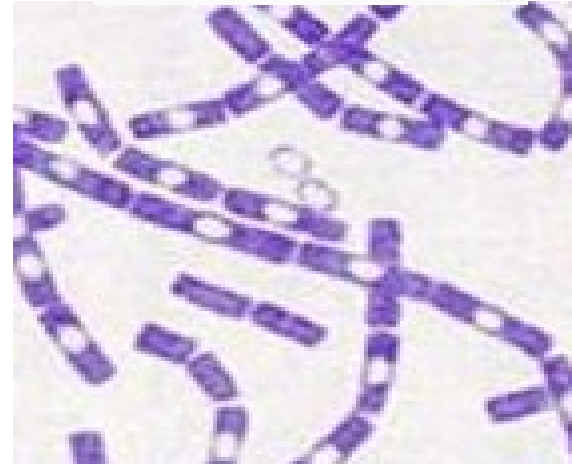
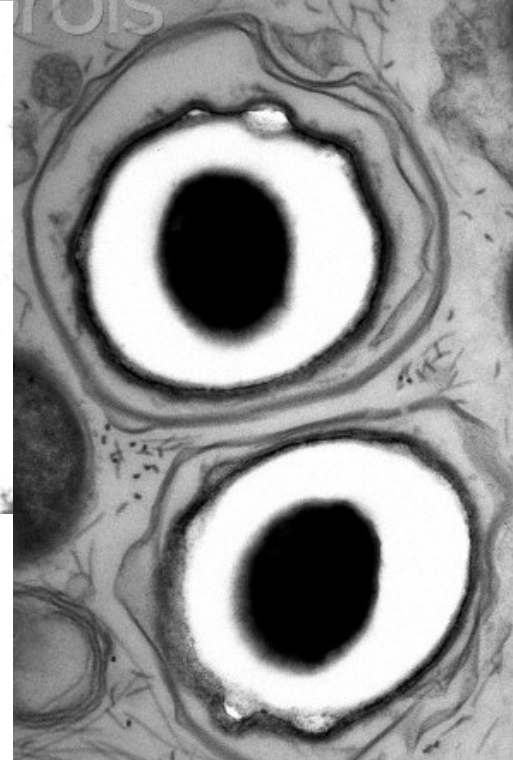
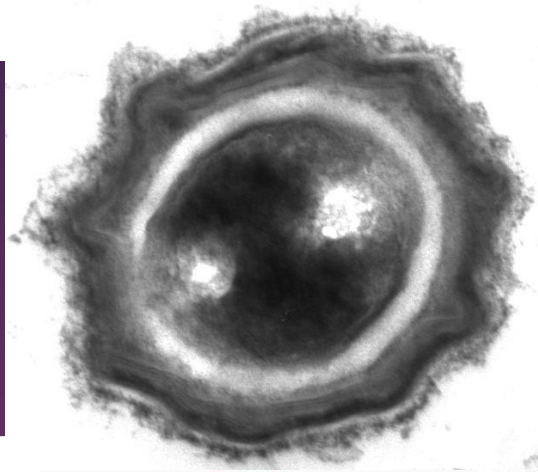




Pozorování bakteriálních endospor a negativní barvení

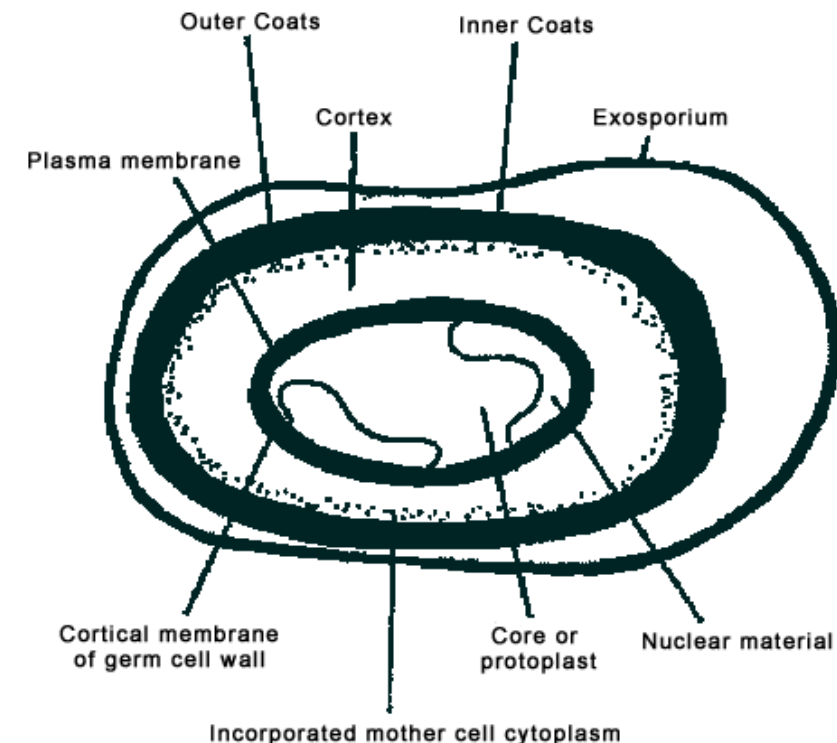
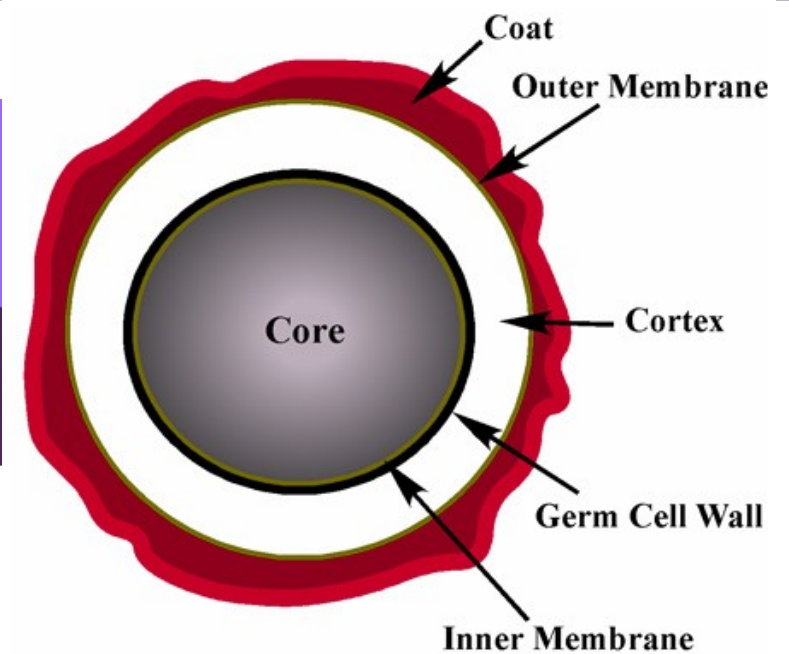
Bakteriální spory

