

# **Pozorování bakteriálních endospor** **a negativní barvení**

## **Cíl:**

Nativní preparát – tvar, velikost a umístění endospor  
(fázový kontrast)

Negativně barvený preparát – pozorování a měření skutečné  
velikosti buňky, tvaru, tvorby řetízků (program LUCIA G)  
Barvení pouzder – Kongo červeň, metylenová modř

## **Kultury k pozorování:**

*Bacillus megaterium* CCM 2007

*Bacillus sphaericus* CCM 1615

*Paenibacillus polymyxa* CCM 1459

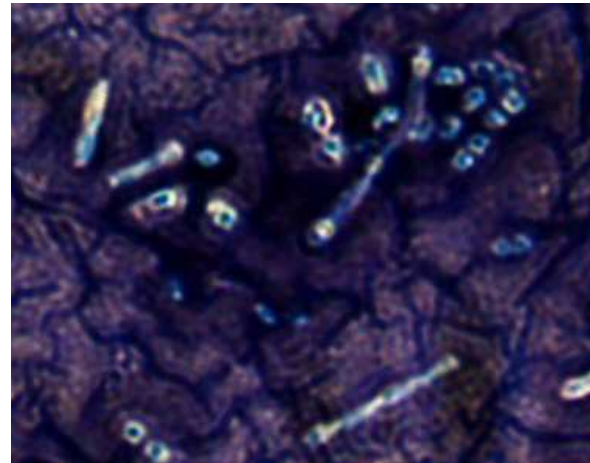
*Bacillus cereus* CCM 2010

*Bacillus thuringiensis* CCM 19

# Negativní barvení

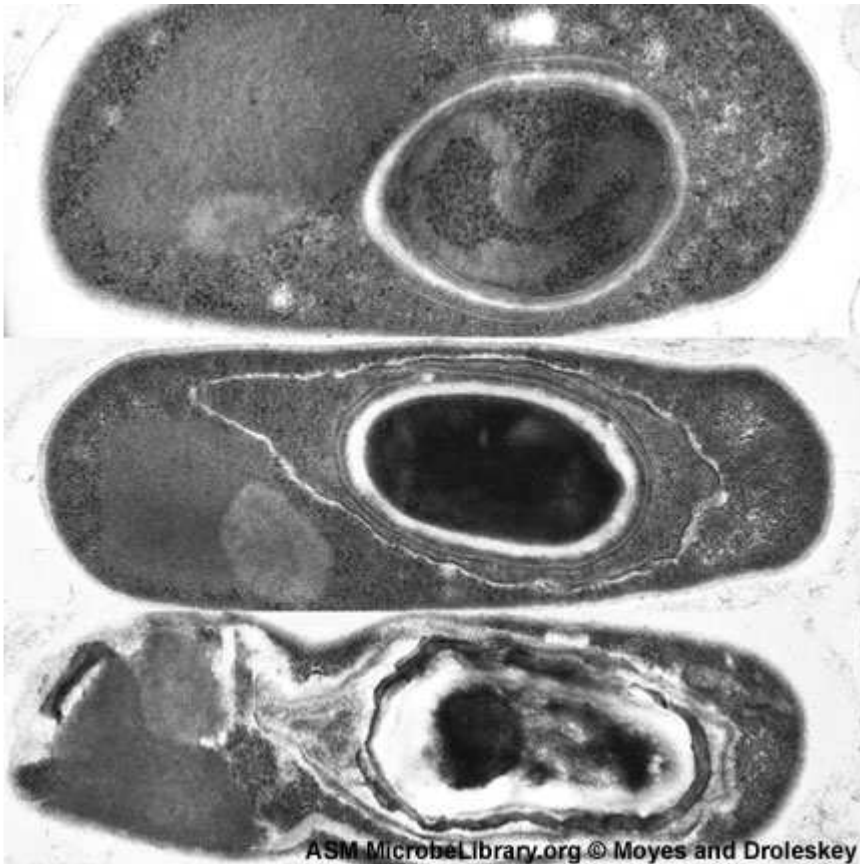
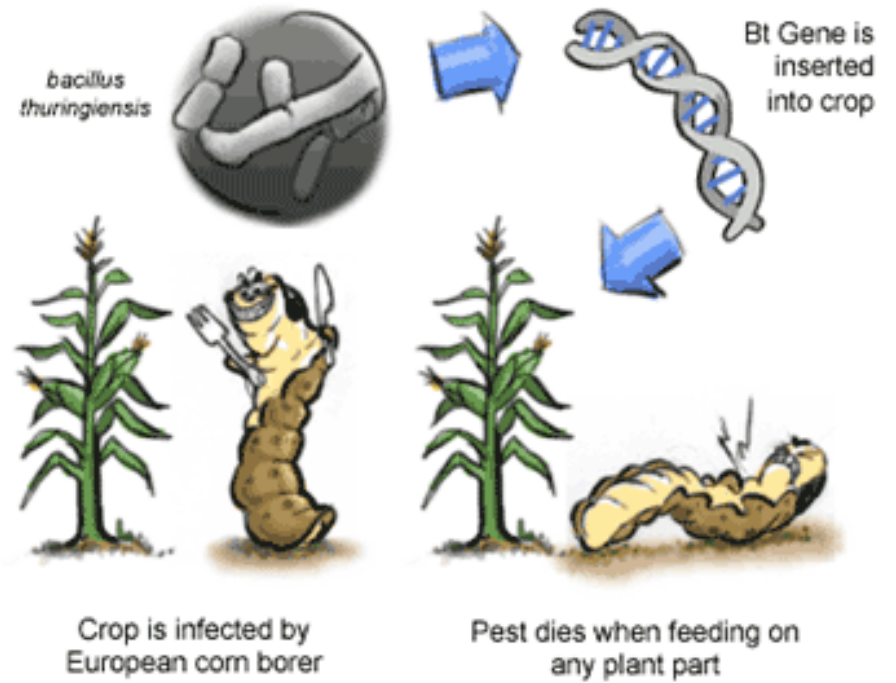
- Obarvení pozadí, buňky nezbarvené, obrys v obarveném pozadí → stanovení pouzder, slizů, velikost buňky

