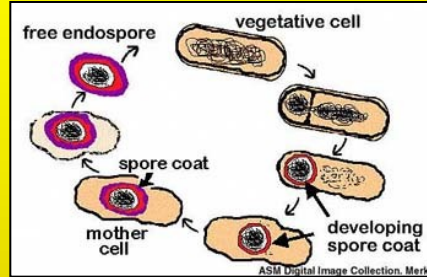
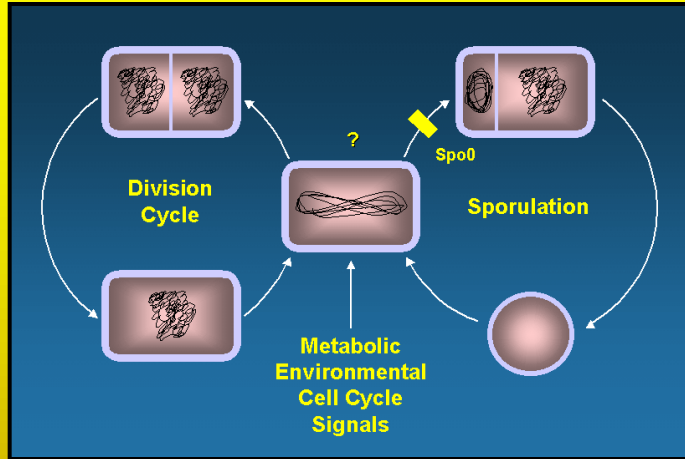
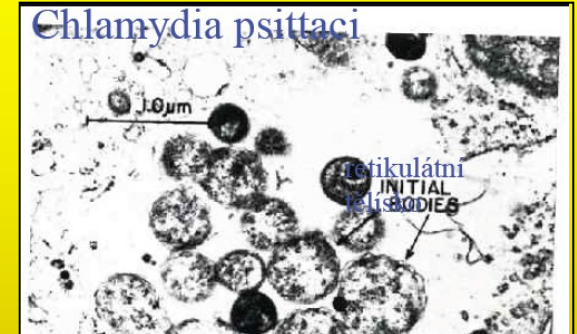


Růstové cykly bakterií

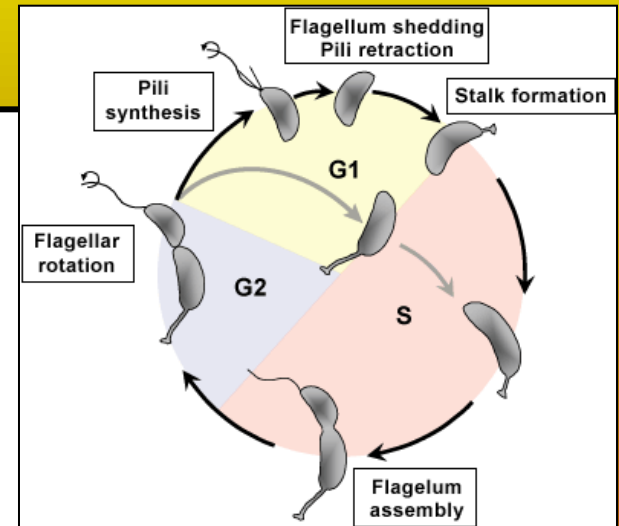


Tvorba spory



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*



Buněčný cyklus
Caulobacter crescentus

Dělení bakteriálních buněk

- Dělení binární
- Dělení asymetrické
- Dělení vedoucí ke vzniku diferencovaných populací
- Buňka vs. populace buněk

Reprodukce bakterií

- Před dělením musí buňka
 - dosáhnout potřebné velikosti
 - nahromadit dostatečné množství živin
 - být ve vhodných podmínkách
 - **zreplikovat** (zdvojit) genetickou informaci (**DNA** i **plasmidy**)
 - oddělit repliky DNA do příslušných částí buňky

Reprodukce bakterií

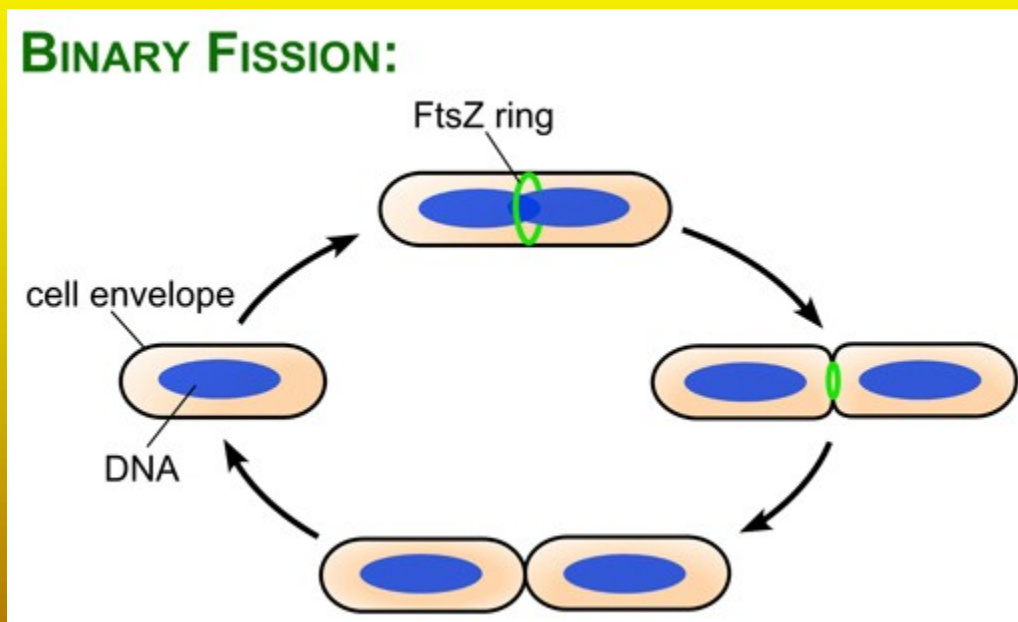
- **Generační doba (doba zdvojení)** – doba mezi dvěma děleními buňky
 - v optimálních podmínkách 20-30 minut
- **Replikace DNA trvá déle než je generační doba**, k iniciaci další replikace dochází před ukončením replikace
 - **dichotomní replikace DNA**
 - pouze u bakterií = replikace eukaryotické DNA probíhá paralelně na více místech
 - jedna bakterie se vlastně dělí naráz několikrát se časovým zpožděním

Buňka – generační doba

Bakterie	Medium	Generační doba (minuty)
<i>Escherichia coli</i>	Glucose-salts	17
<i>Bacillus megaterium</i>	Sucrose-salts	25
<i>Streptococcus lactis</i>	Milk	26
<i>Streptococcus lactis</i>	Lactose broth	48
<i>Staphylococcus aureus</i>	Heart infusion broth	27-30
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Milk	66-87
<i>Rhizobium japonicum</i>	Mannitol-salts-yeast extract	344-461
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Synthetic	792-932
<i>Treponema pallidum</i>	Rabbit testes	1980

Reprodukce bakterií

- Nejen binární dělení!!

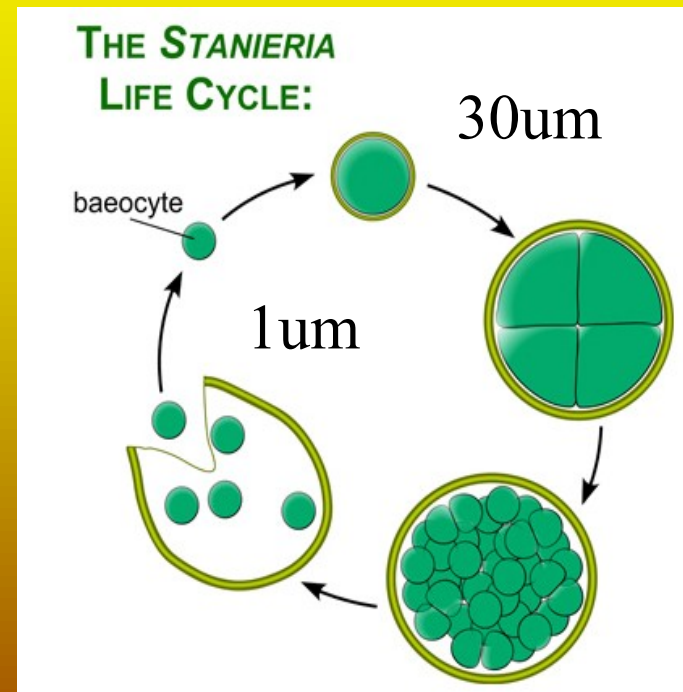
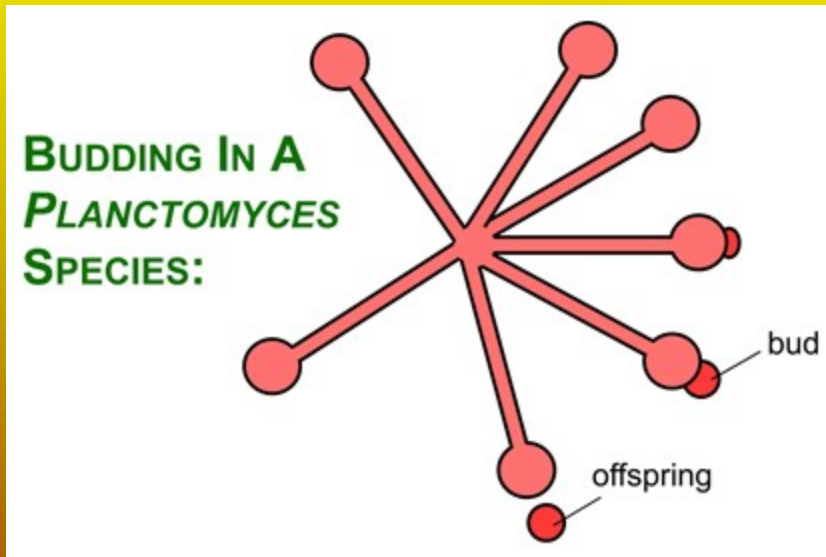


Zdvojení genet.mat.
Segregace nukleoidu
Monomery FtsZ
do středu buňky
Ochrana cytoplazmy
Syntéza b.s.

- Studie – vývoj nových terapeutik bránících dělení buněk...studium struktur a procesů dělení

Neobvyklé příklady reprodukce

- Růst a mnohočetné dělení mateřské buňky
- pučení



Planctomycetes, Cyanobacteria, Firmicutes

sinice

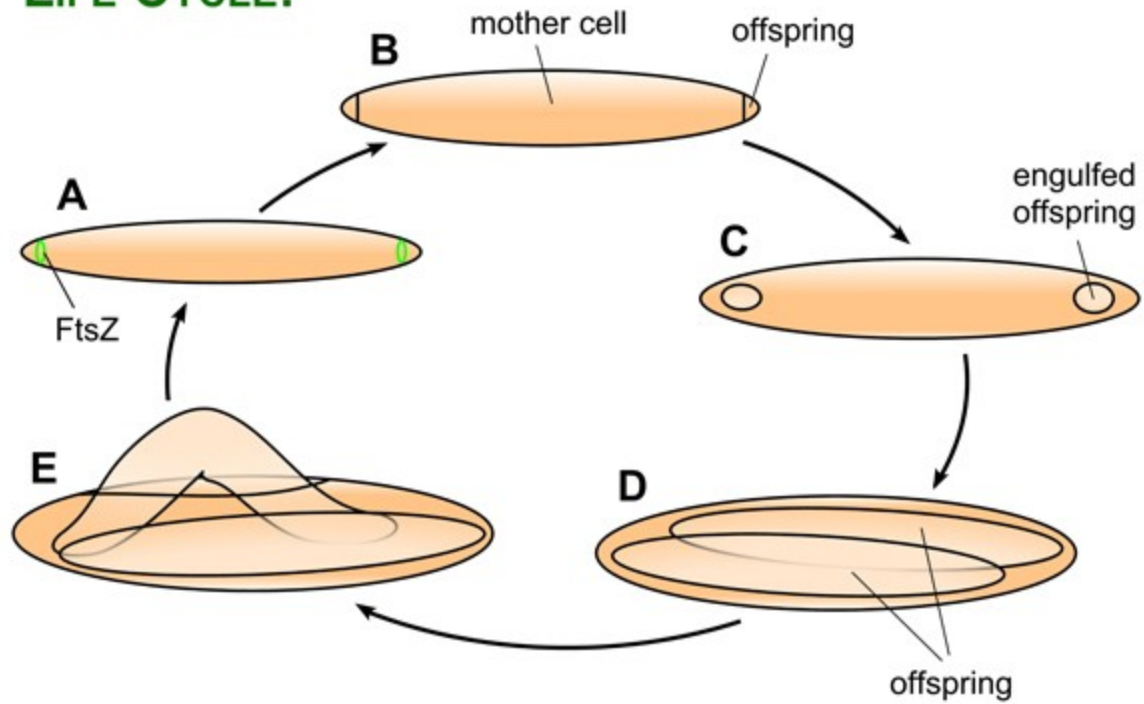
- Růst mateřské buňky:

Epulopiscium spp., *Metabacterium polyspora* and the Segmented Filamentous Bacteria (SFB)

- jako spory bacilů

- In large *Epulopiscium* spp. this unique reproductive strategy begins with asymmetric cell division, see The *Epulopiscium* Life Cycle Figure. Instead of placing the FtsZ ring at the center of the cell, as in binary fission, (A) Z rings are placed near both cell poles in *Epulopiscium*. (B) Division forms a large mother cell and two small offspring cells. (C) The smaller cells contain DNA and become fully engulfed by the larger mother cell. (D) The internal offspring grow within the cytoplasm of the mother cell. (E) Once offspring development is complete the mother cell dies and releases the offspring.
- Our lab studies the mechanisms of intracellular offspring development in *Epulopiscium* and *Metabacterium polyspora*. We are interested in what mechanisms are conserved between these unusual reproductive processes and endospore formation. We hope to gain an understanding of how this novel form of cell reproduction developed over time and how it benefits these intestinal symbionts.

