

## Růstové cykly bakterií

Jednoduché – střídají se dvě stádia

- Rostoucí a klidové
- Přisedlé a volné
- Infekční a reprodukční

Komplexní – s více jak dvěma vývojovými stádii

- Myxobakterie
- Streptomycety

Růstové cykly vedoucí ke vzniku diferencovaných populací

- Sinice-Anabaena

### **Buněčné formy:**

**Vegetativní** – růst a binární dělení (formování mezozomu, septa). Buněčný cyklus trvá průměrně 20 minut, ale podle podmínek růstu se může svou délkou lišit (10 minut u rodu *Beneckea* a více než 24 hodin u *Mycobacterium leprae*. Je třeba mít na paměti, že dělení *in vitro* je kratší než procesy *in vivo*.

DNA translokáza FtsK (tři domény  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ ) umístěná v septu koordinuje segregaci chromozomu s buněčným dělením. Rychlá translokace DNA pomocí FtsK je řízena motivy 8bp (KOPS).

**Spící formy:** nedělí se

**Struktury** dovolující přežití za nepříznivých podmínek:

- ❖ (endo)spory – při hladovění na zdroje uhlíku a dusíku.
- ❖ Cysty – (např. u rodů *Azotobacter*, *Myxococcus*, *Sporocytophaga*), kdy je celá buňka obklopena protektivní vrstvou. Vznikají ukládáním vrstev nad buněčnou stěnu. Jsou odolné proti dehydrataci, ne však proti horku. Jsou často přítomny u procesů fixace dusíku a při ochraně buňky.
- ❖ Exospory (*Metylosinus* and *Rhodomicrobium*)- termostabilní
- ❖ Konidie – termosenzitivní asexuální reprodukční struktury produkované různými rody aktinomycet

### **Jednoduché růstové cykly**

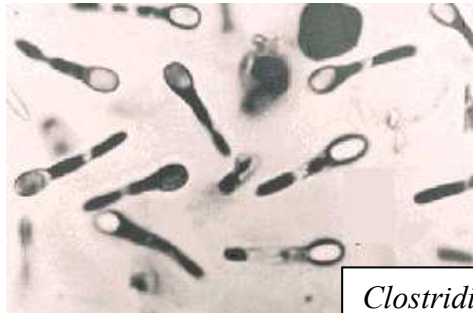
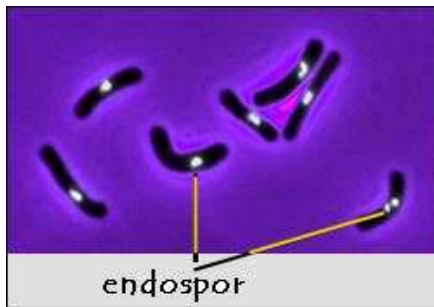
**Vegetativní a klidové stádium – tvorba spor**

- G+ bakterie-endospory
  - Termorezistentní
  - *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporosarcina*, *Sporolactobacillus*, *Thermoactinomyces*
- G-bakterie- exospory
  - Odolné především vůči vysychání, fyzikálnímu poškození a změnám
  - Rezistence zdaleka nedosahuje rezistence endospor
  - *Azotobacter*, *Methylosinus*
- Chlamydie
  - Elementární tělíska-malá, rezistentní, nerostoucí
  - Retikulární tělíska- vegetativní - růst a rozmnožování

## Endospora, sporulace

**Endospora** je dormantní („spící“), odolná, nereproduktivní struktura tvořená malým počtem převážně G<sup>+</sup> bakterií rodů *Bacillus* (aerobní tyčky), *Clostridium*, *Thermoactinomyces* a *Desulfotomaculum* (anaerobní tyčky), *Sporosarcina* (aerobní koky), *Sporolactobacillus*, *Oscillospira*, *Thermoactinomyces*, ale také některými G<sup>-</sup> bakteriemi (*Coxiella burnetii*). Objevují se přibližně 6 – 8 hodin po ukončení logaritmické fáze růstu.

Rozdílný je vznik spor např. rodu *Streptomyces* – vznikají přeměnou zvláštních vícejaderných vláken – nejsou tedy endosporami.