- *Nigrosinem*  
*Azotobacter vinelandii* CCM 289

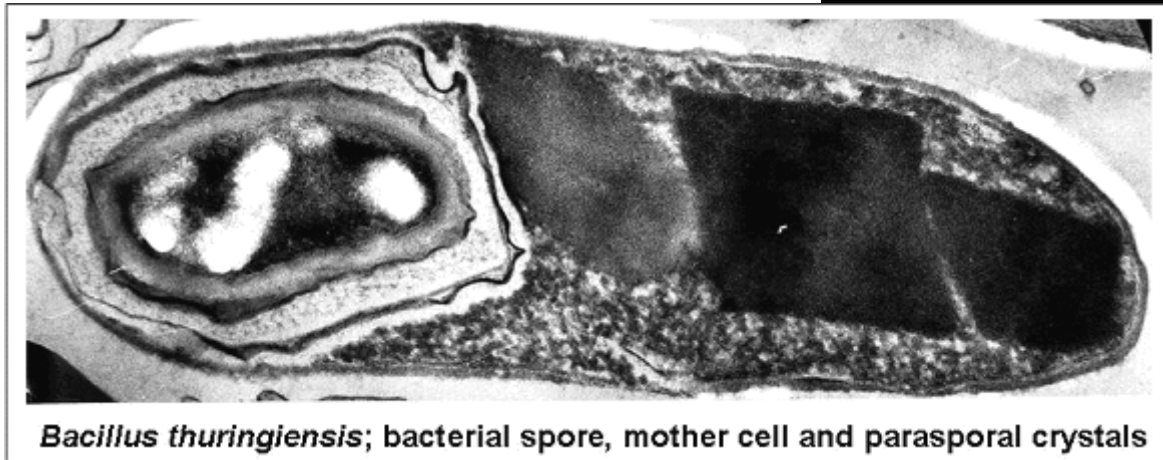
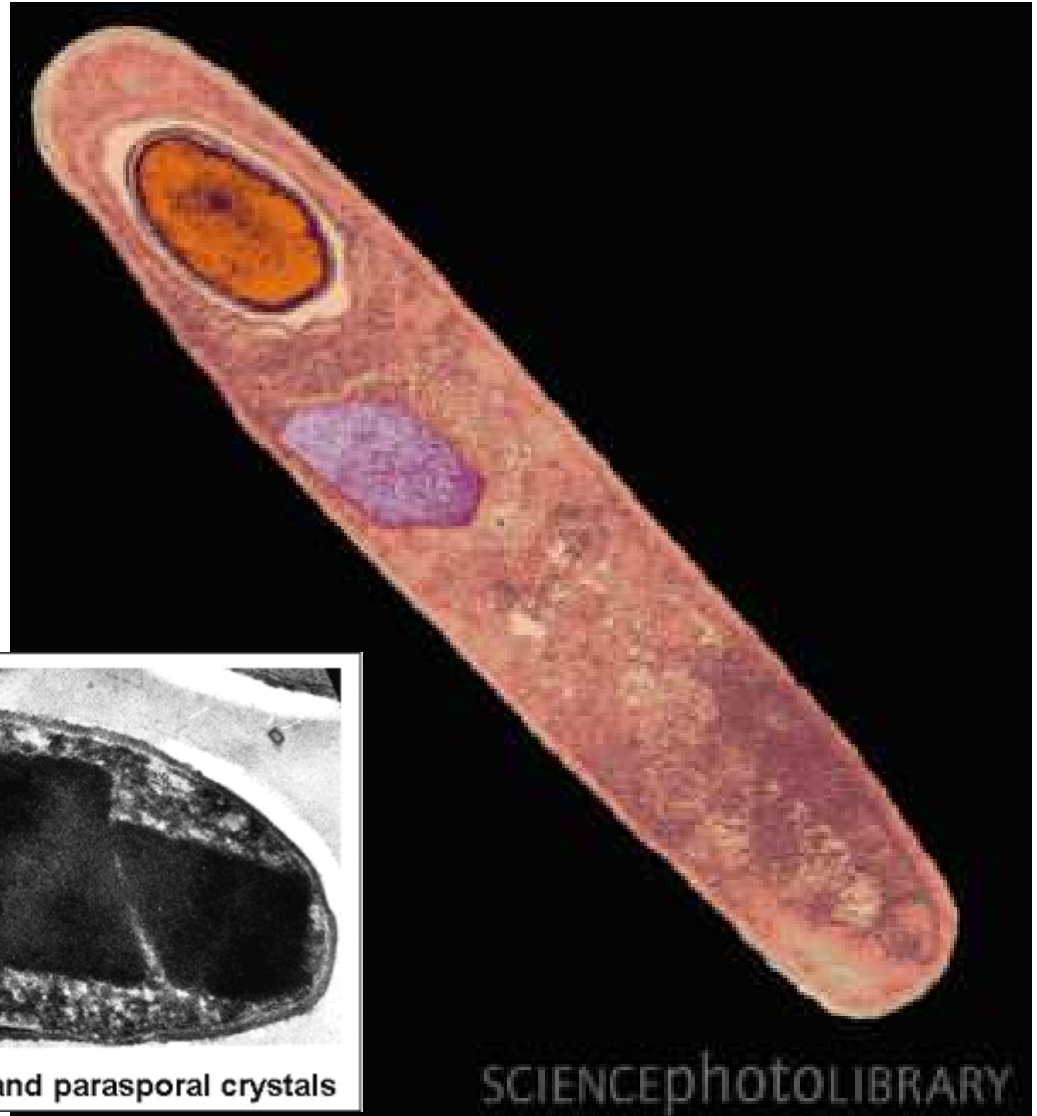


- Pouzder a kapsulí  
zahřívání v karbolfuchsinu a dobarvení nigrosinem
- **pouzdro** – polysacharidy; hlavně u klinických izolátů, chrání před vysycháním a nepříznivými faktory, látková výměna s vnějším prostředím, maskování antigenu, větší odolnost, faktor virulence

