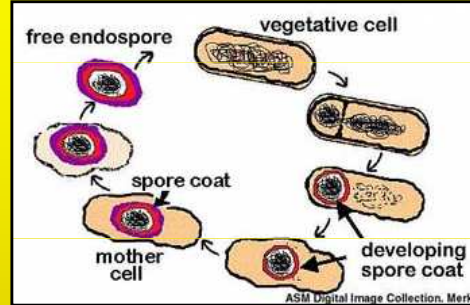
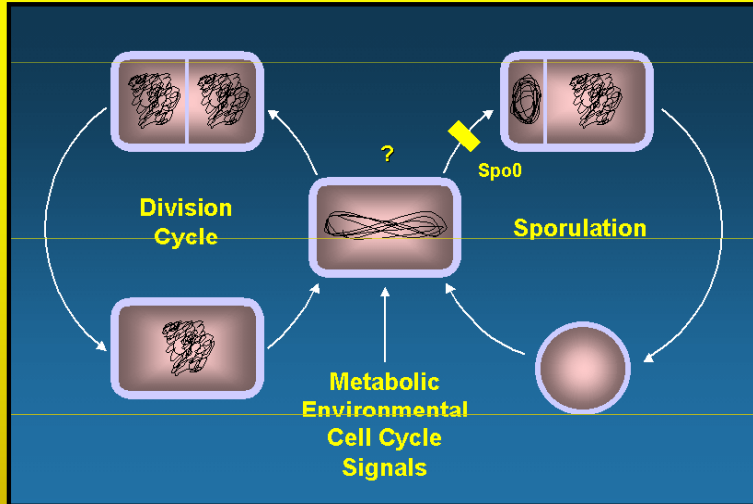
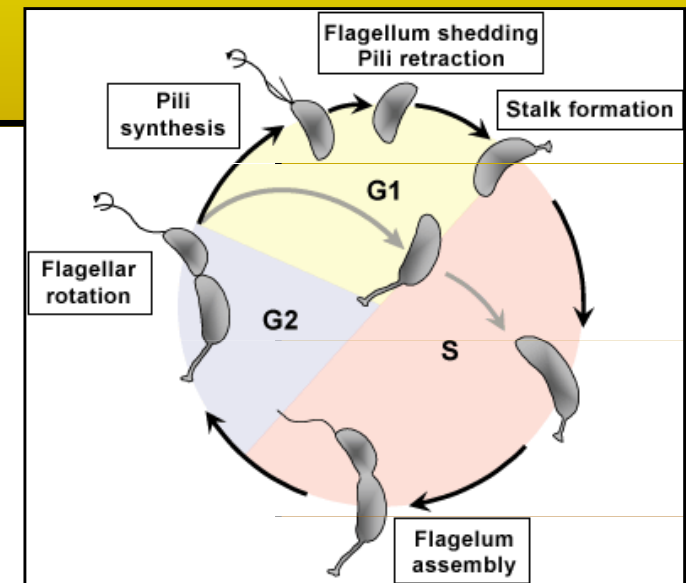
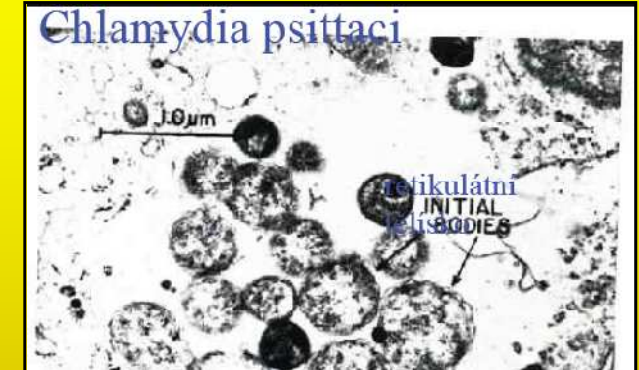


Růstové cykly bakterií



Tvorba spory

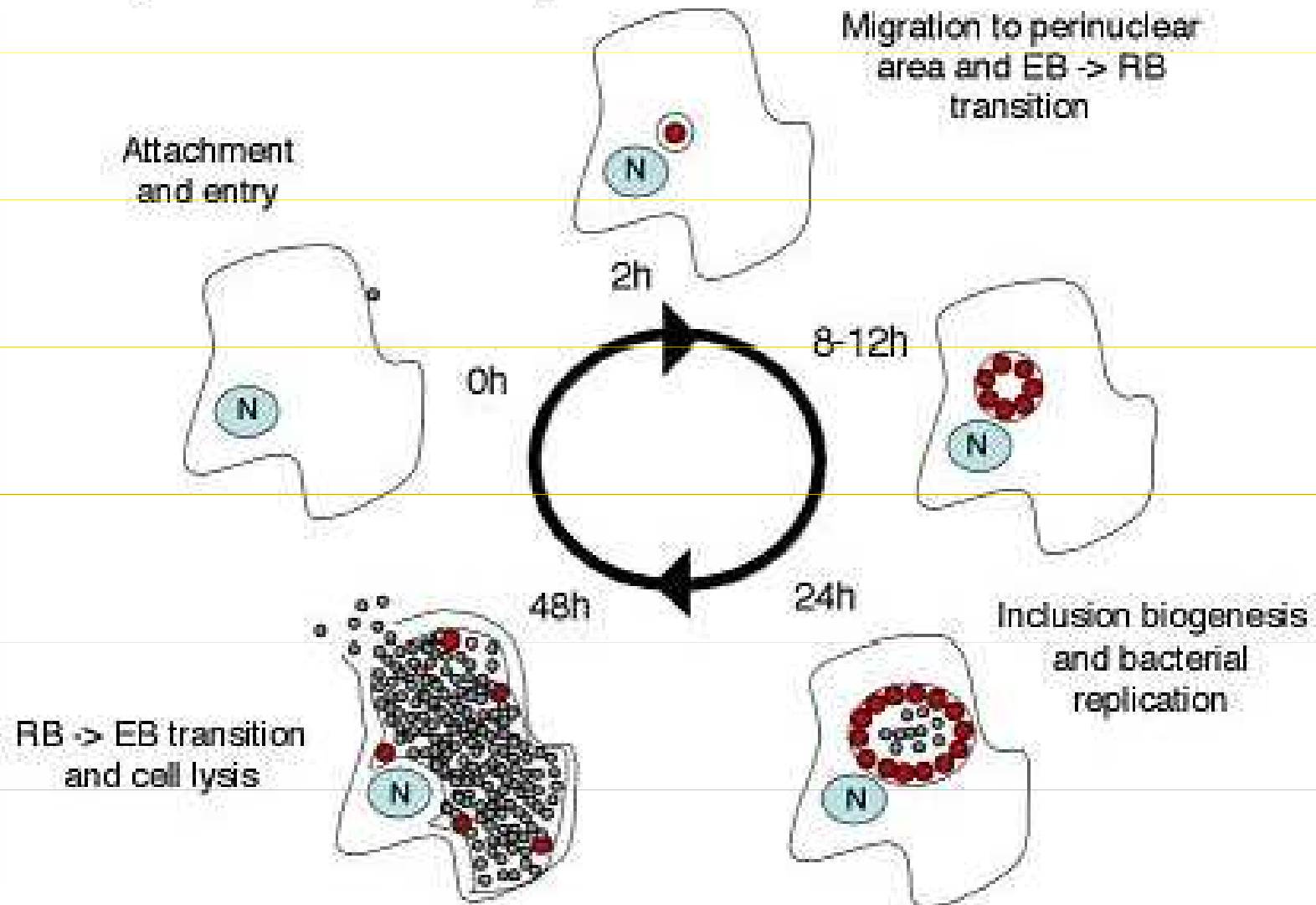


Buněčný cyklus
*Caulobacter
crescentus*

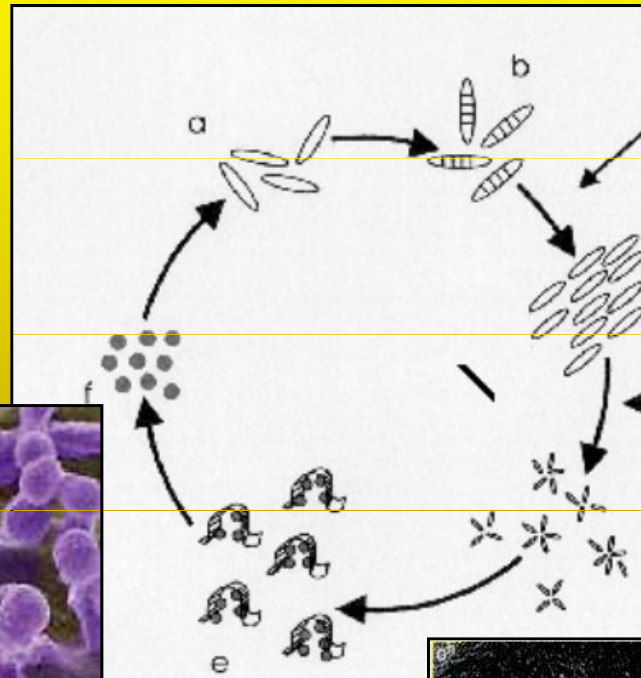
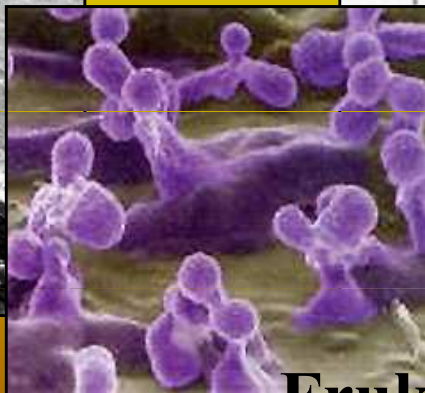
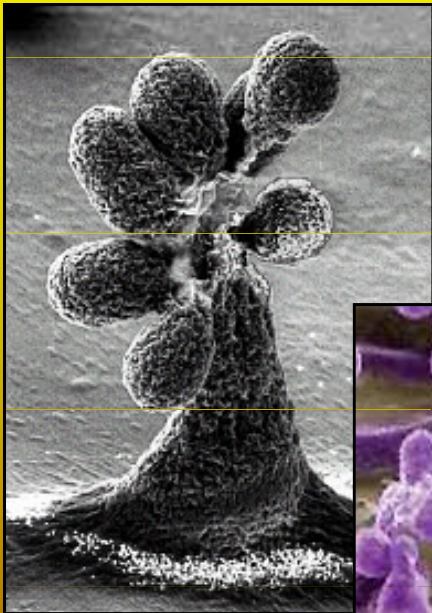
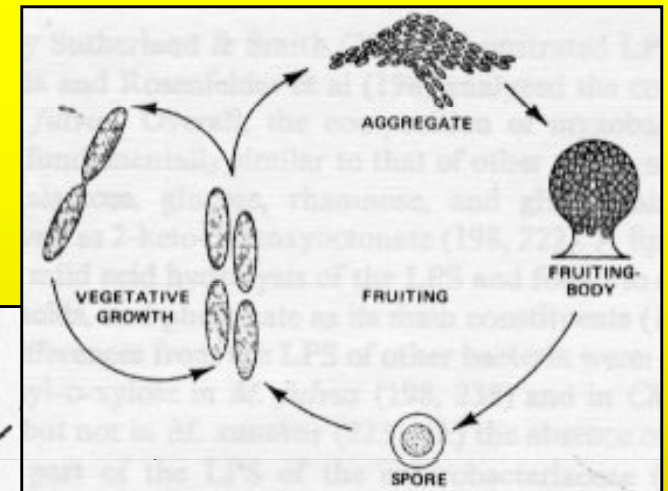
Růstové cykly bakterií