- ▶ Vegetativní buňka → **endospora** = odolné klidové stádium buňky
- ▶ Vzniká **jen jedna** endospora
- ▶ Spory **jsou odolné** k UV a γ záření, lysozymu, vyšším teplotám, nedostatku živin, dezinfekcím
- ▶ Specifický peptidoglykan, specifické bílkoviny, snížené množství vody, zvýšený obsah vápníku
- ▶ Sporulace je **příprava bakterie na nepříznivé podmínky**, NE ODPOVĚĎ na ně
- ▶ Tvoří je převážně **G+ bakterie** – *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporosarcina*...
- ▶ Výjimečně G- (*Coxiella burnetii*)

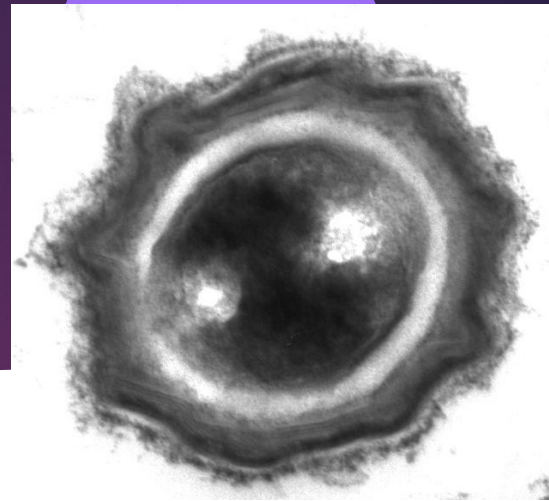


Bakteriální spora - stavba

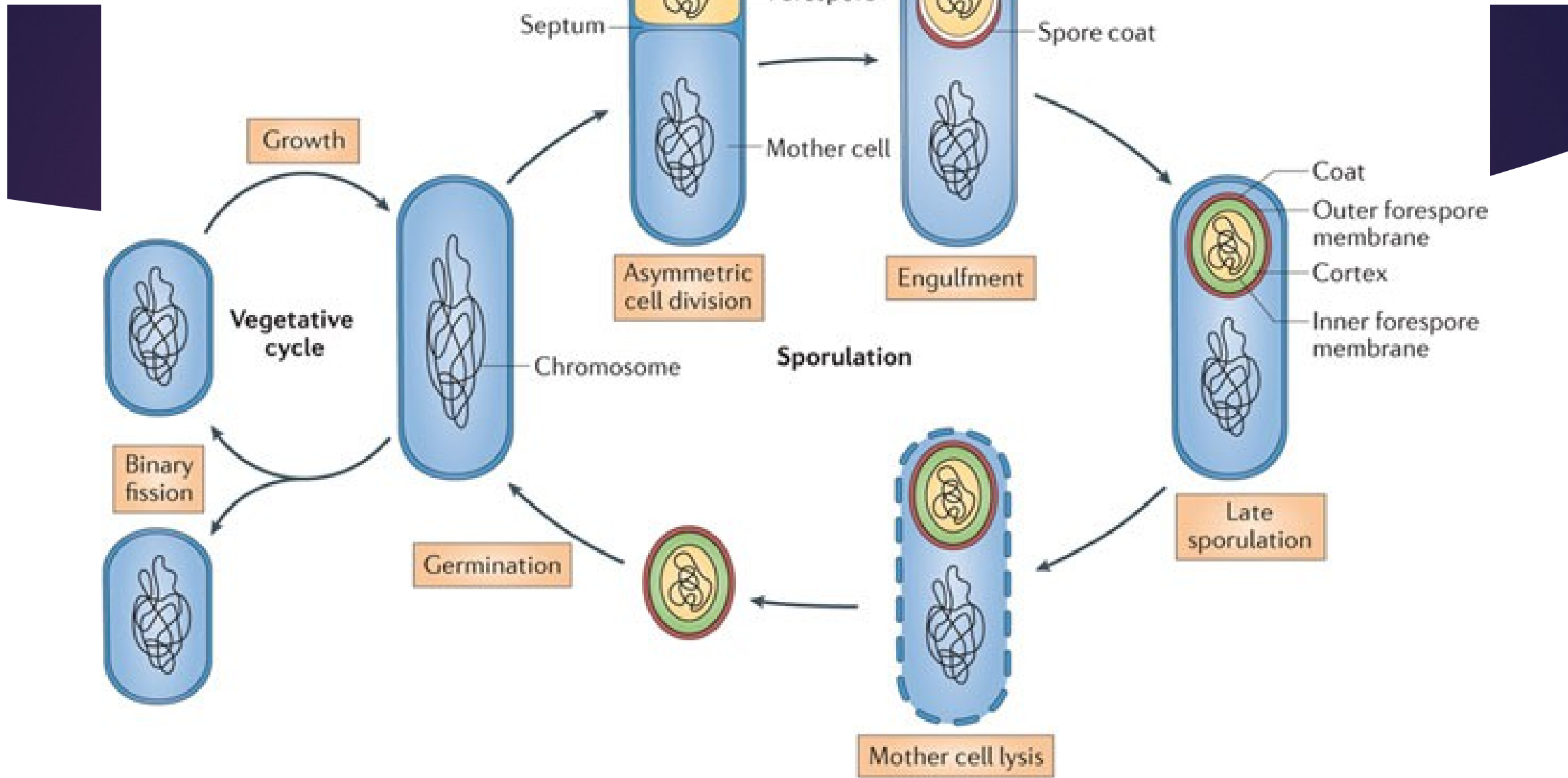
- ▶ **Protoplast** (sporoplast) – gelová matrix, nukleoid, ribozomy, kalcium dipikolinát, proteiny stabilizující DNA
- ▶ Vnitřní membrána (**intina**) z lipoproteinů
- ▶ Vrstva **peptidoglykanu** – zbytek původní buněčné stěny
- ▶ **Kortex** – vnitřní a zevní, zajišťuje nepropustnost a odolnost, termorezistenci, tvořen **peptidoglykany** – jinými než v buněčné stěně
- ▶ Vnější membrána (**extina**) z lipoproteinů
- ▶ **Plášť** - zajišťuje odolnost k chemikáliím a UV
- ▶ **Exospórium** – není u všech taxonů, zajišťuje odolnost