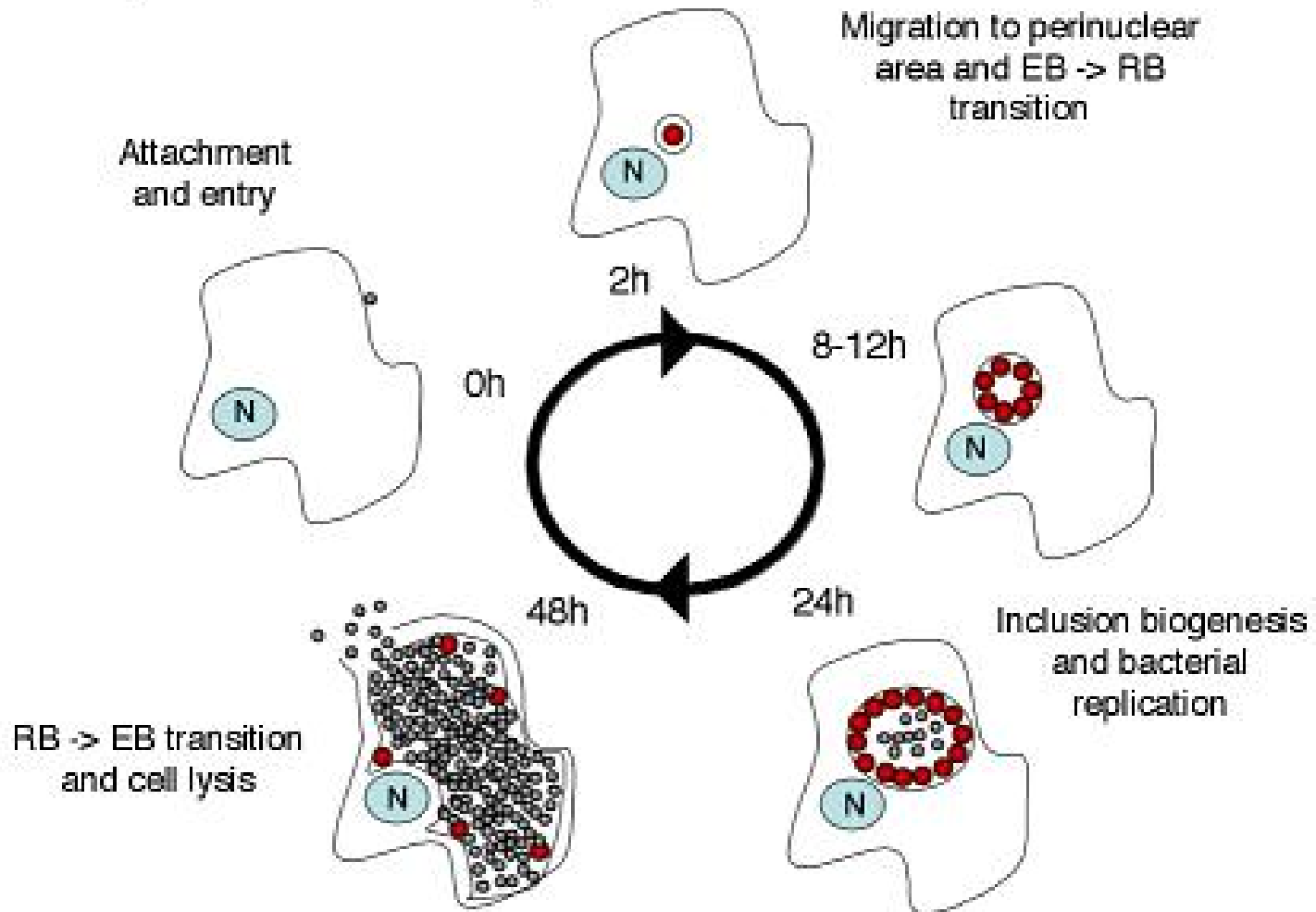
THE *EPULOPISCIUM* LIFE CYCLE:



Some Selected Reviews about Division and Unusual Modes of Reproduction

- Alternatives to binary fission in bacteria. E. R. Angert. *Nature Reviews Microbiology* (2005) vol. 3, pp. 214-224.
- Patterns of growth and development in pleurocapsalean cyanobacteria, J.B. Waterbury and R.Y. Stanier. *Microbiological Reviews* (1978) vol. 42, pp. 2-44.
- Bacterial mitotic machineries. K. Gerdes, J. Møller-Jensen, G. Ebersbach, T. Kruse and K. Nordström. *Cell* (2004) vol. 116, pp. 359-366.
- Bacterial cell division and the septal ring. D. S. Weiss. *Molecular Microbiology* (2004) vol. 54, pp. 588-597.

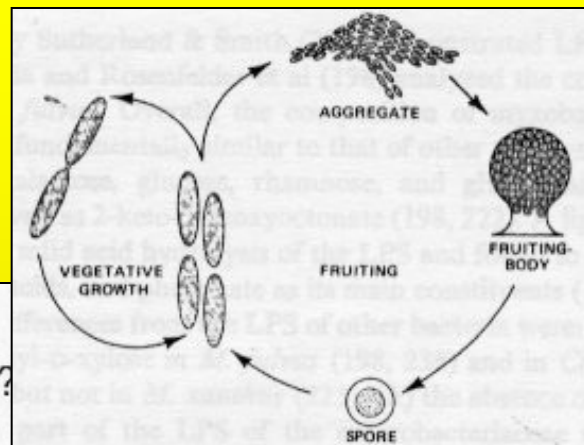
Chlamydia Infectious Cycle



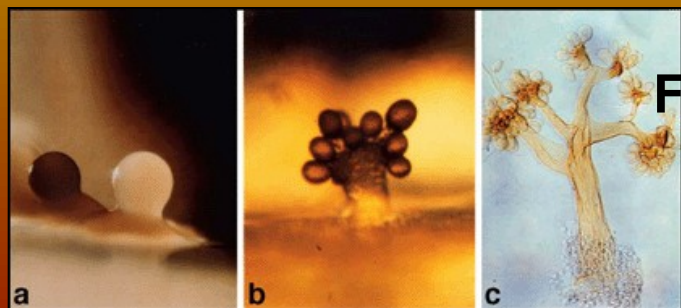
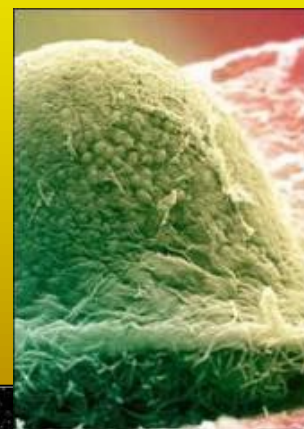
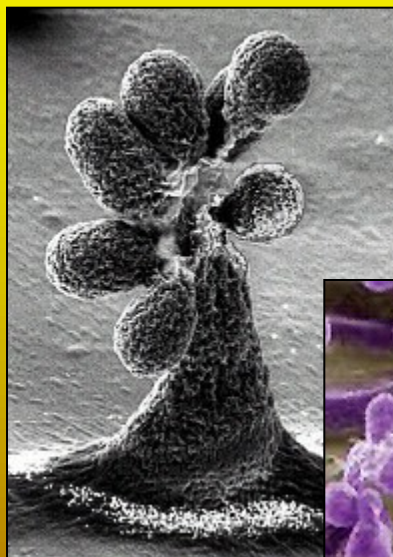
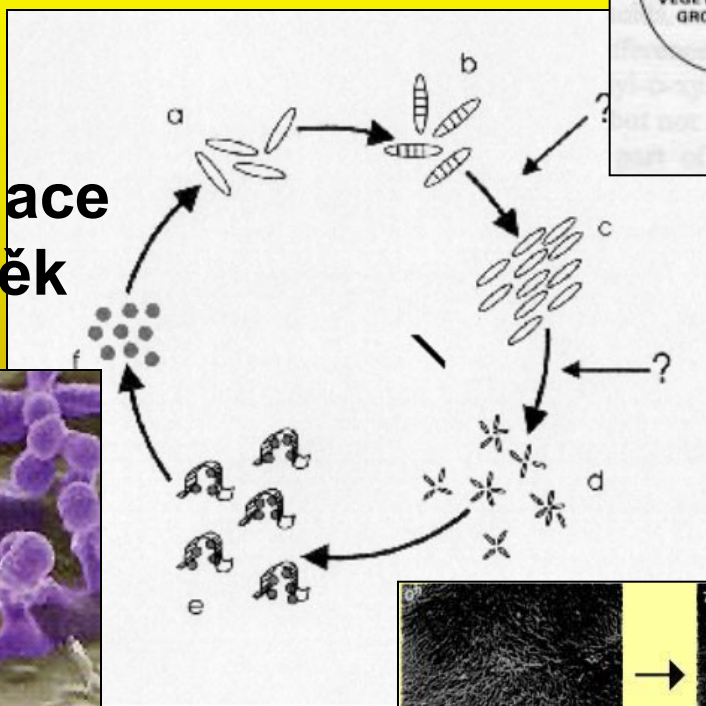
Růstové cykly bakterií

- 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*

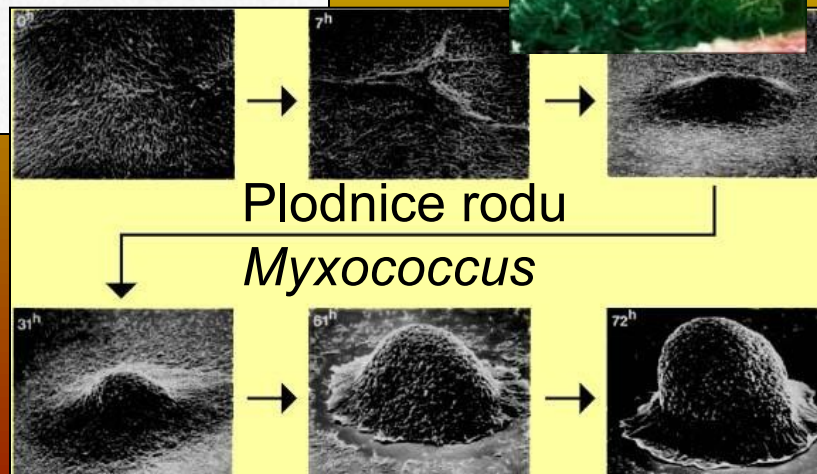
Komplexní růstový cyklus myxobakterií



Agregace buněk



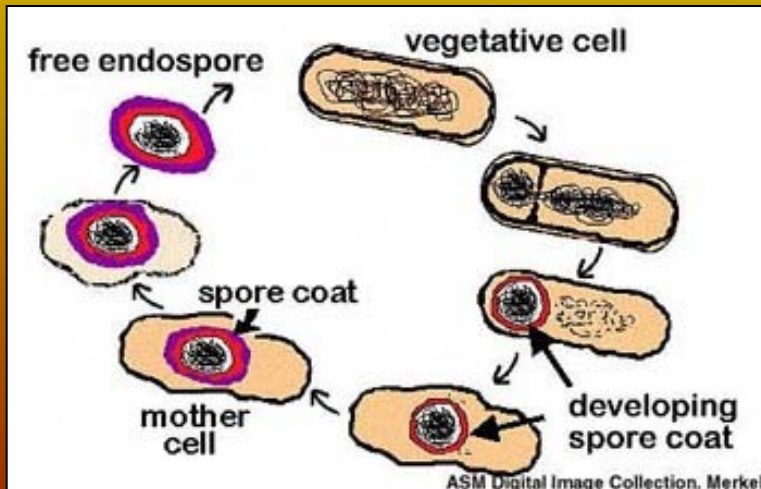
Fruktifikační orgány



Plodnice rodu *Myxococcus*

Jednoduché růstové cykly

- Adaptace či příprava (u sporulace) na změny podmínek životního prostředí; nikoli odpověď!
- U parazitů: přechod z prostředí těla vyšších organismů ven

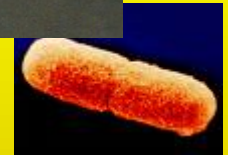


Jaké **buněčné formy** v doménách *Bacteria* a *Archaea* rozeznáváme?

