

Bakteriální spory

Některé bakteriální rody (*Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Sporosarcina*, *Sporolactobacillus*, *Oscillospira*, *Thermoactinomyces*) mohou tvořit klidové formy zvané **spory** (endospory; vznikající uvnitř buňky). Povrch spor je tvořen silným, špatně propustným obalem. Proto jsou velice odolné vůči působení vnějších vlivů, toxinů. Jsou rovněž **obtížně barvitelné**. V preparátech barvených běžnými technikami se obarví pouze jejich obal. **Proto se barví po předchozím moření nebo za horka pomocí silných barviv** – takto se těžko odbarvují kyselinami (acidorezistence) i jinými sloučeninami.

Metody pozorování:

1) po barvení

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

2) fázovým kontrastem

3) Nomarského kontrastem

Mikroorganismy:

Mikroorganismy: <i>Bacillus cereus</i> CCM 2010	1, 1 + Mn
<i>Bacillus subtilis</i> CCM 1615	1 + Mn
<i>Bacillus thuringiensis</i> CCM 19	1 + Mn
<i>Bacillus sphaericus</i> CCM 1615	1, 1 + Mn
<i>Bacillus megaterium</i> CCM 2007	1, 1 + Mn
<i>Bacillus polymyxa</i> CCM 1459	14
<i>Sporosarcina ureae</i> CCM 860	1 + U + Mn

U = urea, přídavek močoviny v médiu
Mn = MnSO₄ · H₂O v médiu

Postupy:

Pozn: ve cvičeních děláme pouze metodu A

A. Barvení malachitovou zelení - Schaefferova-Fultonova metoda

- 1) Uschlý nátěr buněk na sklíčko fixujeme trojím protažením v plameni
- 2) Převrstvíme malachitovou zelení
- 3) Zahříváme 5 minut do výstupu par, doplňujeme barvivo
- 4) Opláchneme vodou
- 5) Dobarvíme kontrastním barvivem - safraninem nebo kongo – červení (převrstvením 5 min)

6) Opláchnout vodou, usušit, pozorujeme pod imerzí
Pozorování: Spory jsou zelené, ostatní buněčný obsah červený.

B. Wirtzovo – Conklinovo barvení

- 1) Fixovaný preparát převrstvíme malachitovou zelení
- 2) Zahříváme 2-3minuty do výstupu par
- 3) Slijeme barvivo, opláchneme
- 4) Body 1-3 opakujeme 3x
- 5) Dobarvíme zředěným karbolfuchsinem 3 minuty
- 6) Opláchneme vodou, usušíme, pozorujeme pod imerzí

C. Möllerova metoda

- 1) Fixovaný preparát moříme (5 %) kyselinou chromovou 10 minut
- 2) Opláchneme vodou
- 3) Převrstvíme karbolfuchsinem, zahříváme nad mírným plamenem 2 minuty do výstupu par, barvivo nesmí vyschnout
- 4) Po zchlazení opláchnout vodou
- 5) Odbarvit 5% kyselinou sírovou 10 – 20s
- 6) Opláchnout vodou
- 7) Odbarvené vegetativní buňky dobarvit methylenovou modří 4 – 6 minut
- 8) Opláchnout vodou
- 9) Usušit, pozorujeme pod imerzí

Pozorování: Spory jsou červené, zbytek buňky modrý.