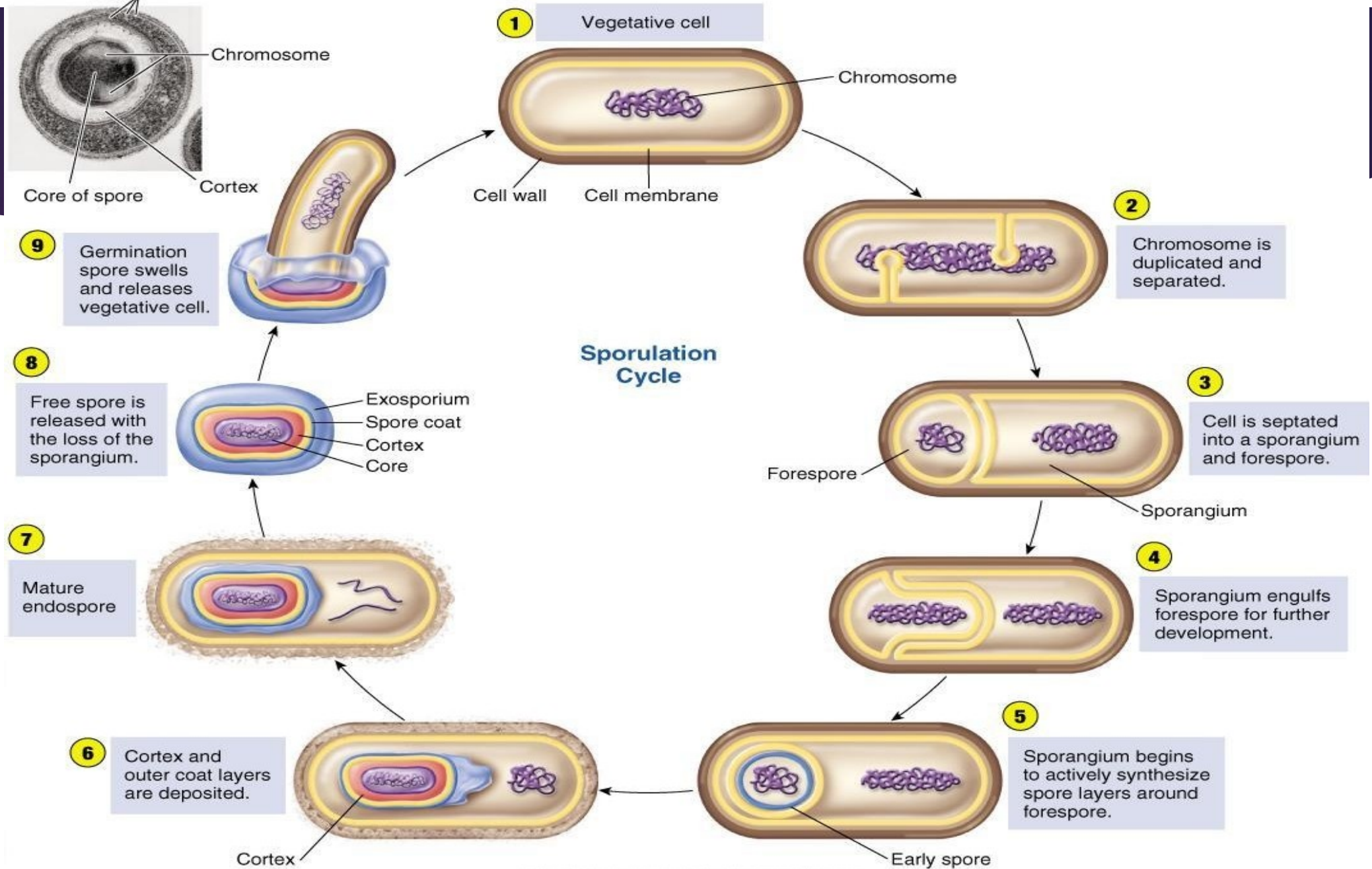
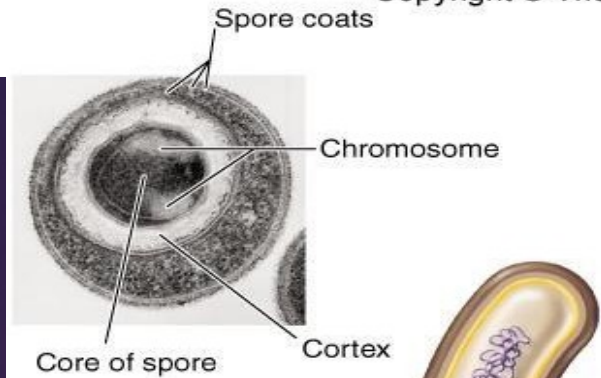