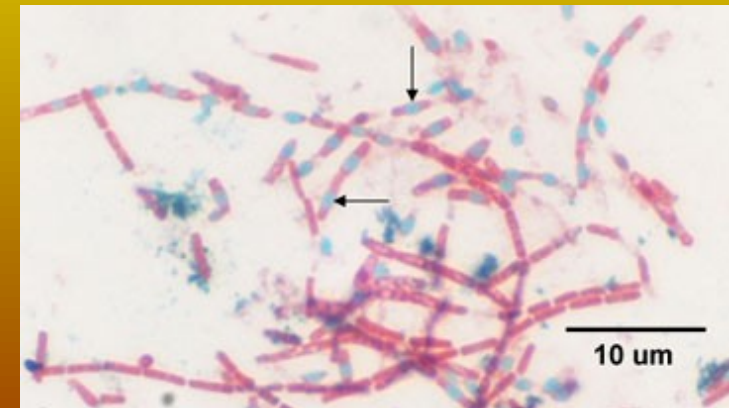
- rostoucí a dělící se **vegetativní formy buněk**
- struktury dovolující přežití nepříznivých podmínek (**cysty** odolné proti dehydrataci, ne však proti horku - *Azotobacter*, *Myxococcus*, *Sporocytophaga*, kdy je celá buňka obklopena protektivní vrstvou nad buněčnou stěnou)
- rody *Metylosinus* and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

Vegetativní a klidové stadium

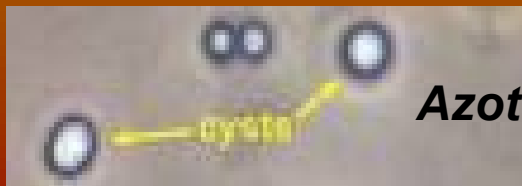
Tvorba spor



- 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*

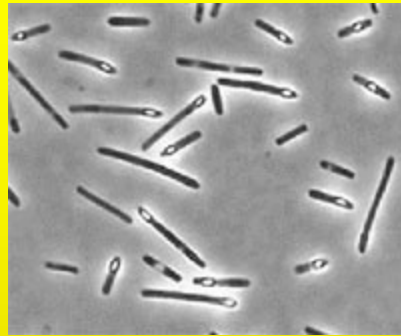


Bacillus megaterium – zelené spory obarvené varem v malachitové zeleni c

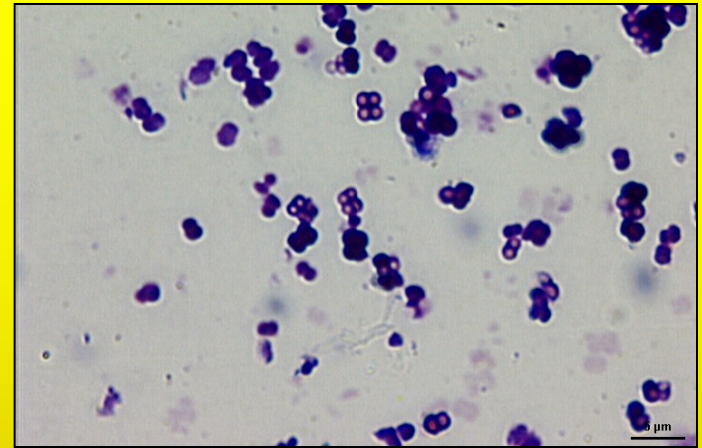




Clostridium difficile



C. perfringens



Sporosarcina ureae –
kulaté spory uvnitř
čtveřice (balíčku) buněk



Azotobacter – pouzdra, cysty



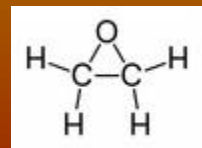
Endospora, sporulace

... 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 přežívat 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

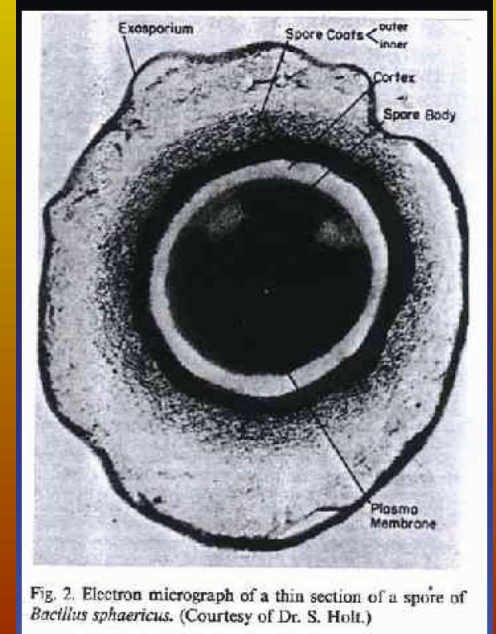


Fig. 2. Electron micrograph of a thin section of a spore of *Bacillus sphaericus*. (Courtesy of Dr. S. Holt.)

Pozorování endospor

vysoce světlolomné útvary
Nebarví se Gramem

- Pozorovat neobarvené endospory můžeme **fázovým kontrastem** (zářící spory) nebo **Nomarského kontrastem** (plastický povrch buňky)



- **Jednoduchým barvením** nezvýrazníme spory samotné, jen vyklenutí buňky (způsobené jejich přítomností).

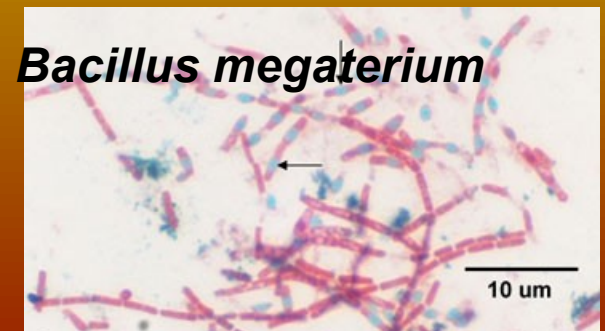
Přímo obarvit endosporu od stadia vzniku kortexu je možné pouze za horka (prospora je pro barvivo ještě propustná!)

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**.
- Příklad: 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**.

K čemu je dobré barvení spor?

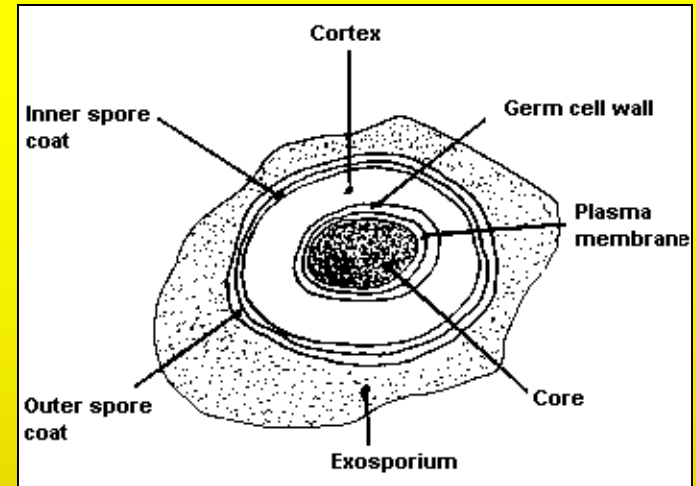
Malachitová zeleň



- Spory se **velmi těžko barví** i po fixaci

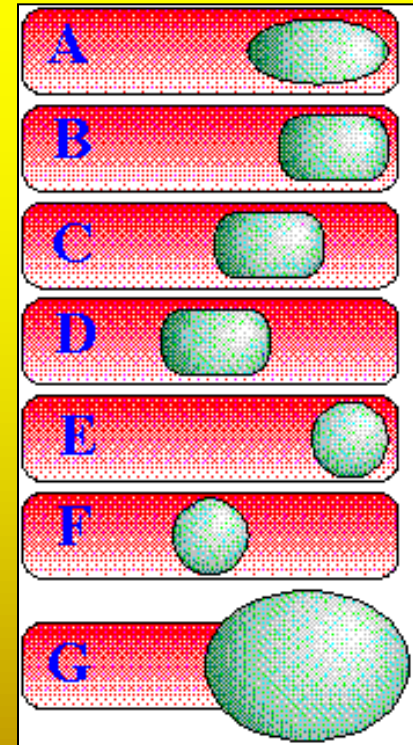
silný, špatně prostupný obal

- 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 závisí na:
 - jejich vývojovém stádium
 - stáří kultury
 - kvalitě živné půdy
 - individuálních vlastnostech mikrobů
- Barvitelnost spor se také (podobně jako u plísní) zlepšuje použitím sporulačních médií (s přídavkem manganu nebo ury).

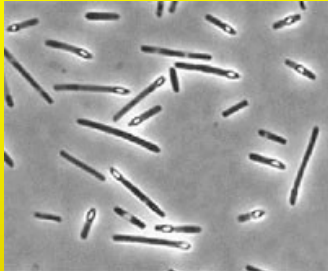


Uložení v buňce:

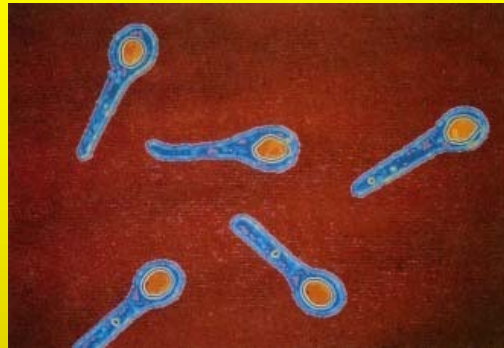
- terminální = na konci tyčinky
C. tetani (jakoby paličky),
B. stearothermophilus
- centrální (*C. histolyticum*, *C. novyi*,
C. septicum, *B. anthracis*, *B. cereus*)
- subterminální = paracentrálně =
= mezi středem a pólem buňky, nejčastěji
(*C. botulinum*, *C. sporogenes*, *B. brevis*)



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



B. perfringens



C. tetani

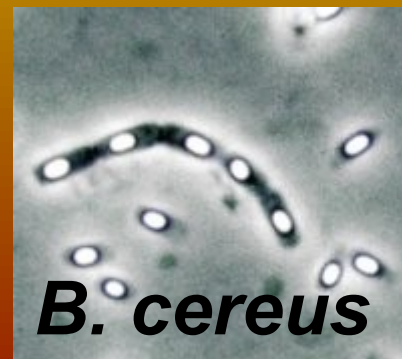


Clostridium botulinum

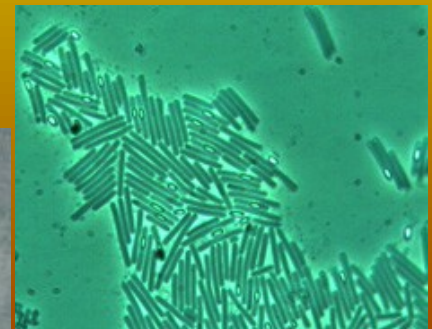
- mírné rozšíření: *C. histolyticum* a *C. novyi*
- U některých druhů spora buňku nezduřuje: *B. anthracis*, *B. cereus*.



B. anthracis



B. cereus



Clostridium difficile

Bacillus sphaericus



Klinicky 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!

