

Protokol č.6
Diferenční barvení bakteriálních endospor
Zvýraznění buněk rodu *Bacillus* negativním barvením

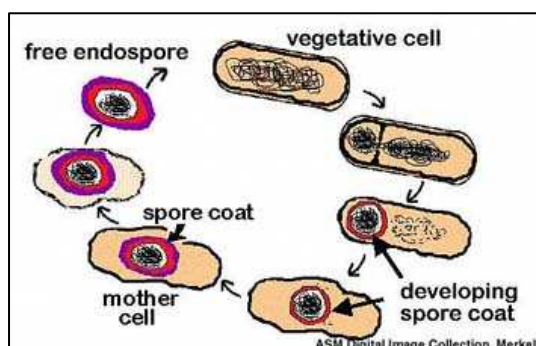
Cíl práce:

Kolik endospor může být přítomno v jedné bakteriální buňce? Proč je jejich barvení problematické? Co má barvení spor společného s barvením acidorezistentním? Který bakteriální rod bude mikroskopován? Jsou negativním barvením barveny buňky?

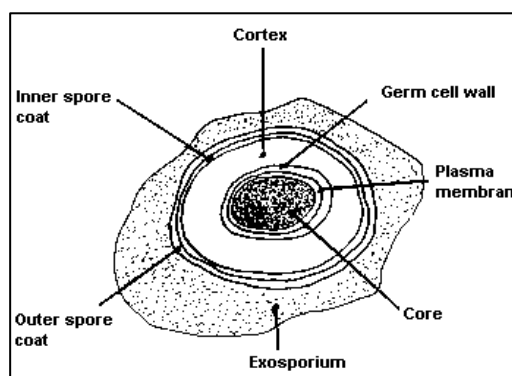
Teoretická část:

Jaké buněčné formy v doménách *Bacteria* a *Archaea* rozeznáváme? Kromě rostoucích a dělících se **vegetativních forem buněk** zde nacházíme i struktury dovolující přežití nepříznivých podmínek. Jsou to **cysty** odolné proti dehydrataci, ne však proti horku (např. u rodů *Azotobacter*, *Myxococcus*, *Sporocytophaga*, kdy je celá buňka obklopena protektivní vrstvou nad buněčnou stěnou). Rody *Metylosinus* and *Rhodomicrobium* vytváří termostabilní **exospory**. **Konidiami** zase nazýváme termosenzitivní asexuální reprodukční struktury produkované různými rody aktinomycet. Konečně **endospory** jsou odolnými klidovými stadii s několika vyjímečnými charakteristikami:

- ❖ Oproti doméně *Eucarya* je v buňce přítomna pouze **jedna endospora**
- ❖ **Peptidoglykan** v kortexu spory je zcela jiného charakteru než peptidoglykan samotné buňky vytvářející sporu
- ❖ Makromolekuly ve spoře jsou stabilizovány přítomností specifických bílkovin, dále ztrátou vody a její náhradou vápníkem (pouze zde unikátní kyselina dipikolinová)
- ❖ Jsou odolné k působení UV a γ záření, vysoušení, lysozymu, teplotním změnám, nedostatku živin a působení mnoha dezinfekčních prostředků. V ethanolu mohou přežít několik měsíců.
- ❖ Vysoká odolnost napomáhá přežít podmínky nevhodné pro život i po tisíce let (?); jsou prostředkem šíření bakterií i na značné vzdálenosti a v různém prostředí. Tvorba spory však **není odpovědí na prostředí, ale přípravou na nepříznivé podmínky**.



Proces vzniku endospory asymetrickým dělením buňky.



endospora

K čemu je barvení endospor dobré? Diagnostické Gramovo barvení určí G+ a G- typ buněčné stěny; souběžné barvení spor u suspektních sporulujících druhů zvýrazní: **tvár a umístění spory v buňce**, což je dalším charakteristickým znakem napomáhajícím identifikaci. Příkladem jsou vždy **oválné** spory *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *Clostridium botulinum*, **kulaté** spory *Clostridium tetani* či *B. sphaericus*, cylindrické či elipsoidní spory dalších druhů. U velikosti spor hodnotíme, **zda a kde vyklenuje buňku**.