# *B. thuringiensis*



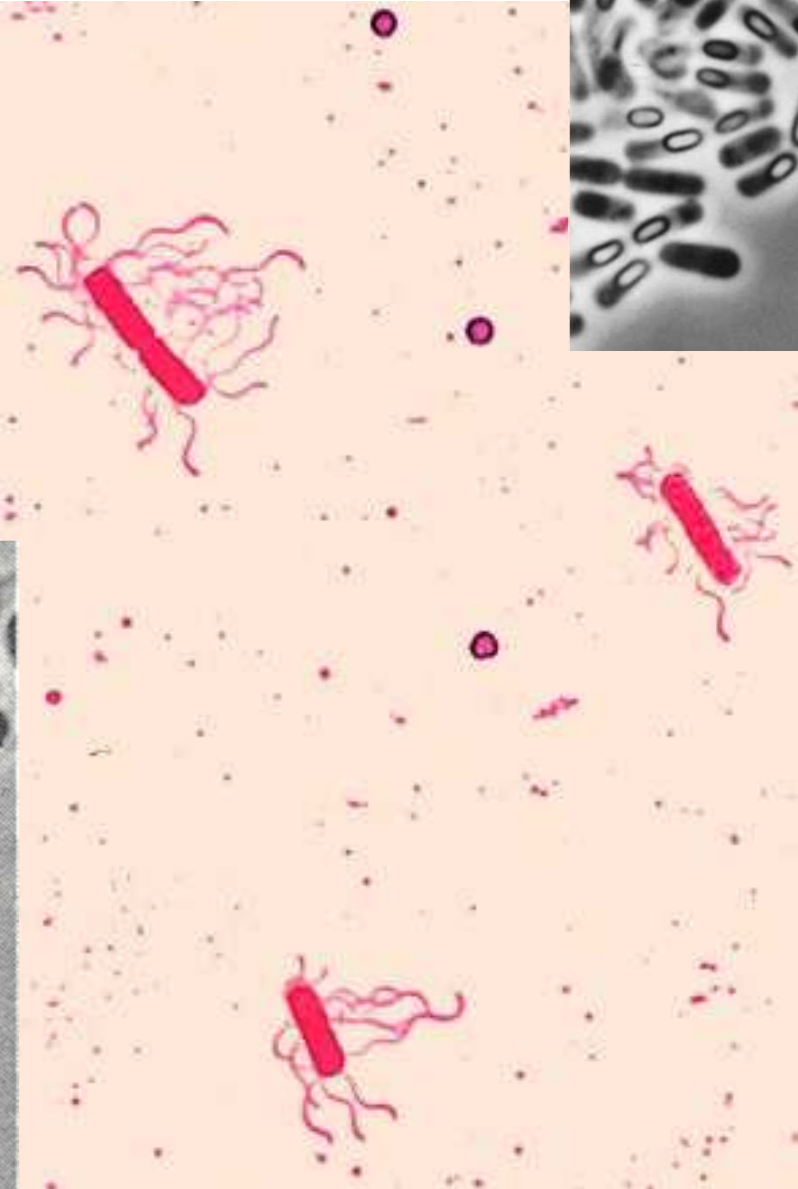
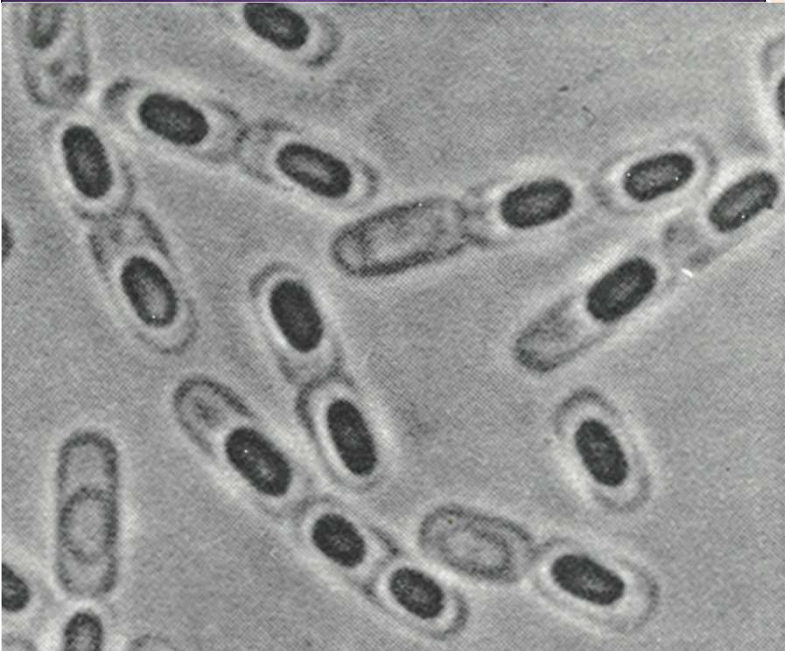
