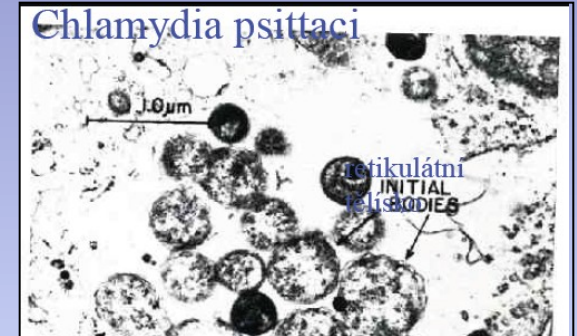
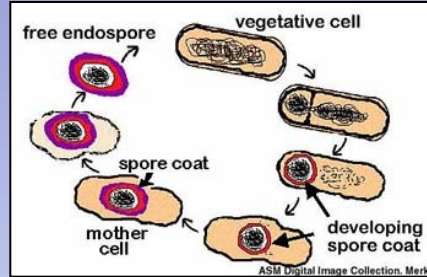
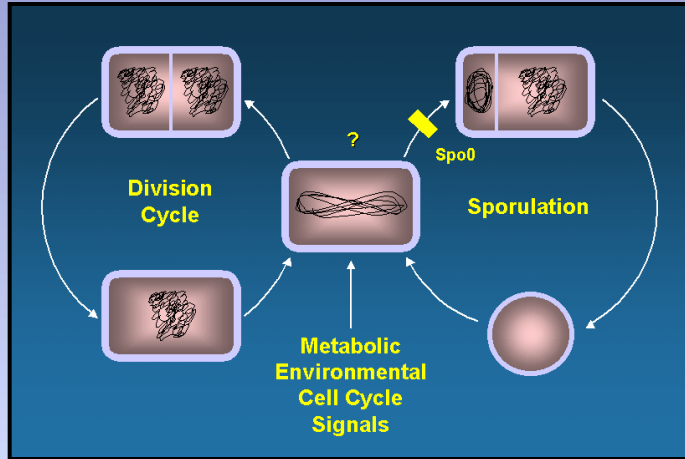
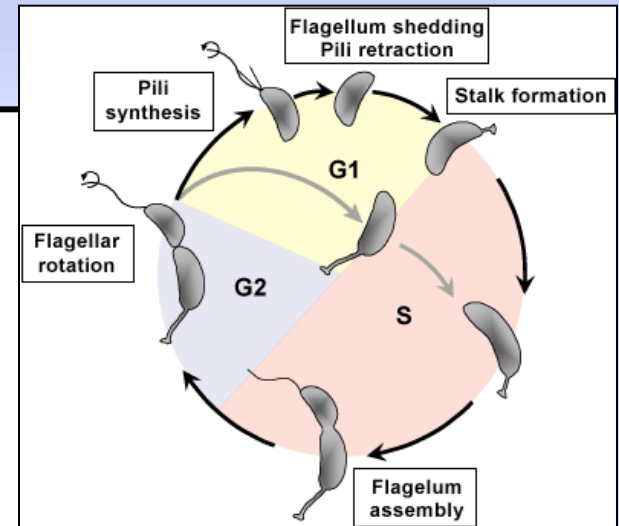


# Růstové cykly bakterií



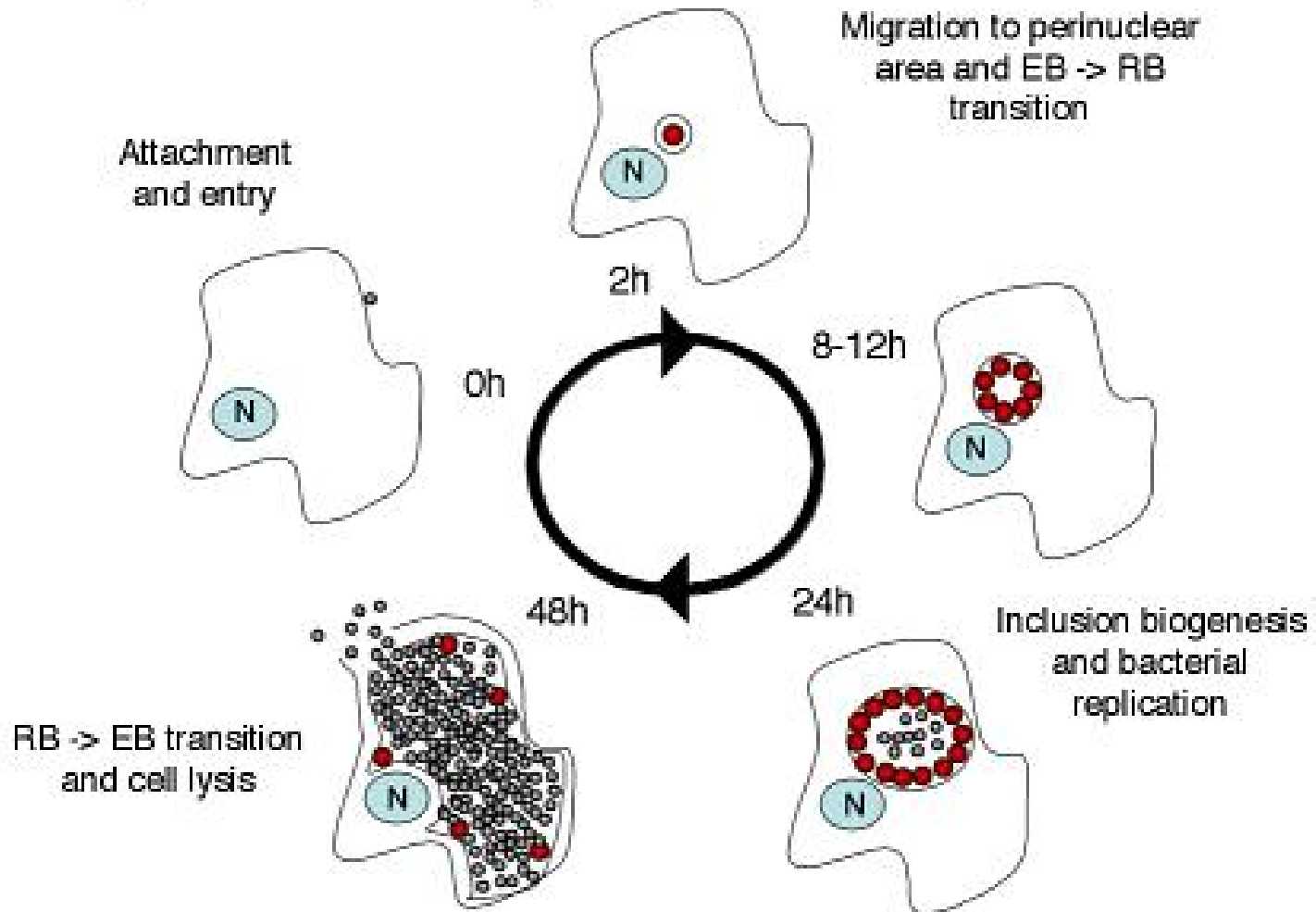
## Růstové cykly bakterií

- 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*

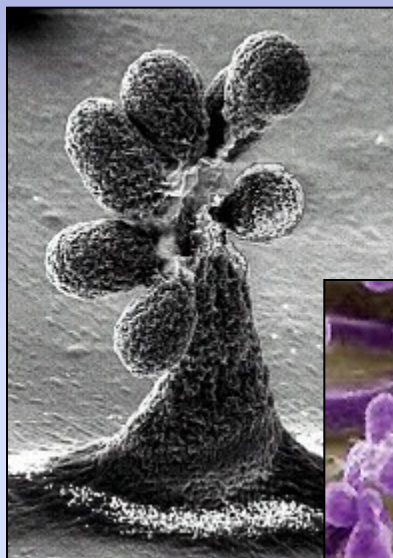
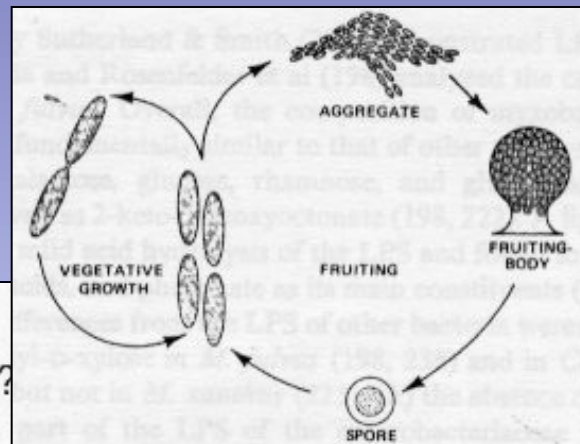


**Buněčný cyklus  
*Caulobacter  
crescentus***

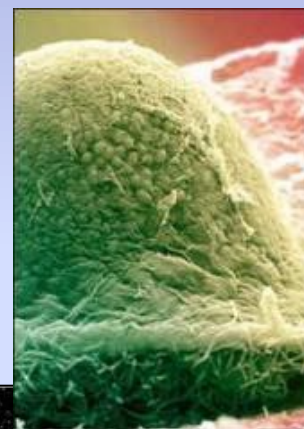
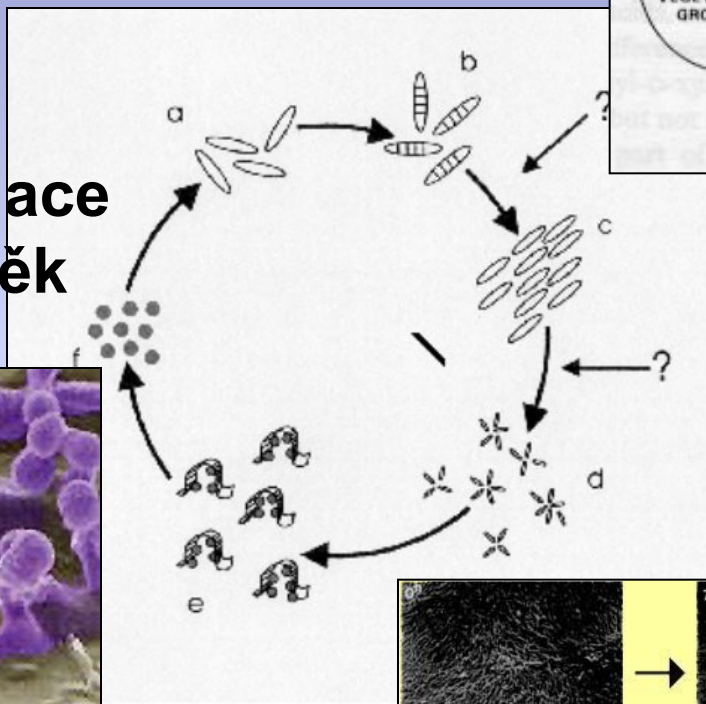
# *Chlamydia* Infectious Cycle



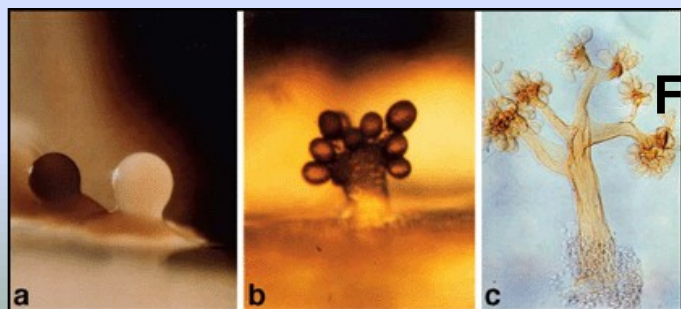
# Komplexní růstový cyklus myxobakterií



Agregace buněk



Plodnice rodu *Myxococcus*



Fruktifikační orgány

# Dělení bakteriálních buněk

- Dělení binární
- Dělení asymetrické
- Dělení vedoucí ke vzniku diferencovaných populací
  
- Stav buňky před dělením...
  