- 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*

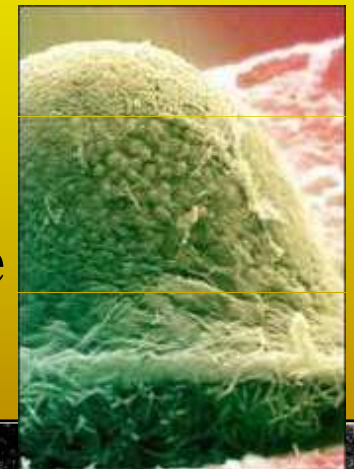
Chlamydia Infectious Cycle



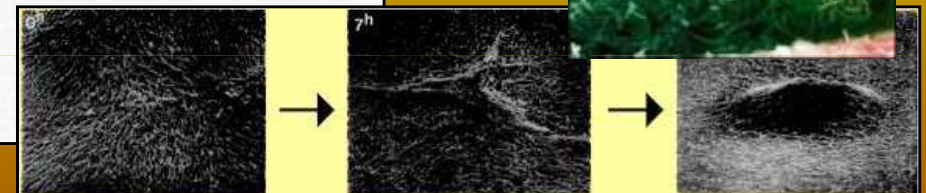
Komplexní růstový cyklus myxobakterií



Agregace buněk

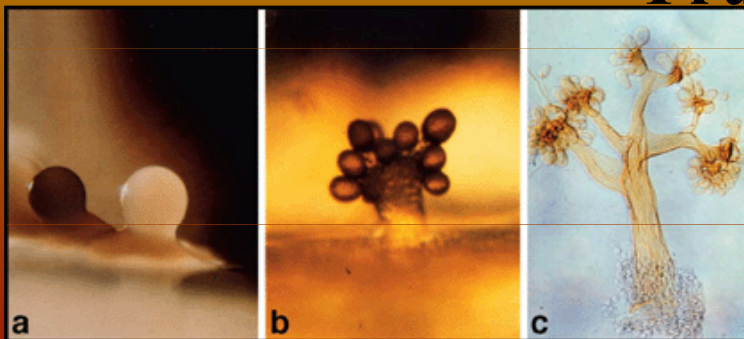


Fruktifikační orgány



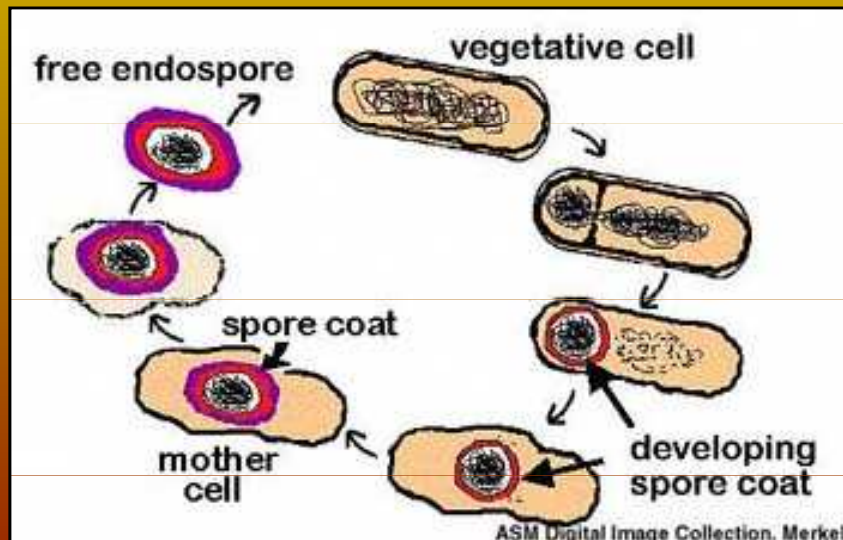
Plodnice rodu

Myxococcus



Jednoduché růstové cykly

- Důvodem je adaptace či příprava (u sporulace) na změny podmínek životního prostředí
- U parazitů: přechod z prostředí těla vyšších organismů ven



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

- rostoucí a dělicí se vegetativní formy buněk
- struktury dovolující přežití nepříznivých podmínek (cysty odolné proti dehydrataci, ne však proti horku - *Azotobacter*, *Myxococcus*, *Sporocytophaga*, kdy je celá buňka obklopena protektivní vrstvou nad buněčnou stěnou)
- rody *Metylosinus* and *Rhodomicrobium* vytváří termostabilní exospory.
- Konidie - termosenzitivní asexuální reprodukční struktury produkované různými rody aktinomycet
- endospory - odolná klidová nereproduktivní stadia s několika vyjímečnými charakteristikami

Vegetativní a klidové stadium

Tvorba spor

Fázový kontrast



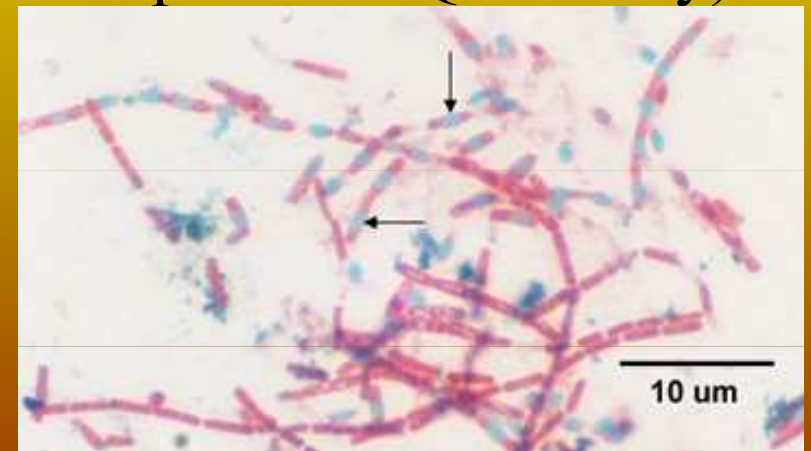
- převážně G+ bakterie
- termorezistentní endospory
Bacillus (aerobní tyčky), *Clostridium*, *Thermoactinomyces* a *Desulfotomaculum* (anaerobní tyčky), *Sporosarcina* (aerobní koky), *Sporolactobacillus*, *Oscillospira*, *Thermoactinomyces*
- Výjimečně i G- bakterie (*Coxiella burnetii*, původce Q-horečky).

- G- bakterie - exospory

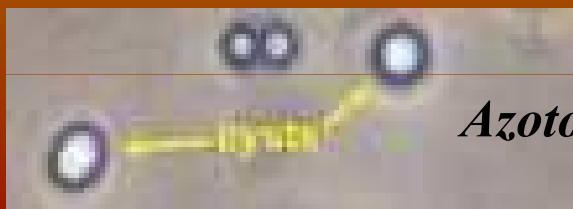
Méně rezistentní, odolné zejm. vůči

vysychání *Azotobacter*,

Methylosinus



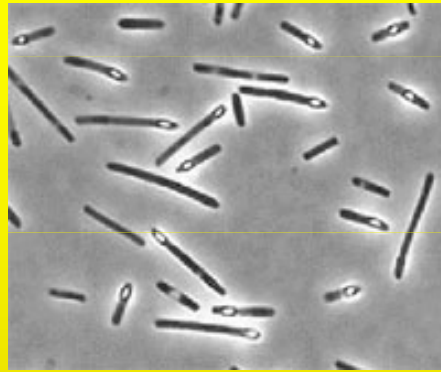
Bacillus megaterium – zelené spory obarvené varem v malachitové zeleni c



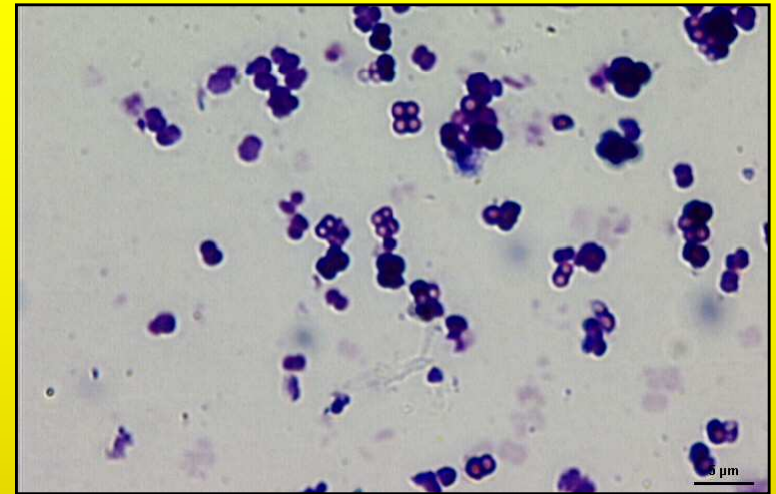
Azotobacter – cysty



Clostridium difficile



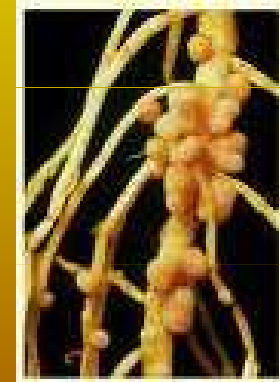
C. perfringens



Sporosarcina ureae –
kulaté spory uvnitř
čtveřice (balíčku) buněk



Azotobacter – pouzdra, cysty



Endospora, sporulace



... s několika vyjímečnými charakteristikami...

- Oproti doméně *Eucarya* v buňce přítomna pouze **jedna endospora**
- **Peptidoglykan** v kortexu spory je zcela jiného charakteru než peptidoglykan samotné buňky vytvářející sporu
- **Stabilizace makromolekul** ve spoře: přítomností specifických bílkovin, dále ztrátou vody a její náhradou vápníkem (pouze zde přítomna v přírodě unikátní kyselina dipikolinová)
minimální obsah vody ----- minimální metabolismus
- **Vysoká odolnost** napomáhá přečkat podmínky nevhodné pro život i po tisíce let (?); jsou prostředkem šíření bakterií i na značné vzdálenosti a v různém prostředí.

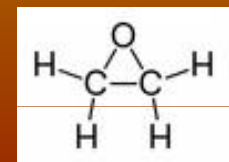


- Tvorba endospory však není odpovědí na prostředí, ale přípravou na nepříznivé podmínky.

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

- Sporicidní látky:

ethylenoxid, β -propionlakton, koncentrované louhy a kyseliny, formaldehyd při prodloužené expozici, kyselina peroctová – Persteril, jodové preparáty, chloramin.



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

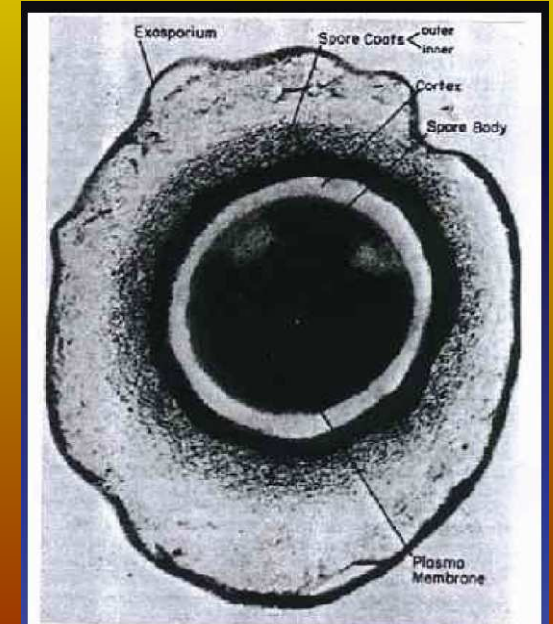


Fig. 2. Electron micrograph of a thin section of a spore of *Bacillus sphaericus*. (Courtesy of Dr. S. Holt.)

Pozorování endospor

vysoce světlolomné útvary
nepřijímající Gramovo barvivo

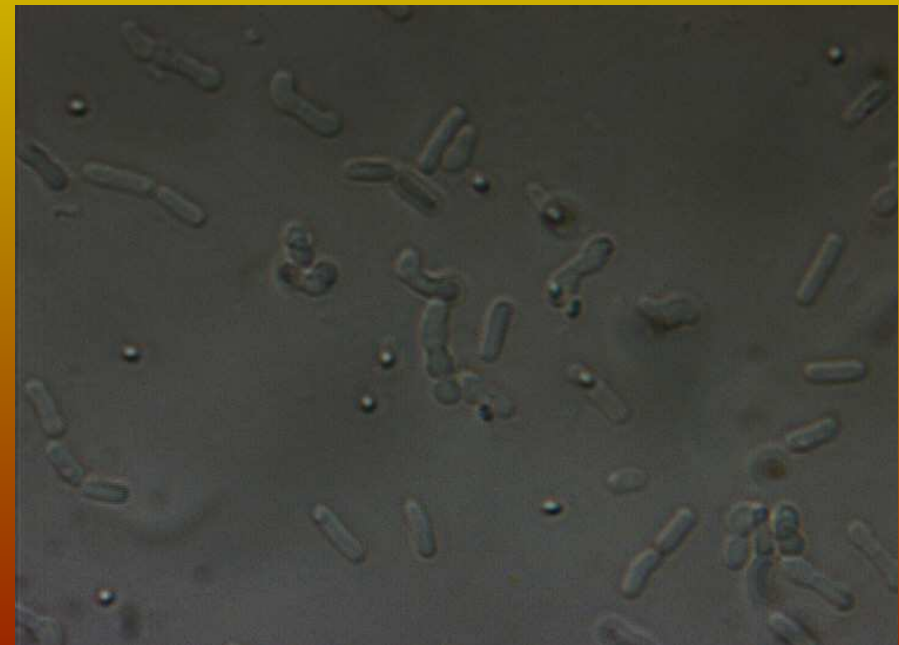
- Pozorovat neobarvené endospory můžeme fázovým (zářící spory) a Nomarského kontrastem (plastický povrch buňky);



Fázový k.

- 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!).

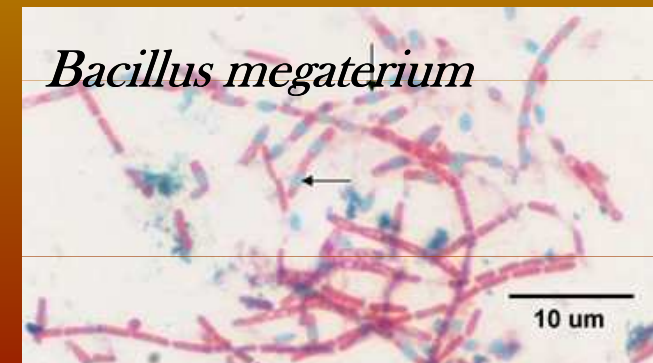


Nomarského k.