*Clostridium difficile*

### 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  $\gamma$ , k vysoušení, lysozymu, teplotním změnám, nedostatku živin a působení mnoha dezinfekčních prostředků. V ethanolu mohou přežít několik měsíců.

Sporicidní látky: ethylenoxid, beta-propionlakton, 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).

Medicínsky 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 transgen -*Bacillus thuringiensis* var.*israelensis*

### Morfologie

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

**Oválné** - *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *Clostridium botulinum*

**Kulaté** – *Clostridium tetani*, *B. sphaericus*

**Cylindrické, elipsoidní.**

Velikost – všímáme si, zda a ve kterém místě spora vyklučuje buňku. Zda je průměr spory větší, než tloušťka vegetativní buňky (rozšíření: *C. botulinum*, *C. tetani*, *Bacillus stearothermophilus*; mírné rozšíření: *C. histolyticum* a *C. novyi*). U některých druhů spora buňku nezduřuje: *B. anthracis*, *B. cereus*.

Uložení v buňce: 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*)

## Barvení

Spory vykazují acidorezistenci.

Obdobné postupu barvení acidorezistentních tyčinek (barvení za horka). Poté vzdorují odbarvování i roztokem HCl+ethanol.

### **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 morfologicky 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 prepisují 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 dipikolinát je charakteristická složka pouze v endosporách. Pod kortexem vzniká další vrstva peptidoglykanu, na povrchu celé spory pak proteinový obal bohatý na cystein. Světlostlomitelnost (fázový a Nomarského kontrast). Mateřská buňka se rozpadá, uvolnění spory.

### Fáze O

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

### Fáze I

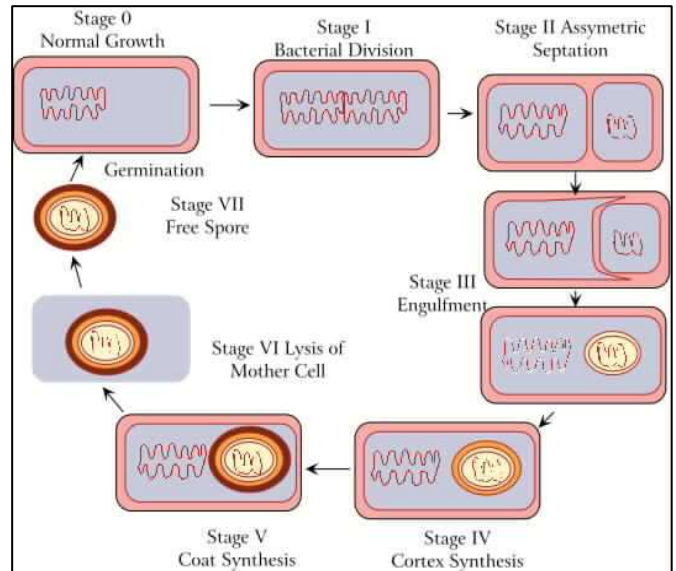
- Tvorba axiálních filament k **rozdělení bakteriálního chromozomu**.

### Fáze II

- Je ukončena replikace buněčného genetického materiálu, a ten se následně **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 spory dochází k zaobalení dvěma membránami – intina a extina (vchlípením cytoplazmatické), vzniká **prospora**.
- Volutinu ubývá
- Hustotou se blíží hustotě spory
- **Není dosud světlolomná** (refraktilní), nezobrazí se tedy, nesvítí, při mikroskopii ve fázovém kontrastu.