Uložení v buňce: terminální = na konci tyčinky (*C. tetani* jakoby paličky),

B. stearothermophilus

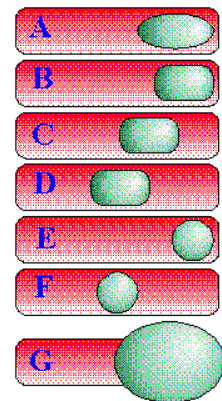
centrální (*C. histolyticum*, *C. novyi*, *C. septicum*, *B. anthracis*, *B. cereus*)

subterminální = paracentrálně = mezi středem a pólem buňky, většinou.

(*C. botulinum*, *C. sporogenes*, *B. brevis*)

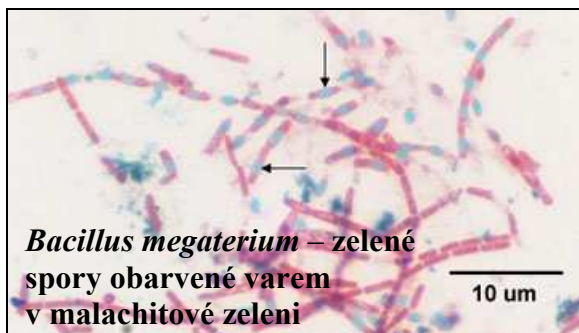
Endospory jsou vytvářeny malým počtem **převážně G+ bakterií** rodů *Bacillus* (aerobní tyčky), *Clostridium*, *Thermoactinomyces*, *Desulfotomaculum* (anaerobní tyčky), *Sporosarcina* (aerobní koky), *Sporolactobacillus*, *Oscillospira*, *Thermoactinomyces*... Výjimečně však endospory nacházíme i u některými G - bakterií! (Př: *Coxiella burnetii*, původce Q-horečky).

Pozorovat neobarvené endospory můžeme **fázovým** (zářící spory) a **Nomarského kontrastem** (plastický povrch buňky); **jednoduchým barvením** nevidíme spory samotné (obarvíme pouze buněčnou stěnu), jen vyklenutí buňky (způsobené přítomností spor). **Přímo obarvit endosporu** ve stadiu vzniku kortexu je možné pouze **za horka** (prospora je však pro barvivo ještě propustná!).



Možné umístění endospory a případné vyklenutí buňky jako identifikační znak

Ve cvičení využijeme dvou typů barvení - strukturálního (diferenciačního) a negativního (obarvení pouze pozadí preparátu - tedy sklíčka). **Strukturální barvení** se používá k identifikaci a studiu bakteriálních struktur, kupříkladu endospor, pouzder, bičíku, inkluzí... Bakteriální **spory špatně přijímají barvivo** vzhledem k rigidnímu špatně propustnému obalu, proto se obarví až během varu (stejně jako např. acidorezistentní bakterie - *Mycobacterium*, které bychom Gramovým barvením neobarvili vzhledem k obsahu mykolových kyselin v buněčné stěně). **Negativním barvením** obarvíme okolí buněk, nikoli buňky samotné. Využívá se pro měření **přesné velikosti** bakteriální buňky. Nabarví se totiž jen pozadí (sklíčko), nikoli buňka samotná. Tím **není velikost buňky deformována** fixací ani barvivem.