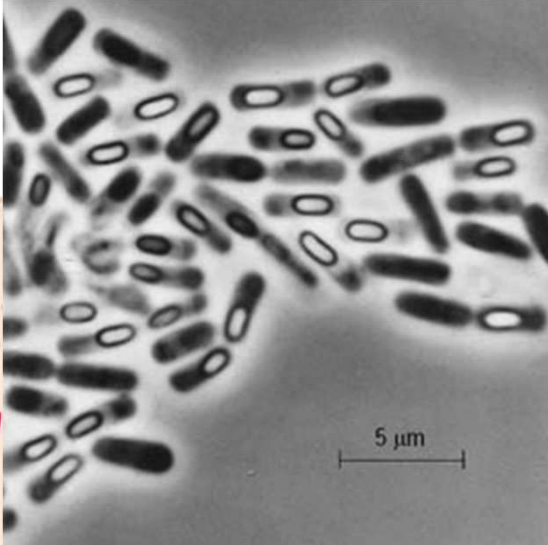
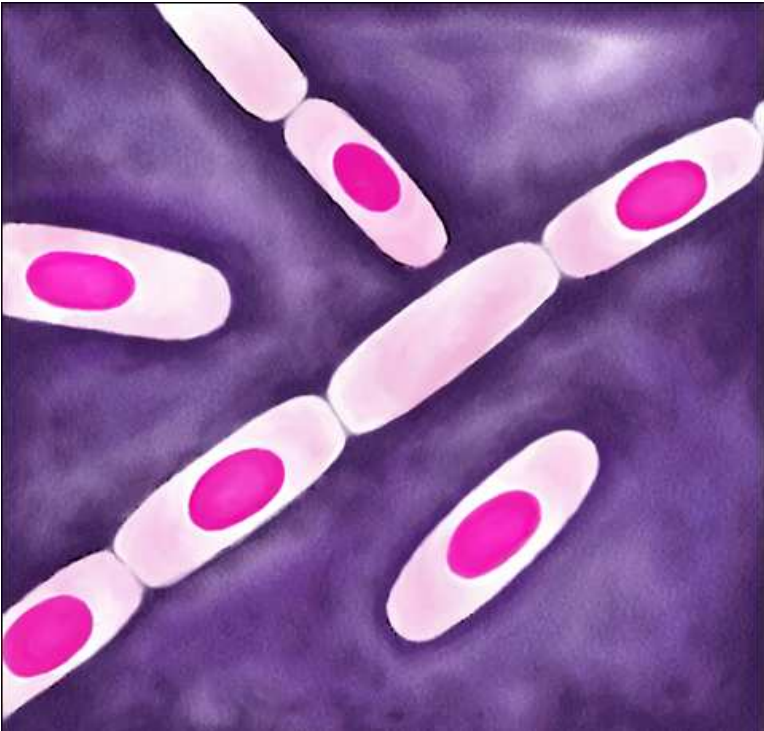
# *B. thuringiensis*