Strukturální barvení endospor



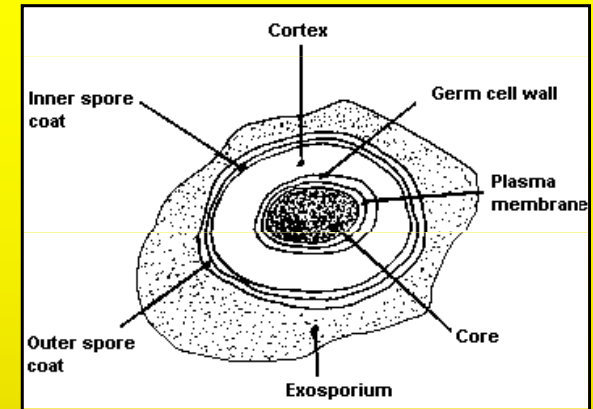
- Diagnostické Gramovo barvení určí G+ a G- typ buněčné stěny; souběžné strukt. barvení spor u suspektních sporulujících druhů zvýrazní:
- **Tvar, velikost a umístění spory v buňce je dalším charakteristickým znakem napomáhajícím identifikaci.** K čemu je dobré barvení spor?
- Př: vždy **oválné** spory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



- Spory se velmi těžko barví i po fixaci

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 (př. alkoholem), čehož se využívá k diferenciaci spor.

- Barvitelnost spor záleží na:

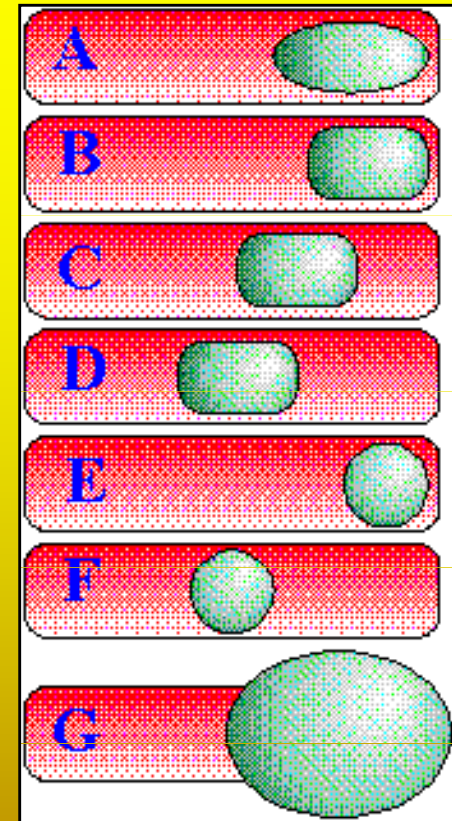
- jejich vývojovém stádium
- stáří kultury
- kvalitě živné půdy
- individuálních vlastnostech mikrobů

proto nelze barvicích
metod používat schematicky

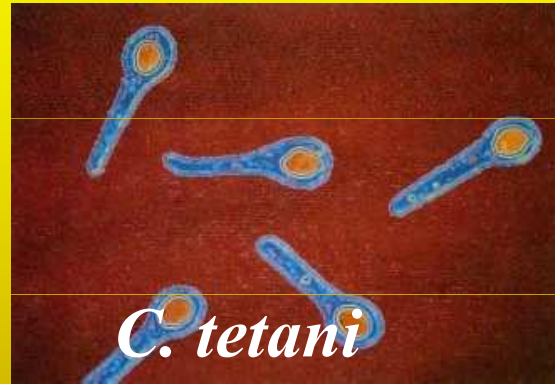
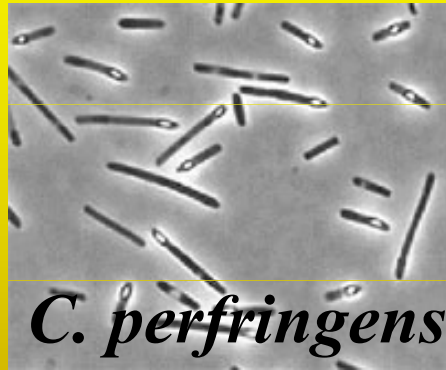
- Barvitelnost spor se také (podobně jako u plísni) zlepší použitím sporulačních médií (s přídavkem manganu).

Uložení v buňce:

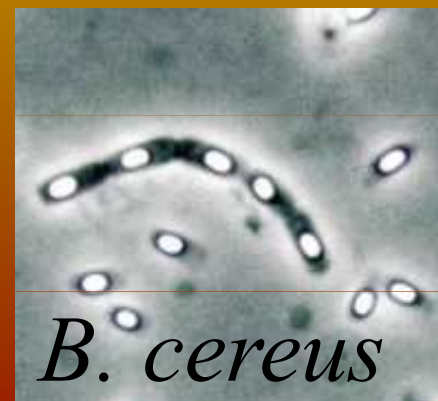
- terminální = na konci tyčinky
(*C. tetani* jakoby paličky),
B. stearothermophilus
- centrální (*C. histolyticum*, *C. novyi*,
C. septicum, *B. anthracis*, *B. cereus*)
- subterminální = paracentrálně =
= mezi středem a pólem buňky, nejčastěji
(*C. botulinum*, *C. sporogenes*, *B. brevis*)



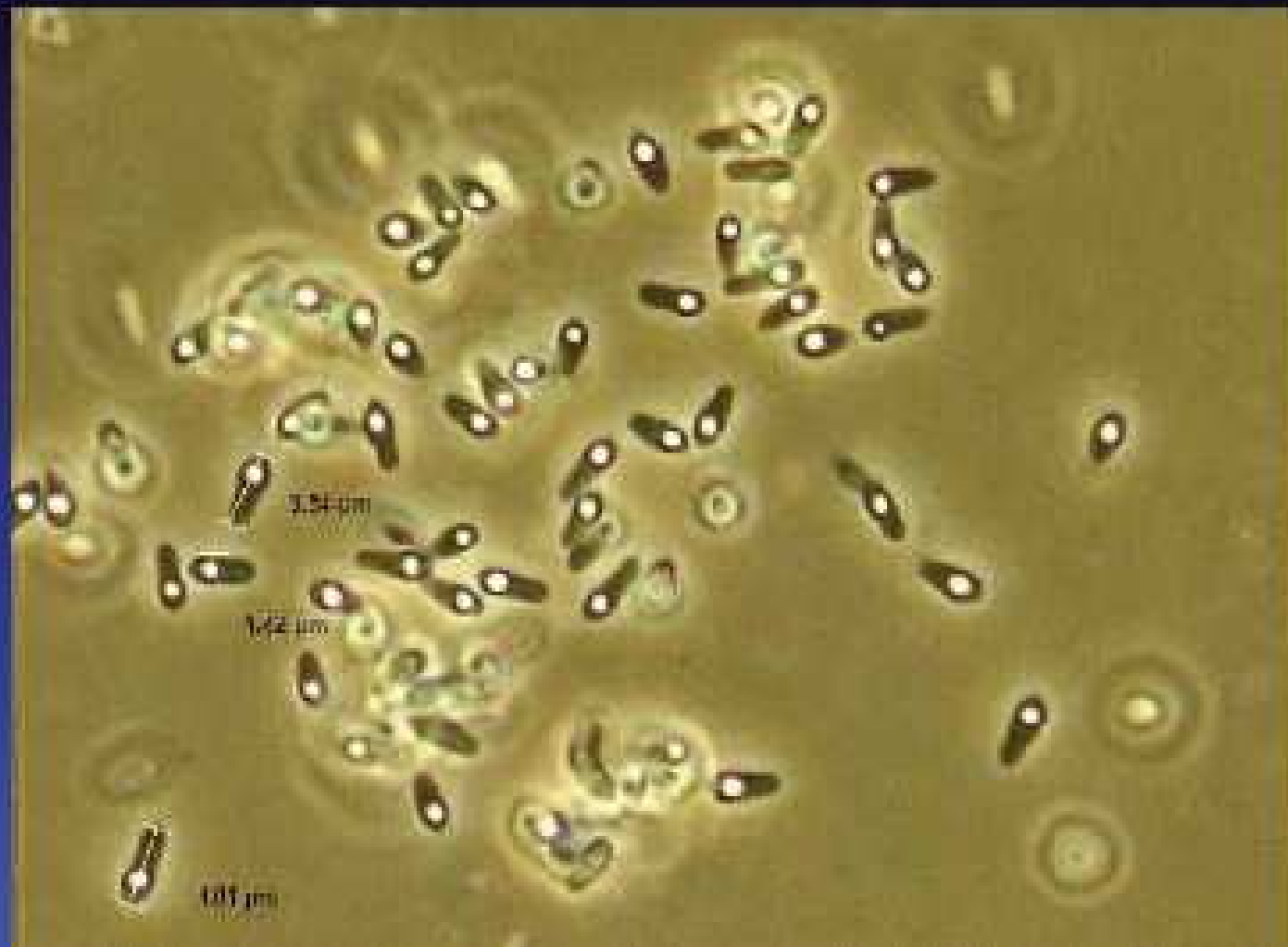
- Rozšíření buňky: *C. botulinum*, *C. tetani*, *Bacillus stearothermophilus*



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



Bacillus sphaericus

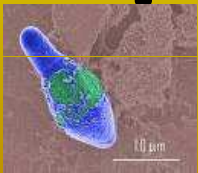


Medicínsky významné jsou spory rodů *Bacillus* a *Clostridium*

Clostridium botulinum:



sporulující buňky odolávají 2-6 hodin teplotě 100 °C
oproti nesporulujícím, které hynou po 30' při 70 °C!
Spory 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.

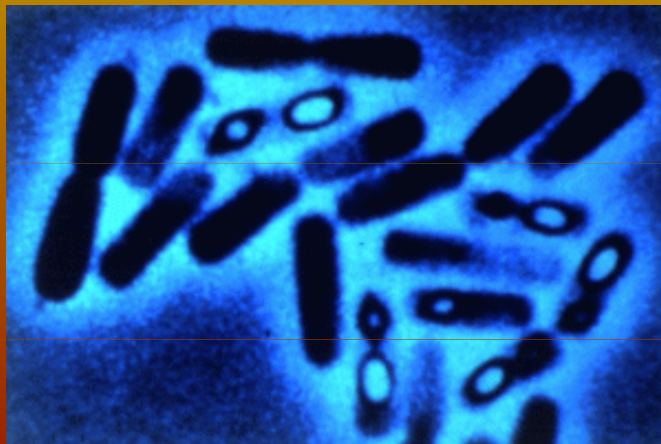


Bacillus anthracis – biologická zbraň, anthrax





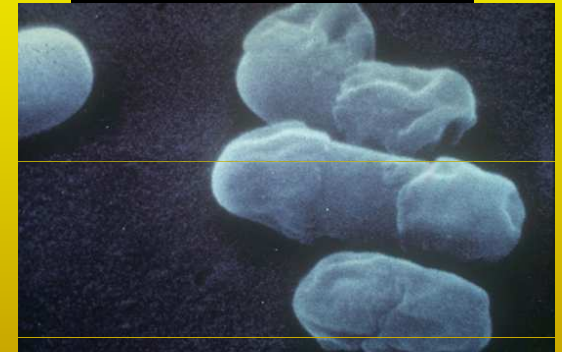
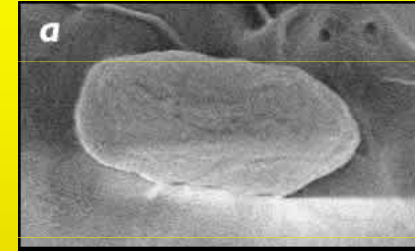
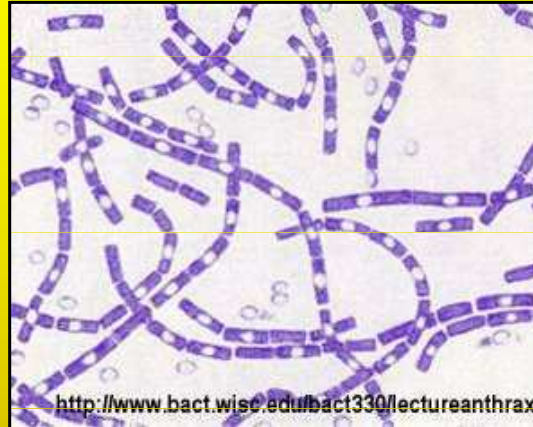
- biopesticidy - Bt toxin transgen -
Bacillus thuringiensis var. *israelensis*