Materiál a použité mikroorganismy:

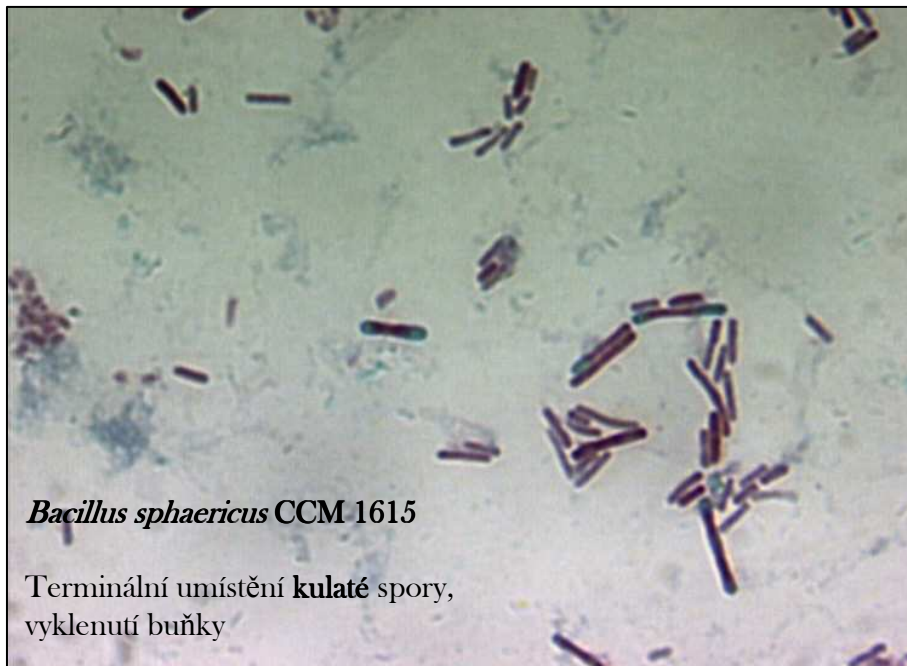
- **Bakteriální kmeny: *Bacillus cereus* CCM 2010.... ??**
- podložní a krycí skla, bakteriologická klička
- stříčka s vodou
- filtrační papír
- sterilní destilovaná voda
- nigrosin (negativní barvení)
- malachitová zeleň, safranin (barvení spor)
- kahan
- pinzeta
- mikroskop (Z 1000x)

Postup:

A. Barvení spor malachitovou zelení - Schaefferova-Fultonova metoda FIXOVANÝ PREPARÁT
--

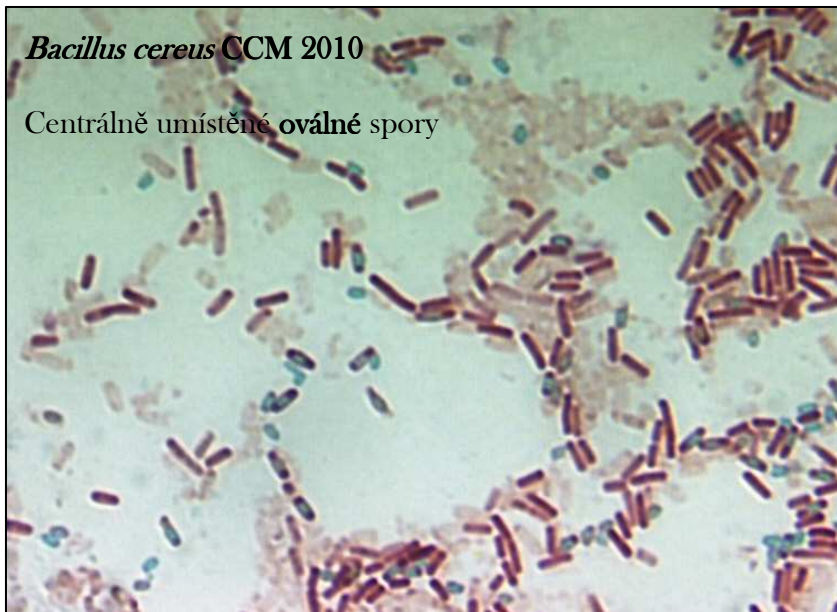
- Uschlý nátěr buněk na sklíčko fixujeme trojím protažením v plameni
- Převrstvíme malachitovou zelení, překryjeme filtračním papírem
- Zahříváme 5 minut do výstupu par, doplňujeme barvivo
- Opláchneme vodou
- Dobarvíme kontrastním barvivem - safraninem nebo kongo - červení (převrstvením 30s)
- Opláchnout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