D. Ziehl – Neelsenovo barvení

- 1) 0,5 ml husté suspenze buněk smícháme s 0,5 ml Ziehl-Neelsenova karbolfuchsinu a 20 minut zahříváme na vařící vodní lázni
- 2) 1 malou kapku smíchat s 1 kapkou nigrosinu na podložním sklíčku
- 3) po uschnutí pozorujeme pod imerzí

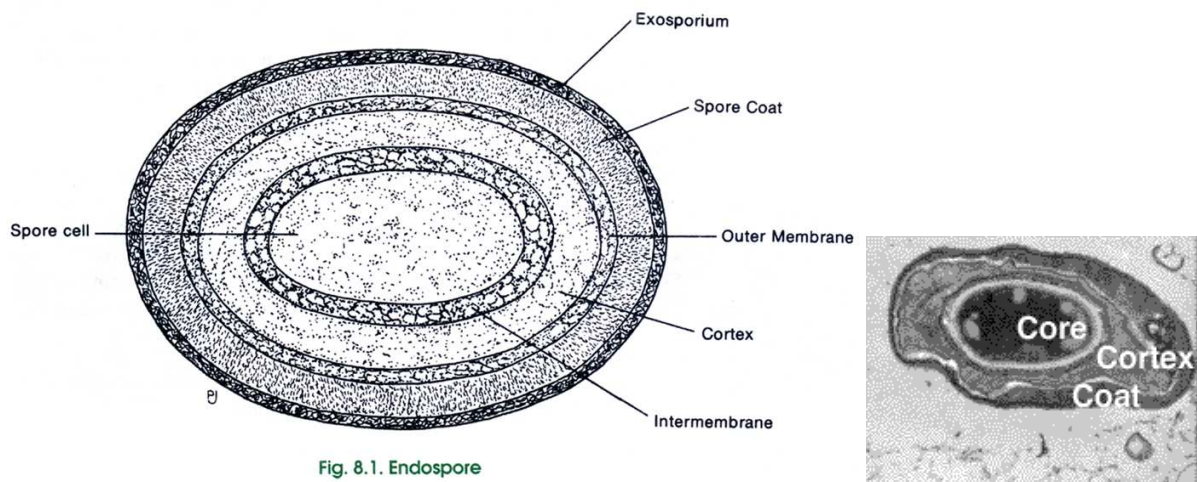
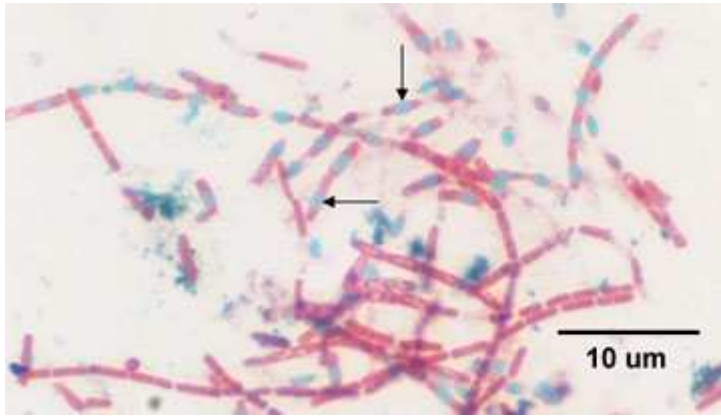


