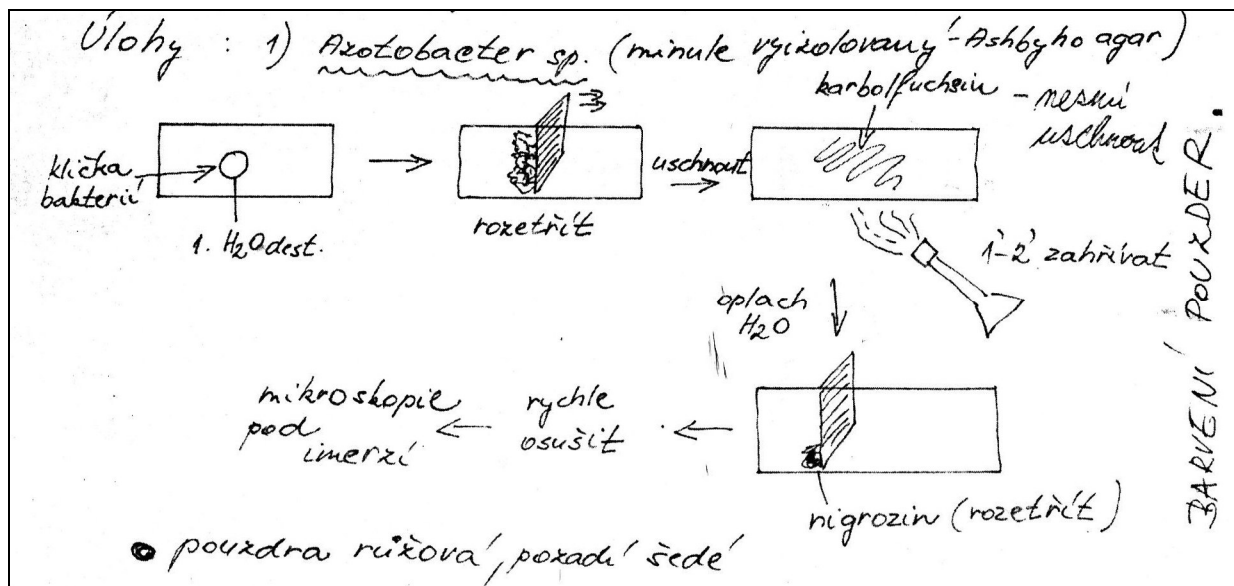
- Na sklíčko kápněte Kongo červen a přímo v ní suspendujte kulturu *A. vinelandii*.
- Suspenzi rozetřete po povrchu sklíčka a nechte dobře zaschnout.
- Převrstvěte na několik sekund kyselinou chlorovodíkovou, potom kyselinu slijte
- Neoplachujeme vodou

- Buňky dobarvíme methylenovou modří (3 minuty převrstvit)
- zbytek osušte filtračním papírem a dosušte na vzduchu.
- Pozorujte imerzním objektivem světle modré buňky, světlá pouzdra a modré pozadí.



C. Barvení pouzder karbolfuchsinem a negativní barvení pozadí nigrosinem

- Klička bakteriálních buněk z Ashbyho agaru se resuspenduje v kapce vody
- Rozetře se po povrchu sklička a nechá se zaschnout
- Podložní skličko se převrství karbolfuchsinem do výstupu par 1 min
- Opalch vodou a negativní dobarvení nigrosinem rozetřeným do tenké vrstvy a vysušeným, aby se nezbarvily i buňky; neoplachujeme
- Pozorujeme pod imerzí červené buňky, růžová pouzdra a šedé pozadí



D. Negativní barvení buněk rodu *Bacillus* nebo *Clostridium*

- Klička bakterií se rozetře v kapce destilované vody, přidá se kapka nigrosinu
- Rozmíchá se kličkou a rozetře se druhým skličkem
- Bez oplachování se nechá zaschnout na vzduchu

Pozorování:

Pozorujeme zelené spory uvnitř červených buněk a můžeme hodnotit tvar a umístění spor uvnitř těchto buněk (napomáhá identifikaci sporulujících druhů).

Pouzdro: pozorujeme zvýrazněné okraje pouzdra – hromadí se u nich barvivo, které nemůže pronikat do slizovité vrstvy (negativní barvení pozadí). V případě barvení pouzder horkým karbolfuchsinem jsou pouzdra růžová a viditelná díky šedého pozadí nabarveného nigrosinem.