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



Bacillus cereus CCM 2010

Centrálně umístěné **oválné** spory



B. Negativní barvení buněk nigrosinem

NEFIXOVANÝ PREPARÁT

- asepticky přeneseme 1 kličku bakteriálních buněk do malé kapky destilované vody, vedle se přidá malá kapka nigrosinu
- kapky se rozmíchají kličkou a rozetřou se jemným tahem druhého sklíčka (přiloženého pod úhlem 45° po celé ploše podložního skla), druhé sklíčko ožihneme
- bez oplachování se nechá zaschnout na vzduchu
- důležité: vytvořit jen tenký film barviva s dostatečně zředěnými buňkami.
- pozorujeme pod imerzí (Z 1000x)

Pozorování: zářících buněk na šedém pozadí



Bacillus cereus CCM 2010
nigrosin

Co ovlivňuje výsledek: tloušťka vrstvy barviva (silný nános může po zaschnutí praskat), koncentrace barviva.

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).

Zajímavosti:

Medicínsky a technologicky 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 jsou inaktivovány po 20' při 121 °C vodní páry při 2atm (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
- ❖ biopesticidy - Bt toxin = bílkovina spor *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

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

Sporulací nazýváme proces vzniku (endo)spory.

- ❑ Ke studiu sporulace je používáno bakterií rodu *Bacillus*, hlavně *B. subtilis*
- ❑ Sporulace probíhá i při dostatku živin, hlavně však ve stacionární fázi
- ❑ Během sporulace *B. subtilis* můžeme rozlišit **7 fází (I -VII)**, jež lze charakterizovat morfologicky a na molekulárně biologické úrovni. Za proces vzniku endospory zodpovídá 7 - 8 genů.
- ❑ Proces začíná ve fázi G1, v průběhu vzniku přepážky (na konci G1) je již jasné, zda vznikne vegetativní buňka nebo spora, buňka přechází od binárního dělení ku sporulaci
- ❑ V místě přepážky se dvojitě vchlípí cytoplazmatická membrána
- ❑ Prospora se utváří v tzv. sporogenní zóně. Primárně se přepisují geny, které připraví prostor pro sporu, zvyšuje se kvantum volutinu (= první známka sporulace, zvýšené množství volutinu zjistíme jeho nabarvením). 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.
- ❑ Jednou odstartovaný proces sporulace již nejde zastavit.

Fáze O

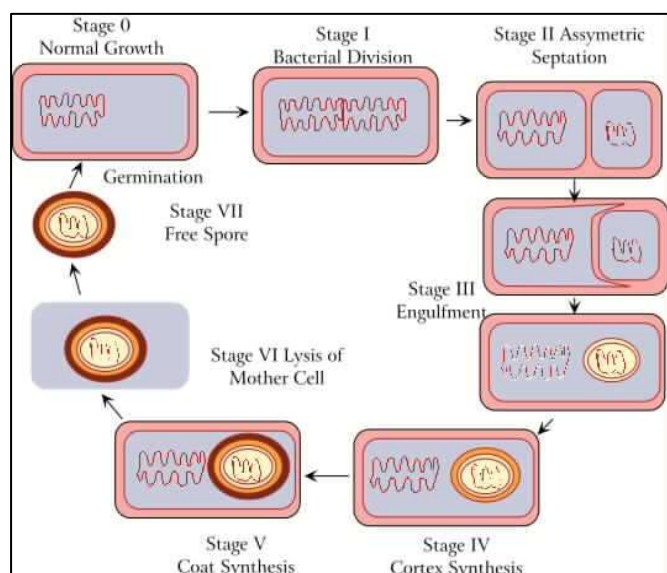
- o Mateřská vegetativní buňka (sporangium) přechází z binárního k **asymetrickému dělení**.