Sporulace – vznik endospory



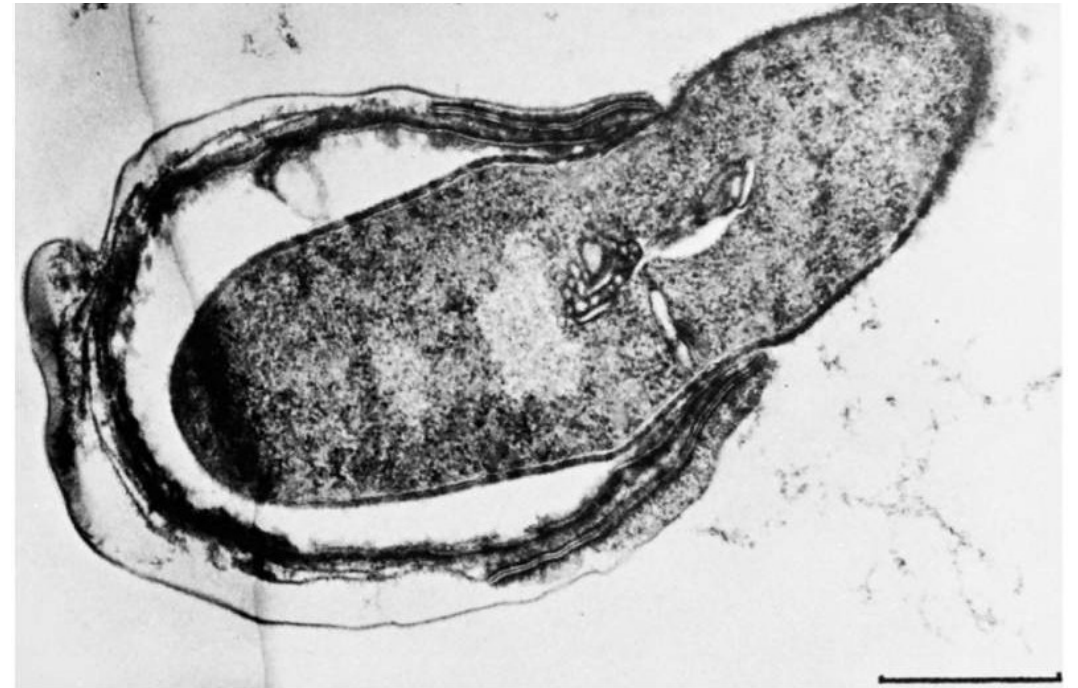
- ▶ Probíhá i při dostatku živin, hlavně v stacionární fázi
- ▶ **Fáze I** – Buňka přechází z binárního k **asymetrickému** dělení
- ▶ **Fáze II** – Chromozom se duplikuje a odděluje
- ▶ **Fáze III** – DNA se rozestoupí k pólům buňky. Vytváří se **septum**, rozdělí buňku na 2 nestejně části – **presporu** a **sporangium**.
- ▶ **Fáze IV** – prespora se obalí dvěma membránami . Tvoří se **prospora**. Není světlolomná.
- ▶ **Fáze V** – tvoří se **kortex** spory s jiným **peptidoglykanem**. Je přítomen **kalcium dipikolinát** (kalcium + kys. dipikolinová tvořena mateřskou buňkou). Endospora už je **světlolomná**.
- ▶ **Fáze VI** – syntéza **pláště**, u rodu *Bacillus* vzniká **exosporium**
- ▶ **Fáze VII** – **Maturace** endospory, lyze mateřské buňky, **uvolnění zralé spory**.