Význam barvení spor do Závěru:

Používá se na diferenciaci spor bacilů a klostridií i na rozlišení askospor kvasinek. Spory se velmi těžko barví i po fixaci, neboť mají silný, špatně prostupný obal. Chceme-li spory obarvit, musíme použít koncentrovaná barviva za tepla nebo různá mořidla. Takto obarvené spory se těžko odbarvují kyselinami a jinými sloučeninami (např. alkoholem), čehož se využívá k diferenciaci spor. Barvitelnost spor ovšem záleží na jejich vývojovém stádium, je podmíněna stářím kultury, kvalitou živné půdy, individuálními vlastnostmi mikrobů, a proto nelze barvicích metod používat schematicky. Barvitelnost spor se také (podobně jako u plísní) zlepšuje použitím sporulačních médií (s přídavkem manganu).

Význam negativního barvení pouzder do Závěru:

Negativní barvení se používá k mikroskopickému stanovení pouzder a slizů a k měření velikosti bakteriálních buněk v případech, kdy by došlo fixací ke změně velikosti buněk a deformaci pouzder. Bakteriální pouzdro je větší při kultivaci např. ve 20% sacharóze.

U patogenních mikrobů mají pouzdra určitý vztah k jejich virulenci. Mají-li pouzdra antigenní vlastnosti (struktury organismu cizí provokující tvorbu protilátek), mohou být podkladem typové imunospécifity. Pouzdra mohou hrát i určitou roli v metabolismu bakteriální buňky – zejména v regulaci příjmu a výdeje vody. Kmeny vytvářející pouzdro rostou na agaru zpravidla v podobě hladkých kolonií. Tyto tzv. S-formy (smooth) mohou spontánní mutací přecházet v drsné R-formy (rough) bez pouzdra. Některé složky pouzdra jsou vylučovány do prostředí v podobě slizu (M-forma, např. *Leuconostoc mesenteroides*).

Přímé barvení pouzdra: protože jsou tvořena látkami hlenového a želatinového charakteru – převážně z polysacharidů, mukopeptidů a kyseliny hyaluronové, tak běžná barviva nepřijímají. Chceme-li je obarvit, musíme preparát nejdříve mořit (např. síranem železnatým nebo měďnatým) nebo použít k jejich průkazu metody negativního barvení – např. metody dle Burriho.

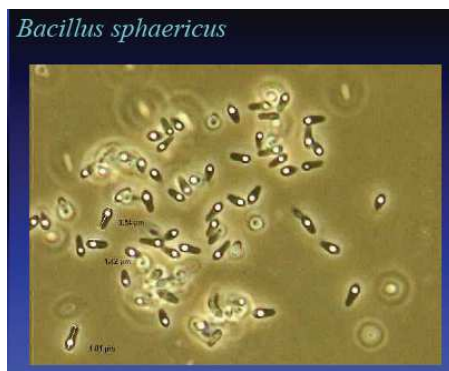
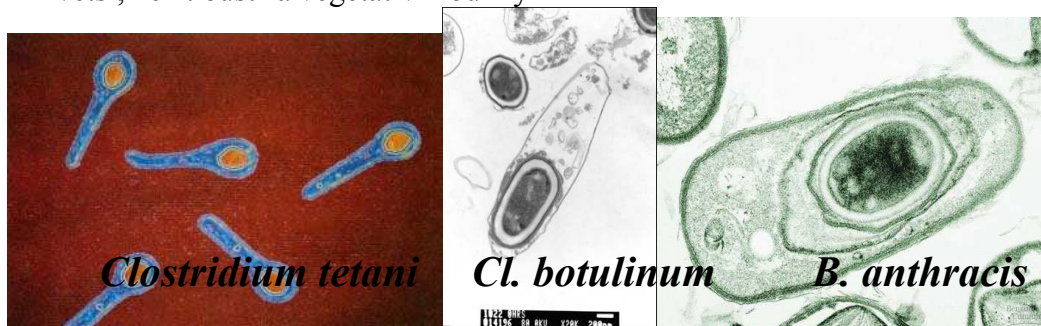
Pro doplnění teorie ke cvičení ke zkoušce:

Pozorování endospor:

Mikroskopie: vysoce světlolomné útvary nepřijímající Gramovo barvivo
Tvar, velikost a uložení – charakteristický znak pro identifikaci