Fig. 8.1. Endospore



Bacillus megaterium

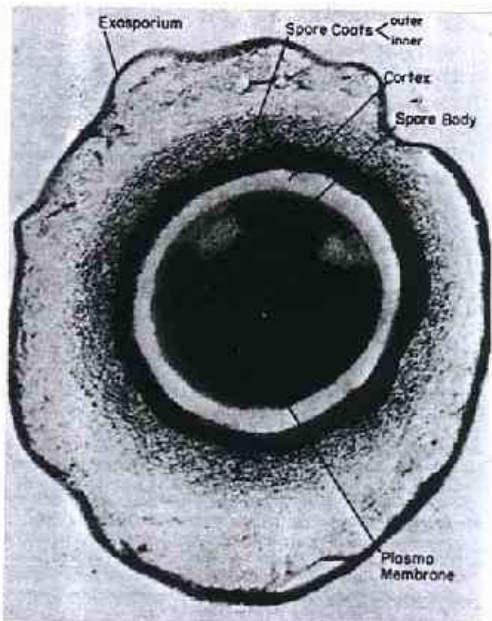
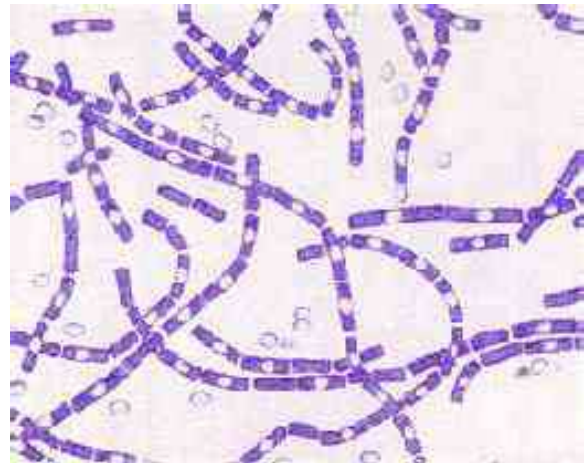
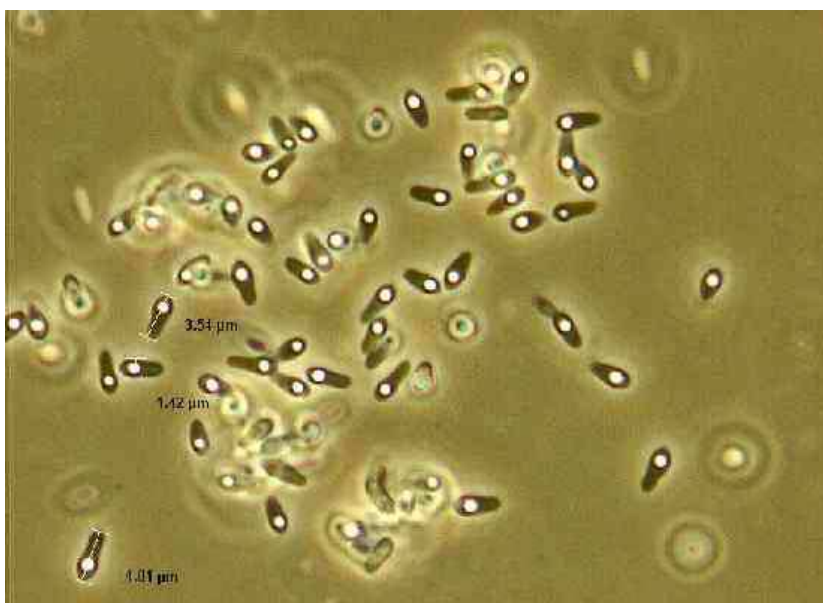


Fig. 2. Electron micrograph of a thin section of a spore of *Bacillus sphaericus*. (Courtesy of Dr. S. Holt.)