Fáze I

- o Tvorba axiálních filament k rozbalení nukleoidu do dlouhého vlákna a replikaci.

Fáze II

- o Je ukončena replikace buněčného genetického materiálu, a ten se následně **rozestupuje 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 prespory dochází k zaobalení dvěma membránami - intina a extina (vchlípením cytoplazmatické). Vchlípením CM se vytvoří septum, které postupně rozdělí buňku na dvě nestejně části. Do obou se rozdělí DNA. Do prespory se vkládá mnoho vápníku a syntetizuje se v ní kyselina dipikolinová, vzniká **prospora**.
- Volutinu ubývá
- Hustotou se blíží hustotě spory
- **Není dosud světlolomná** (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. 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). Kalcium dipikolínát je charakteristická složka pouze v endosporách. Kyselina stabilizuje kvarterní strukturu DNA (ve vazbách) a velké množství Ca^{++} iontů (pro ně není primární transportní systém, transport antiportem).
- Pod kortexem vzniká další vrstva peptidoglykanu, na povrchu celé spory pak proteinový obal bohatý na cystein. Světlolomnost (fázový a Nomarského kontrast).
- Endospora je již **světlolomná**, 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

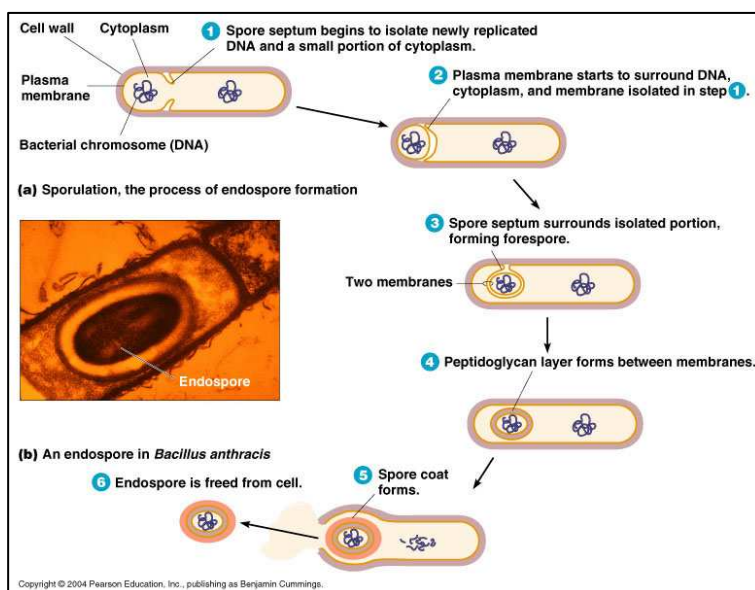
Fáze VI

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

Fáze VII

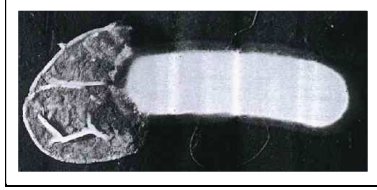
- **Volná** zralá spóra. Vnější architektura, počet a tvar pláště závisí na buňce.

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



Germinace

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



Klíčení spory *B. cereus*

Aktivace

- destabilizací pláště - při působení teploty 70-85 °C po 5 - 10 minutách, dalšími aktivátory jsou malé organické molekuly - malé kyseliny, vitaminy, zvýšení počtu bazí, L-Ala, Ado a Ino. V laboratořích zahřívají 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 spoře 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)