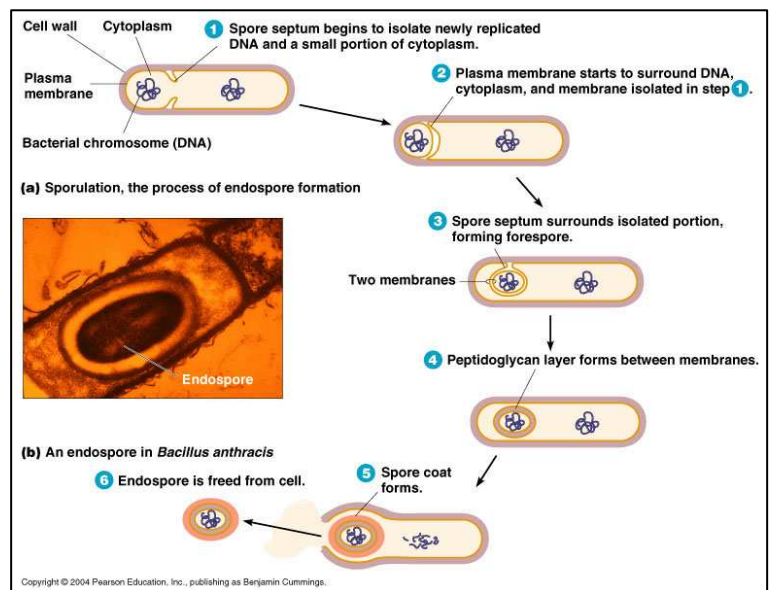


### Fáze IV

- Tvoří se **kortex** spóry (tvoří jej aktivní chromozom) s peptidoglykanem o složení lišícím se od peptidoglykanu buněčné stěny (viz dále). V momentě vzniku kortezu 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  $\text{Ca}^{++}$  iontů (pro ně není primární transportní systém, transport antiportem).
- 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 pláštěů 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.

### **Aktivace**

- destabilizací 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 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.

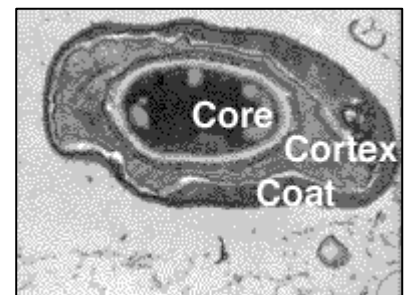
Inhibice klíčení: D-Ala, MgCl<sub>2</sub>, PMSF

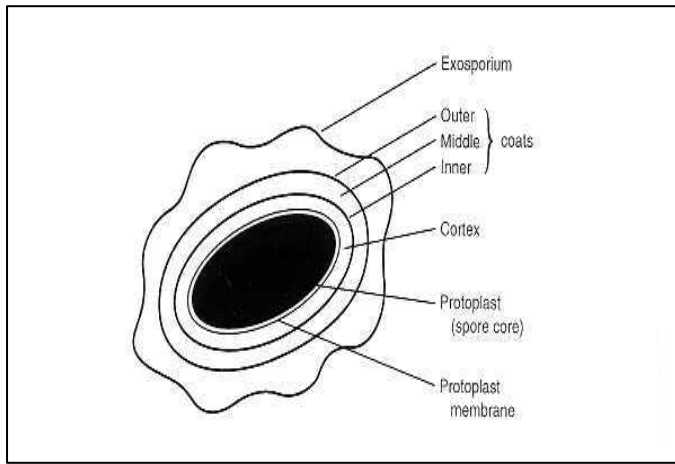
1) terminální germinace – na kratším konci spory

2) centrální – v podélné ose spory

## Stavba zralé spóry

- Jádro – obsahující **sporoplast** či **protoplast** : stroma spóry představuje gelovou matrix, tvořenou bakteriálním jaderným ekvivalentem – nukleoidem, kalcium 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.