- Oválné - *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *Clostridium botulinum*
 - Kulaté – *Cl. tetani*, *B. sphaericus*
 - Cylindrické, elipsoidní.
- **terminální** = na konci tyčinky (*C. tetani* jakoby paličky, proto byl dřívější název „Plectridium tetani“, pléctron = řec. kladivo), *B. stearothermophilus*
 - **centrální** (*C. histolyticum*, *C. novyi*, *C. septicum*, *B. anthracis*, *B. cereus*)
 - **subterminální** = paracentrálně = mezi středem a pólem buňky, většinou (*C. botulinum*, *C. sporogenes*, *B. brevis*)

Velikost – všimáme si, zda a ve kterém místě spora vyklenuje buňku. Zda je průměr spory větší, než tloušťka vegetativní buňky



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

- sporulující buňky odolávají 2-6 hodin teplotě 100 °C

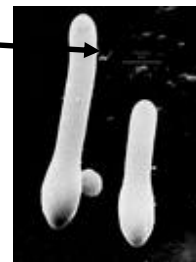
Clostridium botulinum:

- oproti nesporelujícím, které hynou po 30' při 70 °C!
- Spory inaktivovány po 20' při 121 °C vodní páry při
- 2 atm (0,2Mpa) a po 90' - 180' při 160 - 200 °C suchého tepla, vysoce termorezistentní, přežijí až pětihodinový var



Clostridium tetani – tetanus. Ke zničení spor nutno působit 100°C po 90 minut.

Bacillus anthracis – biologická zbraň, anthrax



Spory druhu *Bacillus thuringiensis*:

- používají se jako biopesticidy (cíleně na housenky určitého druhu škůdce)

Stabilizace makromolekul spory:

- přítomnost specifických bílkovin
- ztráta vody a její náhrada vápníkem.

Význam a odolnost spor

Pro bakterii představuje spóra možnost přežít podmínky nevhodné pro život i po tisíce let, jsou také prostředkem šíření bakterií i na značné vzdálenosti a v různém prostředí. Tvorba spory není odpovědí na prostředí, ale přípravou na nepříznivé podmínky. Makromolekuly ve spoře jsou stabilizovány přítomností specifických bílkovin, dále ztrátou vody a její náhradou vápníkem.

Jsou odolné k působení UV záření, záření γ , k vysoušení, lysozymu, teplotním změnám, nedostatku živin a působení mnoha dezinfekčních prostředků. V ethanolu mohou přežít několik měsíců.

Sporicidní látky: ethylenoxid, beta-propionlaktón, koncentrované louhy a kyseliny, formaldehyd při prodloužené expozici, kyselina peroctová – Persteril, jodové preparáty, chloramin.

Většinou je nalézáme ve vodě a půdě, kde mohou přežít až po extrémně dlouhá časová období (1 milion let).

Sporulaci nazýváme proces vzniku (endo)spory.

- Ke studiu sporulace je používáno bakterií rodu *Bacillus*, hlavně *B. subtilis*
- Během sporulace *B. subtilis* můžeme rozlišit **7 fází (I – VII)**, jež lze charakterizovat morfolologicky a na molekulárně biologické úrovni. Za proces vzniku endospory zodpovídá 7 – 8 genů.
- Proces začíná ve fázi G1, v průběhu vzniku přepážky (ne konci G1) je již jasné, zda vznikne vegetativní buňka nebo spora
- Sporulace může být i při max. počtu živin, ale hlavně ve stacionární fázi
- Buňka přechází od binárního dělení ku sporulaci
- V místě přepážky dvojitě vchlípení cytoplazmatické membrány
- Prospora se utváří v tzv. sporogenní zóně. Primárně se přepisují geny, které připraví prostor pro sporu, zvyšuje se kvantum volutinu (= první známka sporulace). Druhým signálem sporulace je zvýšení množství enzymů. Buňka zvyšuje spotřebu acetátu, zvýšení počtu enzymů Krebsova cyklu a hydroláz
- Z biochemického pohledu se na procesu sporulace se podílí amylázy, proteázy, fosfatázy, Dnázy.