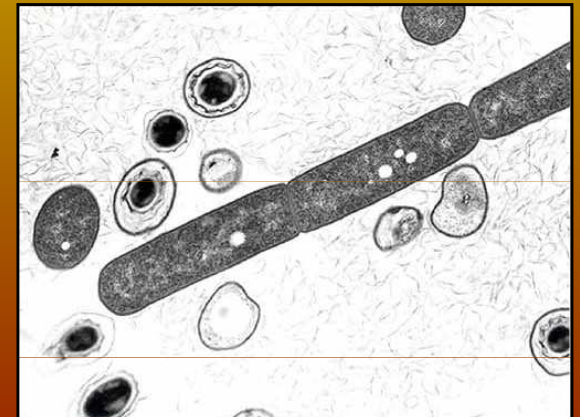
Bacillus anthracis



Lidský neutrofil útočící
na *Bacillus anthracis*

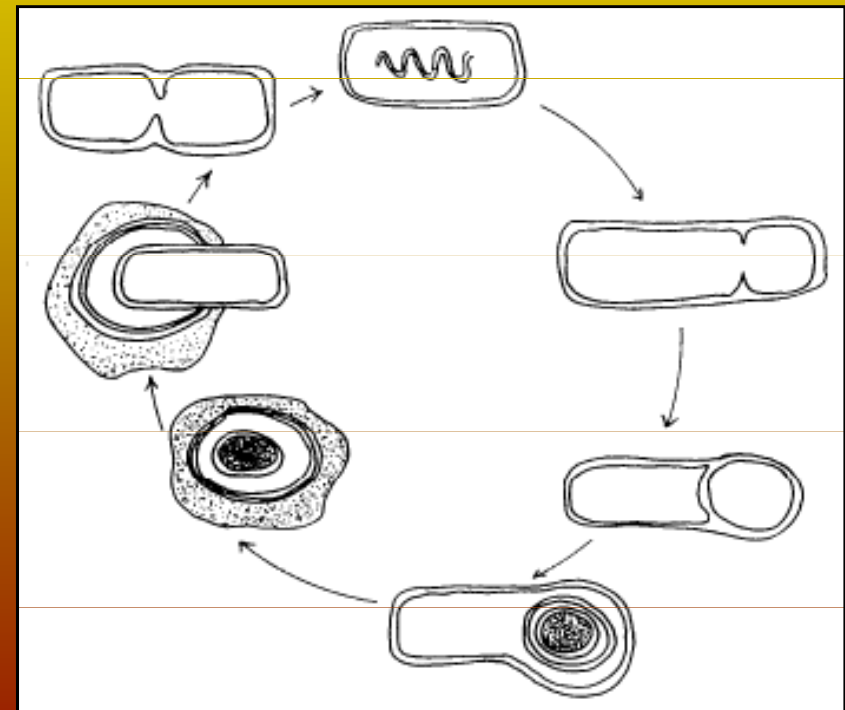
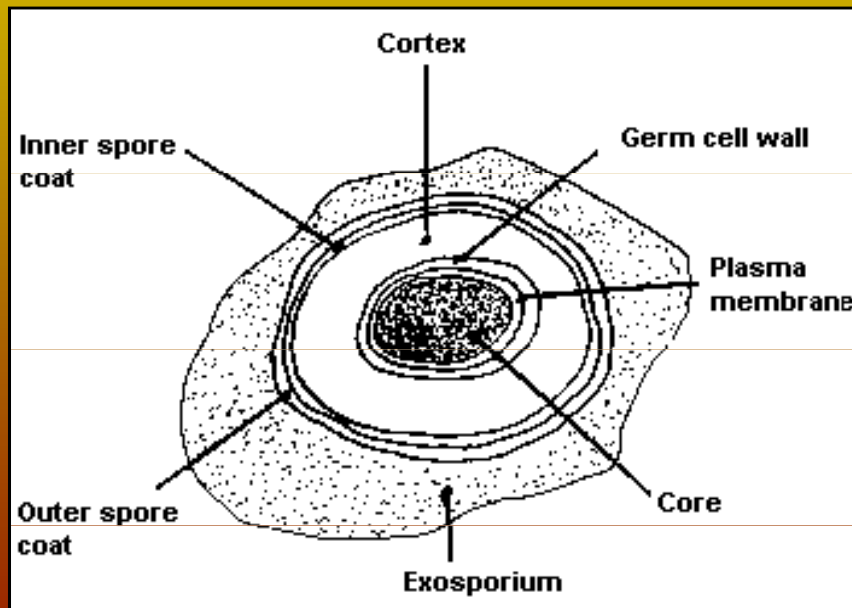


spory



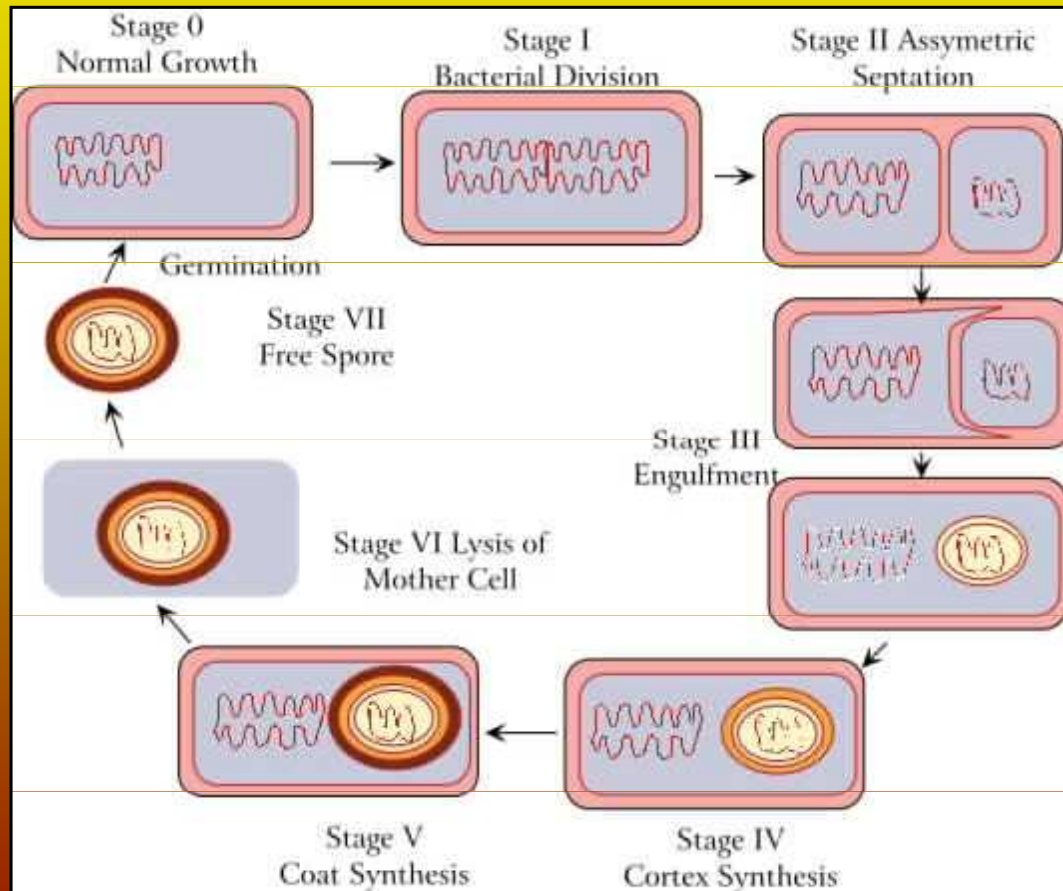
Proces sporulace

- 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*



Během sporulace *B. subtilis* můžeme rozlišit 7 fází (I -VII),
jež lze charakterizovat morfologicky a na molekulárně
biologické úrovni.

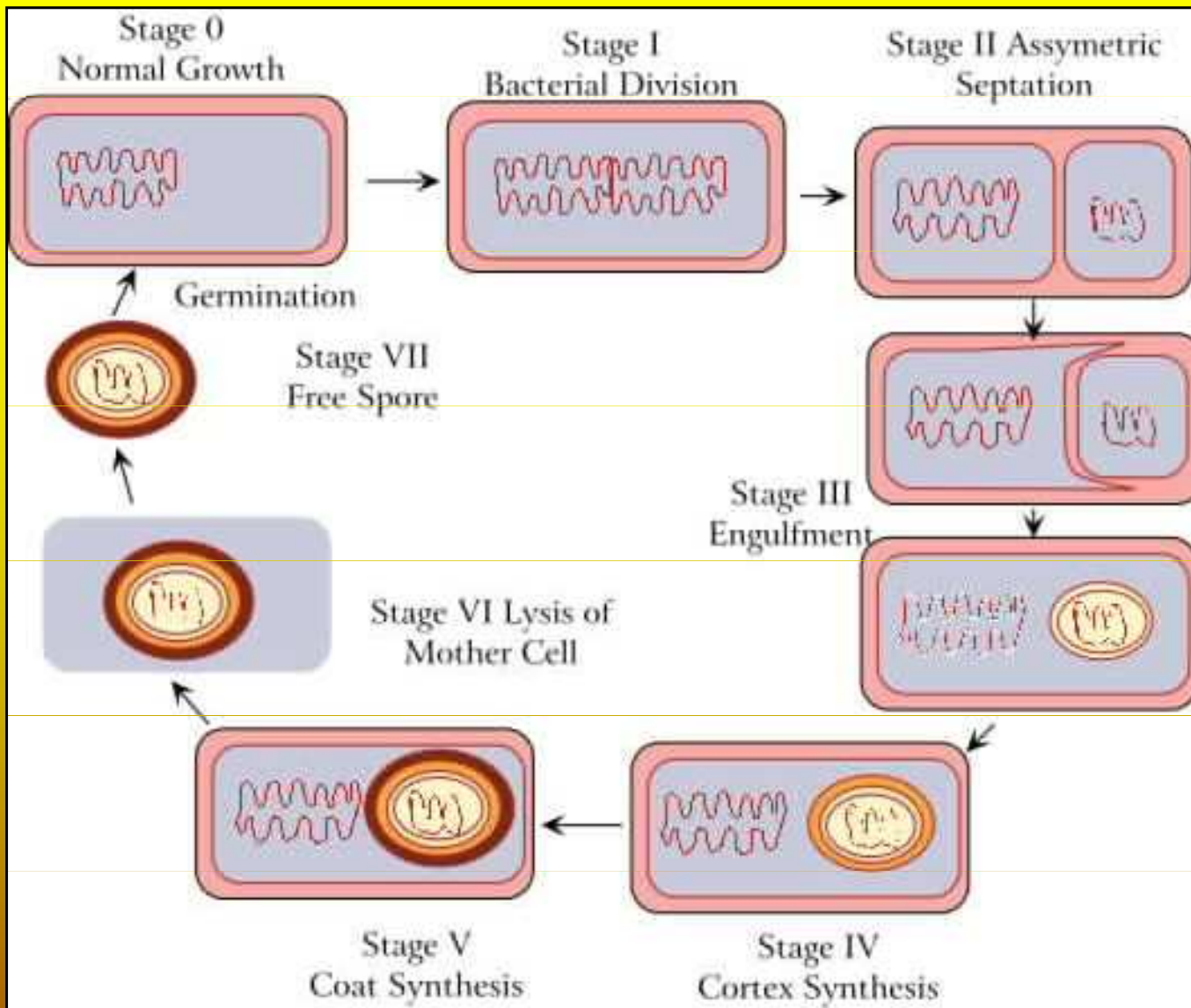
Za proces vzniku endospory zodpovídá 7 - 8 genů.



Fáze 0

Mateřská vegetativní buňka
(sporangium) přechází v
G1 od binárního k
asymetrickému dělení.

v průběhu vzniku přepážky
(na konci G1) je již jasné,
zda vznikne vegetativní
buňka nebo spora

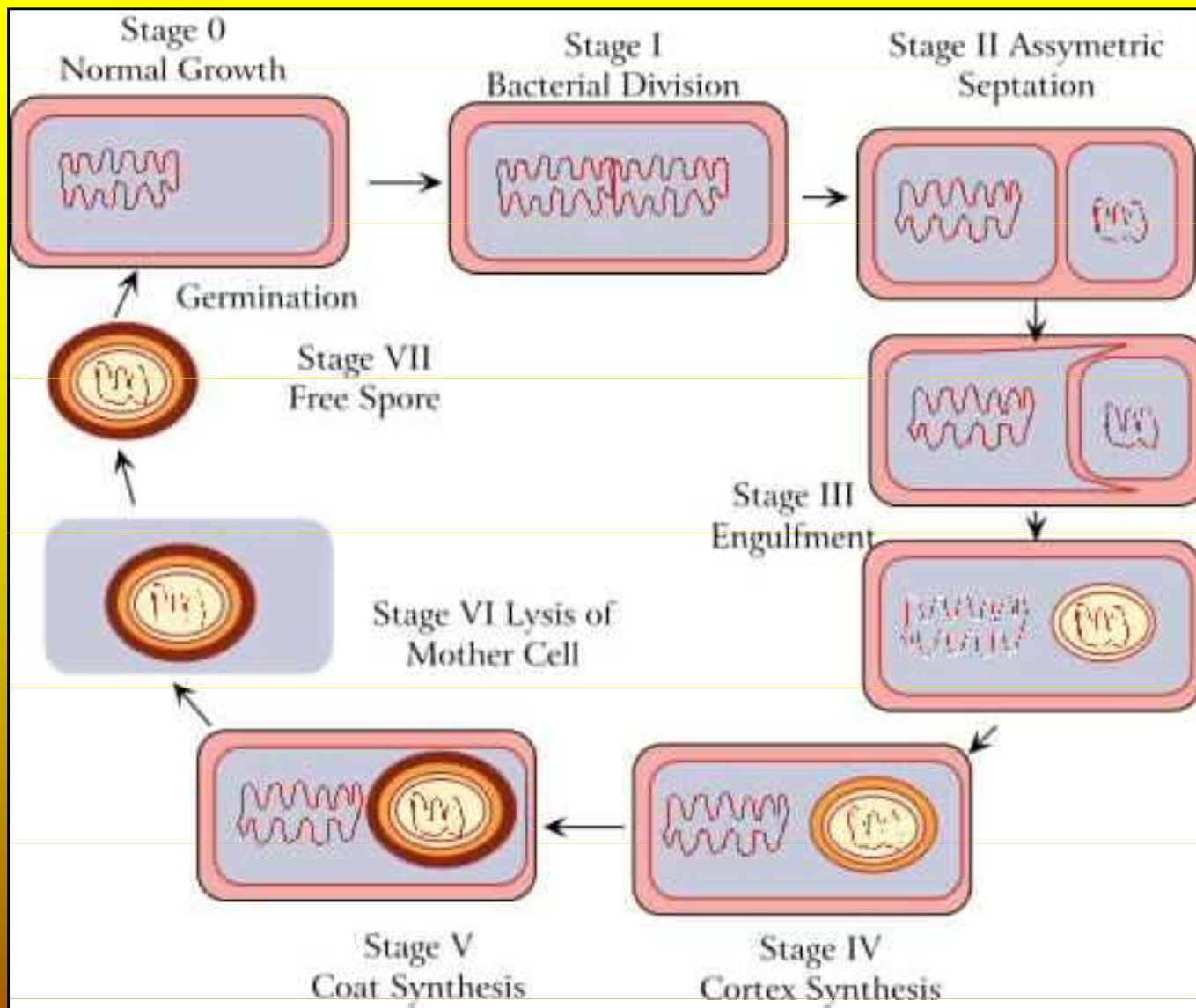


Fáze I

- Tvorba axiálních filament k
- rozdělení bakteriálního chromozomu.
- Sporogenní zóna - jiná hustota b.mat.