- Buňka vs. populace buněk

# Reprodukce bakterií

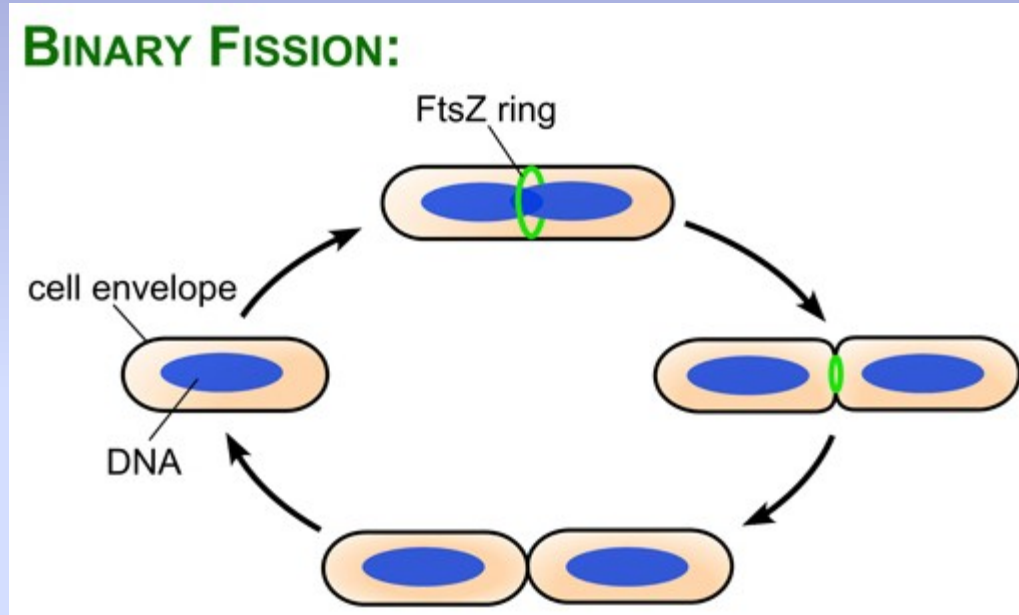
- Generační doba
  - v optimálních podmínkách 20-30 minut
- Replikace DNA trvá déle než je generační doba
  - dichotomní replikace DNA
  - pouze u bakterií
  - = jedna bakterie se dělí naráz několikrát s časovým zpožděním

# Buňka – generační doba

<b>Bakterie</b>	<b>Medium</b>	<b>Generační doba (minuty)</b>
<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

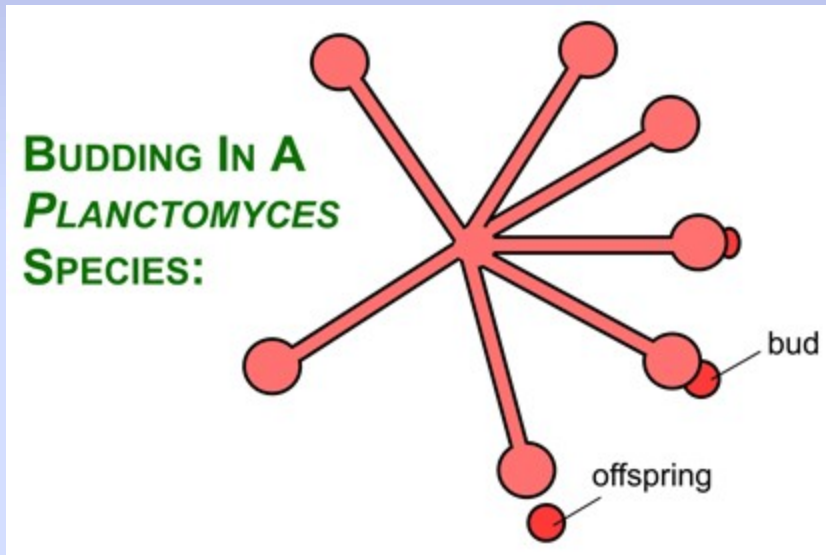
- Binární dělení



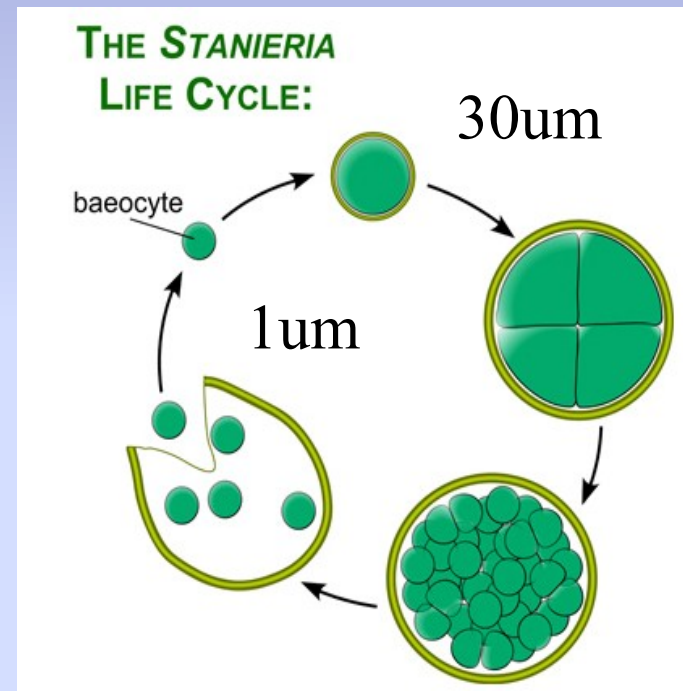
- Studie – vývoj nových terapeutik bránících dělení buněk...studium struktur a procesů dělení

# Neobvyklé příklady reprodukce

- Růst a mnohočetné dělení mateřské buňky
- pučení



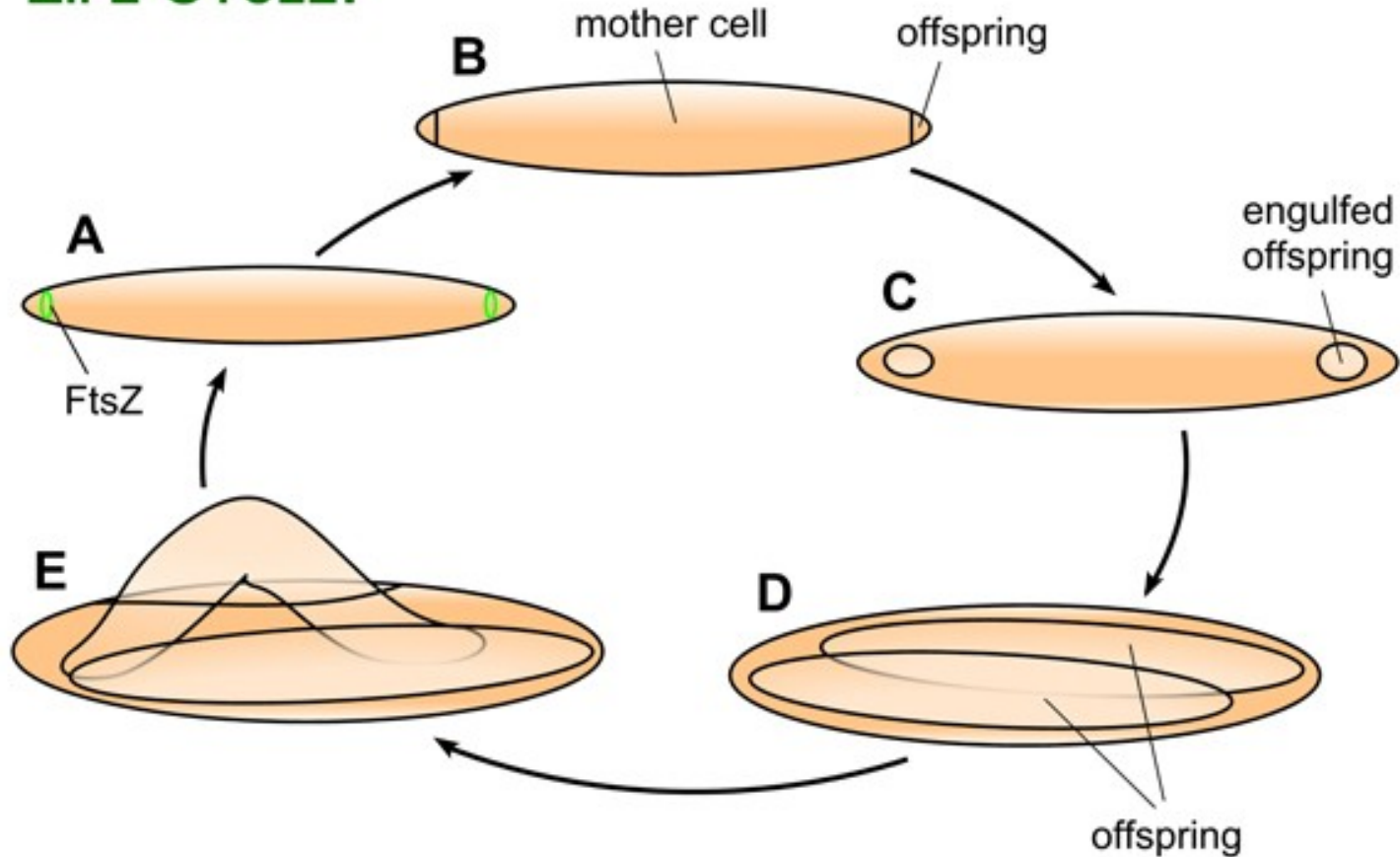
Planctomycetes, Cyanobacteria, Firmicutes



sinice



## THE *EPULOPISCIUM* LIFE CYCLE:



*Epulopiscium* spp., *Metabacterium polyspora*,  
Segmented Filamentous bacteria - SFB

## **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.

# Růstové cykly bakterií

- jednoduché – střídají se 2 stádia

- ◆ rostoucí a klidové

- ◆ přisedlé a volné

- ◆ infekční a reprodukční

- komplexní s více než 2 vývojovými stádii

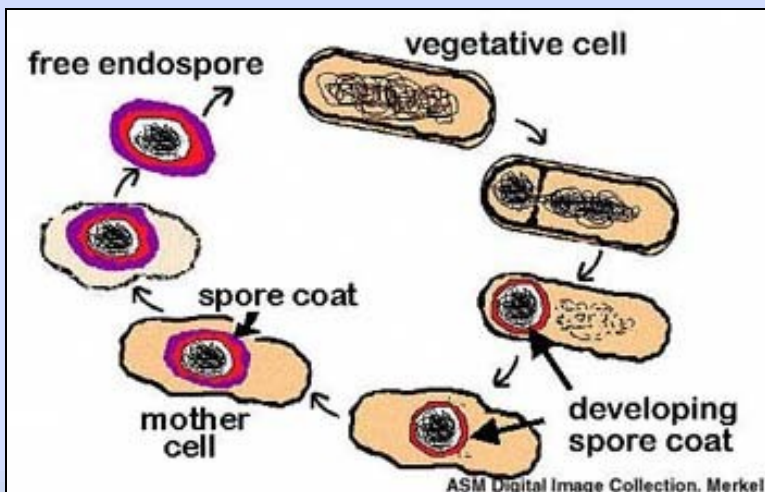
- ◆ myxobakterie

- růstové cykly vedoucí ke vzniku diferencovaných populací

- ◆ sinice - *Anabaena*

# Jednoduché růstové cykly

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

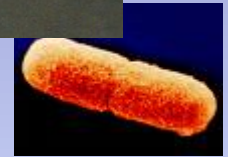


# Jaké buněčné formy v doménách *Bacteria* a *Archaea* rozeznáváme?

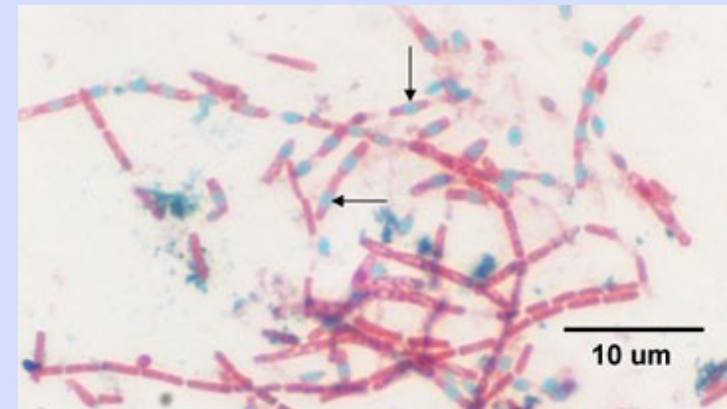
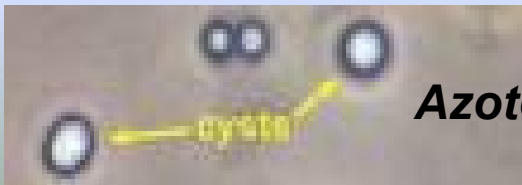
- vegetativní formy buněk
- cysty odolné proti dehydrataci, ne však proti horku - *Azotobacter*, *Myxococcus*, *Sporocytophaga*
- endospory - odolná klidová nereproduktivní stadia  
- hl. u G+, vyj. G-
- exospory - rody *Metylosinus* and *Rhodomicrobium*
- konidie - asexuální reprodukční struktury aktinomycet