- Sporulaci lze zastavit nadbytkem utilizovatelného cukru. Asporulační medium: s glukózou. Jednou odstartovaný proces sporulace již nejde zastavit.
- Proces tvorby začíná replikací DNA a rozbalením bakteriálního chromozomu do dlouhého vlákna. Vchlípením CM se vytvoří septum, které rozdělí buňku na dvě nestejně části. Do obou se rozdělí DNA. Menší část - prespora – se obaluje septem – získá tak dvojitou membránu a ocitá se uvnitř buňky. Mezi membránami vzniká tuhý kortex z peptidoglykanu. Do prespory se vkládá mnoho vápníku a syntetizuje se v ní kyselina dipikolinová. Kalcium dipikolínát je charakteristická složka pouze v endosporách. Pod kortexem vzniká další vrstva peptidoglykanu, na povrchu celé spory pak proteinový obal bohatý na cystein. Světlostlomnost (fázový a Nomarského kontrast). Mateřská buňka se rozpadá, uvolnění spory.

Fáze O

- Mateřská vegetativní buňka (sporangium) přechází z binárního k **asymetrickému dělení**.

Fáze I

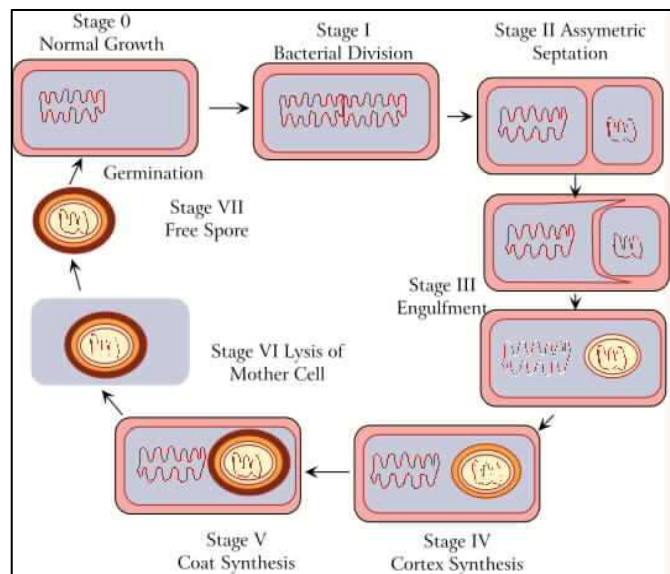
- Tvorba axiálních filament k **rozdělení bakteriálního chromozomu**.

Fáze II

- Je ukončena replikace buněčného genetického materiálu, a ten se následně **roztupuje k pólům buňky**. Končí **invaginace cytoplazmatické membrány**. Přestává fungovat DNA spory, Kroky přebírá druhý nukleoid. Sporogenní zóna je homogenizovaná a zahuštěná. Má vždy jinou hustotu než zbylý obsah buňky.

Fáze III

- Charakterizuje ji **proliferace cytoplazmatické membrány kolem obou vydělených částí buňky**, u spory dochází k zaobalení dvěma membránami – intina a extina (vchlípením cytoplazmatické), vzniká **prospora**.
- Volutinu ubývá
- Hustotou se blíží hustotě spory
- **Není dosud světlostlomná** (refraktilní), nezobrazí se tedy, nesvítí, při mikroskopii ve fázovém kontrastu.



Fáze IV

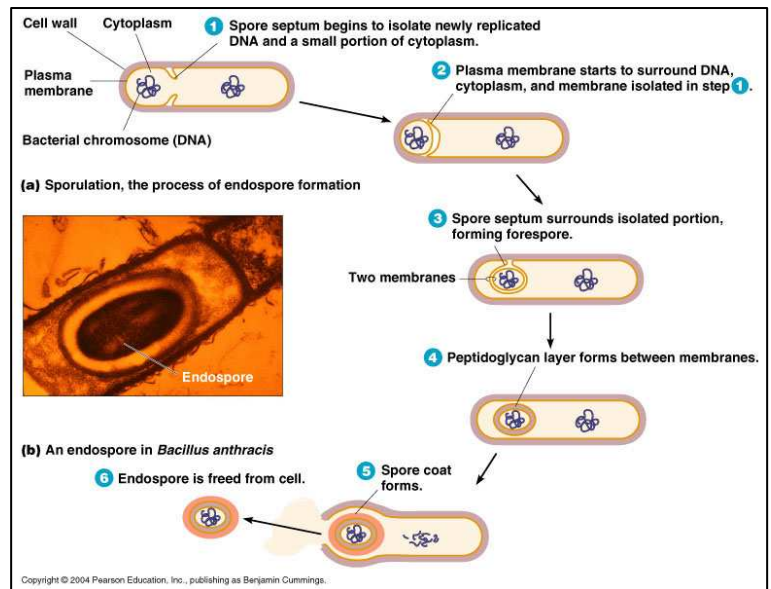
- Tvoří se **kortex** spóry (tvoří jej aktivní chromozom) s peptidoglykanem o složení lišícím se od peptidoglykanu buněčné stěny (viz dále). V momentě vzniku kortexu již dovnitř nepronikne nic než voda. Při vzniku kortexu již minimální obsah volutinu.
- Ve spóře obsažena kyselina dipikolinová (syntetizována mateřskou buňkou, transport; malá molekula; množství regulováno – míra termorezistence. Kyselina stabilizuje kvarterní strukturu DNA ve vazbách) a velké množství Ca^{++} iontů (pro ně není primární transportní systém, transport antiportem).
- Endospora je již **světlostlomná**, se vznikem kortexu již spora nepropustná pro barvivo, obarvitelná až při výstupu par.