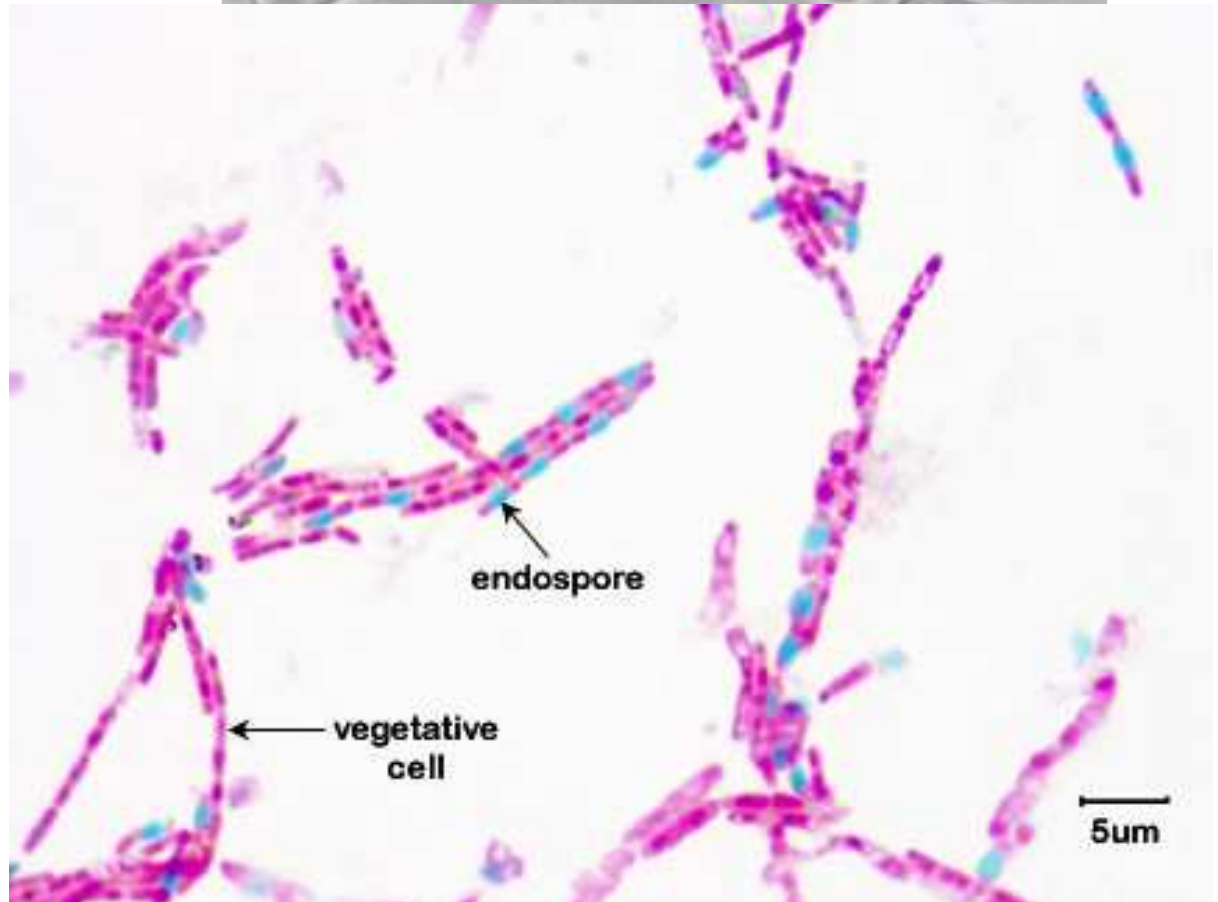
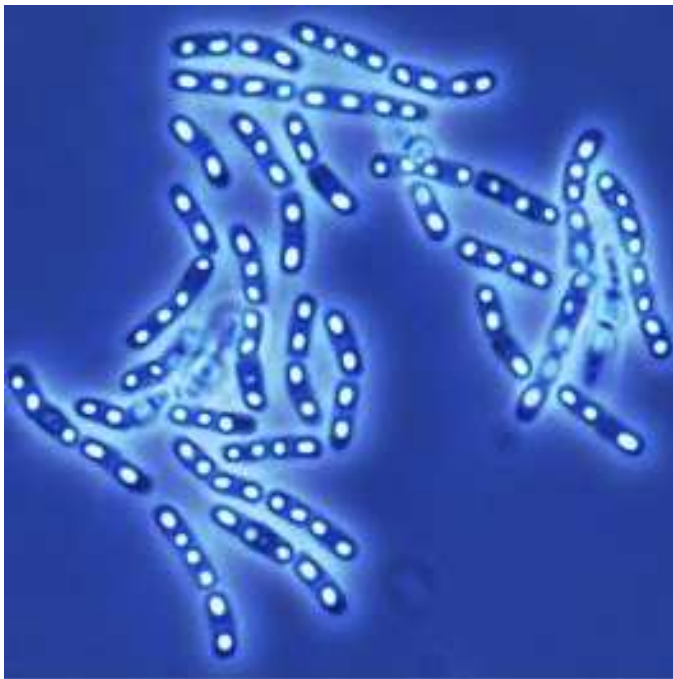