Klíčení spory = germinace

- ▶ Spora se **aktivuje** spontánně, zahřátím, fyzikálními nebo chemickými faktory, přítomností vody, aminokyselin, vitamínů
- ▶ **Klíčení** = přijímání vody, hydrolýza kortexu, ztráta rezistence
- ▶ Destabilizuje se plášť, spora přijímá vodu, ztrácí rezistenci, syntetizuje enzymy, spouští se proteosyntéza, regulační procesy, metabolismus
- ▶ Po dvou hodinách od germinace se vzniklá vegetativní buňka dělí



Bakteriální endospory

- ▶ Tvar a umístění spory v buňce napomáhá k identifikaci bakterií

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

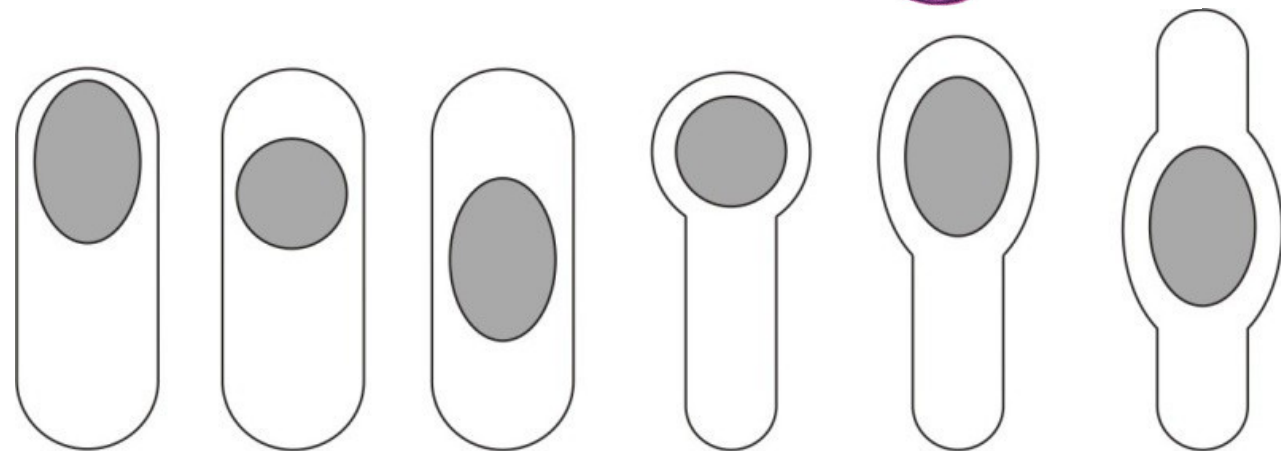
- ▶ **Kulaté** - *Clostridium tetani*, *Bacillus sphearicus*

- ▶ **Terminální** - *C. tetani*

- ▶ **Subterminální** (paracentrální) - *C. botulinum*

- ▶ **Centrální** - *B. cereus*, *B. anthracis*

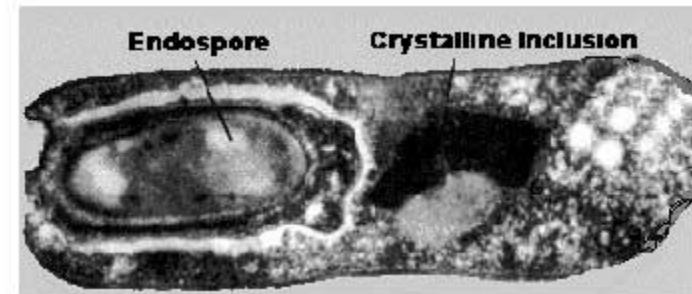
- ▶ Spory **vyklenují/nevyklenují** buňku



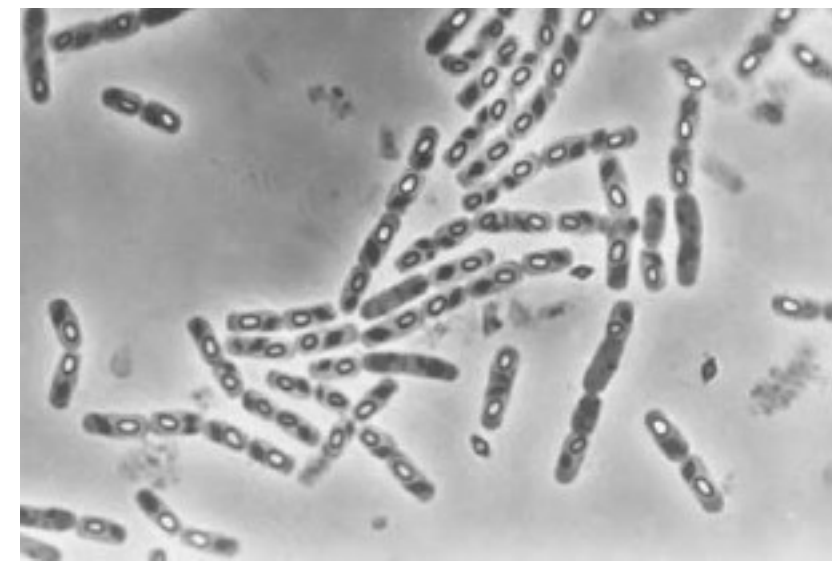
Bakteriální endospory



- ▶ Spory jsou **velmi odolné**, např. *Clostridium botulinum* odolá 90 minut při 100°C (nesporulující buňky hynou při 70°C, 30 minut)
- ▶ **Sporocidní látky** – ethylenoxid, betapropionlakton, koncentrované louhy a kyseliny, formaldehyd, Persteril (kys. peroctová), jodové preparáty, chloramin
- ▶ Spory *Bacillus anthracis* – **antrax**, bioterorismus
- ▶ Bílkovina ze spor *Bacillus thuringiensis* – **biopesticidy**
- ▶ Modifikované spory *Bacillus subtilis* - vehikula **vakcín**