Fáze V

- Probíhá syntéza **pláště** – 2 vrstevného, poté dalšího pláště.
- V době vzniku pláště již spora obsahuje minimum vody
- U příslušníků rodu *Bacillus* vzniká **exosporium** složené z deseti proteinů, polysacharidů a lipidů.
- Unikátnost bílkovin pláště: chemotaxonomii

Fáze VI

- **Maturace endospory a lýza mateřské buňky**, uvolnění zralých spór



Fáze VII

- **Volná zralá spora.** Vnější architektura, počet a tvar plášťů závisí na buňce.

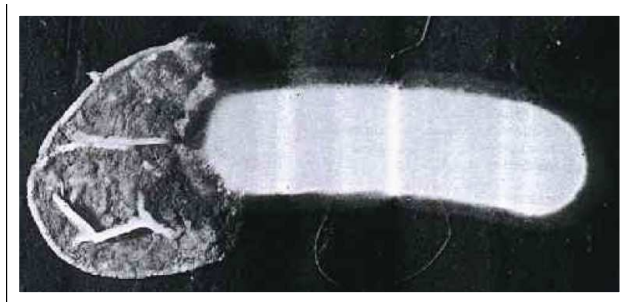
Seznam proteinů zahrnutých do procesu sporulace lze nalézt na adrese <http://expasy.org/cgi-bin/get-entries?KW=Sporulation>.

Jedinečné a charakteristické struktury spory:

Kalcium dipikolinát
Proteiny stabilizující DNA
Kortex
DNA reparační enzymy v procesu germinace

Germinace

Germinací rozumíme rychlý proces klíčení spory. Začíná spontánní aktivací spory.



Klíčení spory *B. cereus*

Aktivace

- destabilizaci pláště – při působení teploty 70-85 °C po 5 – 10 minutách, dalšími aktivátory jsou malé organické molekuly – malé kyseliny, vitaminy, zvýšení počtu bází, L-Ala, Ado a Ino. V laboratořích zahřátí v přítomnosti vody. Aktivovaná spora přijímá vodu a ztrácí rezistenci – bílkovinné stabilizátory jako vnitřní součásti se začínají rozkládat, vzniklé aminokyseliny slouží jako stavební kameny nových proteinů.
- Nejprve ovlivněna proteosyntéza (hlavně degradační enzymy – proto ve spore dostatek Mg)

- V době, kdy buňka tvoří energii začíná fungovat regulační aparát chromozomu (ATP= signál aktivace chromozomu)
- První enzymy – glykosidázy – metabolizování kortexu, poté extiny (fosfolipidy+bílkovina+polysacharid)

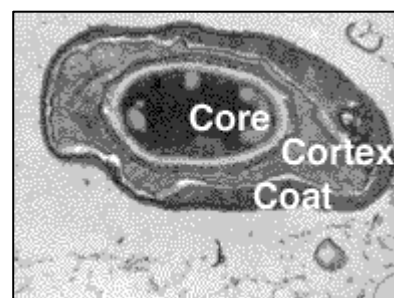
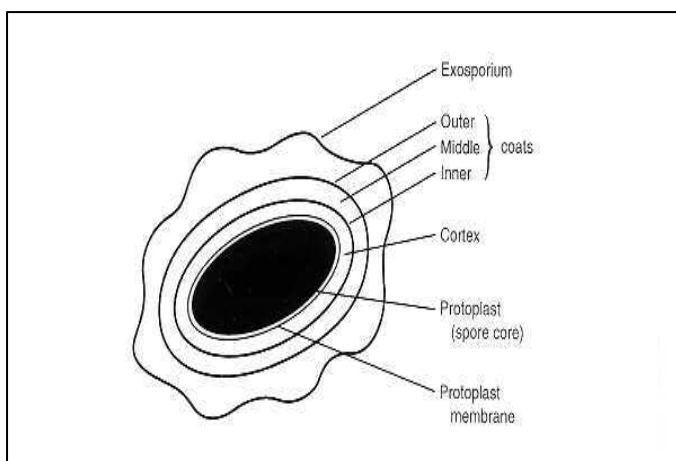
Lytický enzym: p68 => p29 (kortikohydroláza) – depolymerizuje kortex pro nástupný průnik vody. Po dvou hodinách po germinaci spory následuje dělení vegetativní buňky.