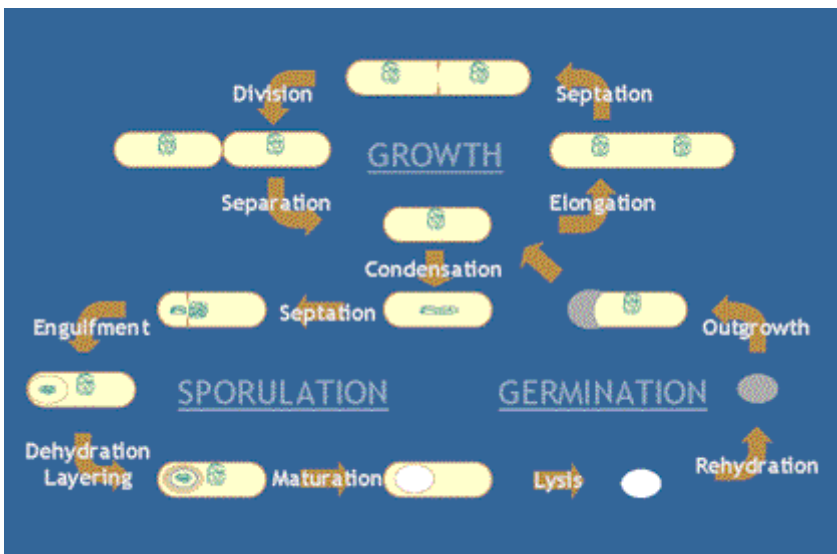




- **Kortex** Rozlišujeme vnitřní kortex (20% kortexu) či stěnu spóry a zevní kortex (80 % kortexu). Zajišťuje nepropustnost (nebarvitelný!), struktury s nízkým obsahem vody jsou barvitelné dle Wirtze. Refrakční index kortexu činí 1,47. Kortex je tvořen peptidoglykany, leč jen 20-30

% 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*

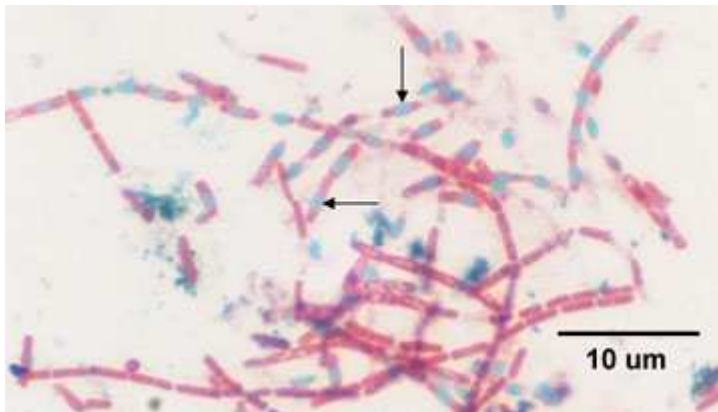


depletion of environmental energy sources causes a fall in  $[GTP]_i$  and accumulation of ppGpp, ppGppp (stringent factors) and ppAppp : such events cause the chromosome to relax itself into an axial filament and duplicate itself, duplicating even its origin. At this stage some species produce antibiotics<sup>+</sup>. All these modifications are reversible. Bacterial transcription is regulated by the alarmone ppGpp, which binds near the catalytic site of RNA polymerase (RNAP) and

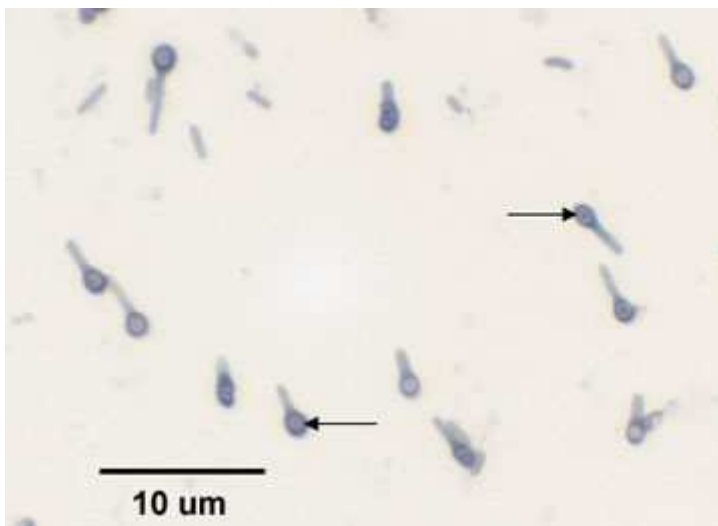
modulates its activity. DksA protein is a crucial component of ppGpp-dependent regulation. The 2.0 Å resolution structure of *Escherichia coli* DksA reveals a globular domain and a coiled coil with 2 highly conserved Asp residues at its tip that is reminiscent of the transcript cleavage factor GreA. This structural similarity suggests that DksA coiled coil protrudes into the RNAP secondary channel (the "backdoor of gene expression") to coordinate a ppGpp bound  $Mg^{2+}$  ion with the Asp residues, thereby stabilizing the ppGpp-RNAP complex. Biochemical analysis demonstrates that DksA affects transcript elongation, albeit differently from GreA; augments ppGpp effects on initiation; and binds directly to RNAP, positioning the Asp residues near the active site. Substitution of these residues eliminates the synergy between DksA and ppGpp. Thus, the secondary channel emerges as a common regulatory entrance for transcription factors<sup>ref</sup>.

before the terminus of the chromosome is duplicated, an asymmetric membranaceous sporal sept irreversibly divides the cell into a major (sporangium) and a minor (forespore) compartment.