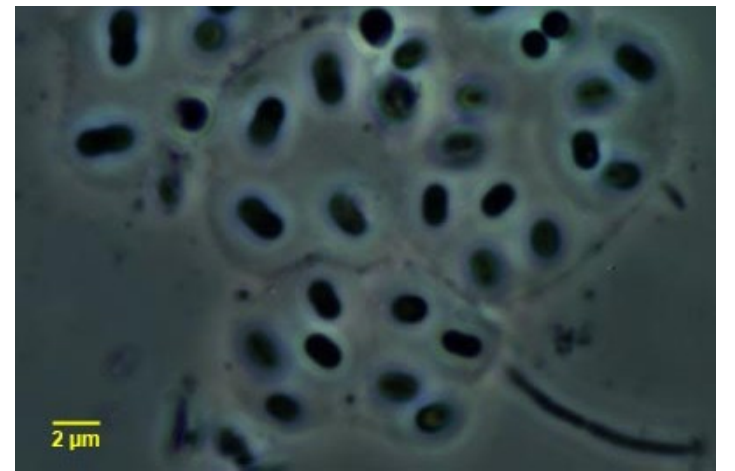
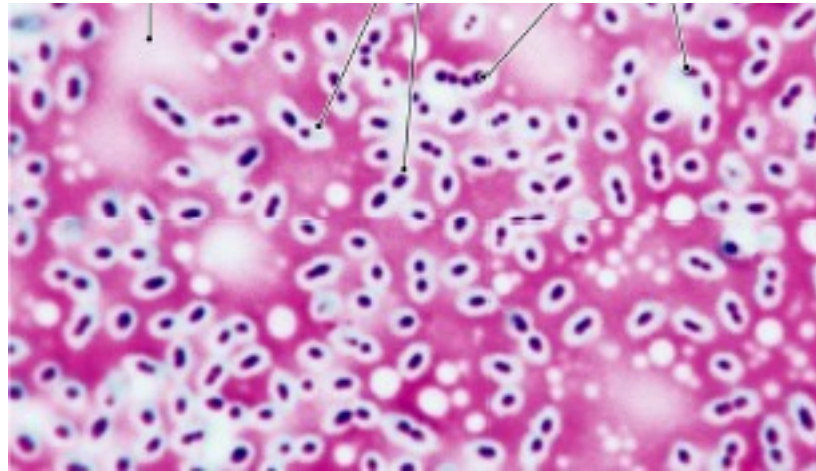
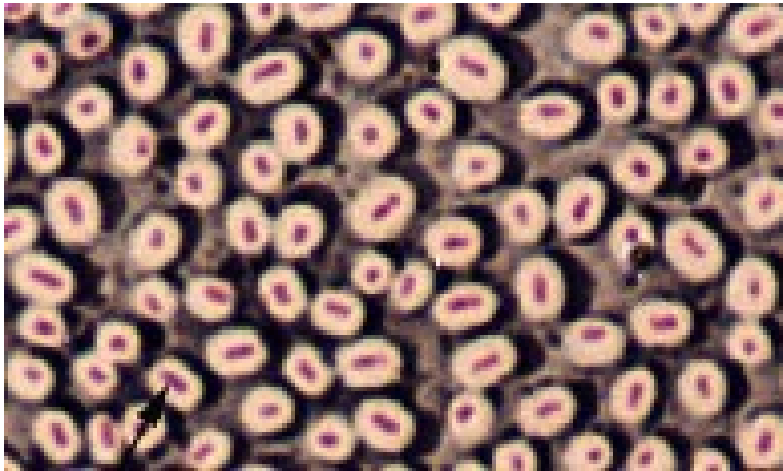


Bacillus thuringiensis



Bakteriální pouzdro

- ▶ **Polysacharidové** či bílkovinové pouzdro **lemuje** bakteriální buňku, **chrání** jí proti vysychání, jedům, imunitnímu systému
- ▶ Adherence, biofilm, rezistence k antibiotikům, faktor virulence
- ▶ Bakterie tvořící pouzdra tvoří **slizové, mukózní**, kličkou tahavé kolonie, které znázorníme negativním barvením
- ▶ Vysoké množství sacharidů v médiu podporuje tvorbu pouzdra

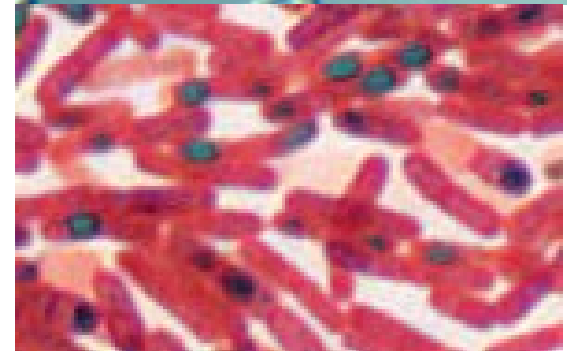


Pozorování spor

- ▶ Neobarvené spory (nativní preparát) pozorujeme **fázovým** (zářící spory) nebo **Nomarského kontrastem** (plastický povrch)
- ▶ **Jednoduchým barvením** se barví jen buňková stěna, nevidíme spory, **jen vyklenutí buňky**
- ▶ Endosporu obarvíme **za horka**. Spory špatně přijímají barvivo, proto se obarví až během varu