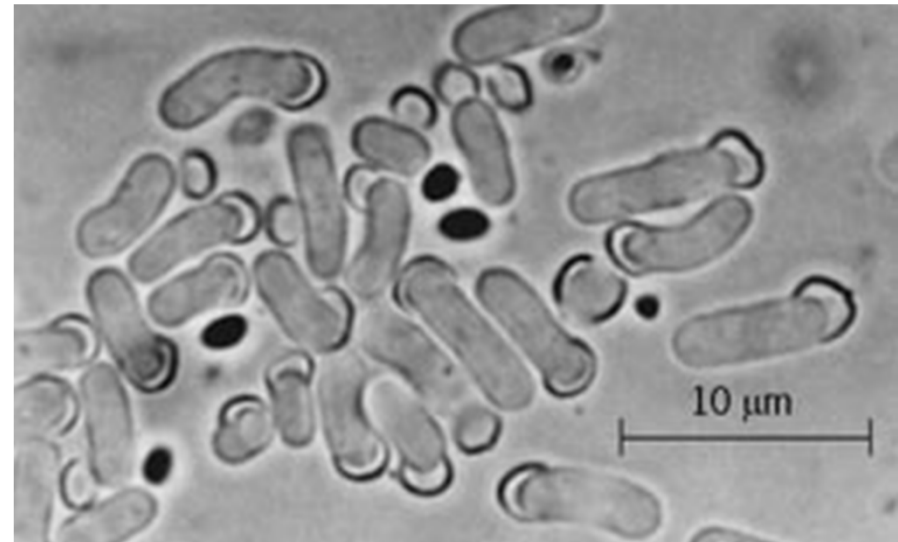
*Bacillus thuringiensis*; bacterial spore, mother cell and parasporal crystals