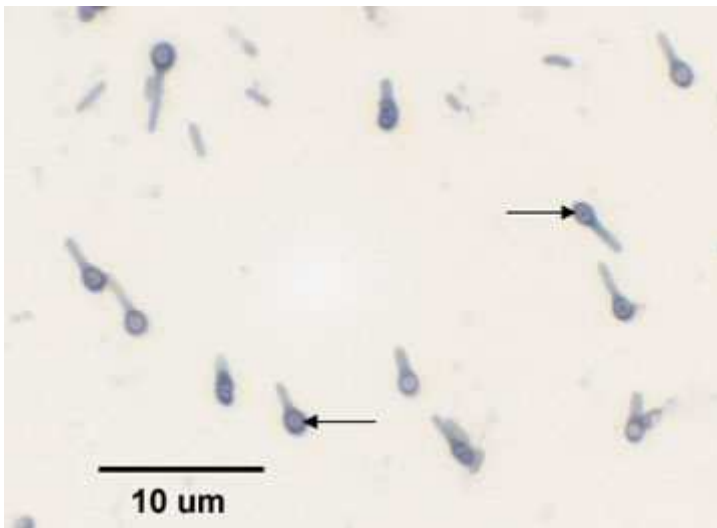
Bacillus anthracis



Bacillus sphaericus



Bacillus cereus

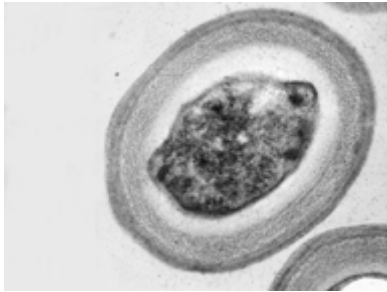


Clostridium tetani

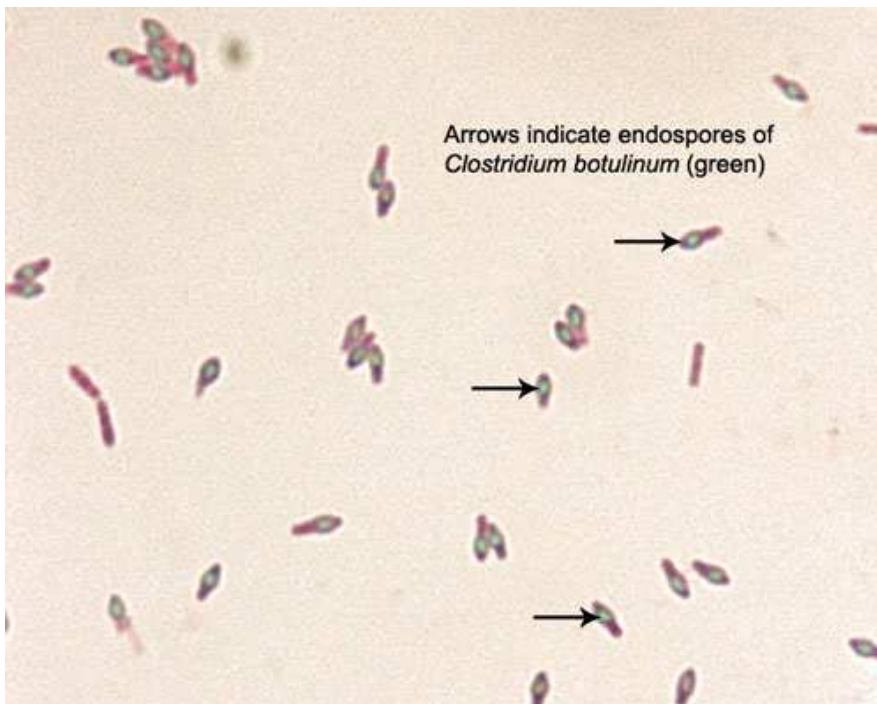


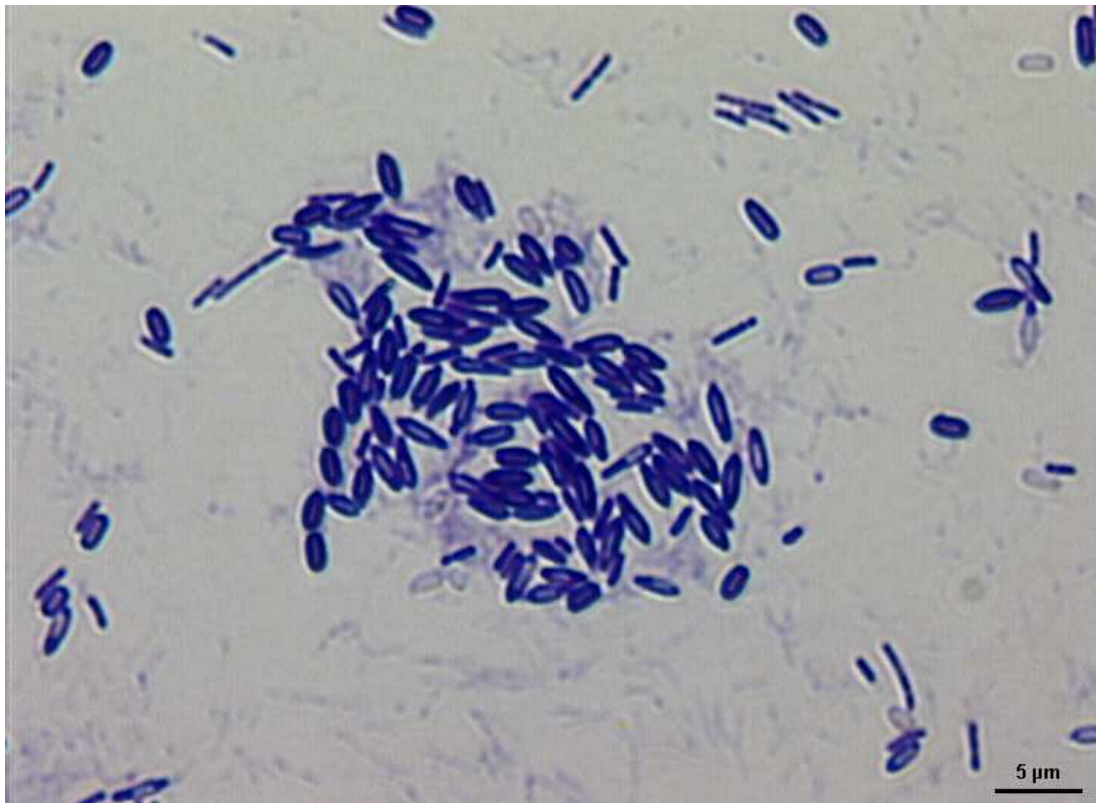


Clostridium botulinum

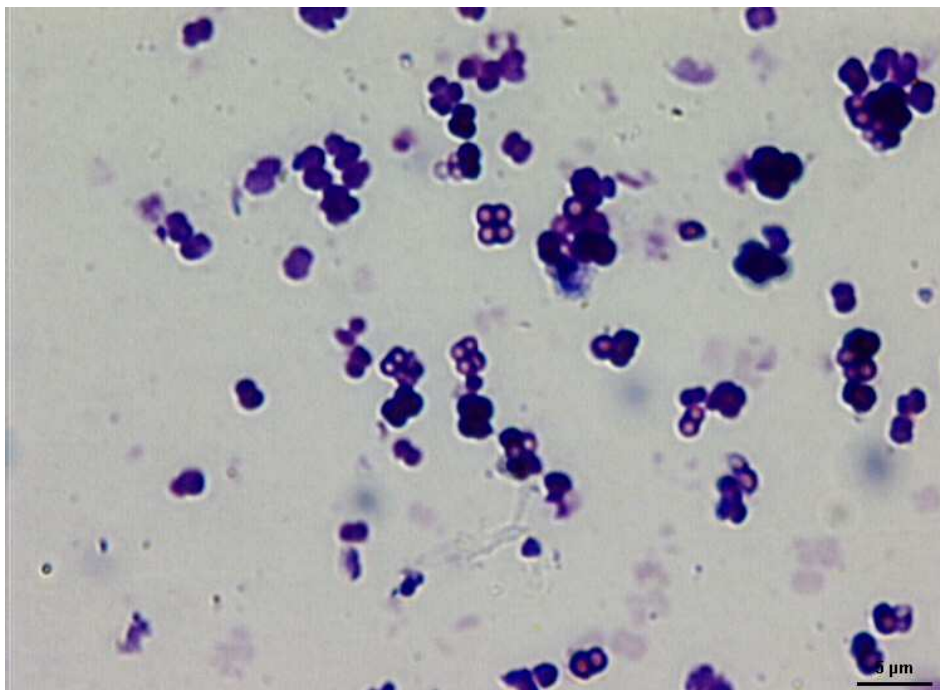


TEM, *Bacillus stearothermophilus*

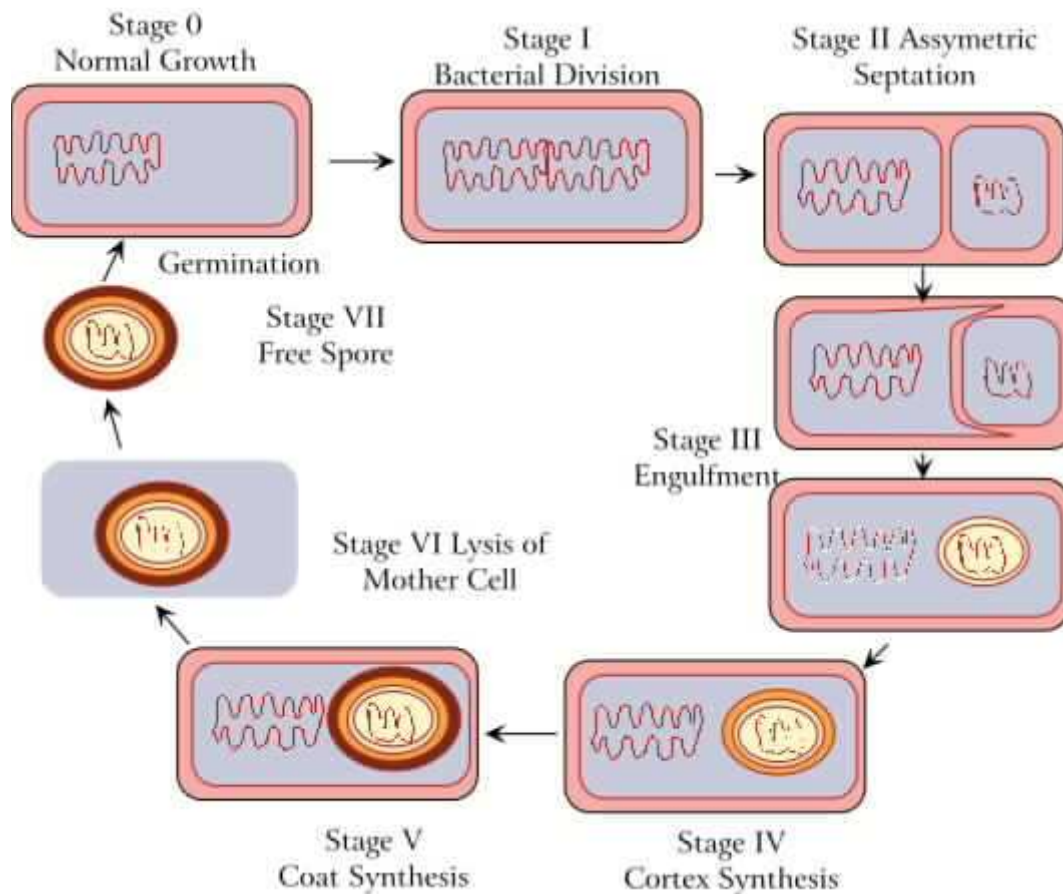




Paenibacillus polymyxa – oválné, vyklenující spory



Sporosarcina ureae – kulaté spory



Zdroje: Skripta Mikrobiologické praktikum

Obrázky: Miniatlas mikroorganismů a dále (včetně animací):

<http://student.cbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit1/prostruct/spore.html>

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. Bičičky (flagely) jsou proteinové struktury sloužící k pohybu bakterií. Bičičky jsou velmi křehké a nejsou viditelné pod světelným mikroskopem. Přítomnost a rozmístění bičiček jsou důležité znaky pro identifikaci a klasifikaci bakterií. Podle rozmístění rozeznáváme bičičky 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 safraninu (roztok 2).
- f. Opláchněte destilovanou vodou a osušte filtračním papírem.
- g. Pozorujte pod mikroskopem imerzním objektivem. Spory jsou zbarveny zeleně, ostatní buněčný obsah červeně.