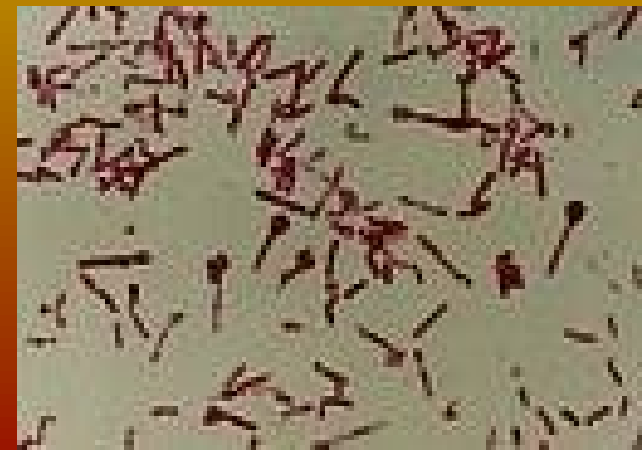
- Spory inaktivovány po 20' při 121 °C vodní páry při 2 atm (0,2Mpa) a po 90' - 180' při 160 - 200 °C suchého tepla, vysoce termorezistentní, přežijí až pětihodinový var



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

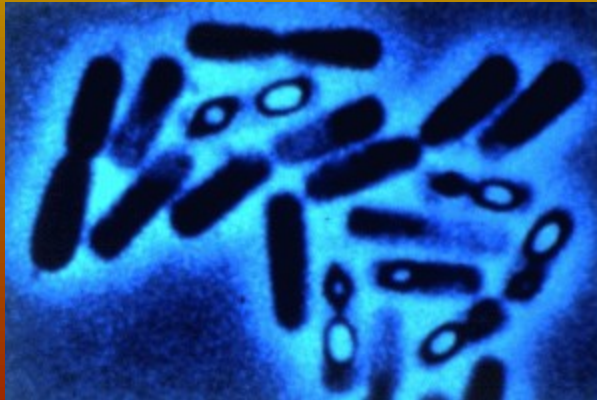
Bacillus anthracis

– biologická zbraň, anthrax





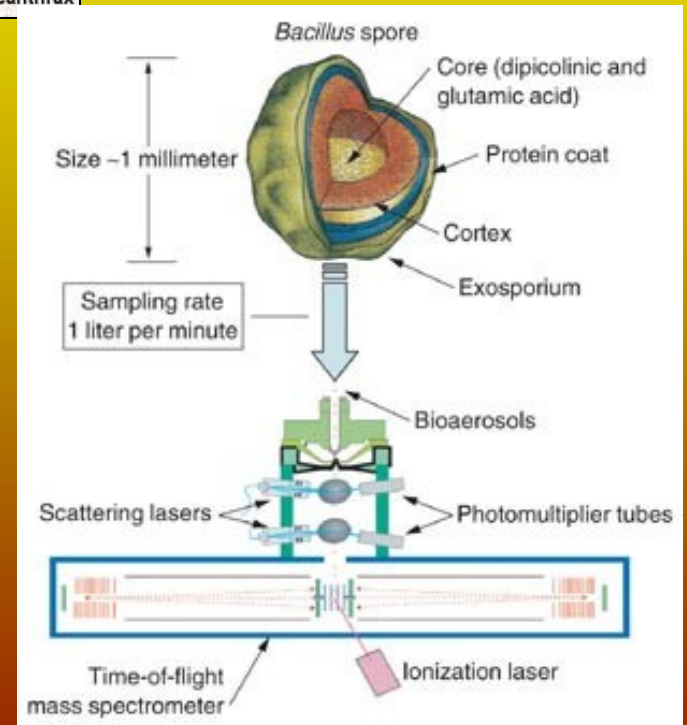
- biopesticidy - Bt toxin transgen – *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*



Bacillus anthracis



Copyright © 2004 Dennis Kunkel Microscopy, Inc.



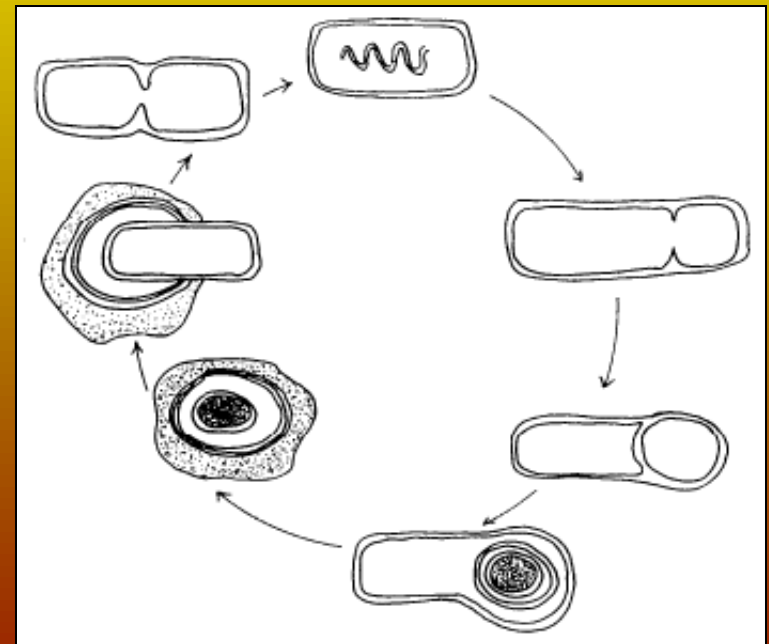
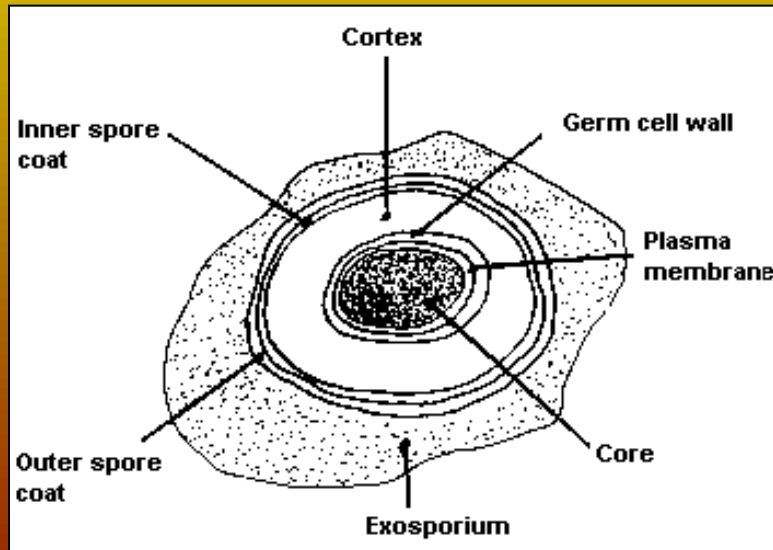
Lidský neutrofil útočící
na *Bacillus anthracis*

bioaerosol mass spectrometry (BAMS)

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*



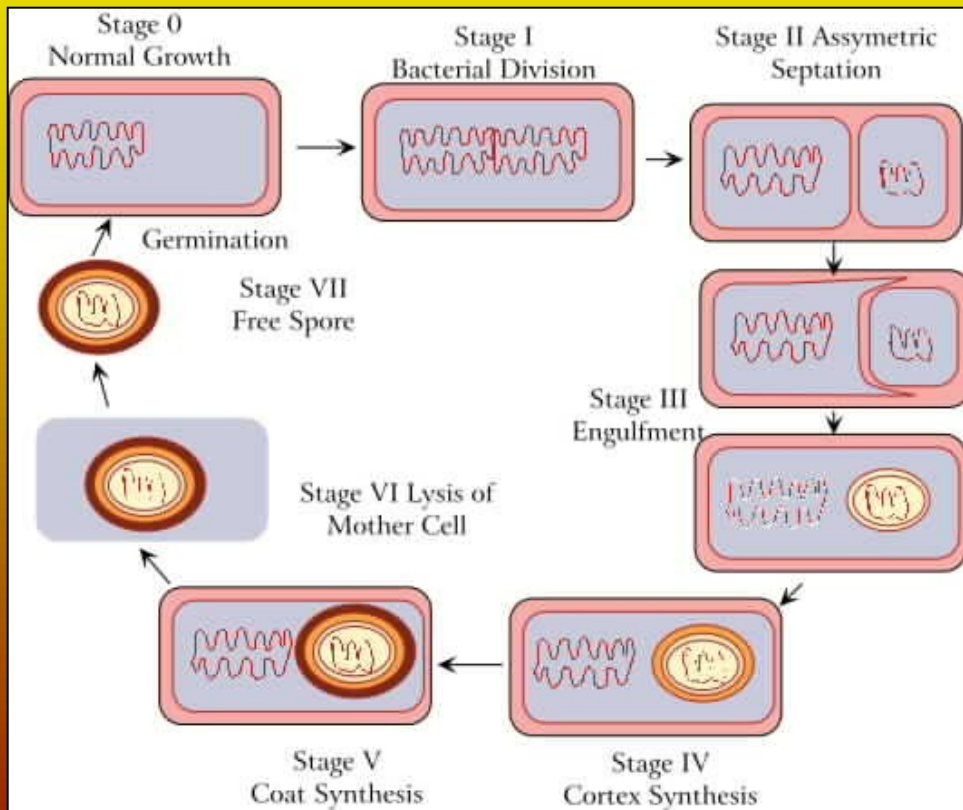
**Během sporulace *B. subtilis* můžeme rozlišit 7 fází (I –VII),
jež lze charakterizovat morfologicky a na molekulárně
biologické úrovni.**

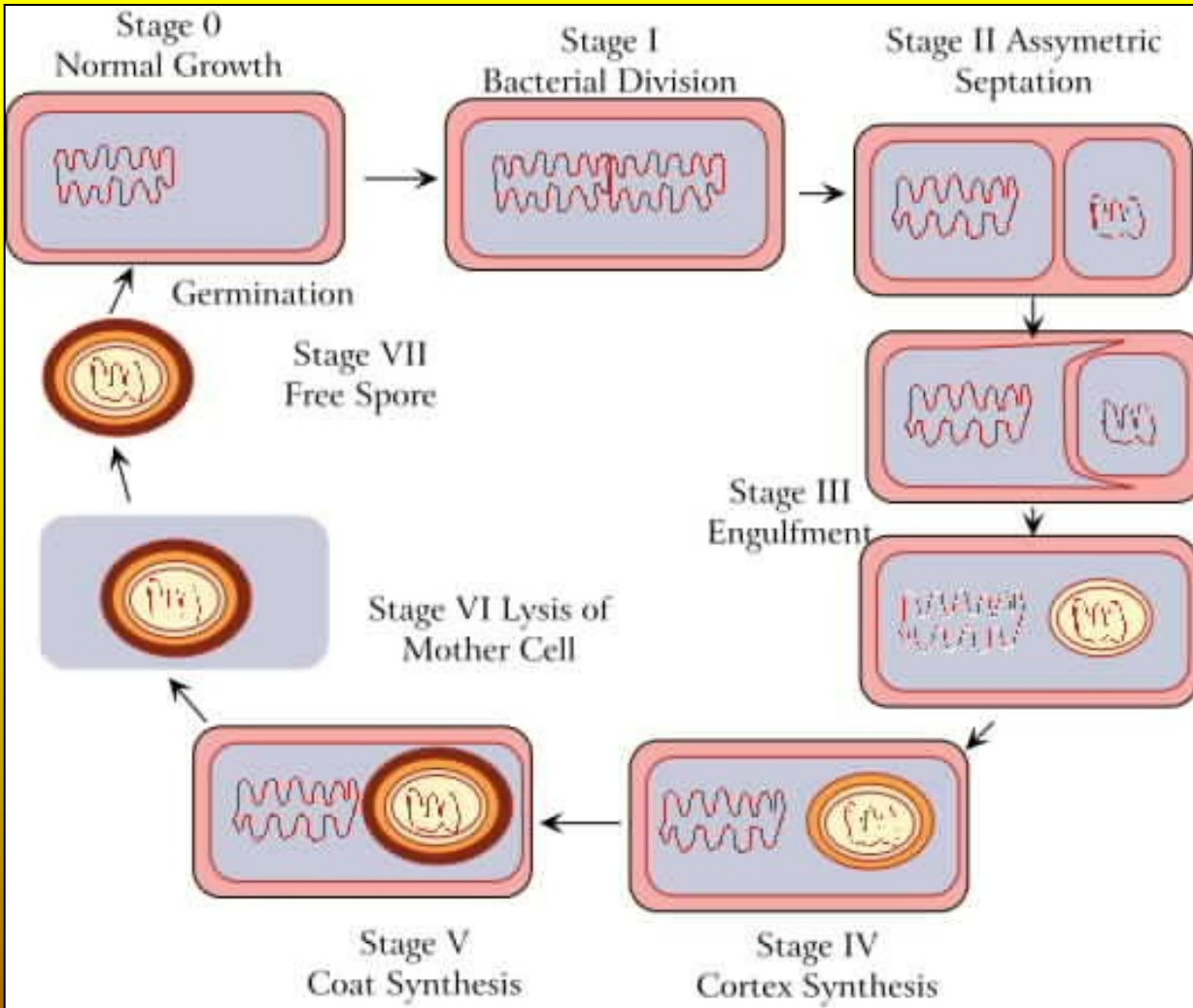
Za proces vzniku endospory zodpovídá 7 – 8 genů.