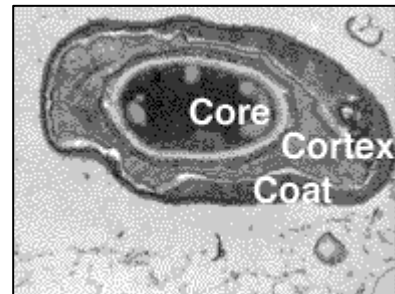
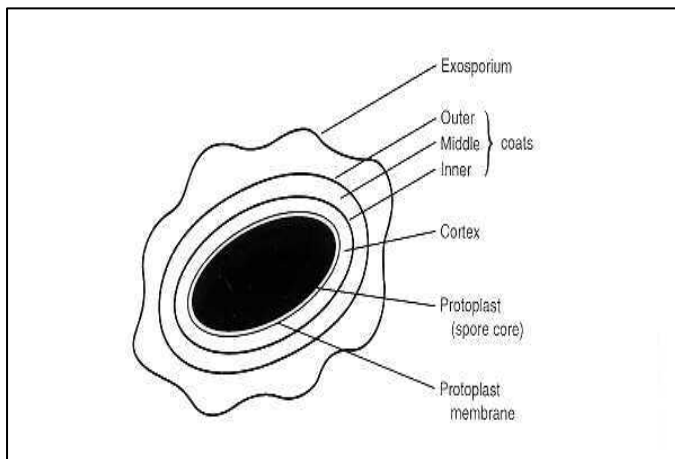
Lytický enzym: p68 => p29 (kortikohydroláza) - depolymerizuje kortex pro nástupný průnik vody. Po dvou hodinách po germinaci spory následuje dělení vegetativní buňky.

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,



nebo pyridin-2,6-dikarboxylovou kyselinou, jež nahrazuje vodu při udržování kvartérní struktury při vazbách, polyaminy, aminokyseliny a 3-fosfoglycerát; refrakční index činí 1,54.

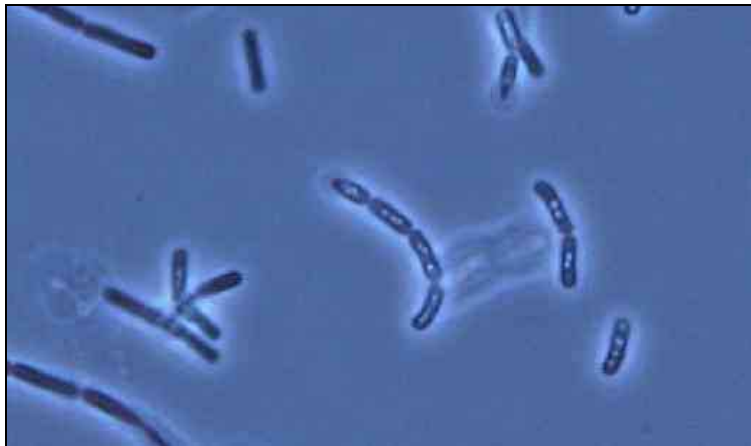
- **Kortex** Rozlišujeme vnitřní kortex (20% kortexu) či stěnu spóry a zevní kortex (80 % kortexu). Zajišťuje nepropustnost (nebarvitelný!), struktury s nízkým obsahem vody jsou barvitelné dle Wirtze. Refrakční

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

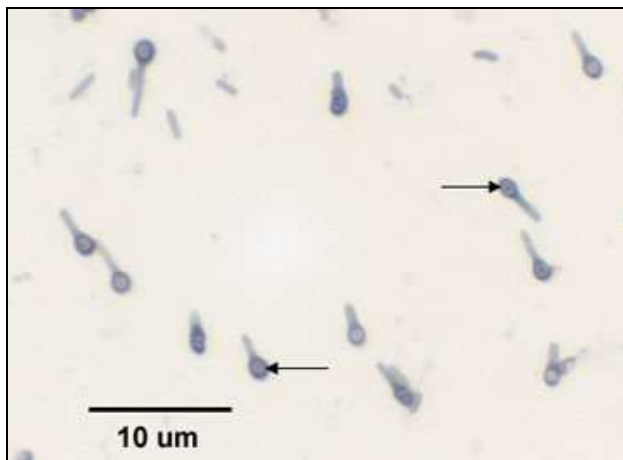
zajišťují enzymy: membránově vázaná Glu-mesoDmp hydroláza a cytosolová Ac-Ala-Glu-mesoDmp lyáza.