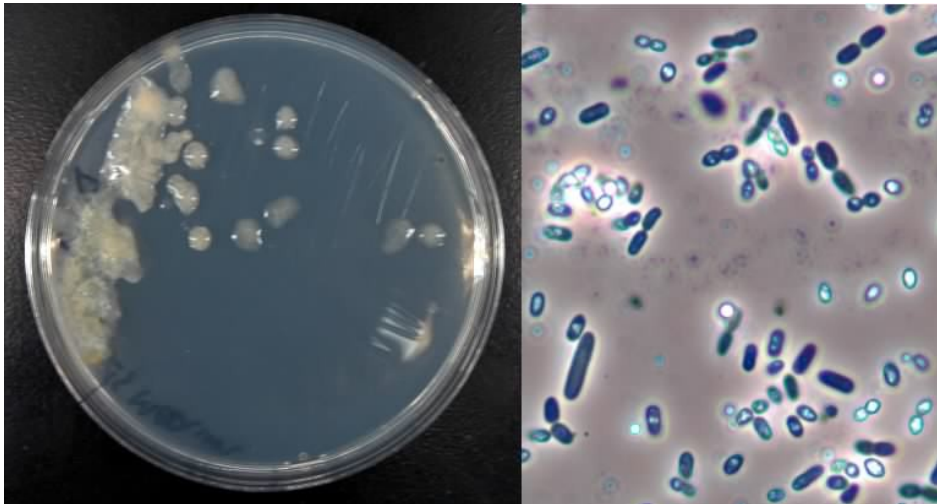
Negativní barvení

- ▶ Obarví **okolí buněk** (pozadí, sklíčko), ne buňky samotné
- ▶ Buňka se **nedeformuje** barvením ani fixací

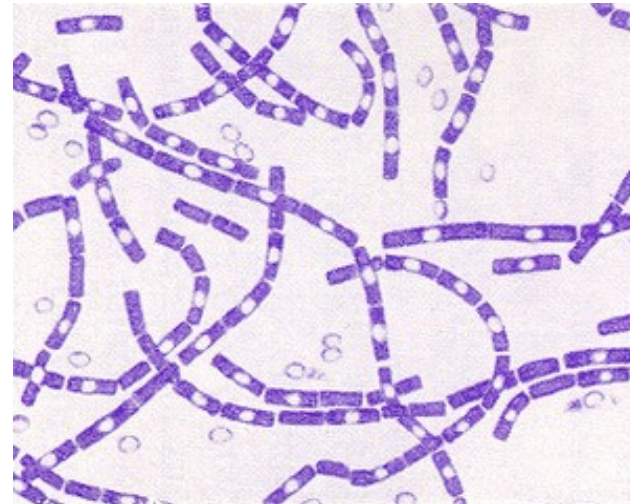


Pozorované bakterie

- ▶ **Azotobacter**
- ▶ G- tyčka až kok
- ▶ Tvoří pigment, sliz, **pouzdra**, cysty
- ▶ Nesymbiotická fixace dusíku



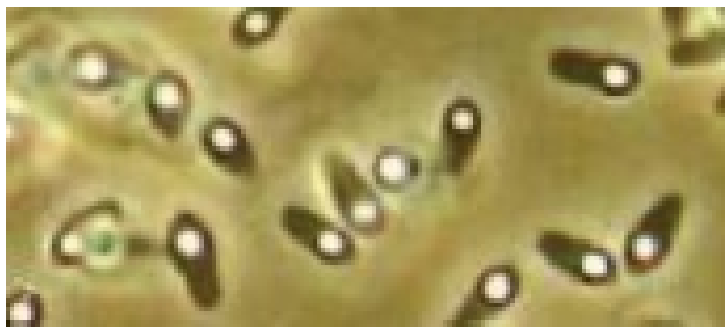
- ▶ **Bacillus**
- ▶ G+ tyčky, sporulují, tvoří řetízky buněk
- ▶ Biozbraně až tvorba antibiotik