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**



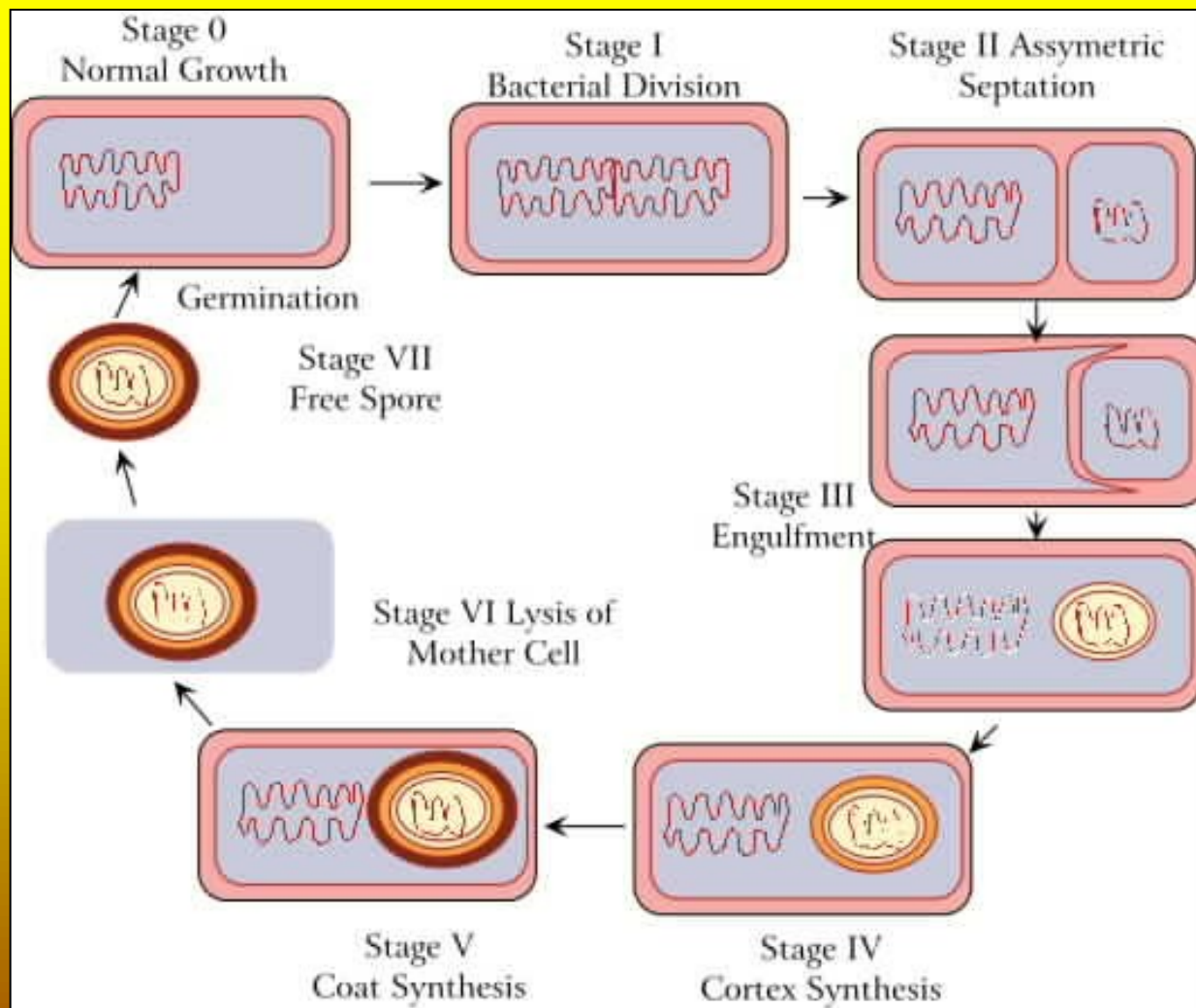


Fáze I

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

Jeden z prvních signálů sporulace: vznik kvanta volutinu

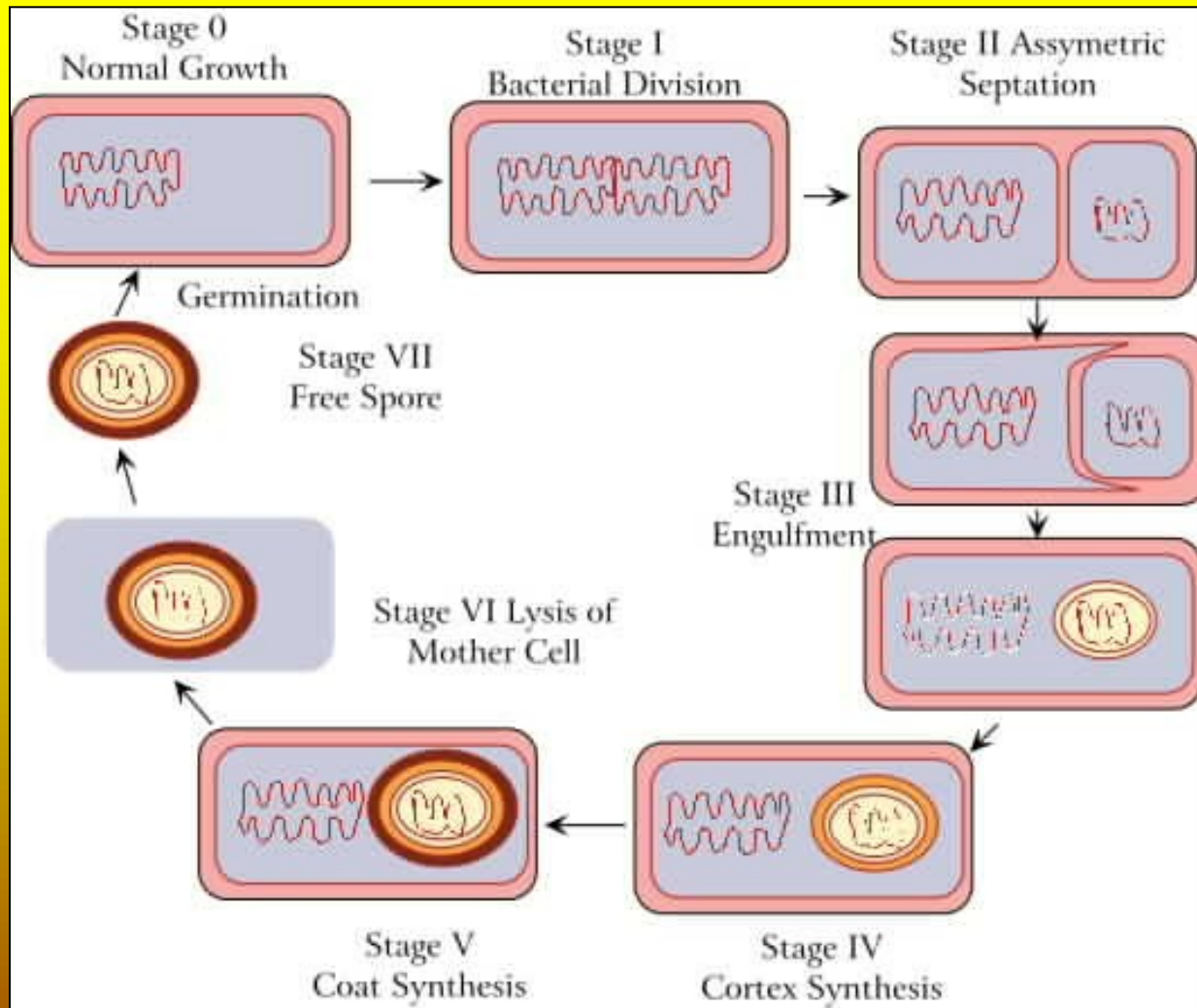
Druhým signálem je zvýšení množství enzymů Krebsova cyklu a hydroláz, spotřeby acetátu



Fáze II

- ukončena replikace buněčného genetického materiálu
- ten se rozestupuje k pólům buňky
- končí invaginace cytoplazmatické membrány

V místě přepážky se dvojitě vchlípí cytoplazmatická membrána



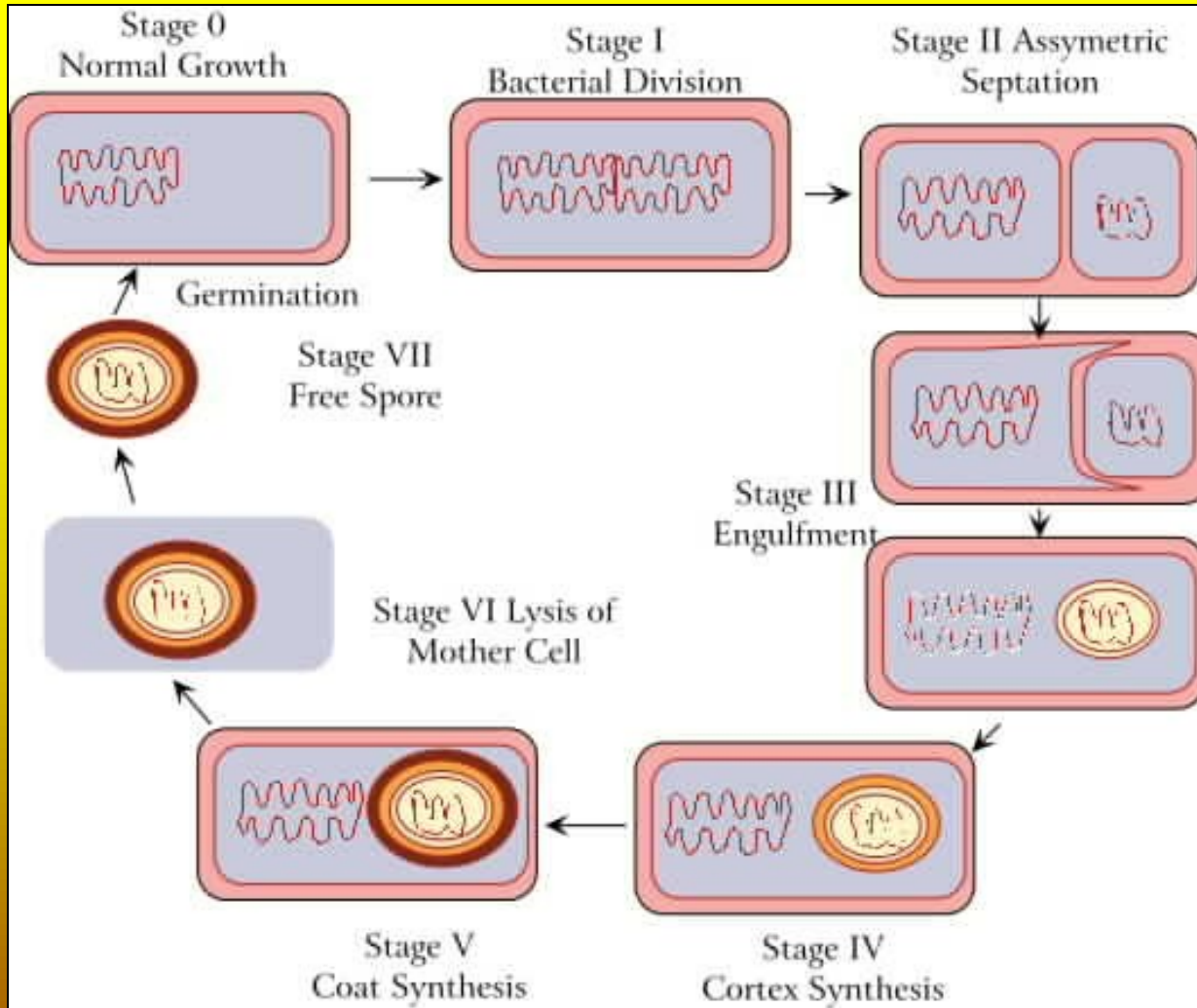
Fáze III

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

Není dosud světlolomná

→ Spora ještě nesvíí při mikroskopii ve fázovém kontrastu)