# Vegetativní a klidové stadium

## Tvorba spor



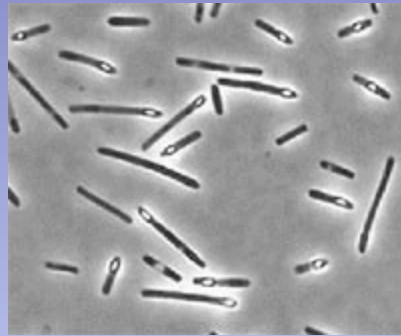
- převážně G+ bakterie
  - termorezistentní endospory
    - Bacillus* (aerobní tyčky), *Clostridium*, *Thermoactinomyces* a *Desulfotomaculum* (anaerobní tyčky), *Sporosarcina* (aerobní koky), *Sporolactobacillus*, *Oscillospira*, *Thermoactinomyces*
- Výjimečně i G– bakterie (*Coxiella burnetii*, původce Q-horečky).
- G- bakterie – cysty
  - Méně rezistentní, odolné zejm.vůči vysychání *Azotobacter*, *Methylosinus*



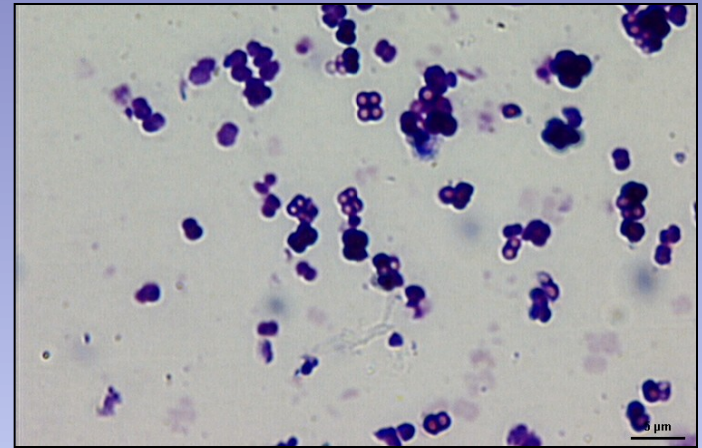
*Bacillus megaterium* – zelené spory obarvené varem v malachitové zeleni c



*Clostridium difficile*



*C. perfringens*



*Sporosarcina ureae* –  
kulaté spory uvnitř  
čtveřice (balíčku) buněk



**Azotobacter – pouzdra, cysty**



# Endospora, sporulace

... s několika vyjímečnými charakteristikami...



- Oproti *Eucarya* - pouze **jedna endospora**
- **Peptidoglykan** v kortexu spory
- Stabilizace makromolekul ve spoře:
  - **bílkoviny, ztráta vody a její náhrada vápníkem**

**minimální obsah vody ----- minimální metabolismus**

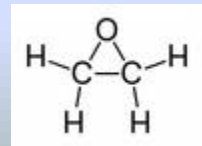
- Vysoká odolnost napomáhá přečkat podmínky nevhodné pro život i po tisíce let (?); jsou prostředkem šíření bakterií i na značné vzdálenosti a v různém prostředí.
- Tvorba **endospory** však **není odpovědí na prostředí, ale přípravou na nepříznivé podmínky.**



- Odolné k působení UV a  $\gamma$  záření, vysoušení, lysozymu, teplotním změnám, nedostatku živin a působení mnoha dezinfekčních prostředků.
- V ethanolu mohou přežívat několik měsíců.

- **Sporicidní látky:**

**ethylenoxid,  $\beta$ -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

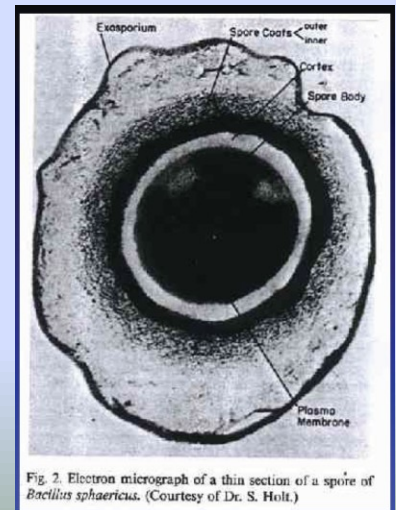
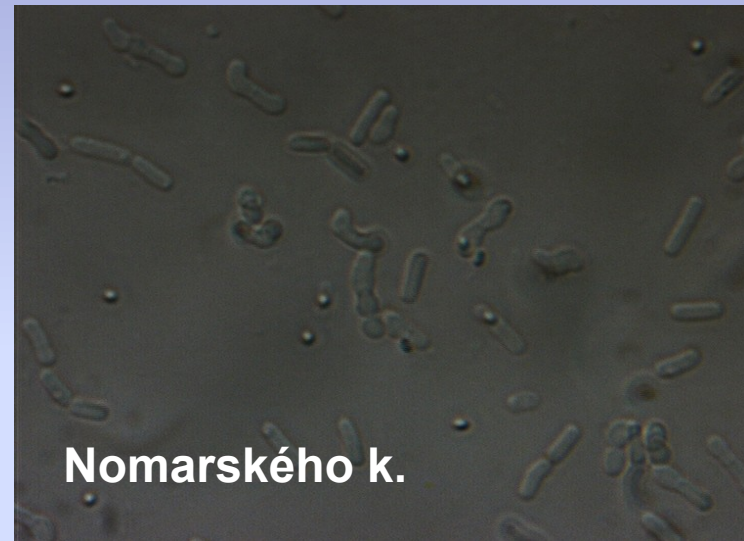


Fig. 2. Electron micrograph of a thin section of a spore of *Bacillus sphaericus*. (Courtesy of Dr. S. Holt.)

# 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).

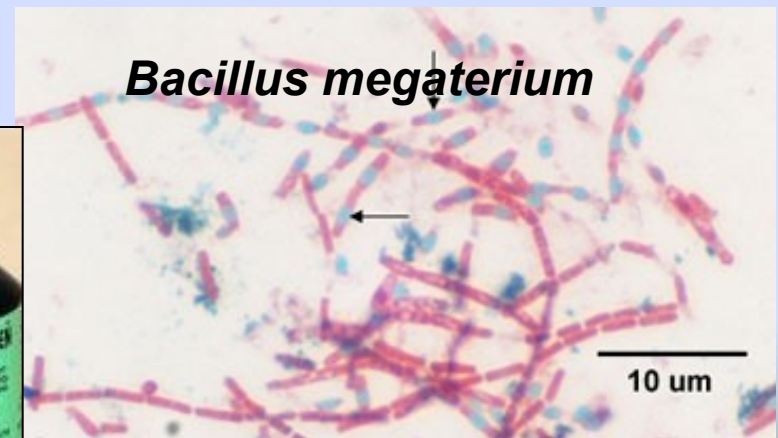
Přímo obarvit endosporu od stadia vzniku kortexu je možné pouze za horka (prospora je pro barvivo ještě propustná!)

# Strukturální barvení endospor

- Strukturální barvení spor u suspektních sporulujících druhů zvýrazní:
- **Tvar, velikost a umístění spory v buňce** je dalším charakteristickým **znakem napomáhajícím identifikaci**.
- Příklad: **oválné** spory *B. cereus*, *B. anthracis*, *Cl. botulinum*, **kulaté** spory *Clostridium tetani* či *B. sphaericus*, **cylindrické** či **elipsoidní** spory
- 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

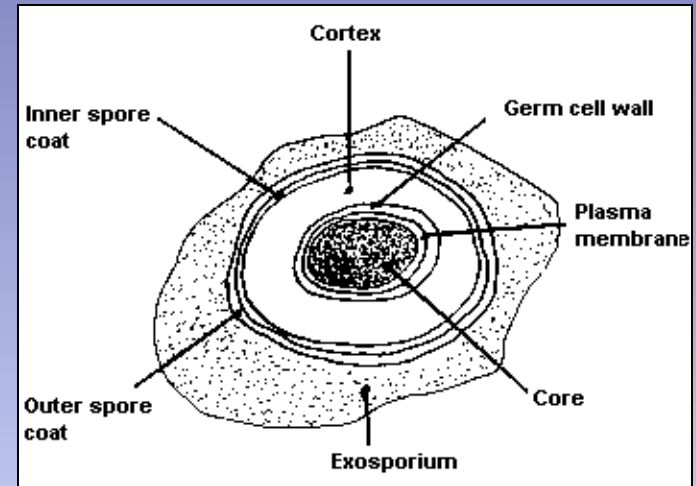
**silný, špatně prostupný obal**

- **koncentrovaná barviva**
- **za tepla**
- **Mořidla**

- Takto obarvené spory se těžko odbarvují

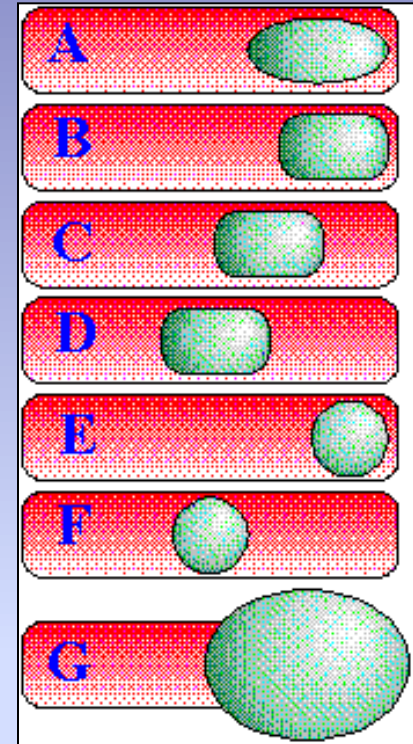
- Barvitelnost spor závisí na??

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

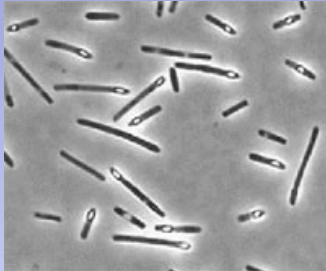


## Uložení v buňce:

- terminální = na konci tyčinky  
*C. tetani* (jakoby paličky),  
*B. stearotermophilus*
- 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*

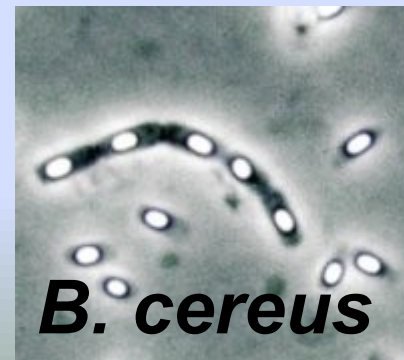


*Clostridium botulinum*

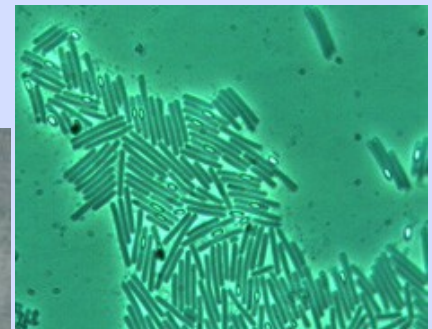
- mírné rozšíření: *C. histolyticum* a *C. novyi*
- U některých druhů spora buňku nezduřuje: *B. anthracis*, *B. cereus*.