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

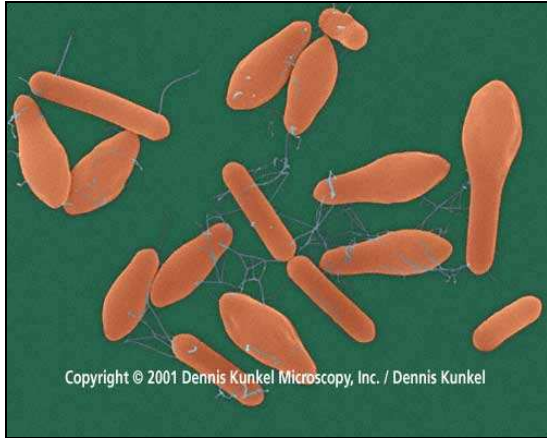
Mikroskopie některých sporulujících druhů bakterií:



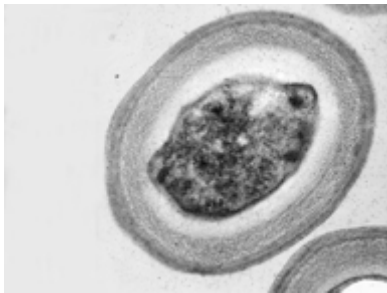
Bacillus cereus



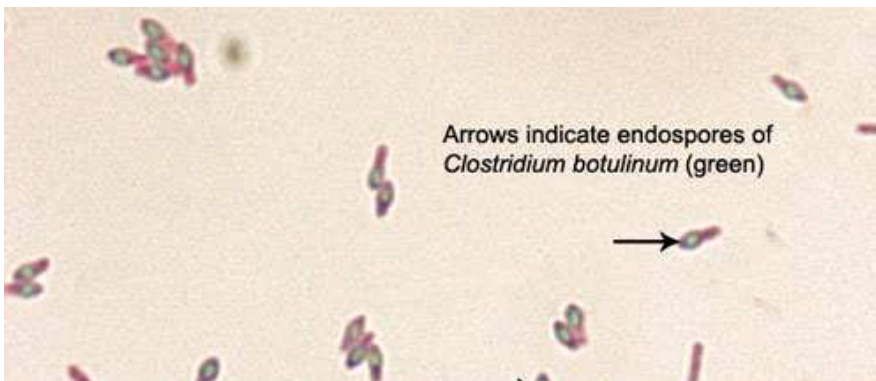
Clostridium tetani - paličky



Clostridium botulinum

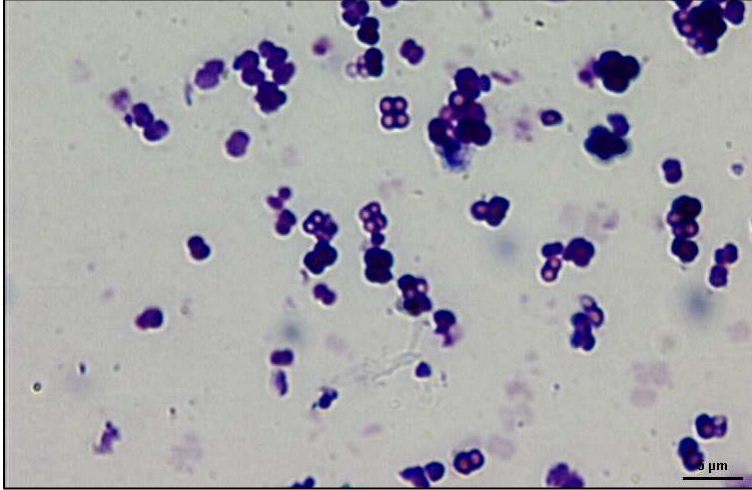


TEM, spora *Bacillus stearothermophilus*



Paenibacillus polymyxa –
oválné, vyklenující spory

v



Sporosarcina ureae –
kulaté spory uvnitř
čtveřice (balíčku) buněk