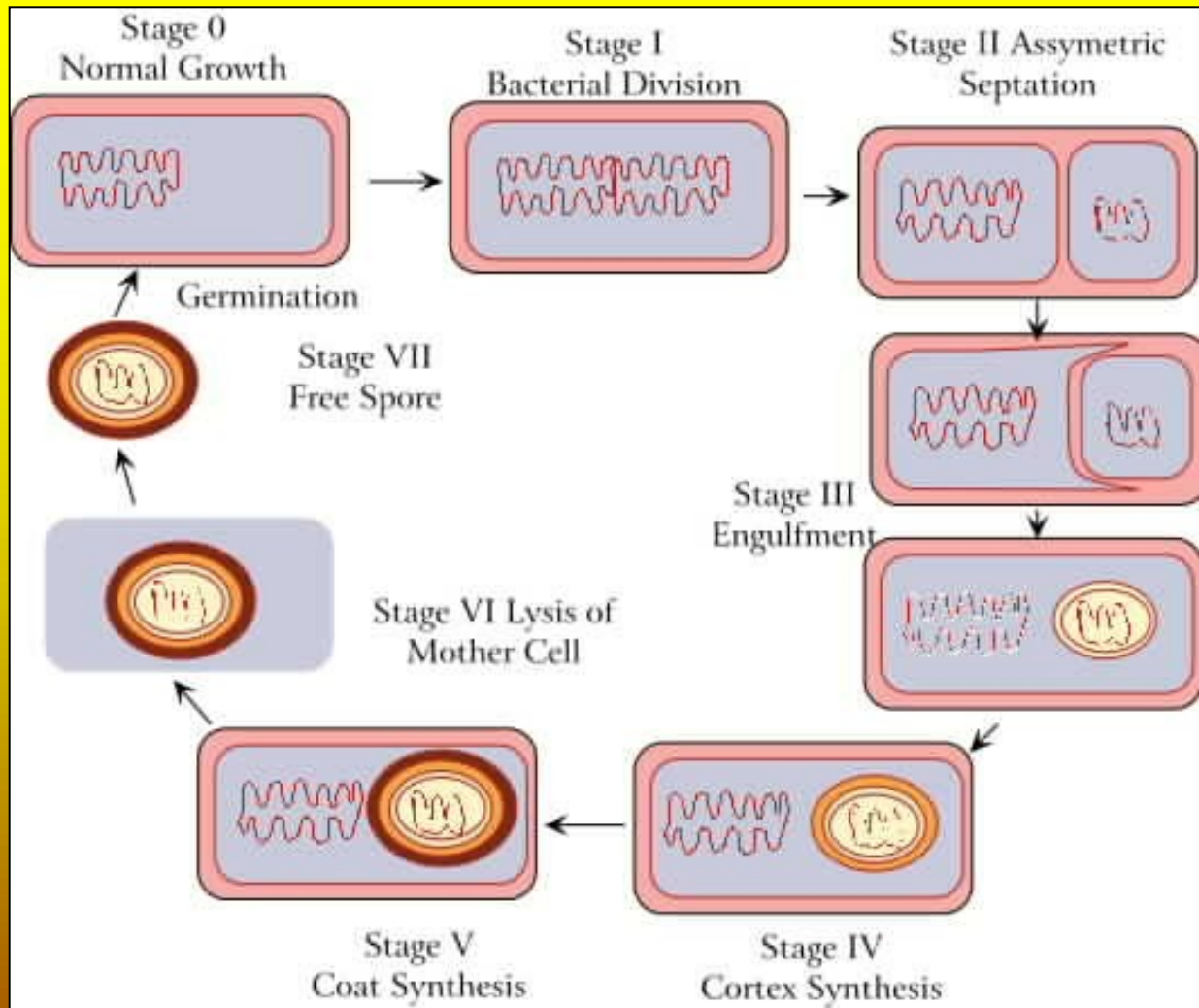
Fáze IV



- 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.

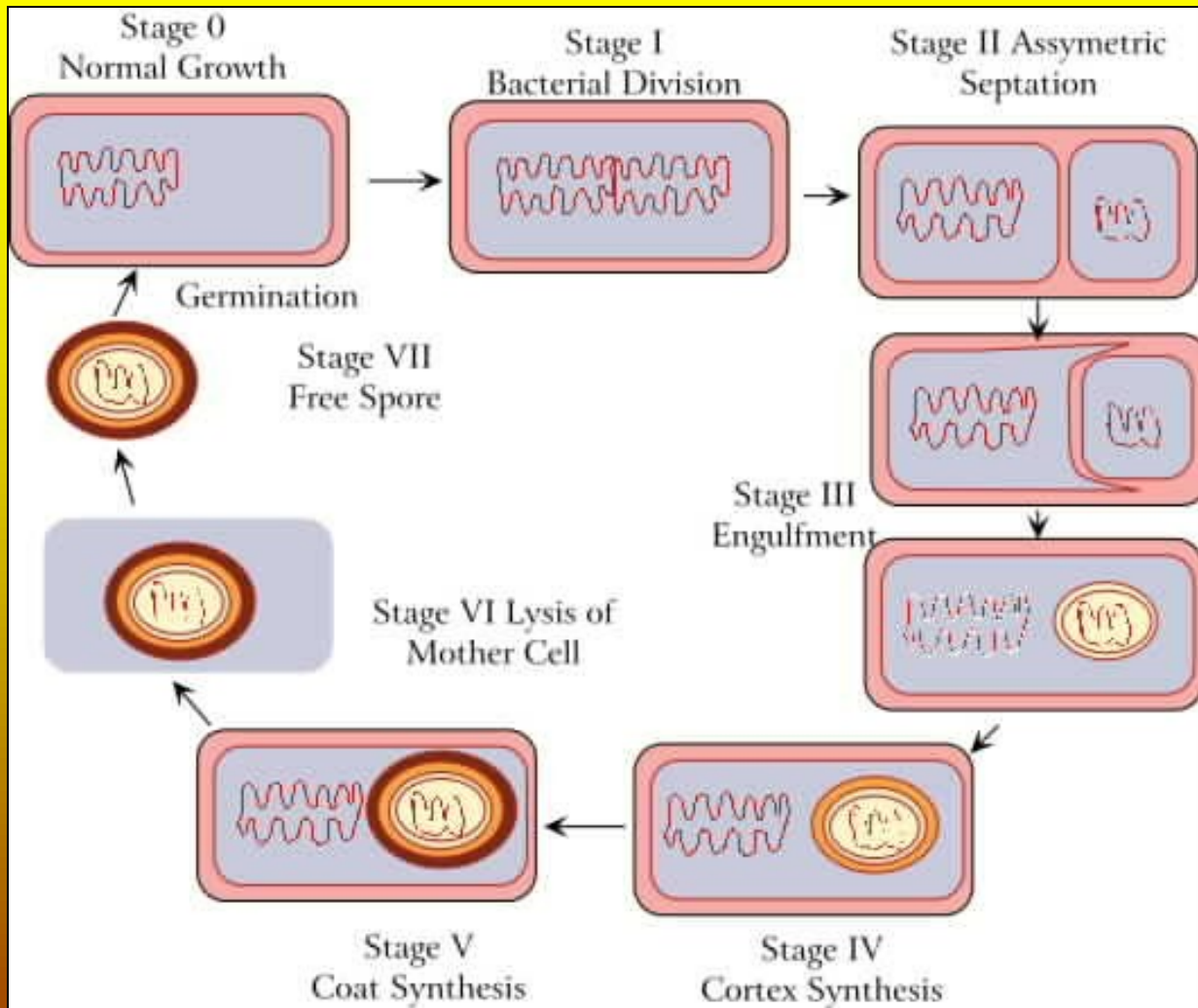
Termorezistence – do prospory transportována k. dipikolinovaná



Fáze V

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

Chemotaxonomie – unikátní bílkoviny pláště

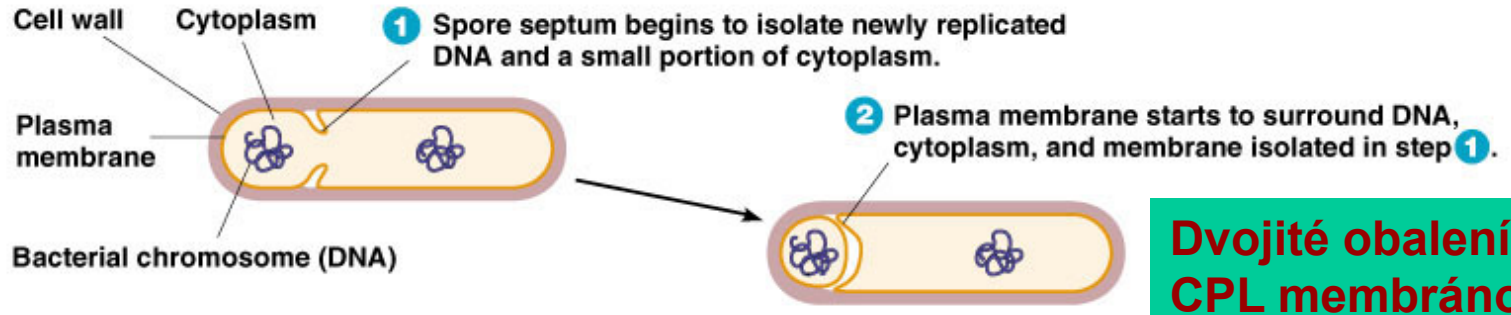


Fáze VI

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

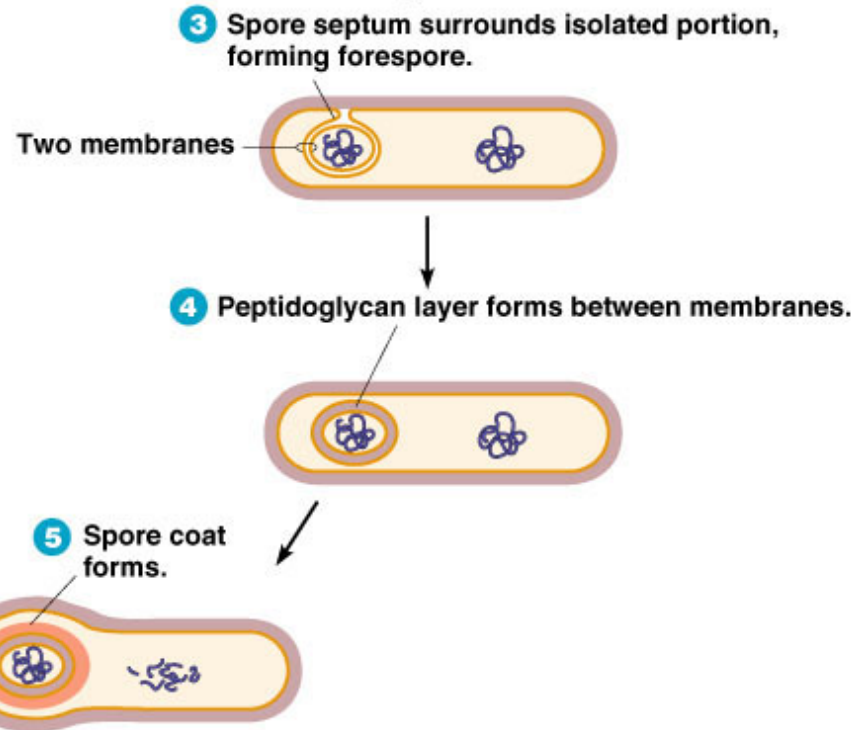
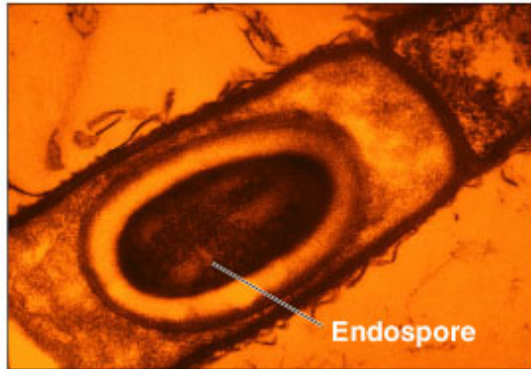
Fáze VII

- **Volná zralá spóra.**



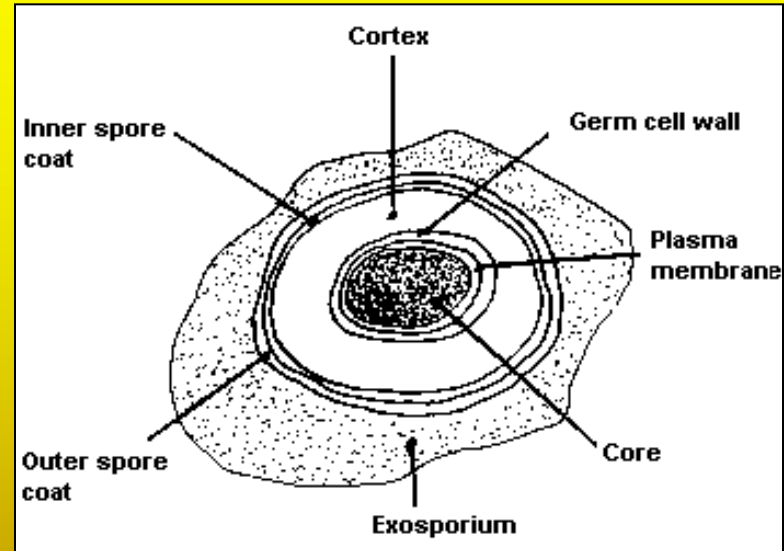
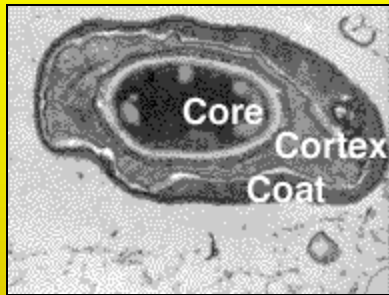
Dvojitě obalení spory CPL membránou

(a) Sporulation, the process of endospore formation



(b) An endospore in *Bacillus anthracis*

Stavba zralé spory



- Jádro – gelová matrix
 - bakteriální jaderný ekvivalent nukleoid
 - kalcium dipikolinát (CDPA) nebo pyridin-2,6-dikarboxylová kyselina, 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).