*B. anthracis*



*B. cereus*



*Clostridium difficile*

# *Bacillus sphaericus*



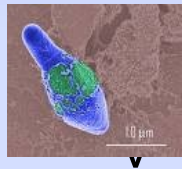


# Klinicky významné jsou spory rodů *Bacillus* a *Clostridium*

## *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.

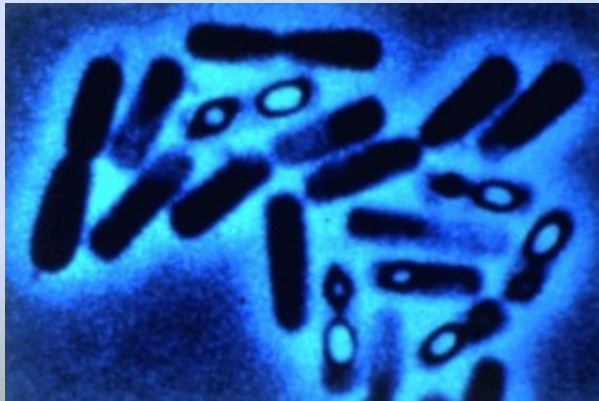
## *Bacillus anthracis*

– biologická zbraň, anthrax

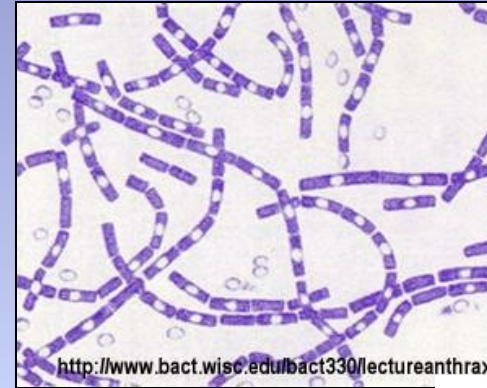




- biopesticidy - Bt toxin transgen – *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*



# *Bacillus anthracis*

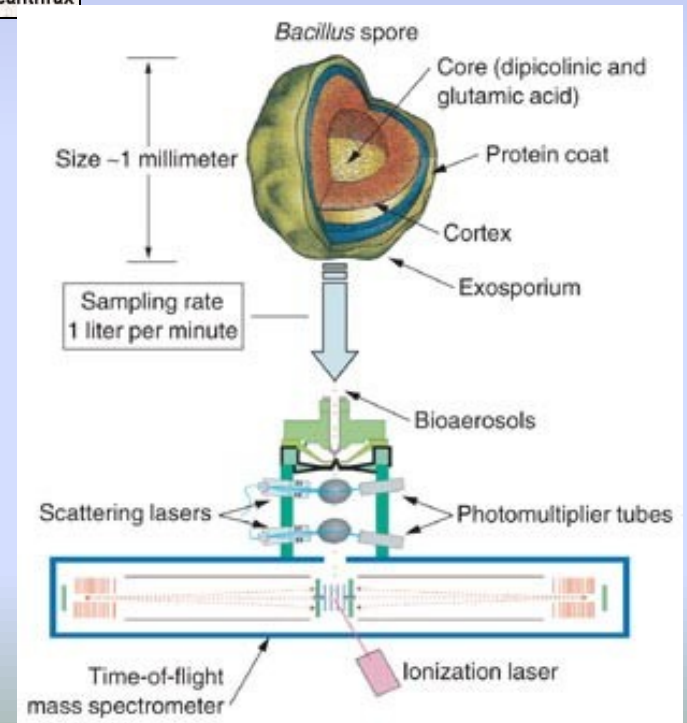


<http://www.bact.wisc.edu/bact330/lectureanthrax>



Copyright © 2004 Dennis Kunkel Microscopy, Inc.

Lidský neutrofil útočící  
na *Bacillus anthracis*

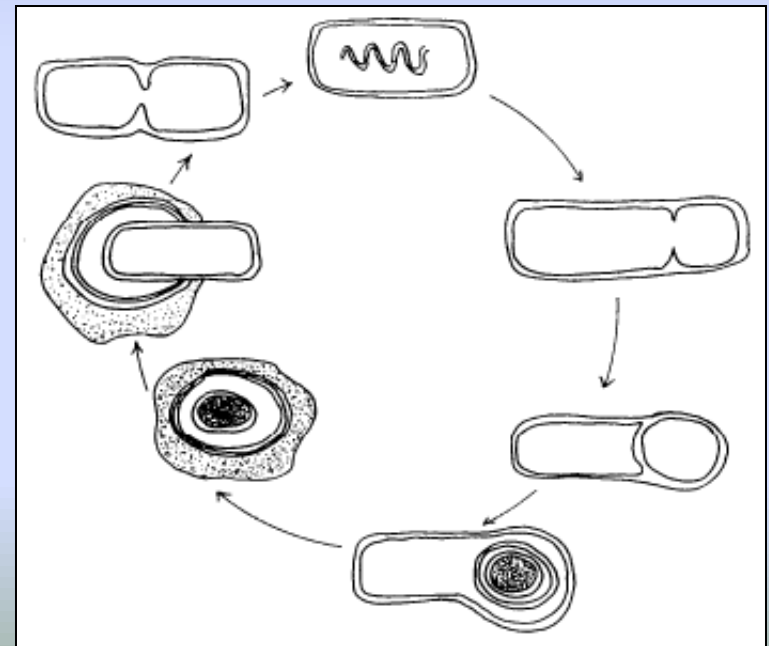
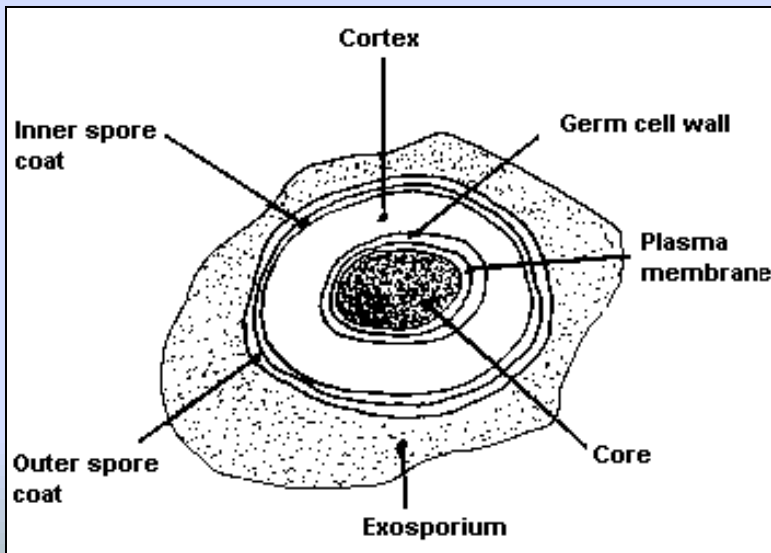


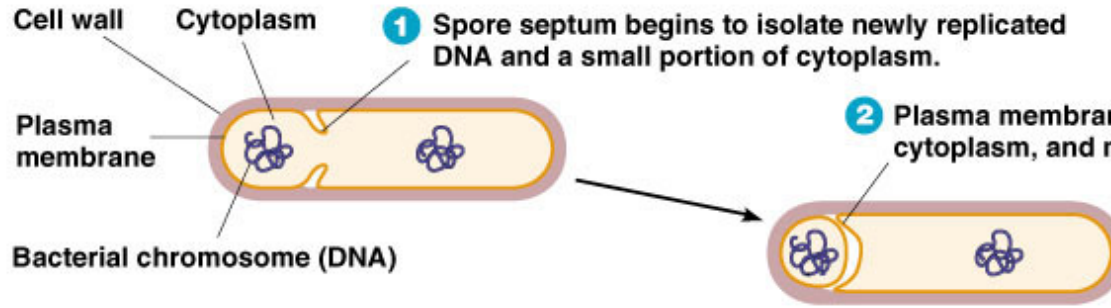
bioaerosol mass spectrometry (BAMS)

# Proces sporulace

- Začíná ve fázi G1 přechodem od binárního k asymetrickému dělení
- probíhá i při dostatku živin, hlavně však ve stacionární fázi

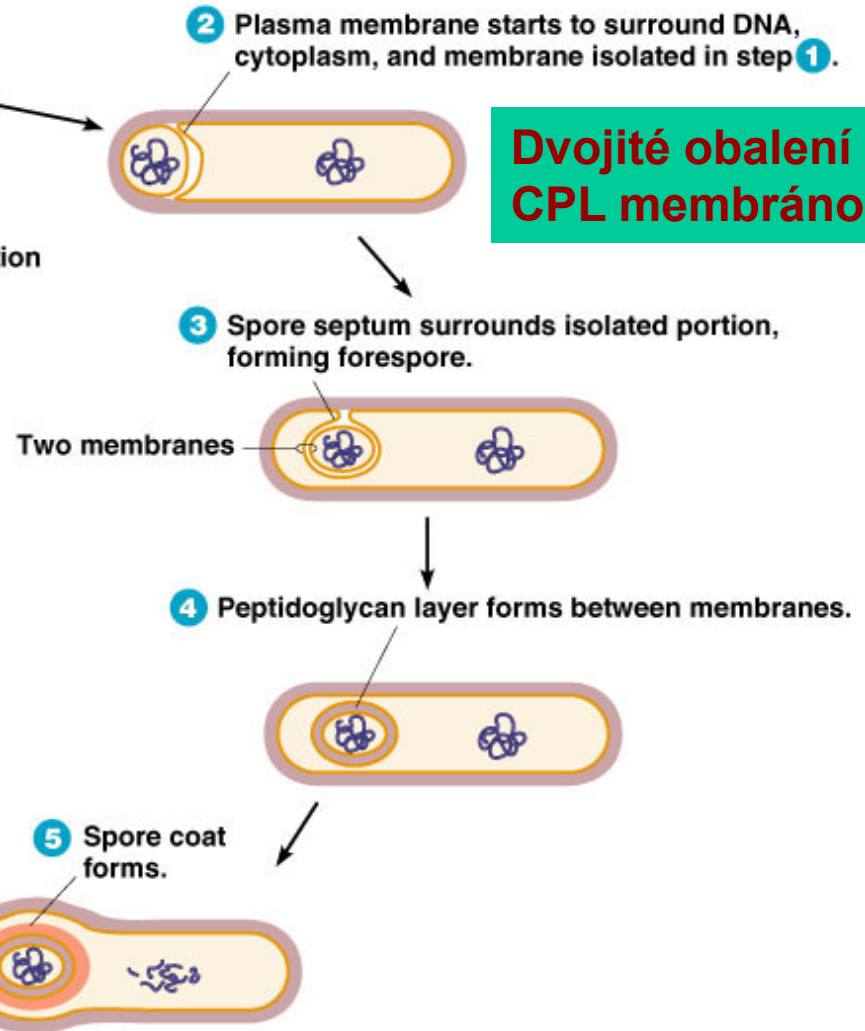
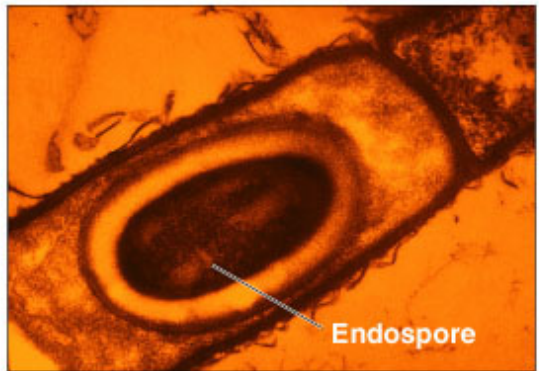
**Ke studiu sporulace je používáno bakterií rodu *Bacillus*, hlavně *B. subtilis***





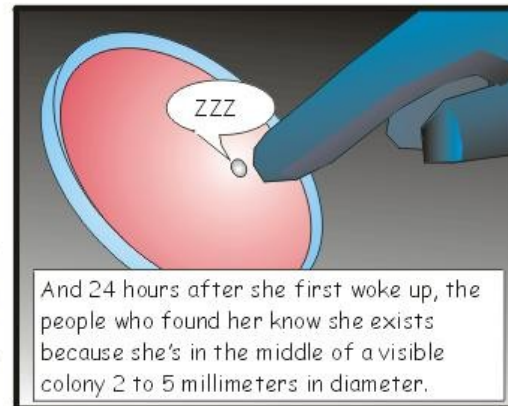
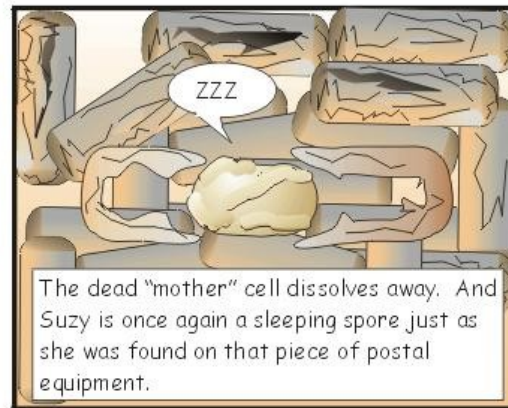
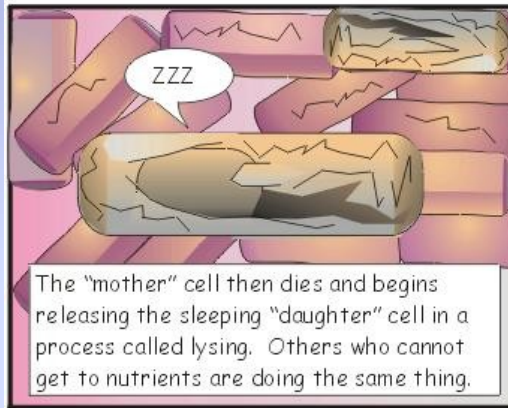
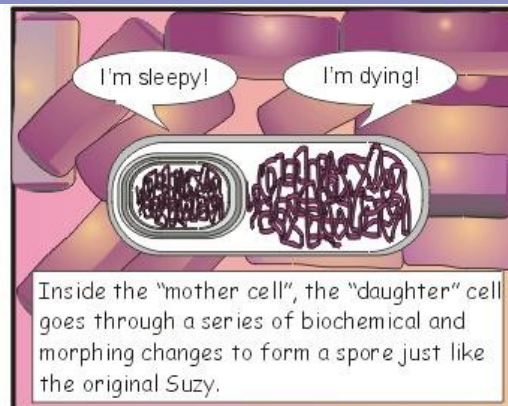
**Dvojité obalení spory CPL membránou**