SCIENCEPHOTOLIBRARY

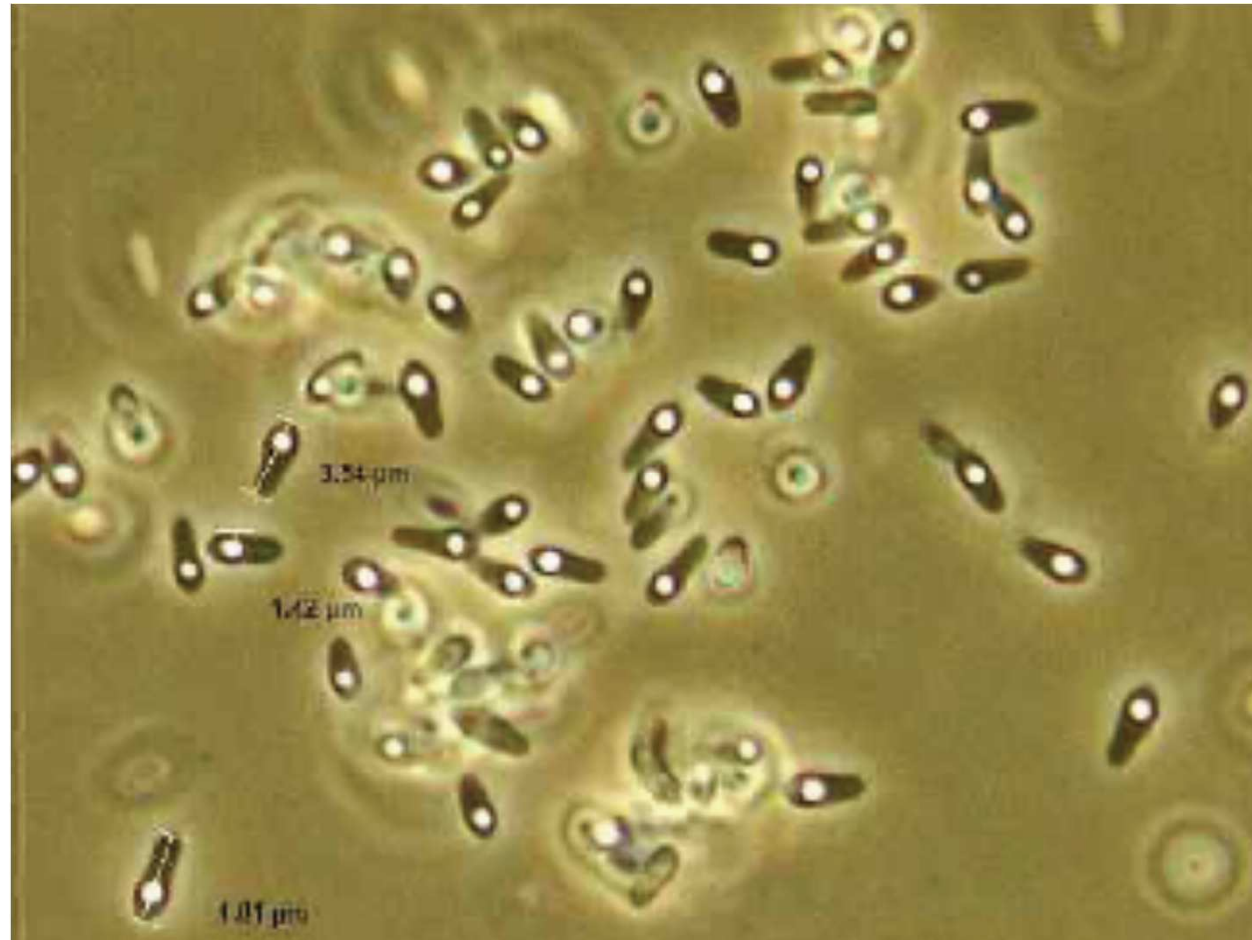
***B. cereus***



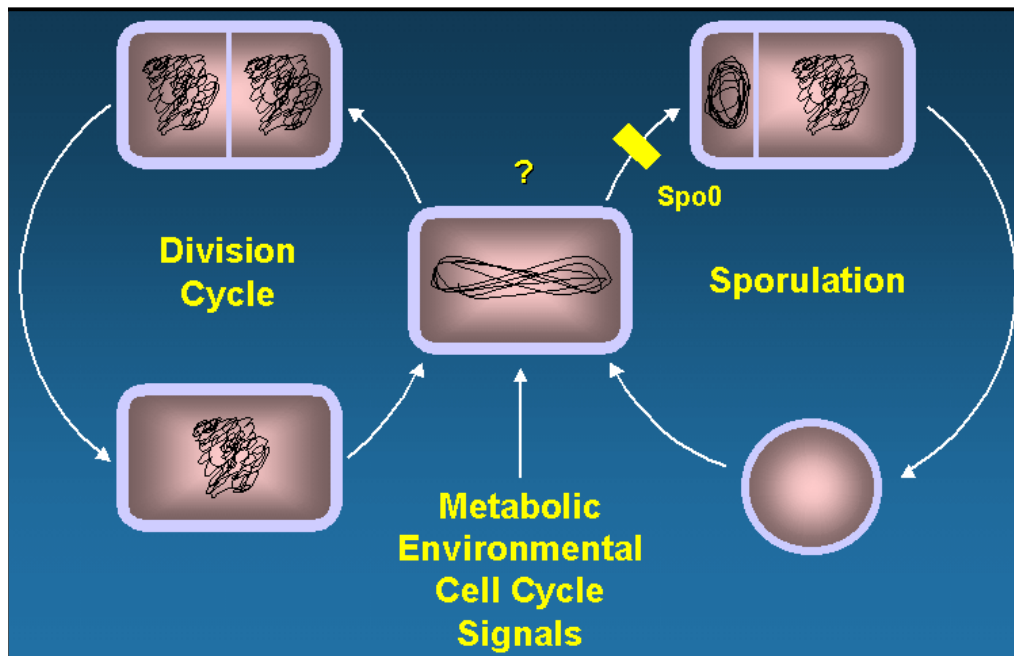