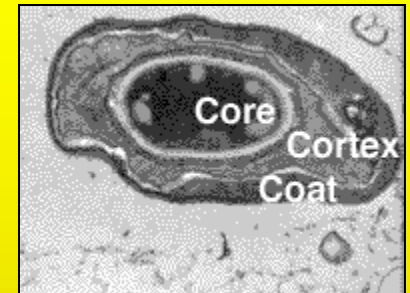
Jen 20-30 % PG jednotek shodných s jednotkami v buněčné stěně.

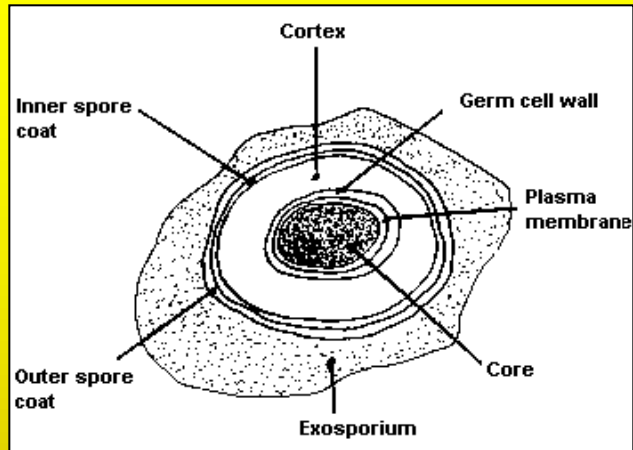
- Zbylých 50-60 % **N-acetylmuramyl-laktam**,

- dalších 18-20 % kyseliny N-acetylmuramové je spojeno s **L-alaninem** namísto tetrapeptidu.

- Tyto modifikace zajišťují enzymy:

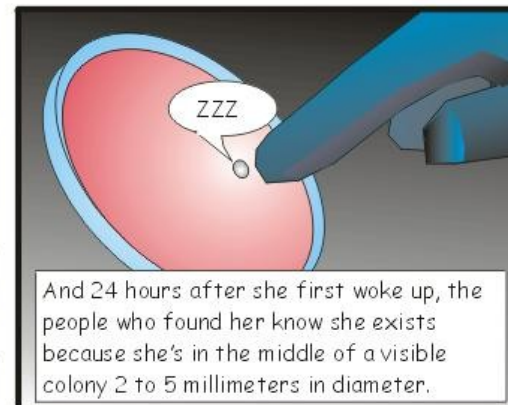
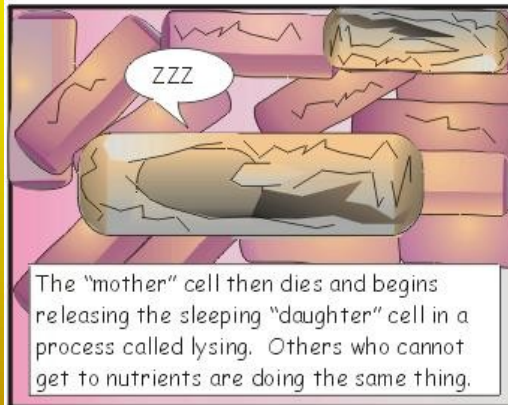
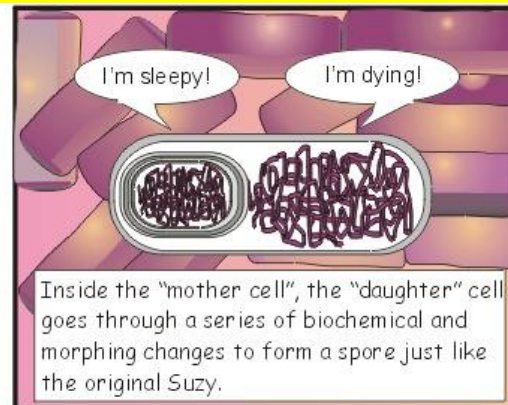
membránově vázaná **Glu-mesoDmp hydroláza** a cytosolová **Ac-Ala-Glu-mesoDmp lyáza**.





- **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,

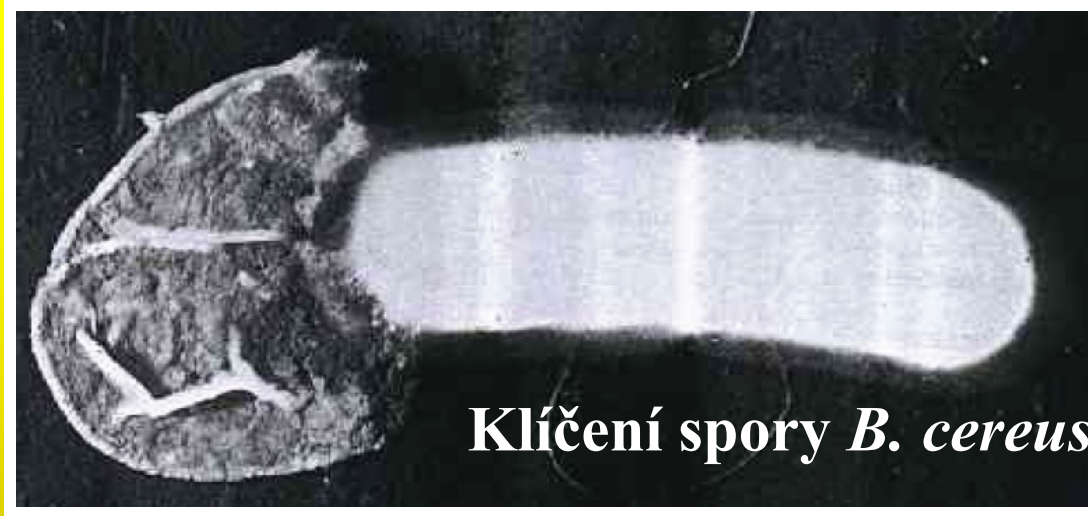
další aktivátory: malé organické molekuly, L-Ala, Ado a Ino, vyšší obsah bazí

V laboratořích zahřátí v přítomnosti vody.

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



vzniklé AMK - stavební kameny nových proteinů



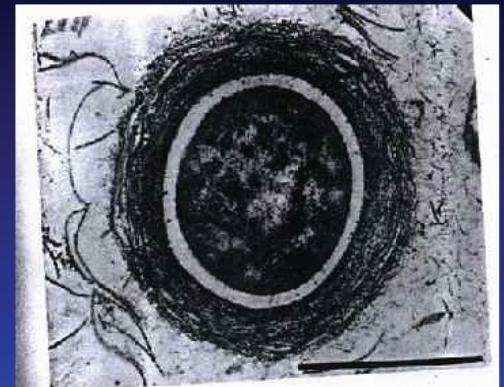
- Lytický enzym: p68 => p29 (kortikohydroláza) - depolymerizuje kortex pro nástupný průnik vody.
- Po dvou hodinách po germinaci spory následuje dělení vegetativní buňky.
- Inhibice klíčení: D-Ala, $MgCl_2$, PMSF

Exospory = cysty

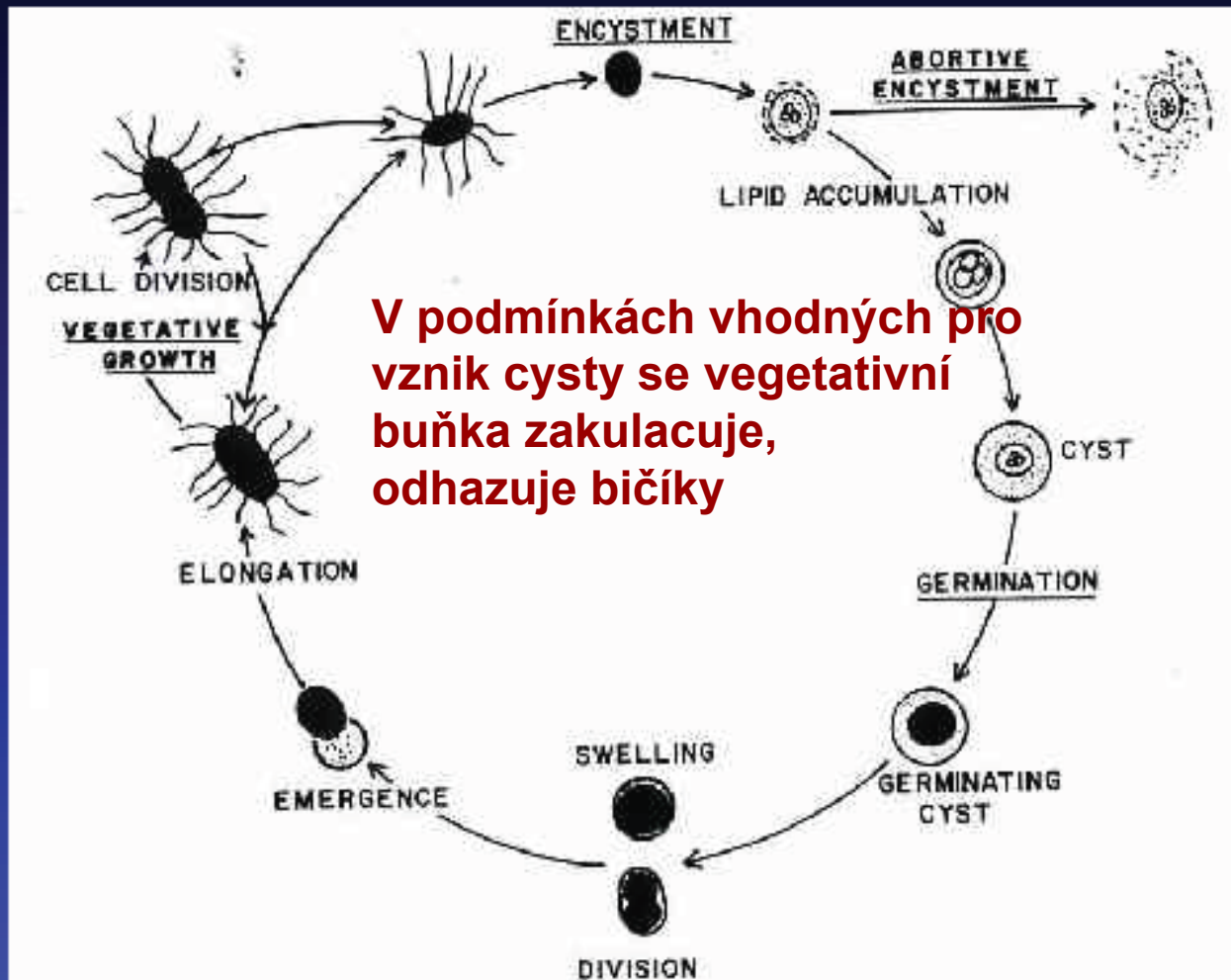


- Nejsou tolik rezistentní vůči teplu
- Rezistentní vůči vysychání
- Granula PHB – typická pro cysty
- Odlišné obaly – algináty, různé polysacharidy
- Nejpodrobněji popsány u *Azotobacter vinelandii*,
 - mnohovrstevný obal (vnější částí vyšší hustota), unikátní lipidy
- Za příznivých podmínek cysty klíčí 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 Sudoff, 1975.)