Jeden z prvních signálů sporulace: vznik kvanta volutinu

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

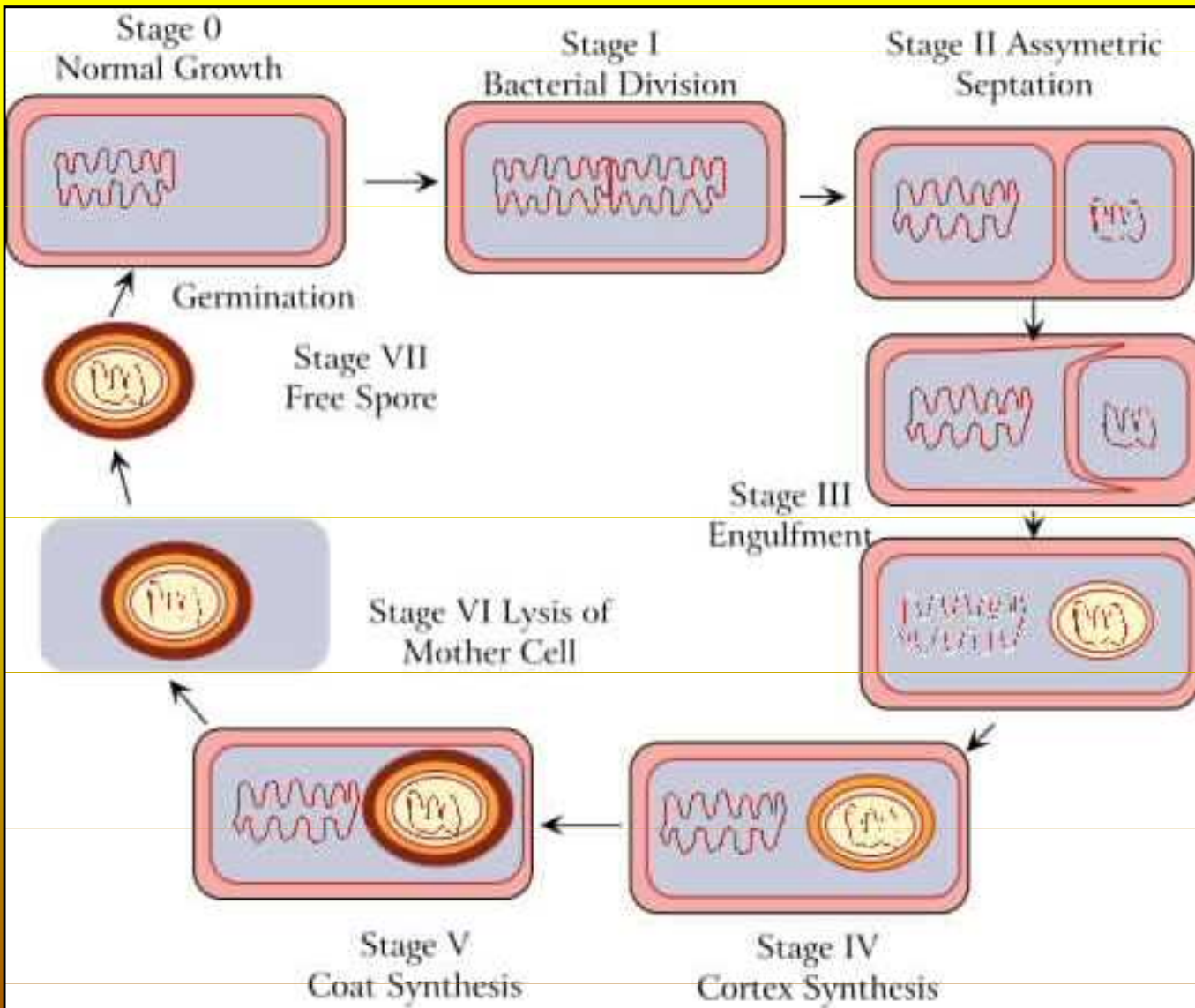


Fáze II

- ukončena replikace buněčného genetického materiálu, a ten se následně rozestupuje k pólům buňky. Končí invaginace cytoplazmatické membrány.

V místě přepážky se dvojitě vchlípí cytoplazmatická membrána

Fáze III

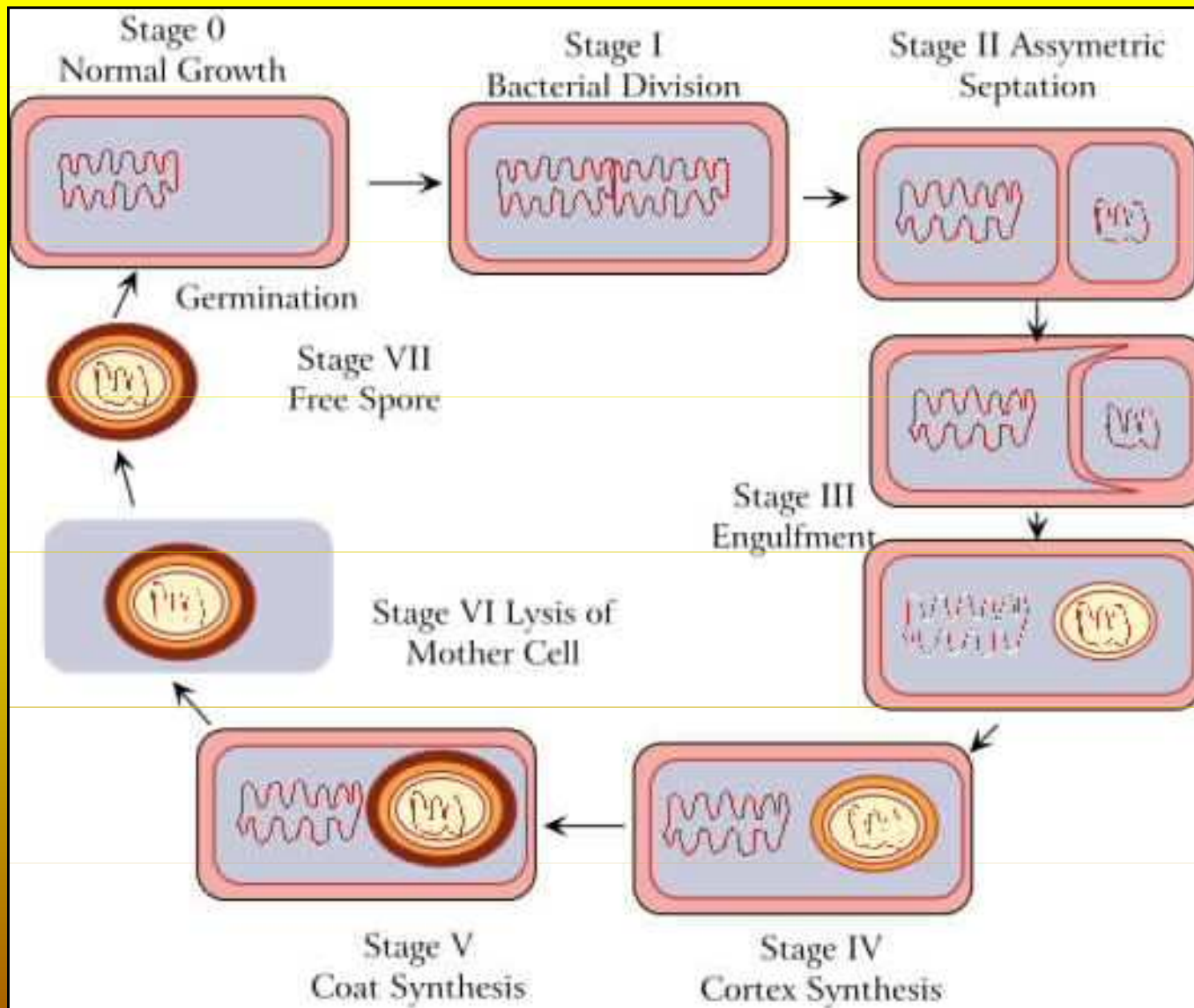


- proliferace cytoplasmatické membrány kolem obou vydělených částí buňky, u spory dochází k zaobalení (prospora - barvitelná)
- Intina. extina

Není dosud světlolomná

→ Spora se nezobrazí (nesvítí při mikroskopii ve fázovém kontrastu)

Fáze IV

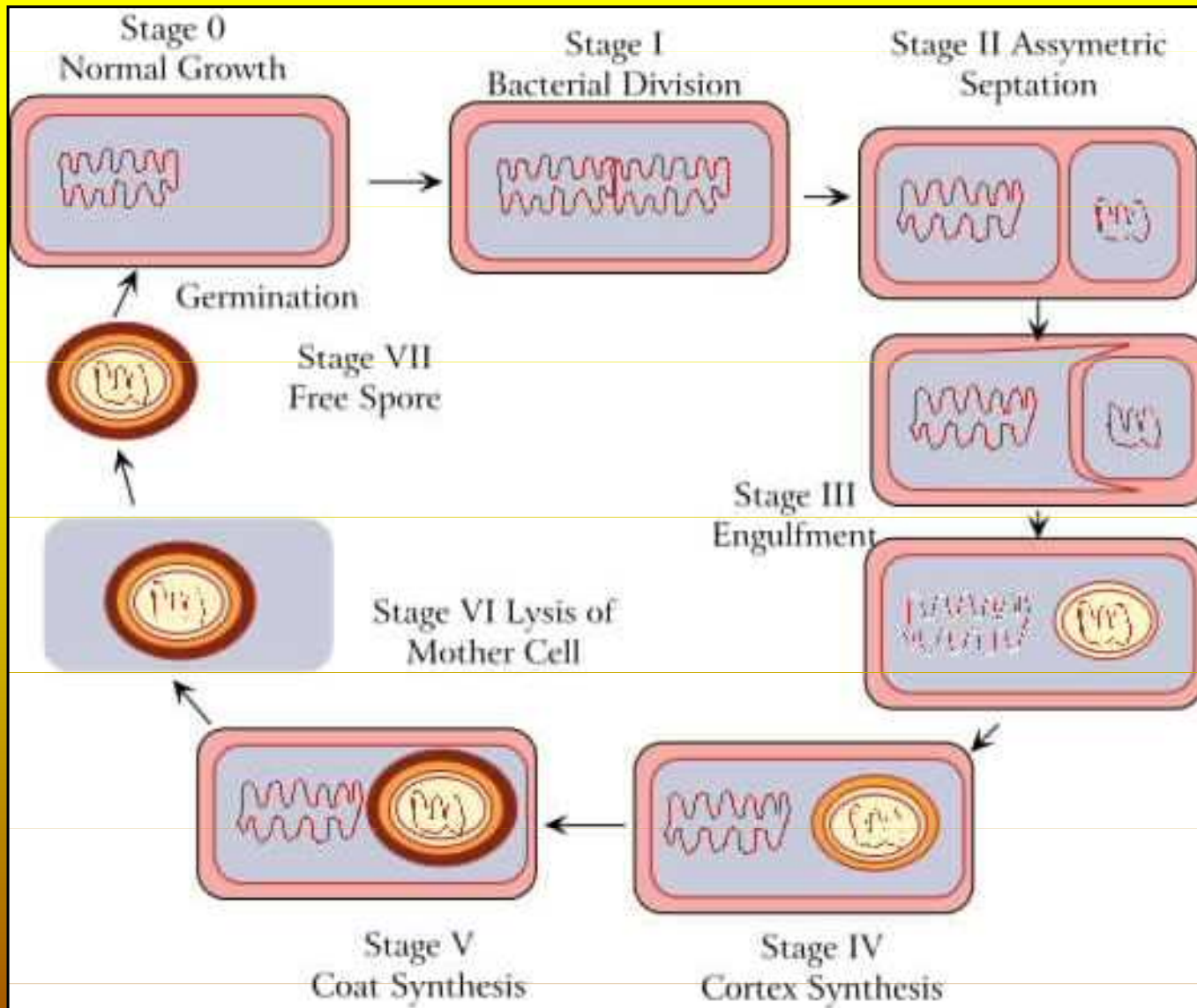


Tvoří se kortex spóry s PG o složení lišícím se od peptidoglykanu buněčné stěny

- Ve spóře obsažena kyselina dipikolinová (stabilizuje kvarterní strukturu DNA ve vazbách) a velké množství Ca^{++} iontů - aktivní transport - antiport.