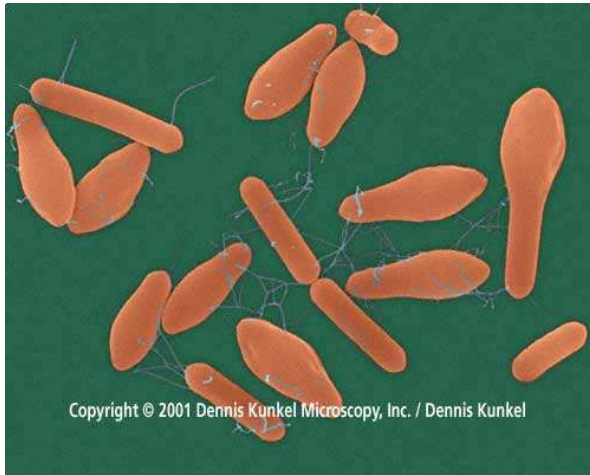
the sporangium endocytoses the prespore (then called anterior chamber of the spore), that in such a way becomes surrounded by 2 bilayers whose inner layers are facing up. Such a polarity guarantees the deposition of peptidoglycan in the intermembrane space. DPA is synthesized in the sporangium and actively imported into the future spore : acting as a buffer, it drives the passive influx of  $\text{Ca}^{2+}$ . 80 genes (grouped into 4 families : *spo*, *ger*, *ssp* and *cot*) are needed for sporulation. Spore specific proteins are synthesized thanks to specific  $\sigma$  subunits in RNA polymerase :  $\sigma^E$  and  $\sigma^F \Rightarrow \sigma^G$  in the forespore &  $\sigma^K$  in the sporangium.