Methylosinus trichosporium

- metanotrof, opouzďřený
- 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*

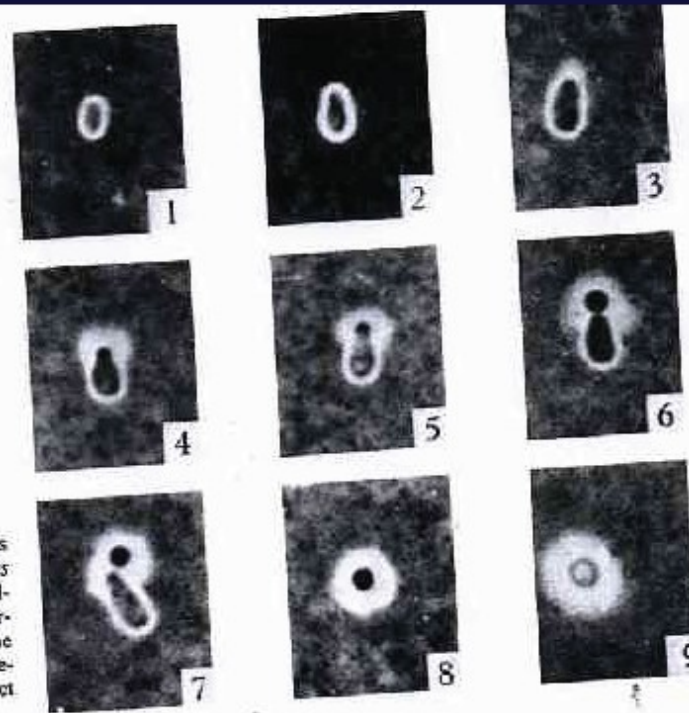
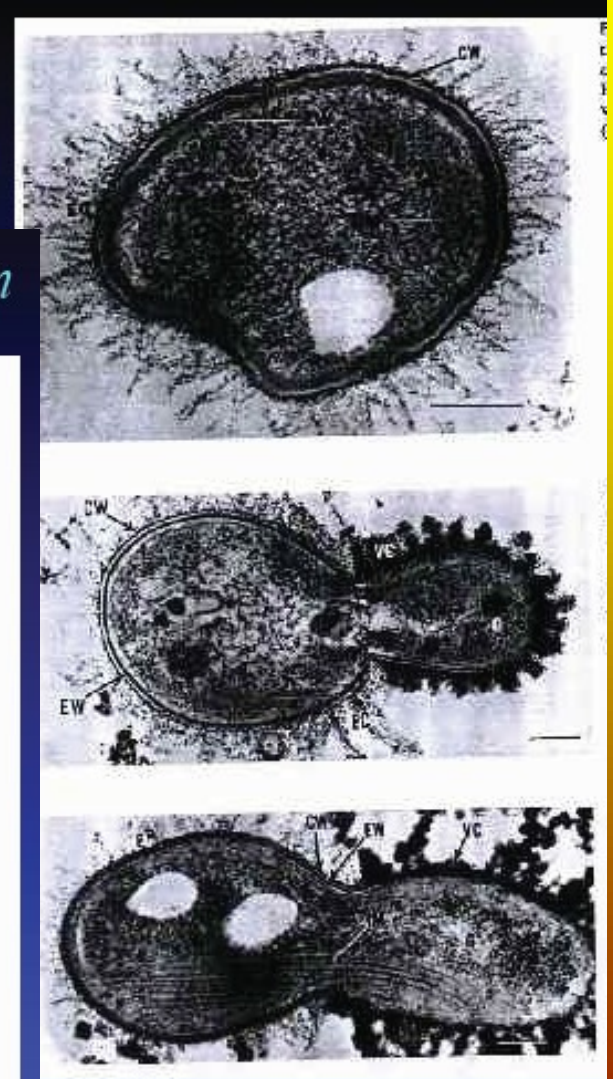


Fig. 7. Phase contrast photomicrographs of exospore formation by *Methylosinus trichosporium*. The capsulated, rod-shaped, vegetative cell becomes pear-shaped, and the tapered end buds off the cell that is eventually released as the refractile exospore. (From Whittenbury et al., 1970.)



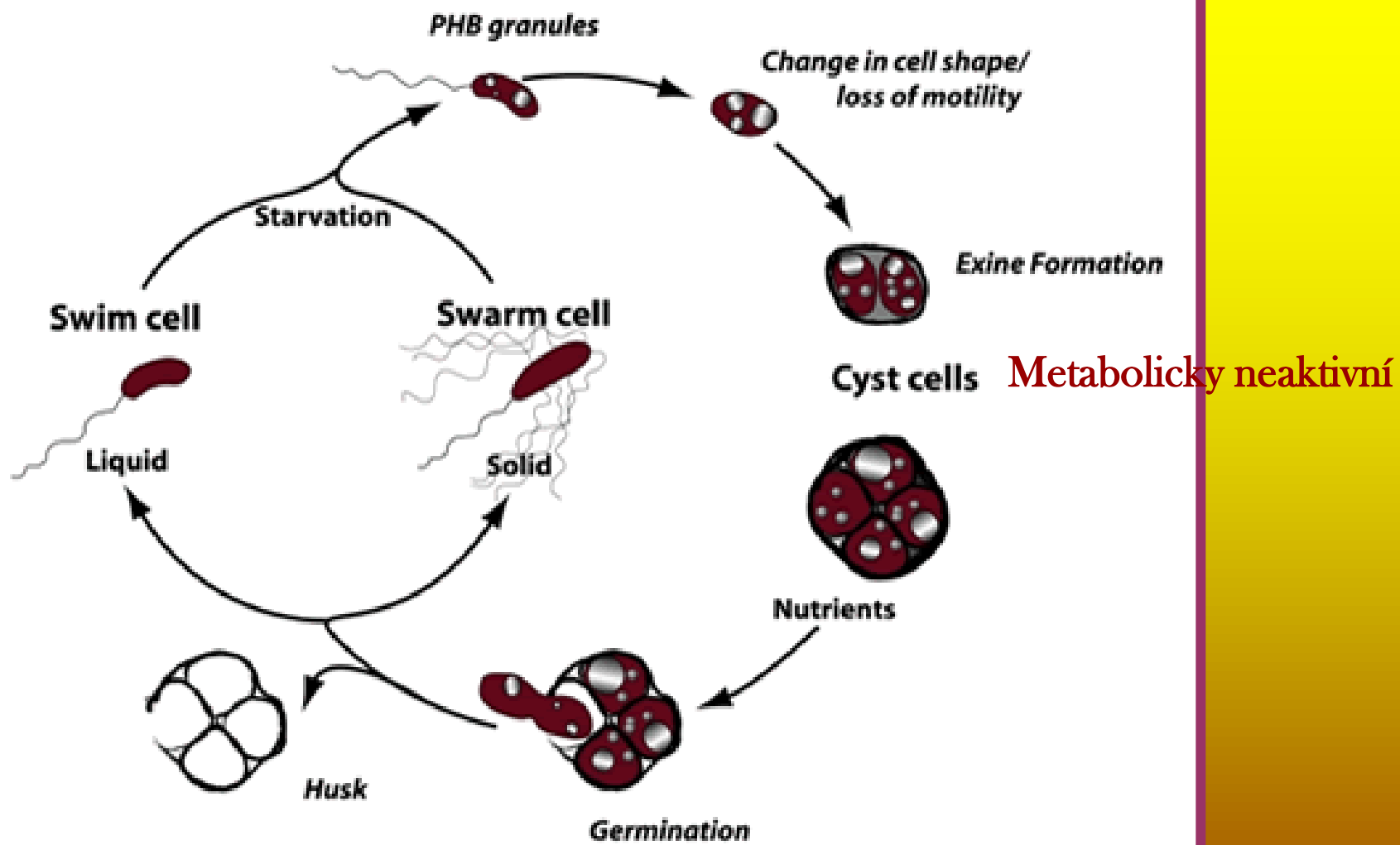


Fig 1, The *R. centenum* life cycle

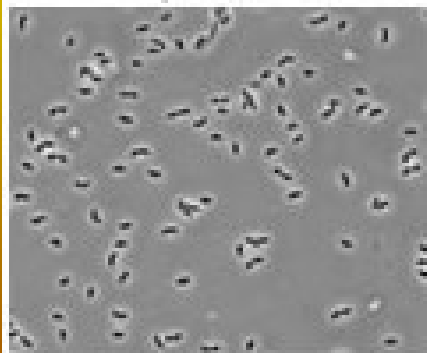
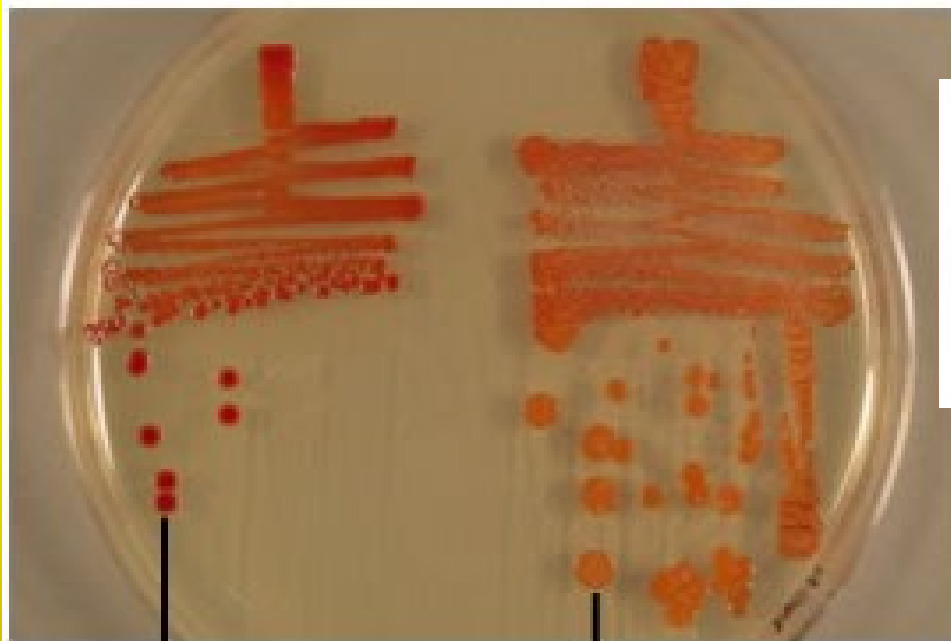
(Berleman and Bauer 2004)

Rhodospirillum centenum – plovoucí a plazivé buňky a zároveň tvorba cyst

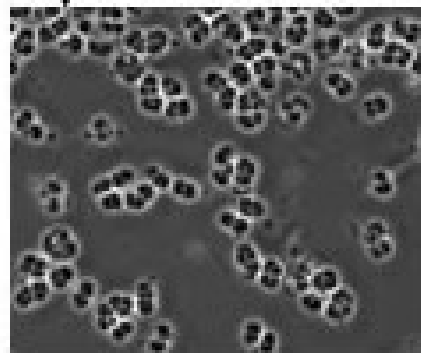
Berleman, J. & C. E. Bauer (2004):

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.

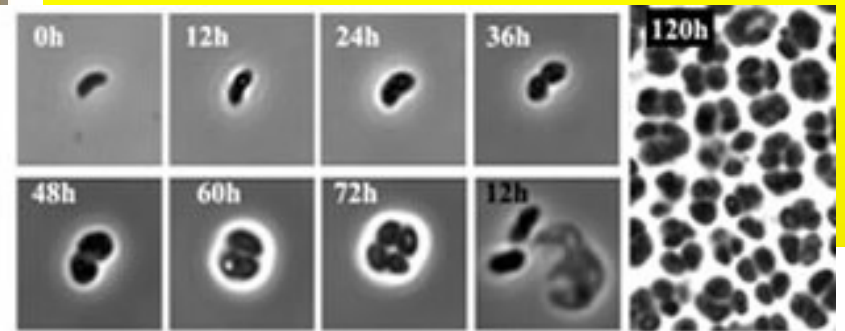


Fig. 2. The panels labeled with white numbers show cell types observed at points after induction of cyst formation. The panel with black numbers depicts germinating cells twelve hours after induction of germination.

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