Spory rodu *Bacillus*

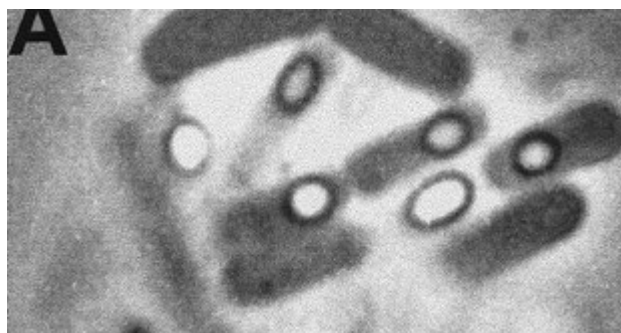
B. Sphaericus

kulaté, terminální, ztlušťují buňku



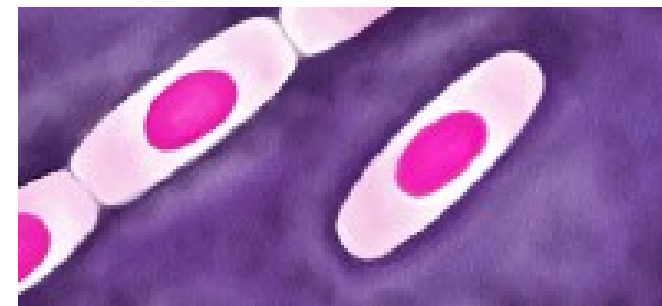
B. thuringiensis

oválné, subterminální, nevyklenují



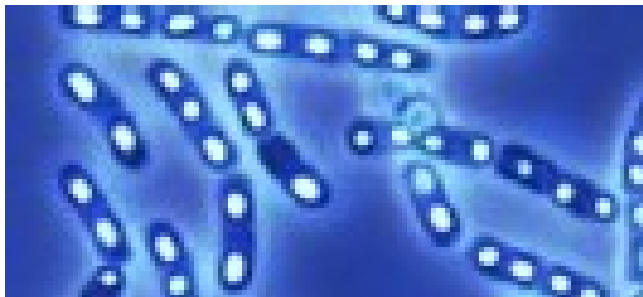
B. cereus

centrální, oválné, nevyklenují



B. megaterium

Kulaté
Subterminální
Nevyklenují



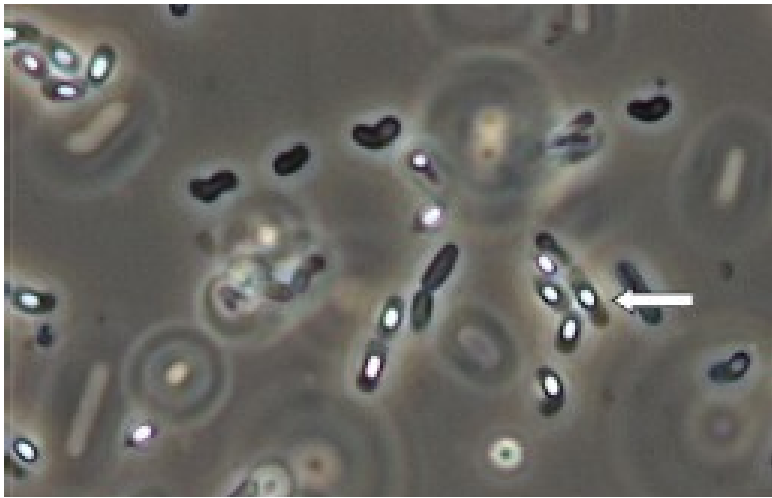
Paenibacillus polymyxa

Velké centrální
Vyklenující



Práce ve cvičení

Nativní preparát - fázový kontrast



Negativně barvený preparát

Obarví okolí buněk

Nigrosin



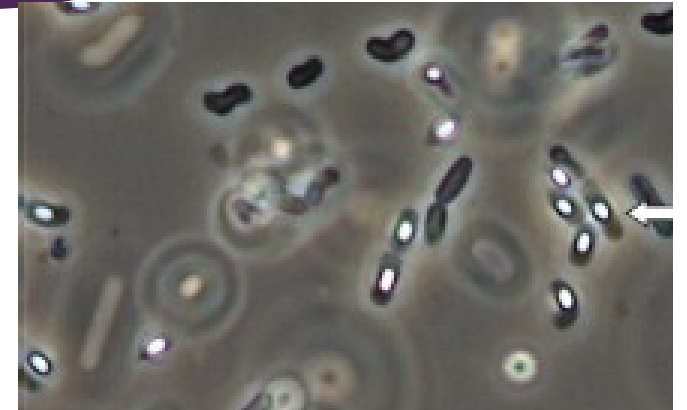
Kongo červeně



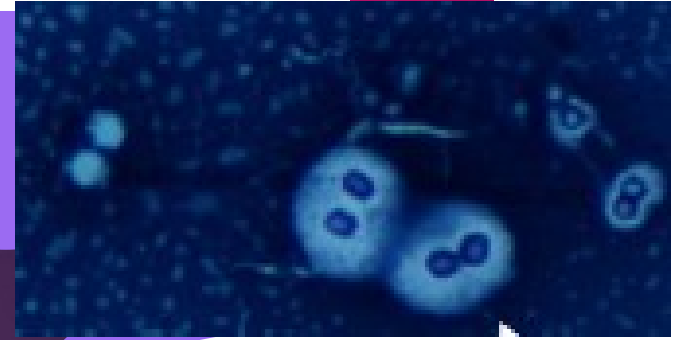
Obrázky – druhá prezentace

Postup

- ▶ **Nativní preparát – Bacillus – každý svůj preparát**
 - ▶ Sklíčko protáhnout plamenem, doprostřed nanést kapku vody
 - ▶ Ožehnutou kličkou vnést do kapky kličku kultury a rozmíchat, přikrýt krycím sklem aby tam nebyly bubliny, přebytečnou vodu odsát
 - ▶ Pozorovat do 5 minut fázovým kontrastem (1000x)
 - ▶ Je vidět tvar a umístění spor, pohyb
-
- ▶ **Negativní barvení – nigrosin – Bacillus nebo Azotobacter– každý svůj preparát**
 - ▶ Do kapky vody rozmíchat vyžíhanou kličkou trochu kultury
 - ▶ Přidat kapku nigrosinu
 - ▶ Rozmíchat kličkou, rozetřít jemným tahem druhého sklíčka (pod 45° uhlím) a nechat zaschnout bez oplachování
 - ▶ Pozorovat s imerzí v jasném poli (1000x)
 - ▶ Je vidět přesná velikost a tvar buňky



Postup – barvení pouzder



- ▶ **Barvení pouzder – Kongo červení – Azotobacter – ve dvojici**
- ▶ Do kapky Kongo červeně nanést kulturu a rozetřít po sklíčku
- ▶ Nechat zaschnout, na několik sekund převrstvit HCl, tu následně slít, neoplachovat, pouze dosušit preparát filtračním papírem
- ▶ Na 3 minuty převrstvit metylenovou modří, opláchnout, usušit
- ▶ Pozorovat s imerzí v jasném poli (1000x)
- ▶ Vidíme modré buňky, světlá pouzdra a modré pozadí

- ▶ **Barvení pouzder – nigrosinem, dobarvení modří – Azotobacter - ve dvojici**
- ▶ Kapka vody + kapka nigrosinu, do toho nanést vyžíhanou kličkou kulturu a rozetřít po sklíčku, nechat zaschnout
- ▶ Převrstvit na 3 minuty metylenovou modří, opláchnout, osušit
- ▶ Pozorovat s imerzí v jasném poli (1000x)
- ▶ Vidíme modré buňky obklopeny světlými pouzdry, pozadí tmavé