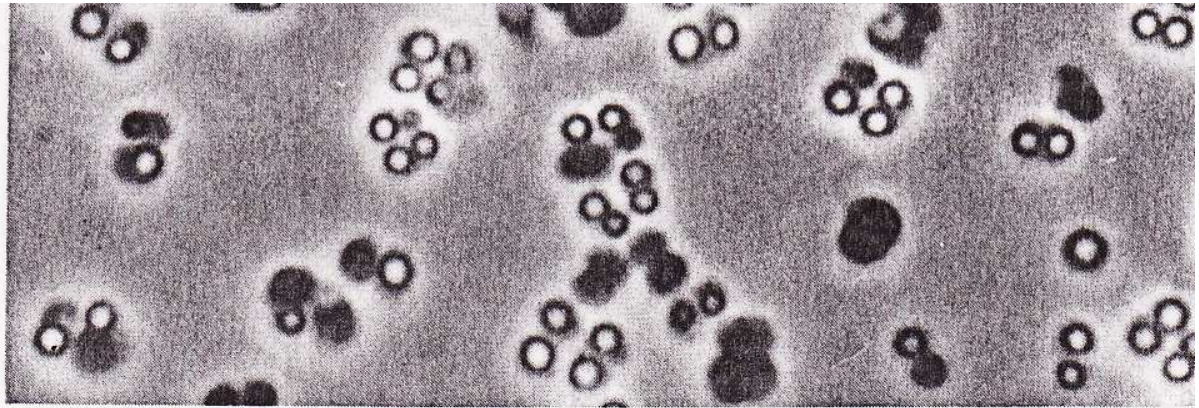
***Bacillus megaterium***



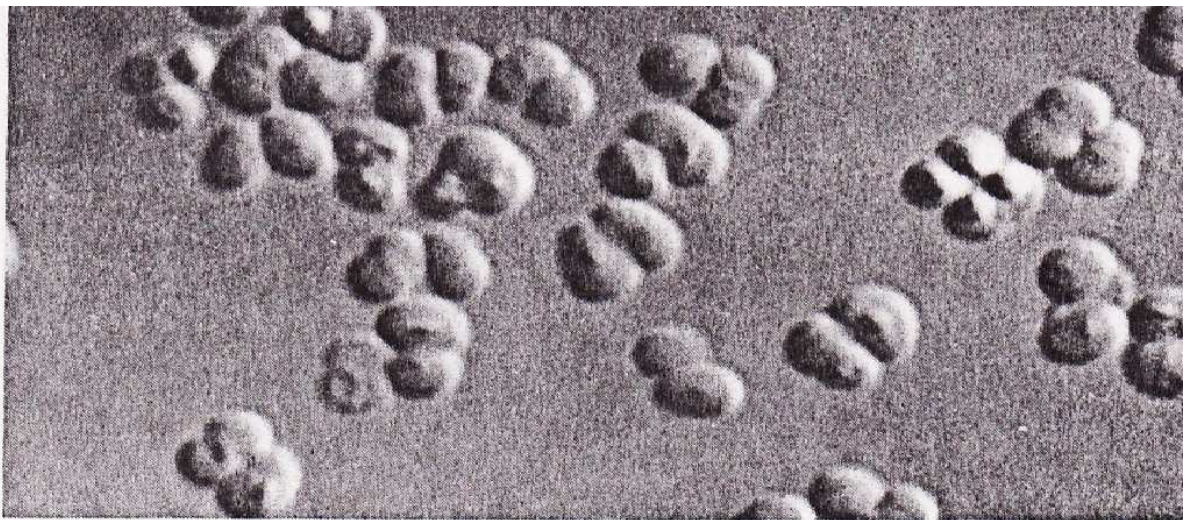
***Clostridium tetani***



*Clostridium botulinum*



**Figure 13.91.** *S. ureae*. Endospores. Phase contrast ( $\times 2000$ ).

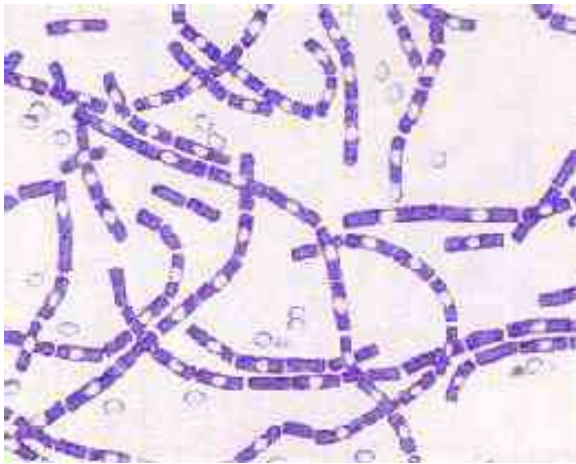


**Figure 13.90.** *S. halophila*. Same preparation as in Fig. 13.89. Marski differential interference contrast ( $\times 2000$ ).