Endospora je již světlolomná - Nomarského a fázový kontrast.

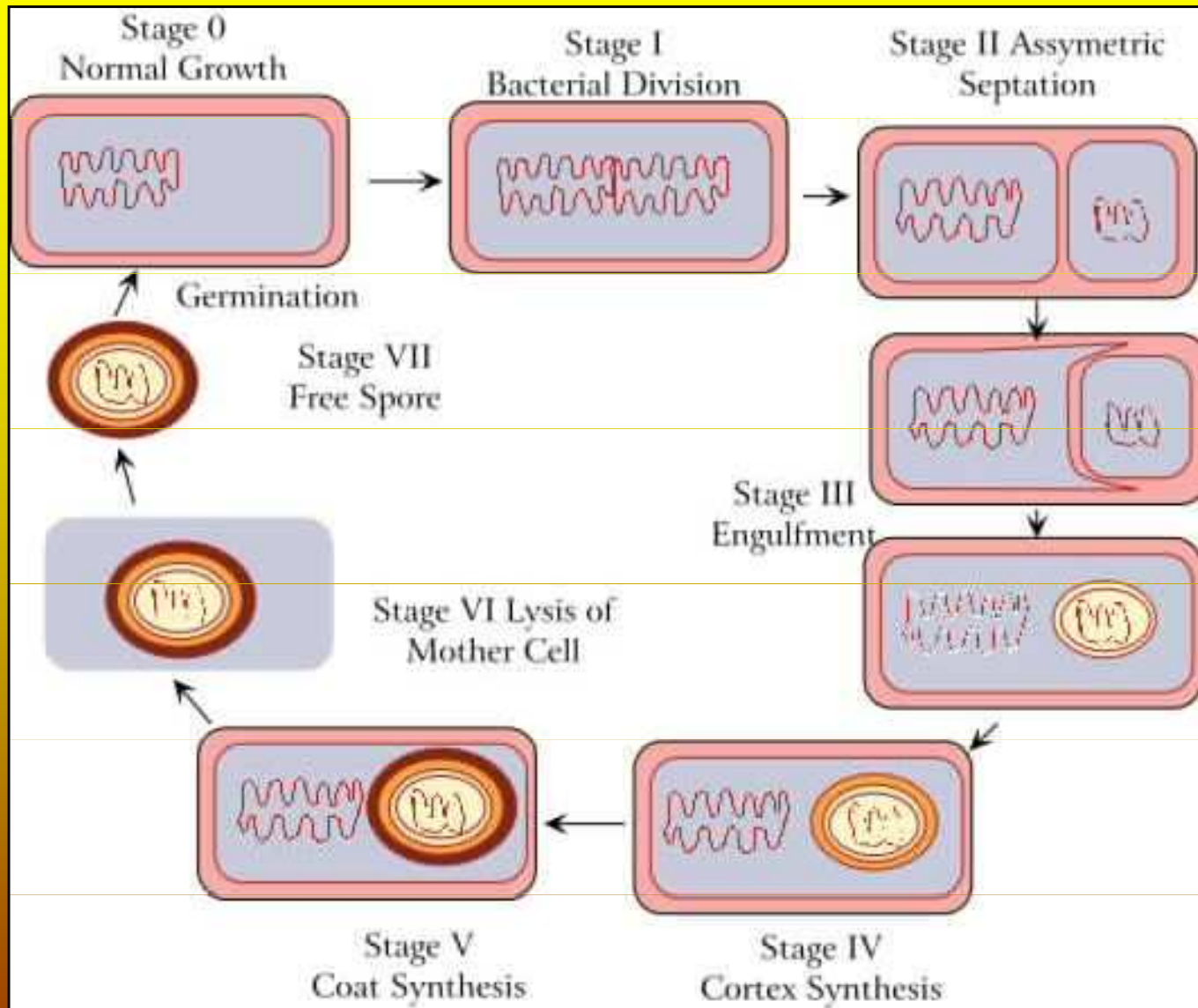
Termorezistence - k. dipikolinovaná transport do prospory



Fáze V

- Syntéza pláště.
- Vícevrstevný.
- Již minimum vody.
- U rodu *Bacillus*: Vzniká exosporium složené z deseti proteinů, polysacharidů a lipidů.

Chemotaxonomie – unikátní bílkoviny pláště



Fáze VI

- Maturace endospory a lyze mateřské buňky, uvolnění zralých spór

Fáze VII

- Volná zralá spóra.

Cell wall
Cytoplasm

Plasma membrane

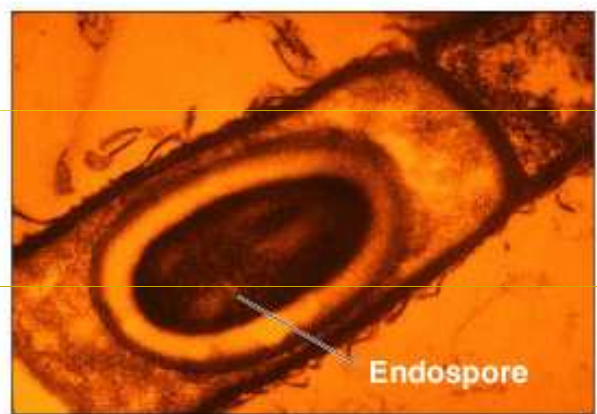
Bacterial chromosome (DNA)

1 Spore septum begins to isolate newly replicated DNA and a small portion of cytoplasm.

2 Plasma membrane starts to surround DNA, cytoplasm, and membrane isolated in step 1.

Dvojité obalení spory membránou

(a) Sporulation, the process of endospore formation



3 Spore septum surrounds isolated portion, forming forespore.

Two membranes

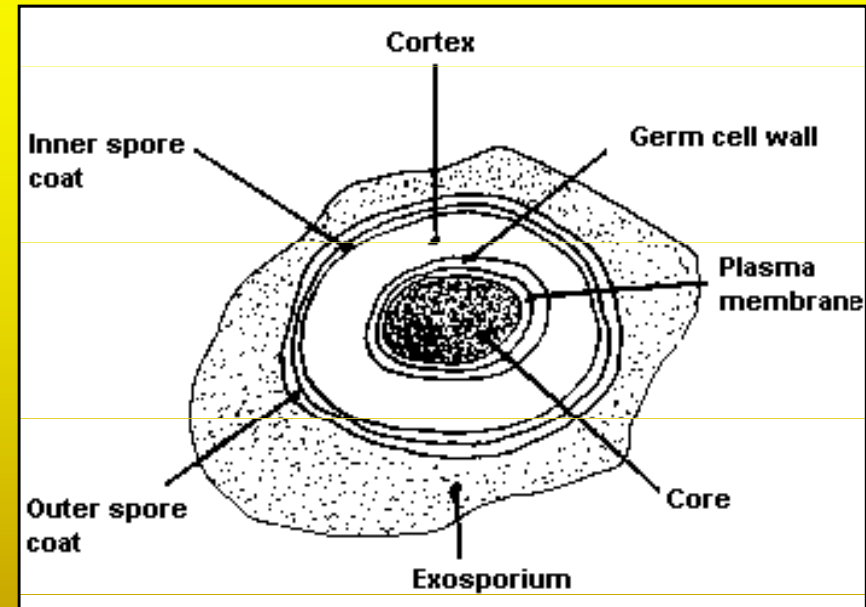
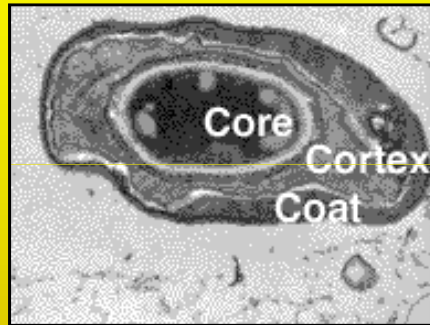
4 Peptidoglycan layer forms between membranes.

(b) An endospore in *Bacillus anthracis*

6 Endospore is freed from cell.

5 Spore coat forms.

Stavba zralé spory



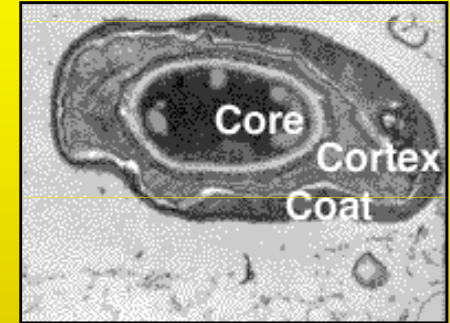
- Jádro - představuje gelovou matrix, tvořenou bakteriálním jaderným ekvivalentem - nukleoidem, kalcium dipikolinátem (CDPA) nebo pyridin-2,6-dikarboxylovou kyselinou, jež nahrazuje vodu při udržování kvarterní struktury DNA

- **Kortex**

1) **vnitřní kortex** (20% kortexu) či stěnu spóry

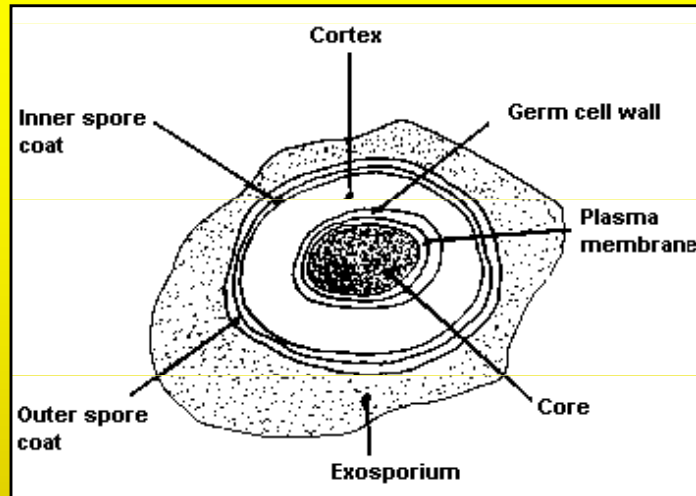
2) **zevní kortex** (80 % kortexu).

- Zajišťuje **nepropustnost (nebarvitelný!)**
- Kortex tvořen peptidoglykany (PG).



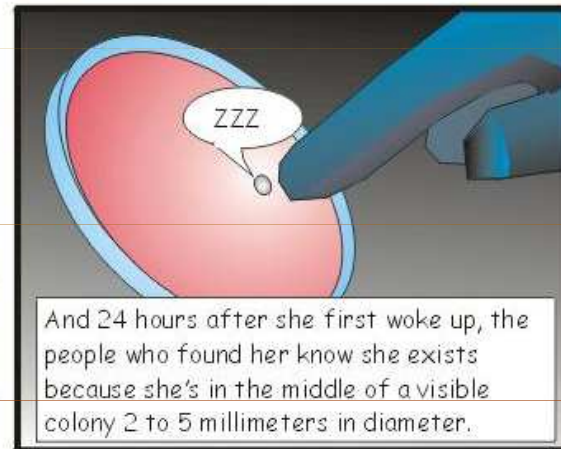
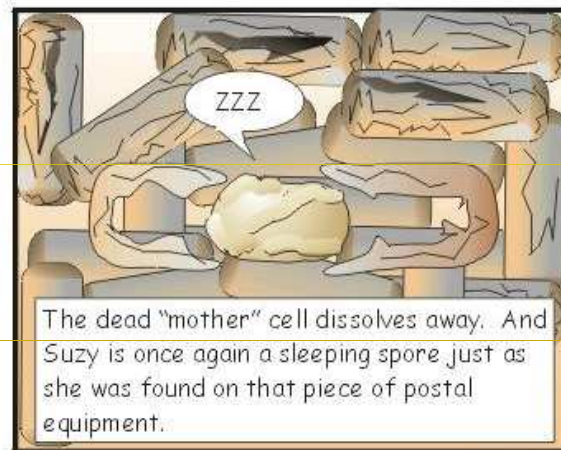
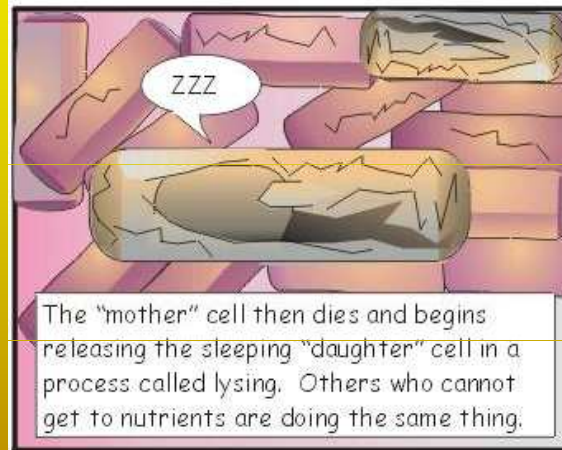
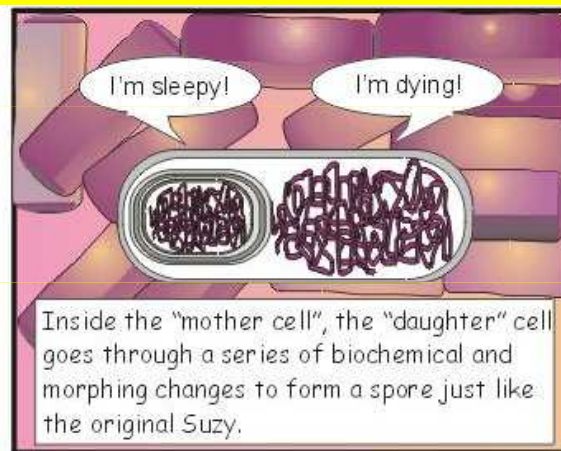
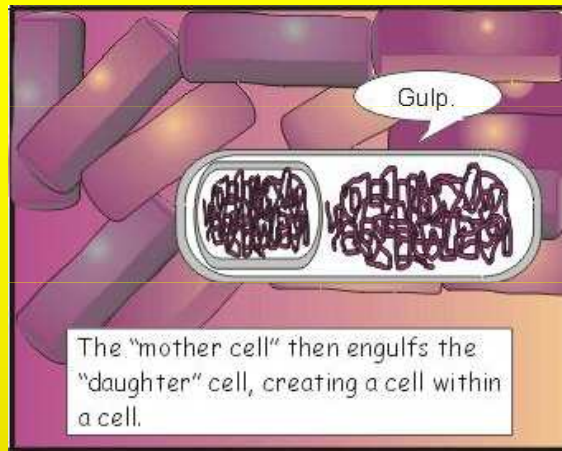
Jen 20-30 % PG jednotek shodných s jednotkami v buněčné stěně.