**(a) Sporulation, the process of endospore formation**



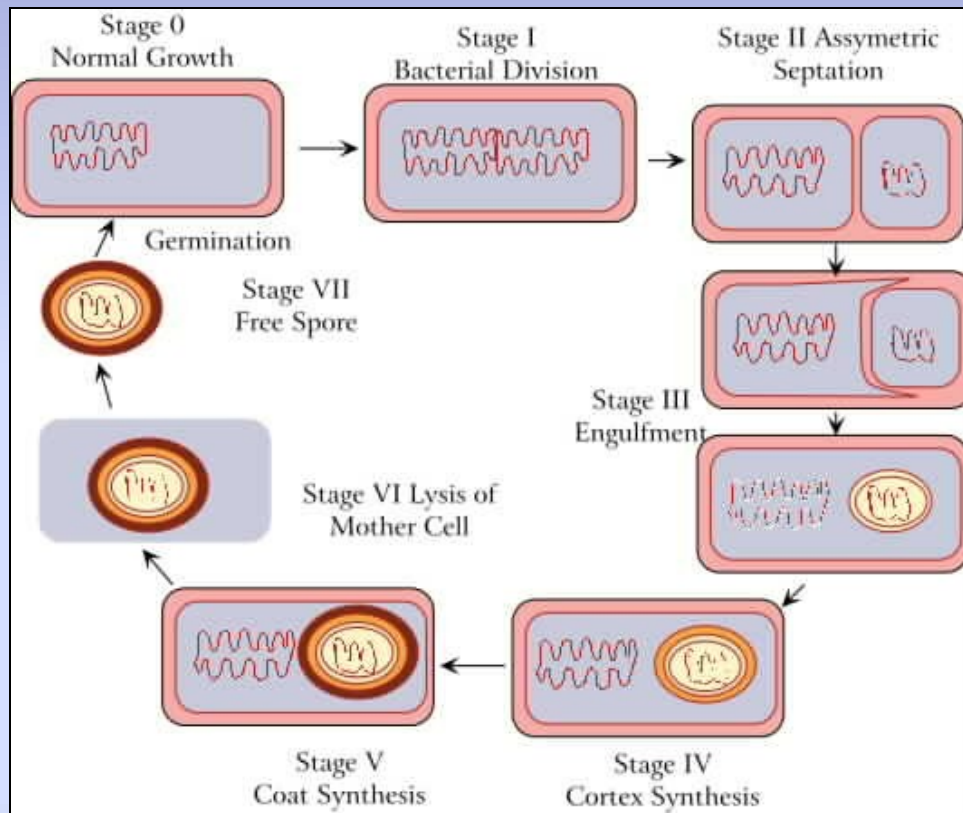
**(b) An endospore in *Bacillus anthracis***

## Jedinečné a charakteristické struktury spory



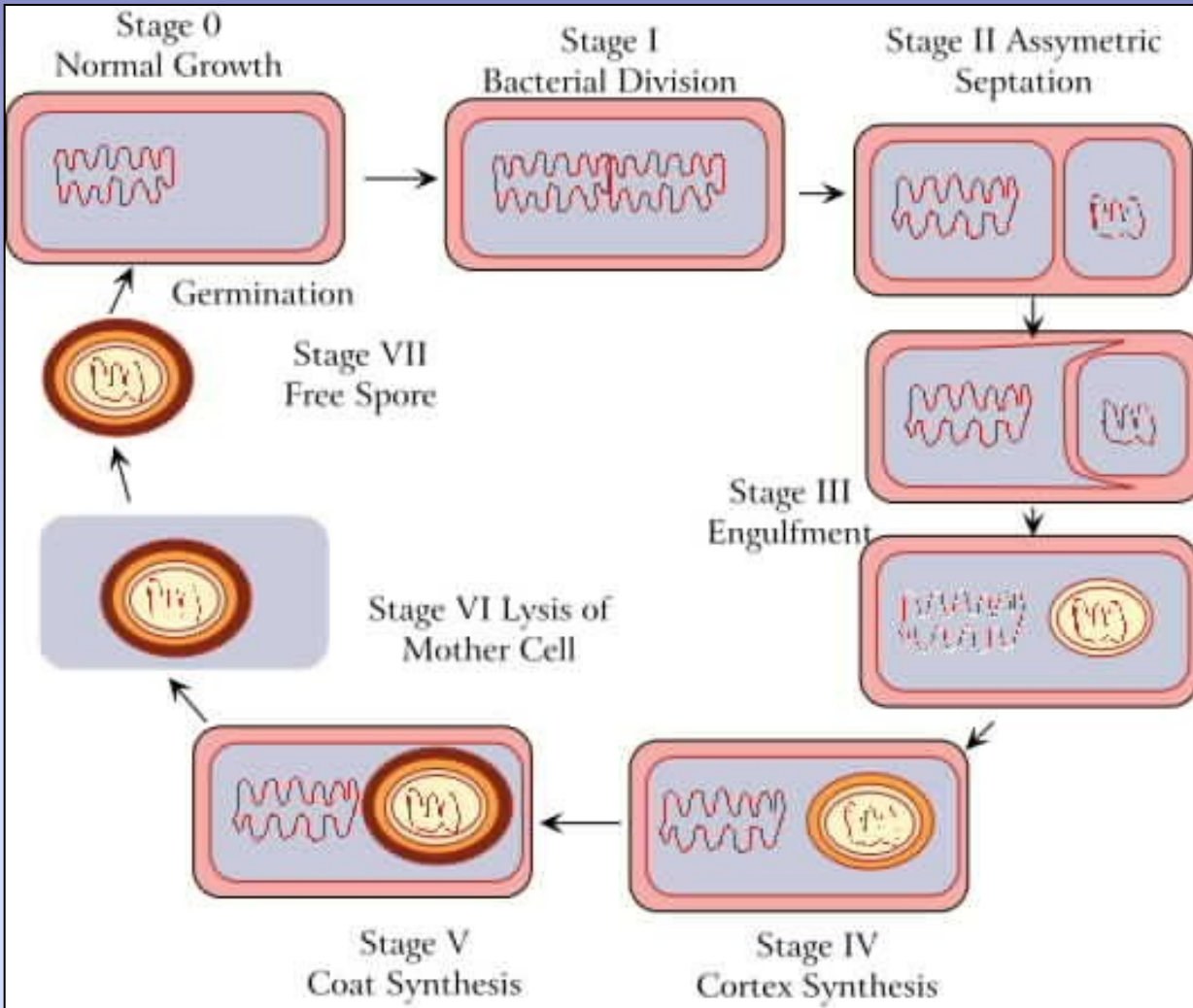
- Kalcium dipikolinát
- Proteiny stabilizující DNA
- Kortex
- DNA reparační enzymy v procesu germinace

Během sporulace *B. subtilis* můžeme rozlišit 7 fází (I –VII)  
Za proces vzniku endospory zodpovídá 7 – 8 genů.