Inhibice klíčení: D-Ala, MgCl₂, PMSF

- 1) terminální germinace – na kratším konci spory
- 2) centrální – v podélné ose spory

Stavba zralé spóry

- Jádro – obsahující **sporoplast** či **protoplast** : stroma spóry představuje gelovou matrix, tvořenou bakteriálním jaderným ekvivalentem – nukleoidem, kalciem dipikolinátem (CDPA) nebo pyridin-2,6-dikarboxylovou kyselinou, jež nahrazuje vodu při



udržování kvarterní struktury při vazbách, polyaminy, aminokyseliny a 3-fosfoglycerát; refrakční index činí 1,54.

- **Kortex** Rozlišujeme vnitřní kortex (20% kortexu) či stěnu spóry a zevní kortex (80 % kortexu). Zajišťuje nepropustnost (nebarvitelný!), struktury s nízkým obsahem vody jsou

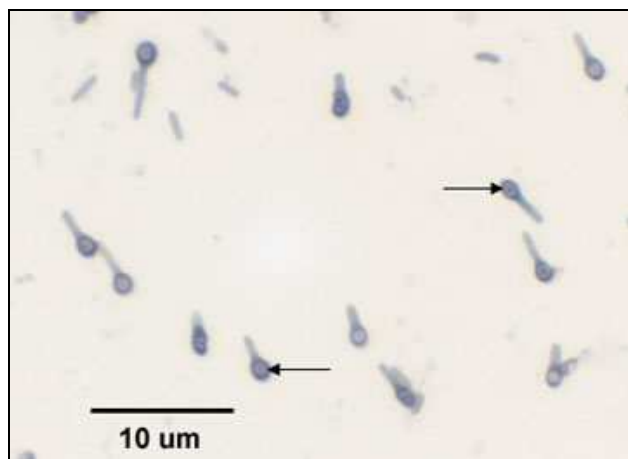
barvitelné dle Wirtze. Refrakční index kortexu činí 1,47. Kortex je tvořen peptidoglykany, leč jen 20-30 % peptidoglykanových jednotek je shodných s jednotkami v buněčné stěně. Zbýlých 50-60 % jednotek představuje N-acetylmuramovou kyselinu modifikovanou na N-acetylmuramyl –laktam, dalších 18-20 % kyseliny N-acetylmuramové je spojeno s L-alaninem namísto tetrapeptidu . Tyto modifikace zajišťují enzymy: membránově vázaná Glu-mesoDmp hydroláza a cytosolová Ac-Ala-Glu-mesoDmp lyáza.

- **Perikortikální membrána**
- **Pláště** složené z proteinů bohatých na cystein (a podobných keratinu), zajišťují odolnost spór k působení chemikálií.
- výše zmíněné **exosporium** u rodu *Bacillus*

Mikroskopie některých sporulujících druhů bakterií:

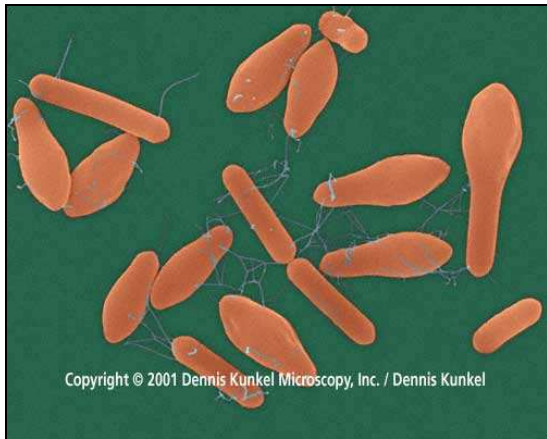


Bacillus cereus

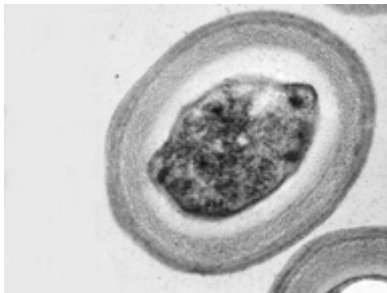


Clostridium tetani – paličky

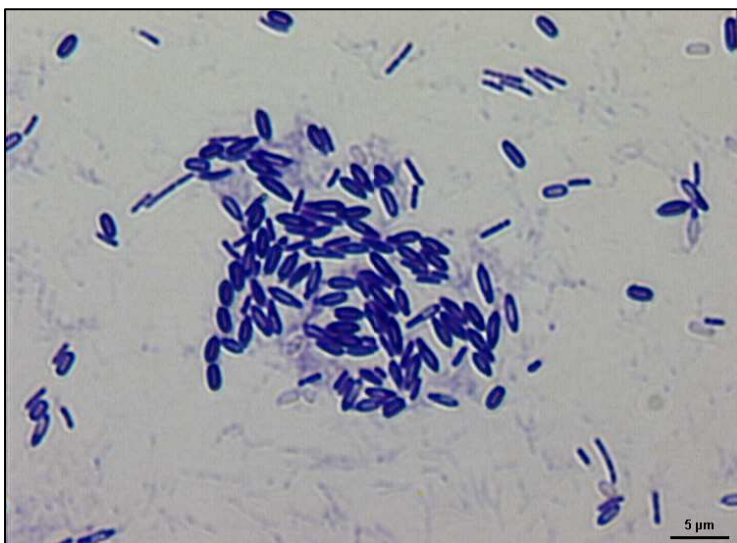
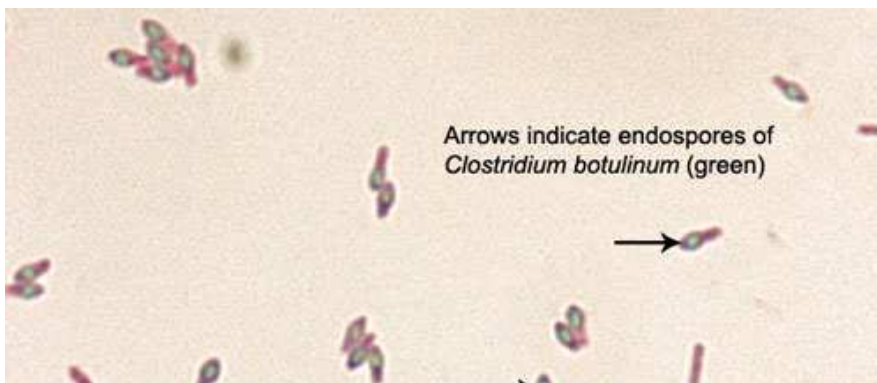




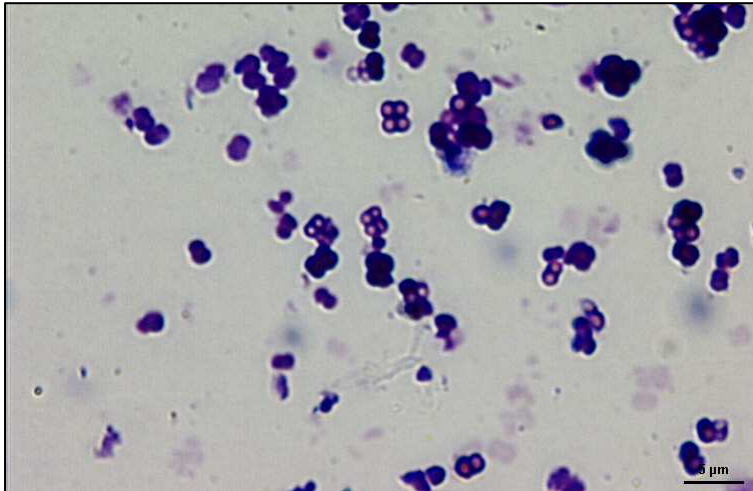
Clostridium botulinum



TEM, spora *Bacillus stearothermophilus*



Paenibacillus polymyxa –
oválné, vyklenující spory



Sporosarcina ureae –
kulaté spory uvnitř
čtveřice (balíčku) buněk