- Zbylých 50-60 % **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*

Jedinečné a charakteristické struktury spory



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

Germinace spory – terminální, centrální

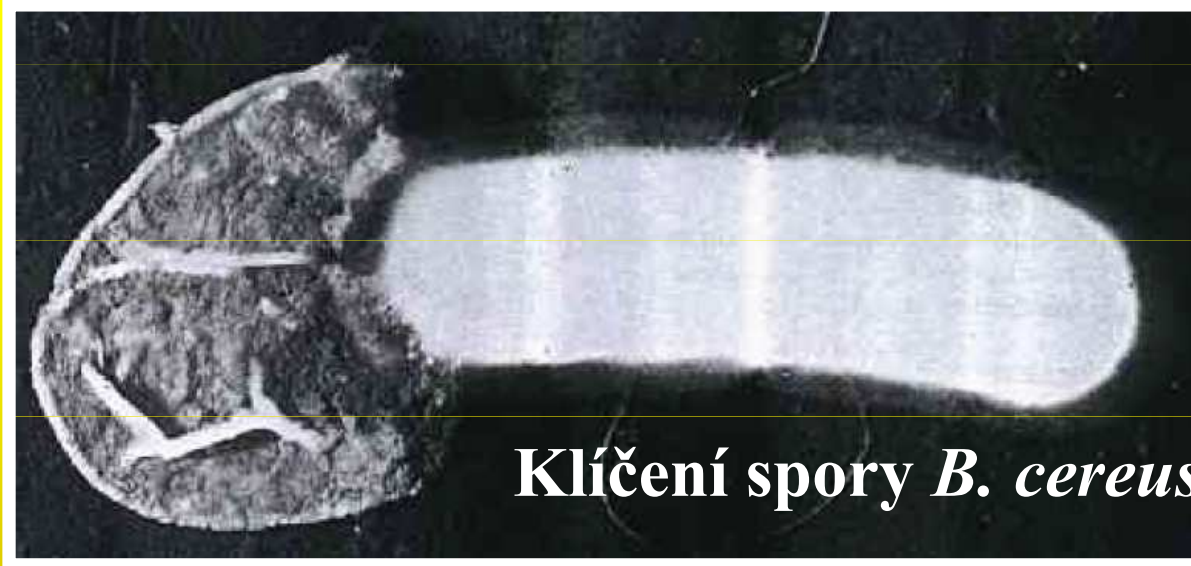
- Germinací rozumíme rychlý proces klíčení spory.
- Začíná spontánní aktivací spory
- Aktivace – destabilizací pláště – působením teploty 70-85 °C po 5 - 10 min,
další aktivátory: malé organické molekuly, L-Ala, Ado a Ino, vyšší obsah bází

V laboratořích zahřátí v přítomnosti vody.

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



vzniklé AMK - stavební kameny nových proteinů



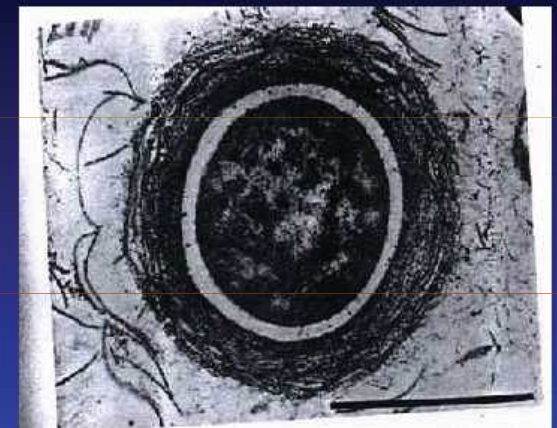
- Lytický enzym: p68 => p29 (kortikohydroláza) - depolymerizuje kortex pro nástupný průnik vody.
- Po dvou hodinách po germinaci spory následuje dělení vegetativní buňky.
- Inhibice klíčení: D-Ala, MgCl₂, PMSF

Cysty

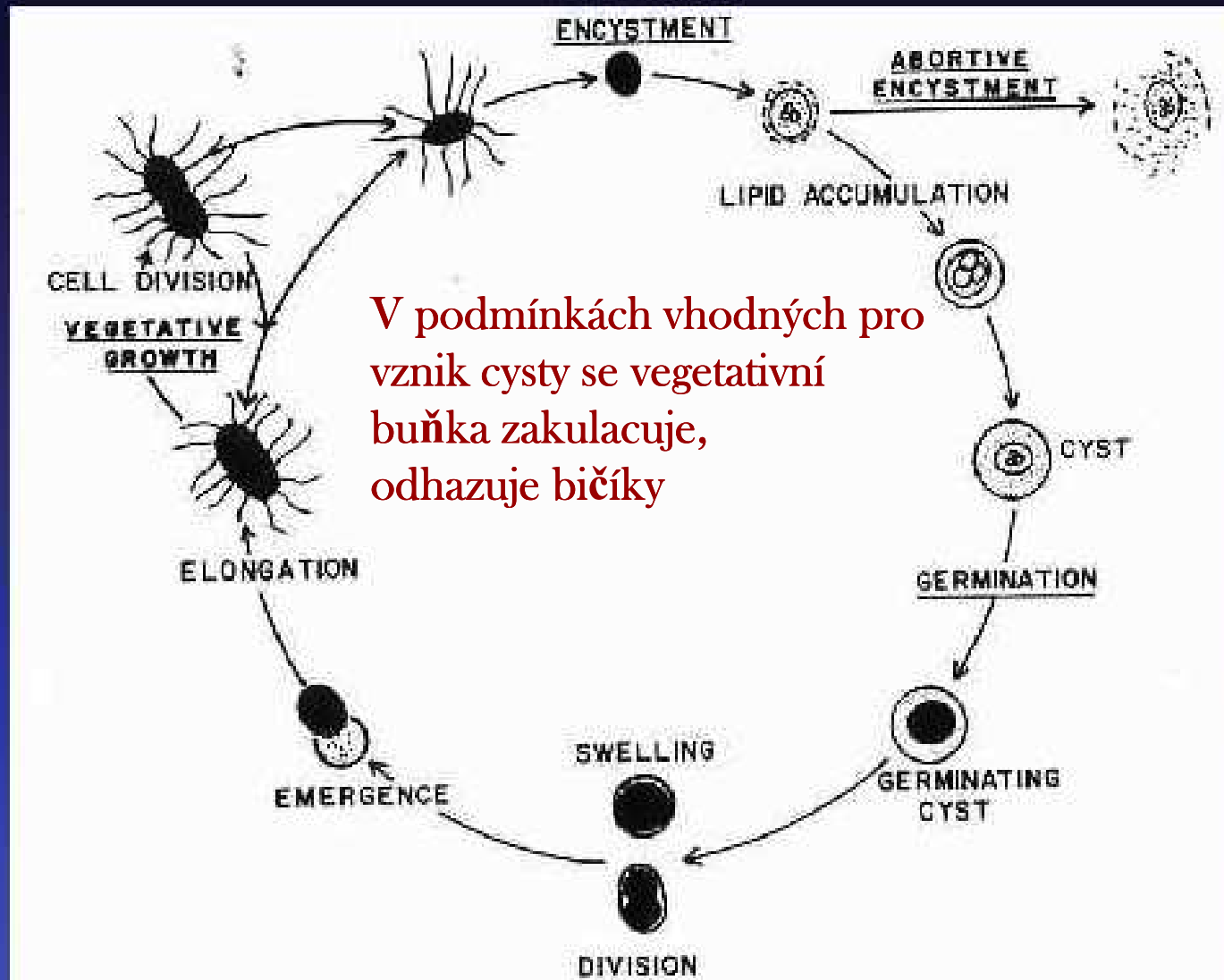


- Nejsou tolik rezistentní vůči teple
- Rezistentní vůči vysychání
- Granula PHB - typická pro cysty, přítomností lze navodit
- Odlišné obaly - algináty, různé polysacharidy
- Nejpodrobněji popsány u *Azotobacter vinelandii*,
 - mnohohvrstevný obal (vnější částí vyšší hustota), unikátní lipidy
- Za příznivých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

Cysta *Azotobacter vinelandii*



Růstový cyklus *Azotobacter vinelandii*



V podmínkách vhodných pro vznik cysty se vegetativní buňka zakulacuje, odhazuje bičíky