## Fáze 0

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

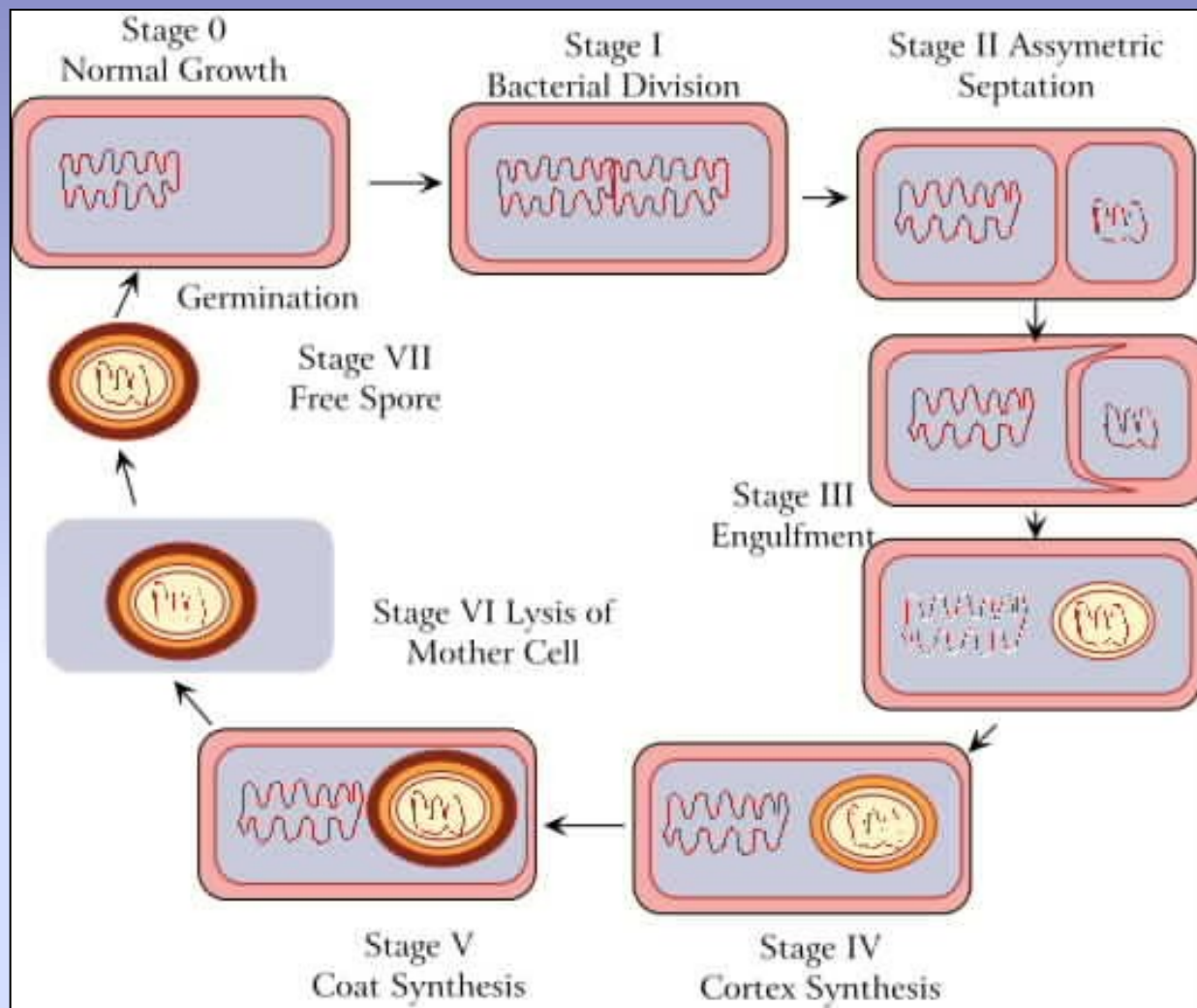


## Fáze I

Jeden z prvních signálů sporulace: vznik kvanta volutinu

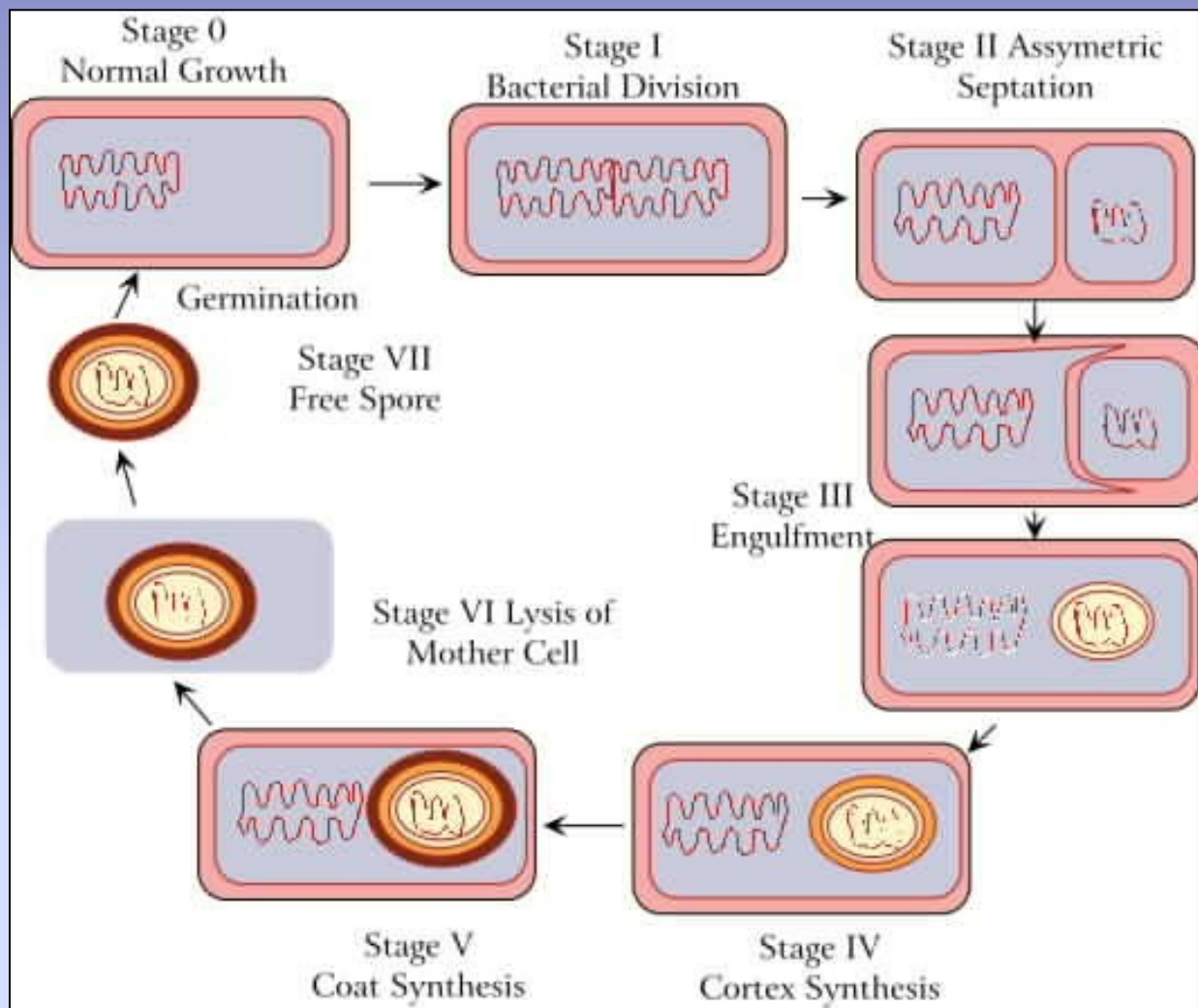
Druhým signálem - zvýšení množství enzymů Krebsova cyklu a hydroláz, spotřeby acetátu





## Fáze II

V místě přepážky se dvojitě vchlípí cytoplazmatická membrána

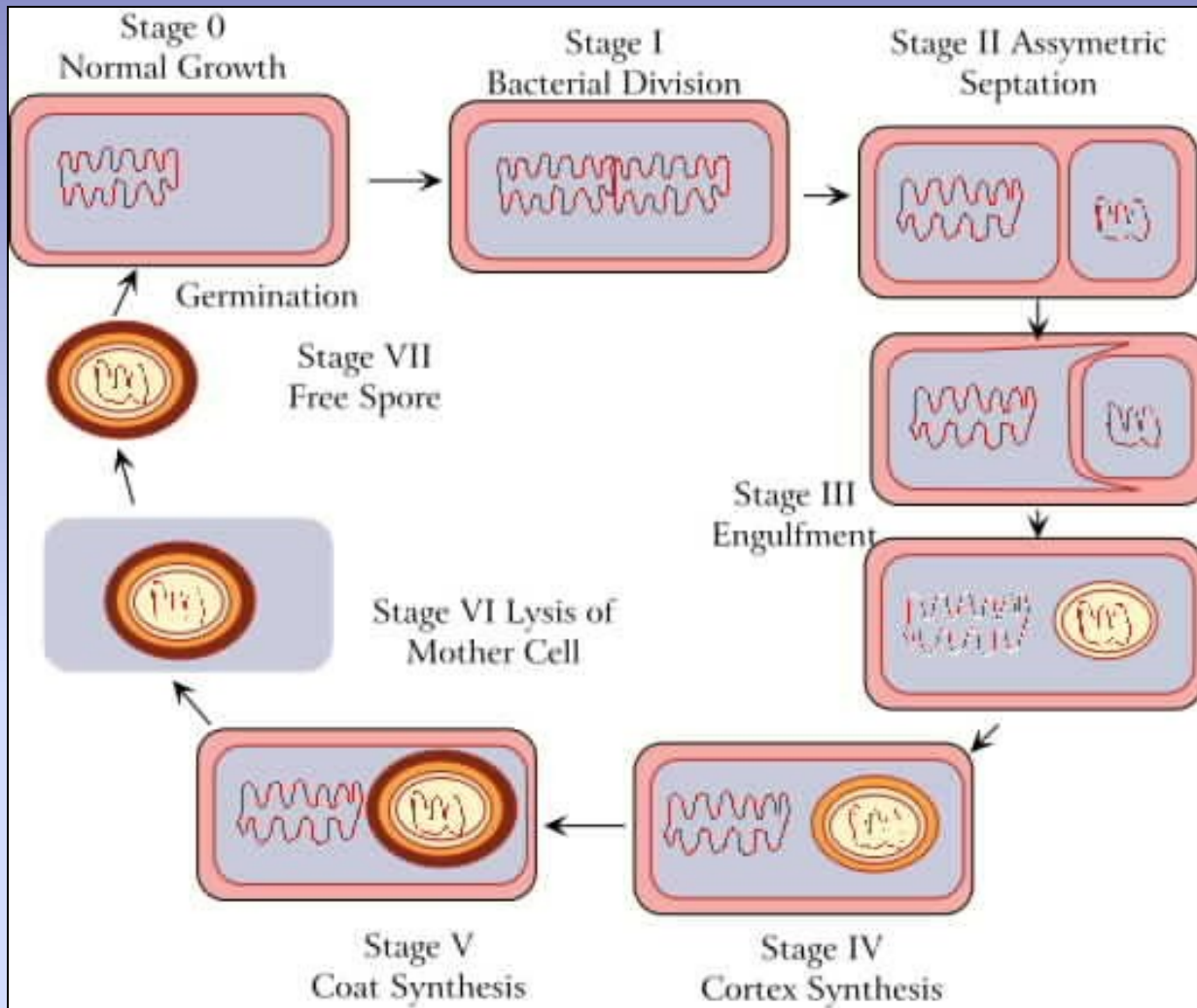


### Fáze III

- Intina, extina

Není dosud  
světlolomná

➔ Spora ještě nesvíí při mikroskopii ve fázovém kontrastu)



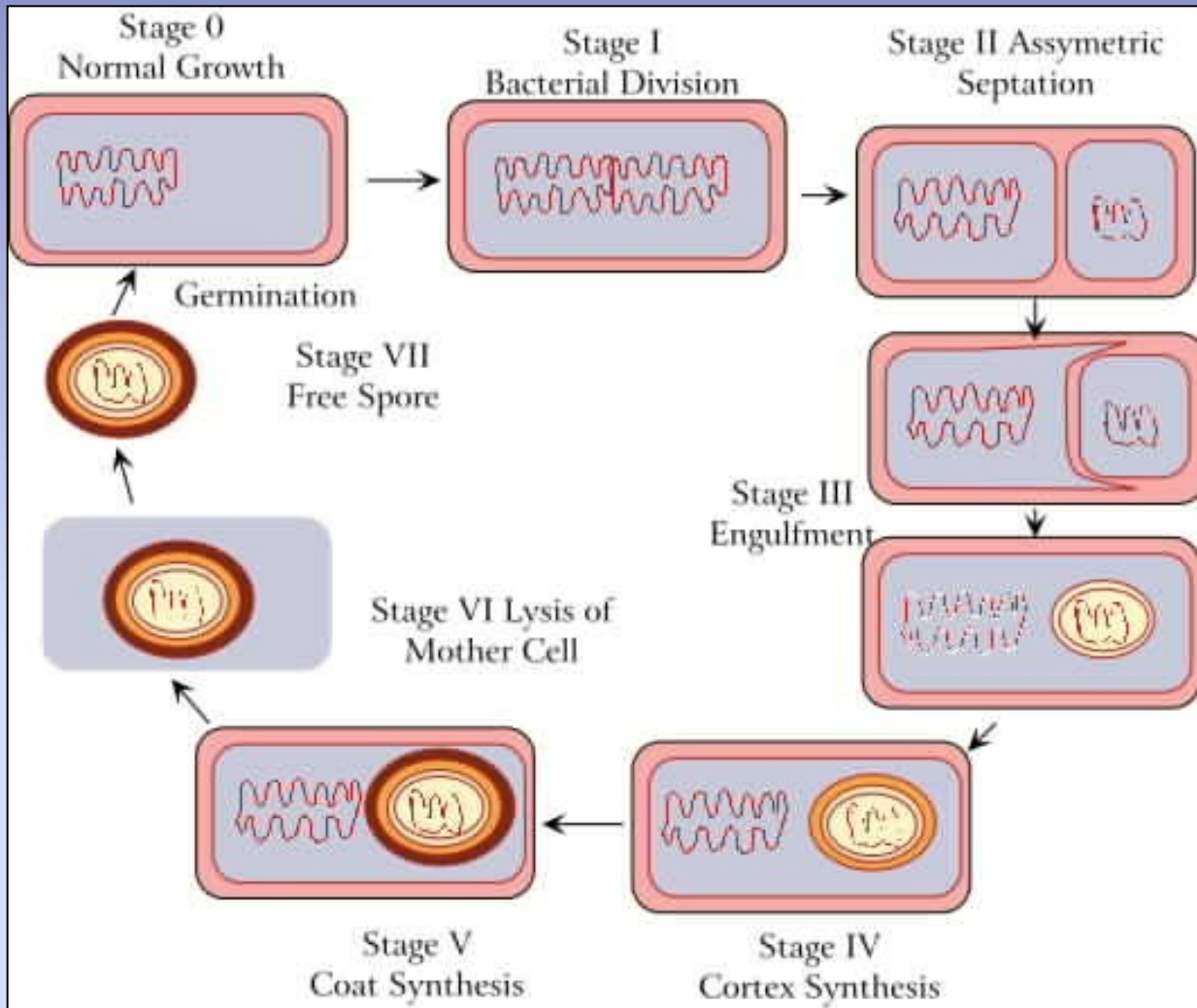
## Fáze IV

kortex  
kyselina  
dipikolinová

**Ca<sup>++</sup> ionty**  
 – aktivní transport  
 - antiport.

Endospora je již **světlolomná** – Nomarského a fázový kontrast.