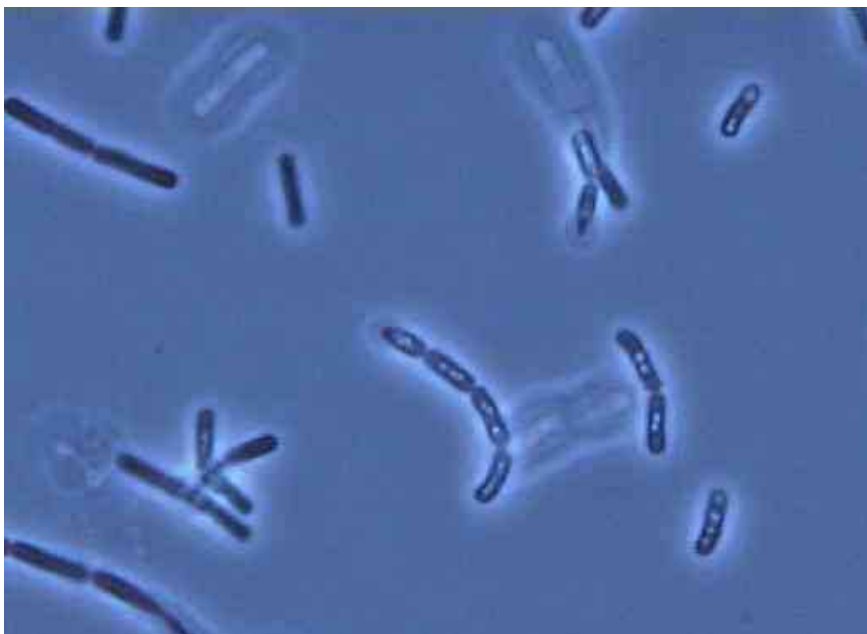




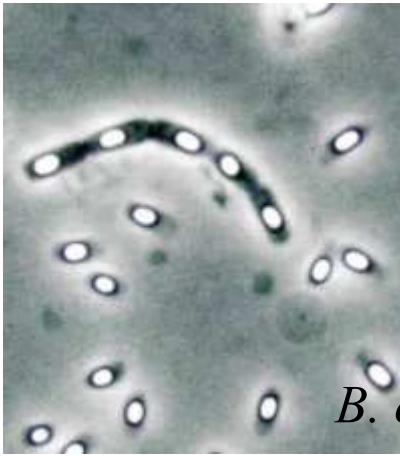
*Bacillus sphaericus*



*Bacillus anthracis*



*Bacillus cereus*



*B. cereus*

### Metody pozorování:

#### 1) po barvení

- malachitovou zelení - Schaefferova-Fultonova metoda  
- Wirtzovo a Conklinovo barvení
- Möllerova metoda
- Ziehl-Neelsenovým roztokem - karbolfuchsin

#### 2) fázovým kontrastem

### Nomarského kontrastem

endospory není možné snadno odbarvit. Mnohé bakterie vylučují chemikálie, které přilnou k jejich povrchu a vytvářejí viskózní povlak. Je-li tato struktura okrouhlá nebo oválná, pak se nazývá **pouzdro**. Je-li nepravidelného tvaru a volně připojená k bakteriální stěně, pak se jedná o **slizovou vrstvu**. Schopnost vytvářet pouzdro je dána geneticky, ale velikost pouzdra je ovlivněna médiem, na kterém bakterie roste. Většina pouzder je tvořena polysacharidy, které jsou rozpustné ve vodě a nenabitě (neváží iontová barviva). Většina barvicích technik využívá barvení bakterií a pozadí, pouzdro zůstává bezbarvé. Bičinky (flagely) jsou proteinové struktury sloužící k pohybu bakterií. Bičinky jsou velmi křehké a nejsou viditelné pod světelným mikroskopem. Přítomnost a rozmístění bičiček jsou důležité znaky pro identifikaci a klasifikaci bakterií. Podle rozmístění rozeznáváme bičinky peritrichální (všude kolem bakterie) a polární (na jedné nebo obou stranách buňky).

#### D. Barvení endospor

- a. Natřete a fixujte různě staré kultury *B. subtilis* (24 h, 48 h v bujonu, starou kulturu na agaru).
- b. Nátěr zakryjte malým kouskem filtračního papíru (menší než podložní sklo).
- c. Převrstvěte malachitovou zelení (pozor: velmi barví všechno kolem!!!) a umístěte nad páru po dobu 10 minut. Přidávejte barvivo podle potřeby. Udržujte vlhké.
- d. Pinzetou odstraňte opatrně papír, opláchněte destilovanou vodou.
- e. Překryjte na 30 s vrstvou safranínu (roztok 2).
- f. Opláchněte destilovanou vodou a osušte filtračním papírem.
- g. Pozorujte pod mikroskopem imerzním objektivem. Spory jsou zbarveny zeleně, ostatní buněčný obsah červeně.

Zdroje:

<http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/leguide/unit1/prostruct/spore.html>

[focosi.immunesig.org/physiobacteria.html](http://focosi.immunesig.org/physiobacteria.html)

<http://www.bgsc.org/cycle.gif>

<http://www.fao.org/docrep/t0533e/T0533E06.gif>

<http://www.biodeug.com/cours/microbio/2015.gif>