Nepohyblivé stadium se encystuje

Buňka se stává světlolomnou, z vnější strany depozice lipidických látek

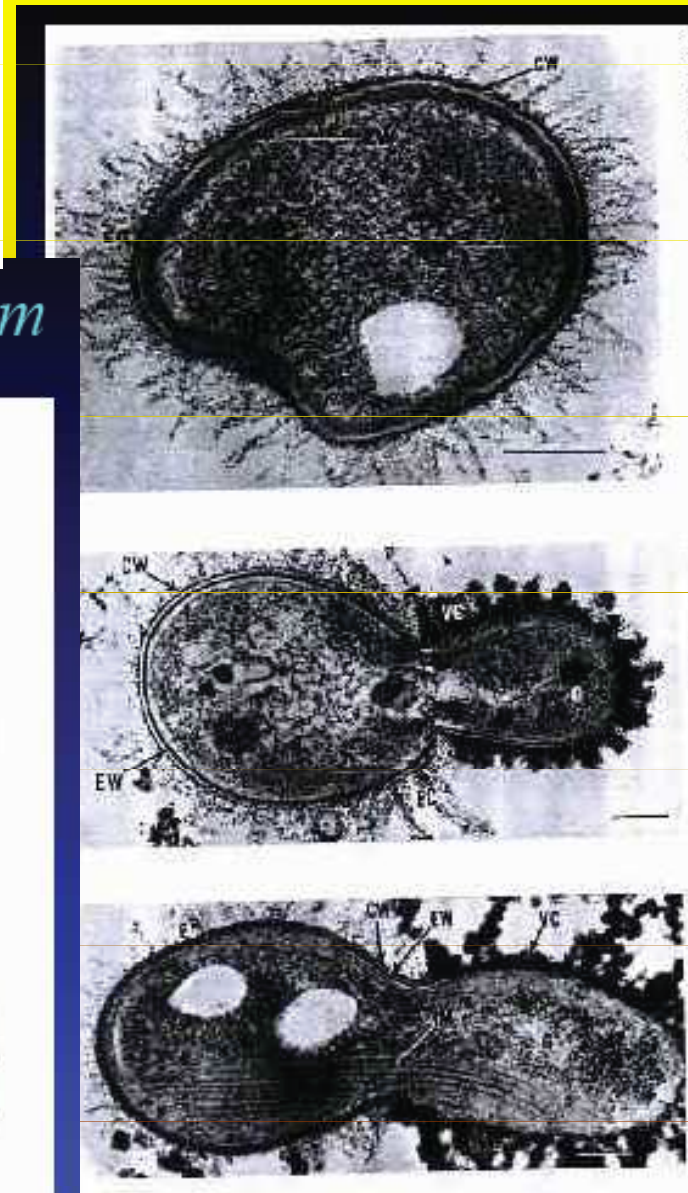
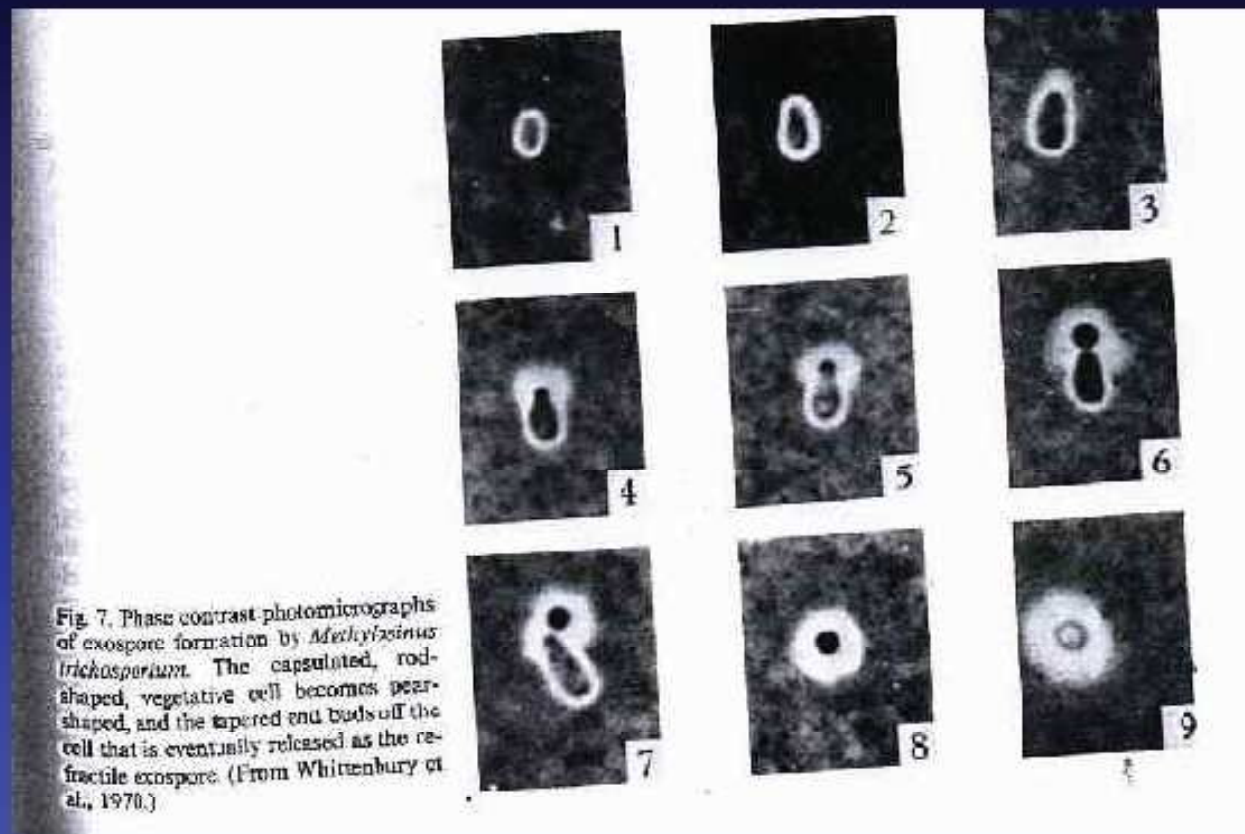
Akumulace lipidů i uvnitř buňky

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

Methylosinus trichosporium

- metanotrof, opouzdřený
- exospory rezistentní vůči vysychání a teplotě do 78°
- stacionární fáze
- prodlužování buňky do hruškovitého tvaru
- pučení na zúženém konci
- uvolňuje se kulatá exospora
- za vhodných podmínek klíčí

Tvorba exospory u *Methylosinus trichosporium*



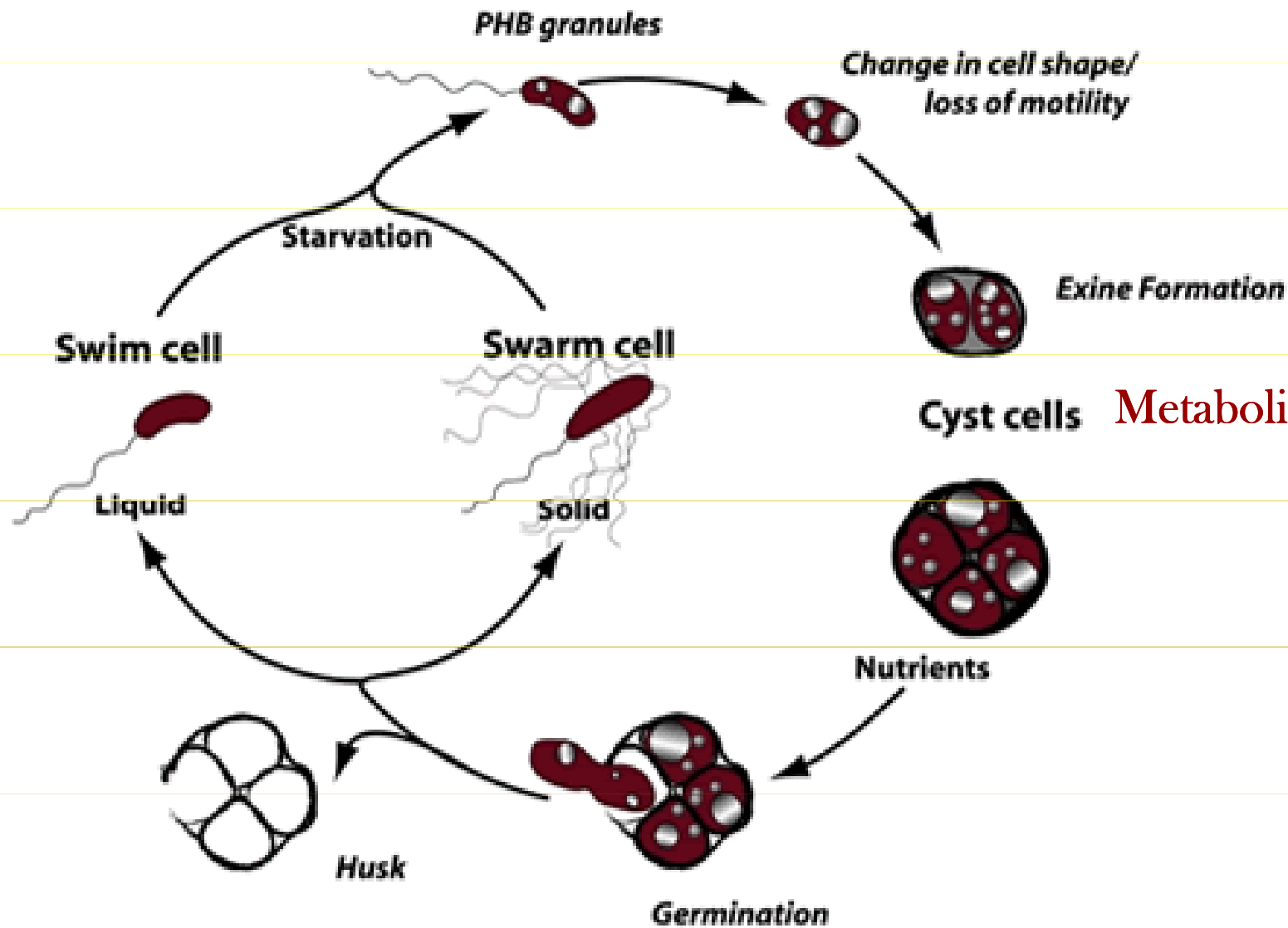


Fig 1, The *R. centenum* life cycle

(Berleman and Bauer 2004)

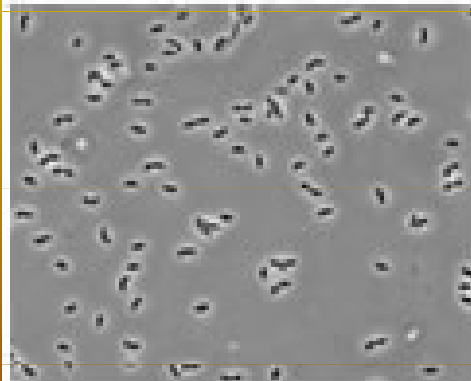
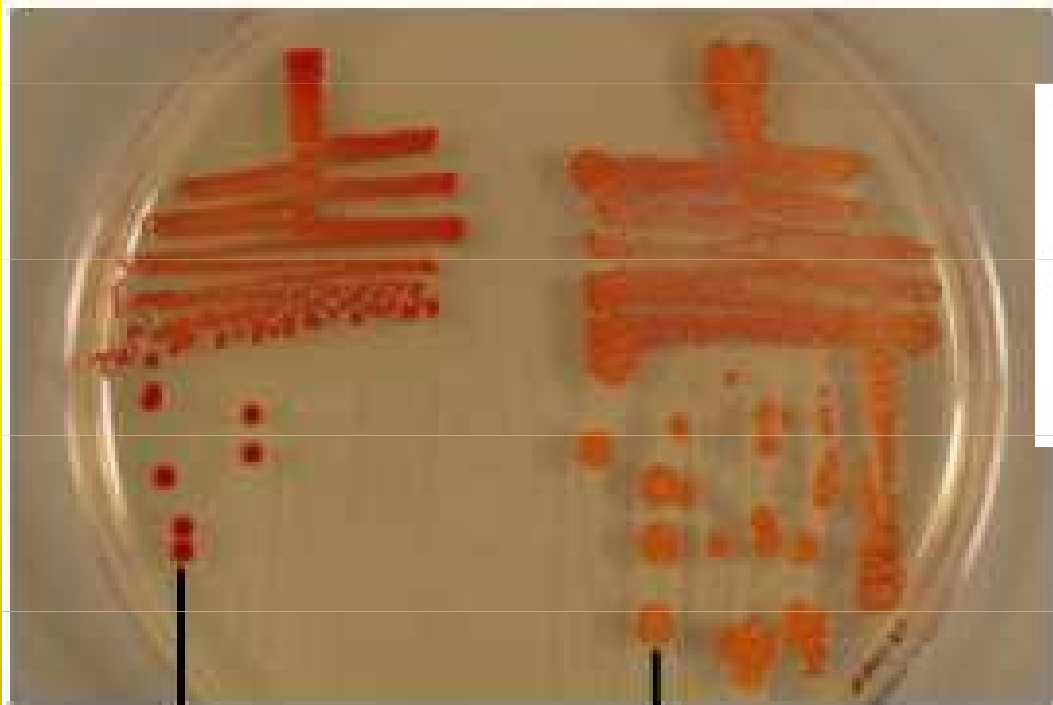
Rhodospirillum centenum - plovoucí a plazivé buňky

Berleman, J. & C. E. Bauer (2004):

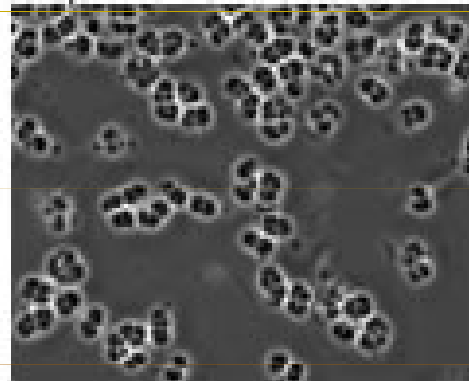
a zároveň tvorba cyst

Characterization of the cyst cell formation

in the purple photosynthetic bacterium *Rhodospirillum centenum*. *Microbiology* 150, 383-390



Wildtype



Hyper-cyst

Fig. 3. Wild type cells on the left which contain no cyst cells and hypercyst mutant cell line on the right that constitutively produce cyst cells.

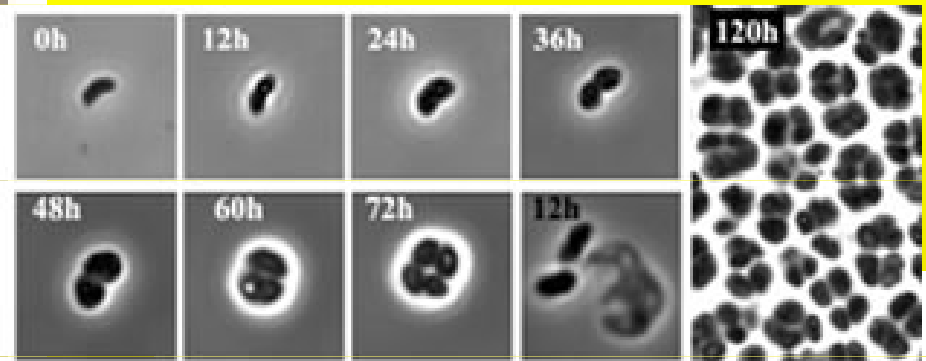


Fig. 2. The panels labeled with white numbers show cell types observed at points after induction of cyst formation. The panel with black numbers depicts germinating cells twelve hours after induction of germination.

Berleman, J., B. Hasselbring, & C. E. Bauer 2004. Hypercyst Mutants in *Rhodospirillum centenum* Identify Regulatory Loci Involved in Cyst Cell Differentiation. *J. Bacteriol.* 186, 5834-5841