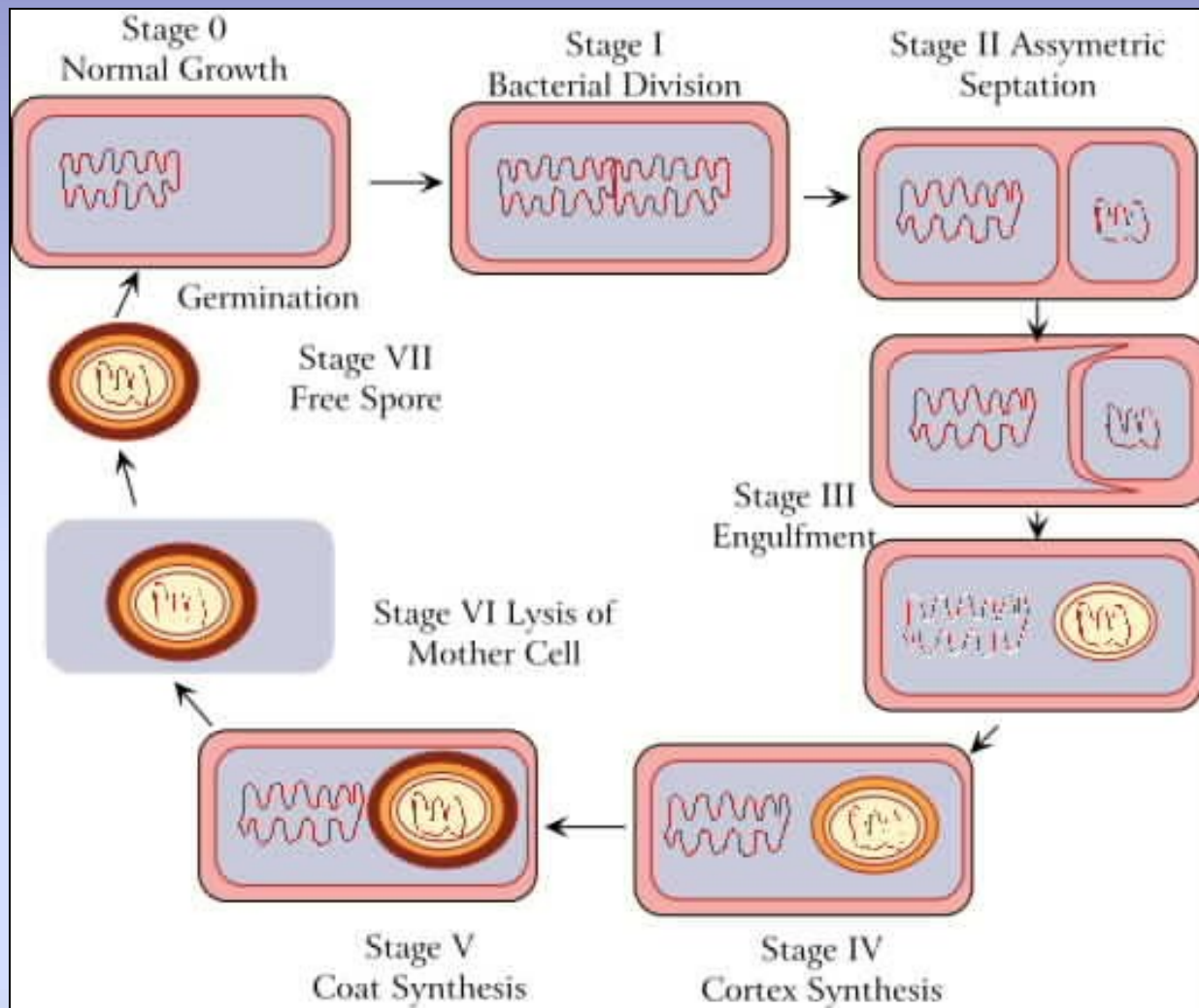
Termorezistence – do prospory transportována k. dipikolinovaná



## Fáze V

- **Plášť**
- minimum vody.
- **exosporium**

Chemotaxonomie – unikátní bílkoviny pláště

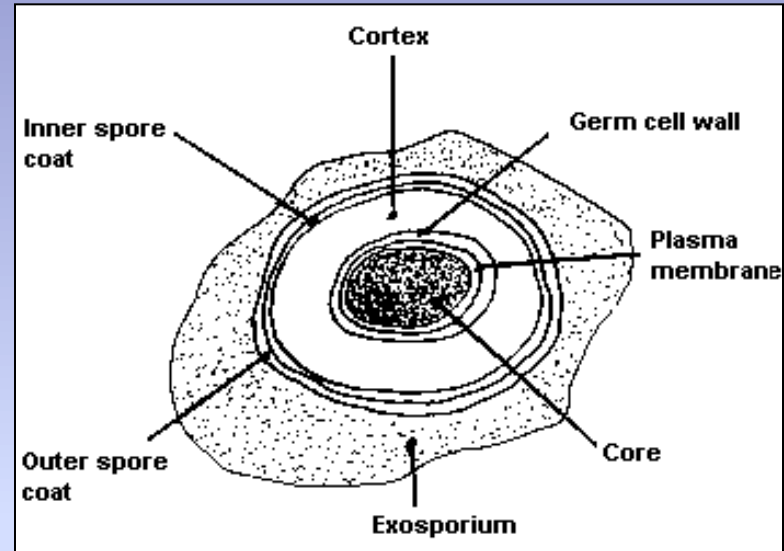
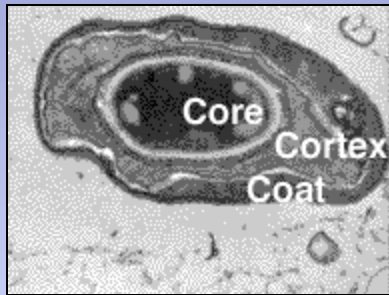


- Fáze VI

Fáze VII

- **Volná zralá spóra.**

# Stavba zralé spory



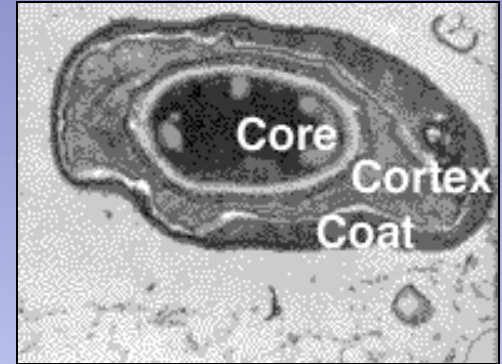
- Jádro – gelová matrix
  - bakteriální jaderný ekvivalent nukleoid
  - kalcium dipikolinát (CDPA) nebo pyridin-2,6-dikarboxylová kyselina

- **Kortex**

- 1) vnitřní kortex** (20% kortexu)

- 2) zevní kortex** (80 % kortexu)

- Zajišťuje **nepropustnost (nebarvitelný!)**



- Kortex tvořen peptidoglykany (PG).

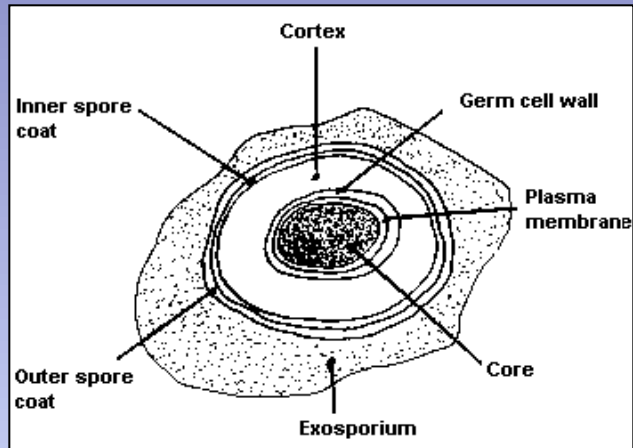
- Jen 20-30 % PG jednotek shodných s jednotkami v buněčné stěně.**

- 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**
  - proteiny bohaté na cystein (a podobné keratinu)
  - odolnost spór k působení chemikálií.
- **exosporium** u rodu *Bacillus*



# Germinace spory – terminální, centrální

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

## V laboratoři??

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

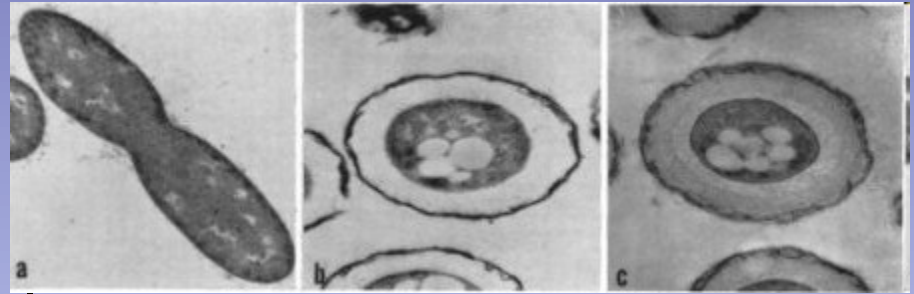


vzniklé AMK - stavební kameny nových proteinů



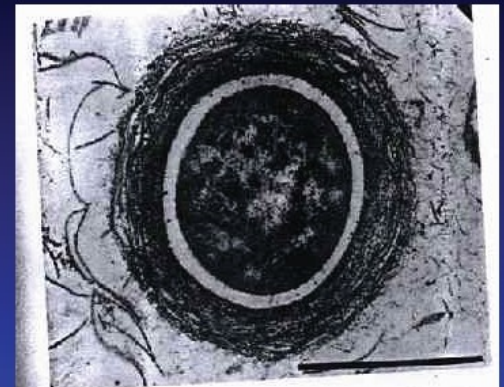
- Lytický enzym: p68 => p29 (kortikohydroláza) – depolymerizuje kortex pro nástupný průnik vody.
- Po 2h po germinaci spory
  - dělení vegetativní buňky
- Inhibice klíčení: D-Ala, MgCl<sub>2</sub>, PMSF
- Podpora??

# Exospory = cysty

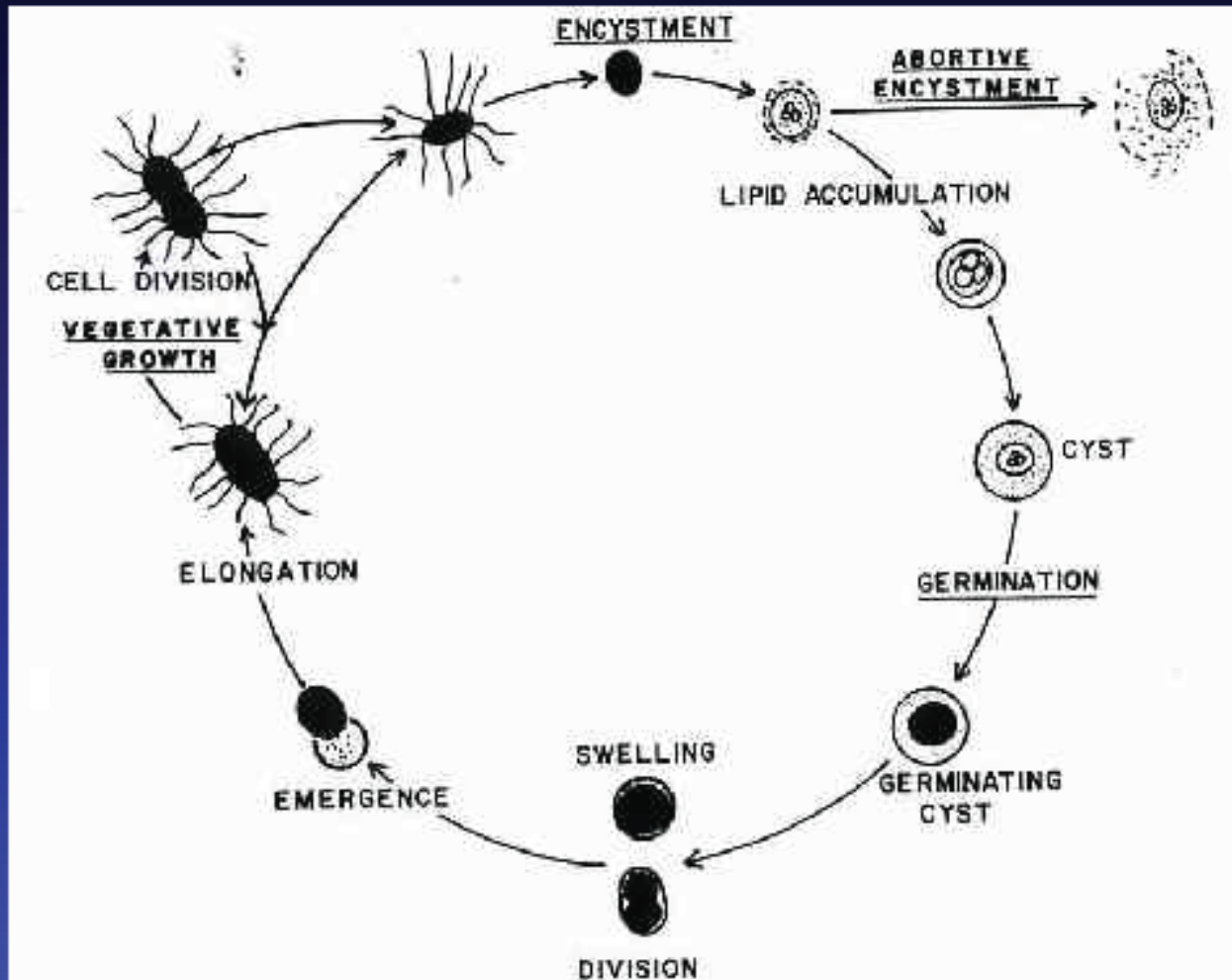


- Nejsou tolik rezistentní vůči teplu
- Rezistentní vůči vysychání
- Granula PHB – typická pro cysty
- Odlišné obaly – algináty, různé polysacharidy
- Nejpodrobněji popsány u *Azotobacter vinelandii*,
  - mnohovrstevný obal (vnější částí vyšší hustota), unikátní lipidy
- Za příznivých podmínek cysty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

*Cysta Azotobacter vinelandii*



# Růstový cyklus *Azotobacter vinelandii*



Nepohyblivé  
stadium se  
encystuje

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*

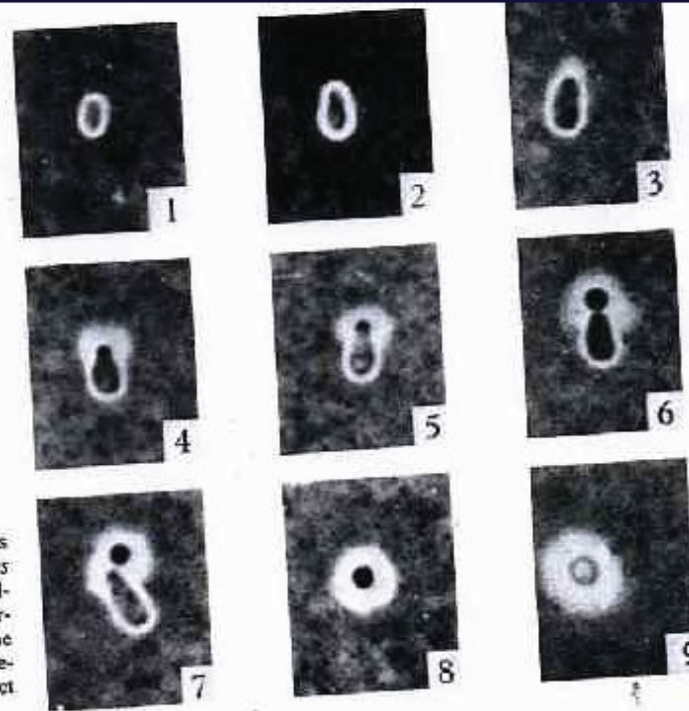
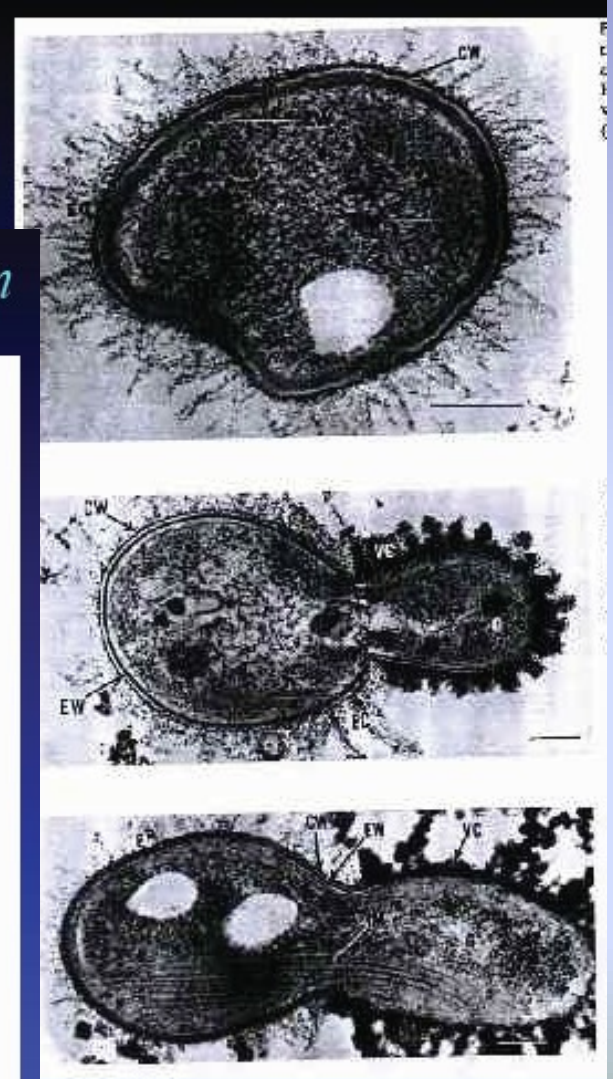


Fig. 7. Phase contrast photomicrographs of exospore formation by *Methylosinus trichosporium*. The capsulated, rod-shaped, vegetative cell becomes pear-shaped, and the tapered end buds off the cell that is eventually released as the refractile exospore. (From Whittenbury et al., 1970.)



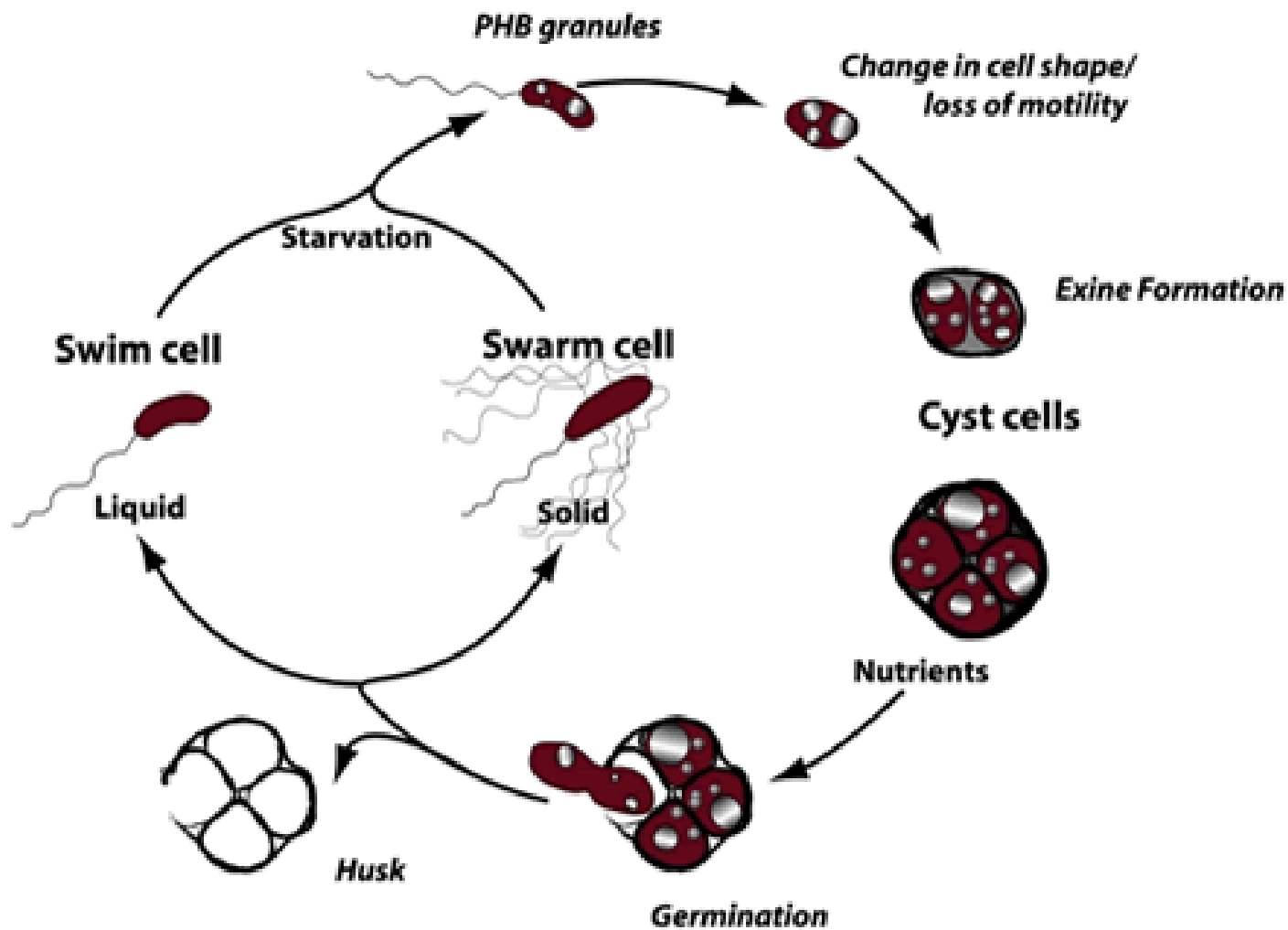


Fig 1, The *R. centenum* life cycle

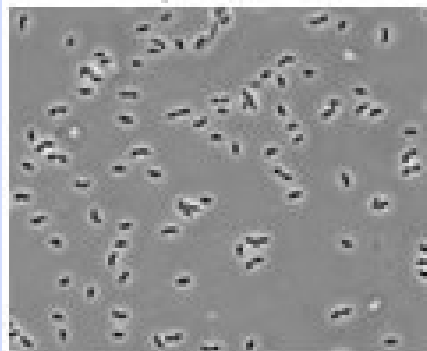
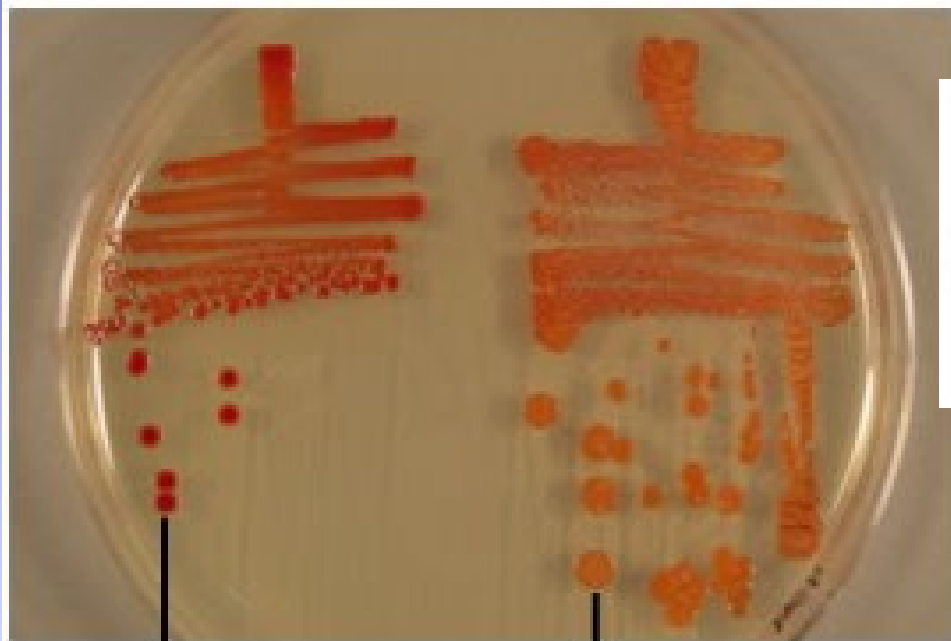
(Berleman and Bauer 2004)

## *Rhodospirillum centenum* – plovoucí a plazivé buňky a zároveň tvorba cyst

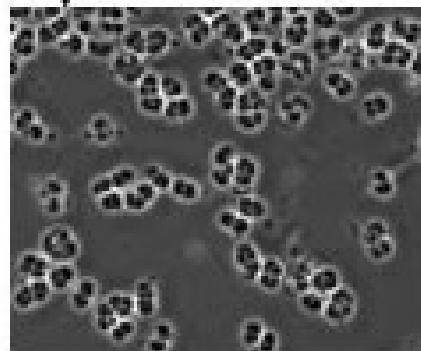
Berleman, J. & C. E. Bauer (2004):

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.

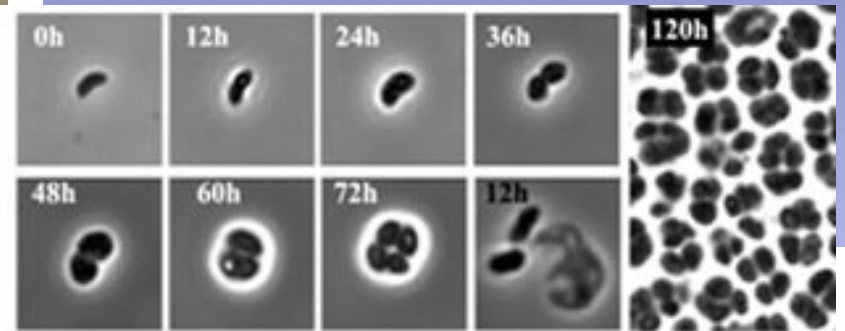


Fig. 2. The panels labeled with white numbers show cell types observed at points after induction of cyst formation. The panel with black numbers depicts germinating cells twelve hours after induction of germination.

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

Děkuji za pozornost