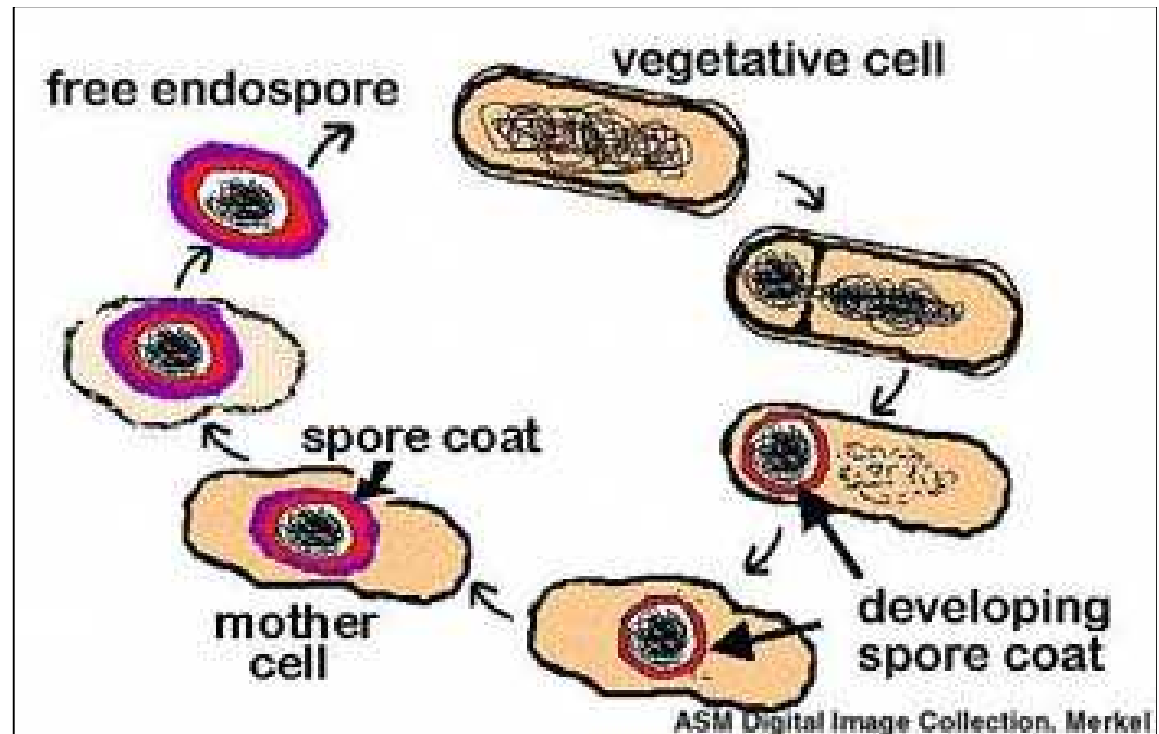
# *B. megaterium*



# *B. sphaericus*



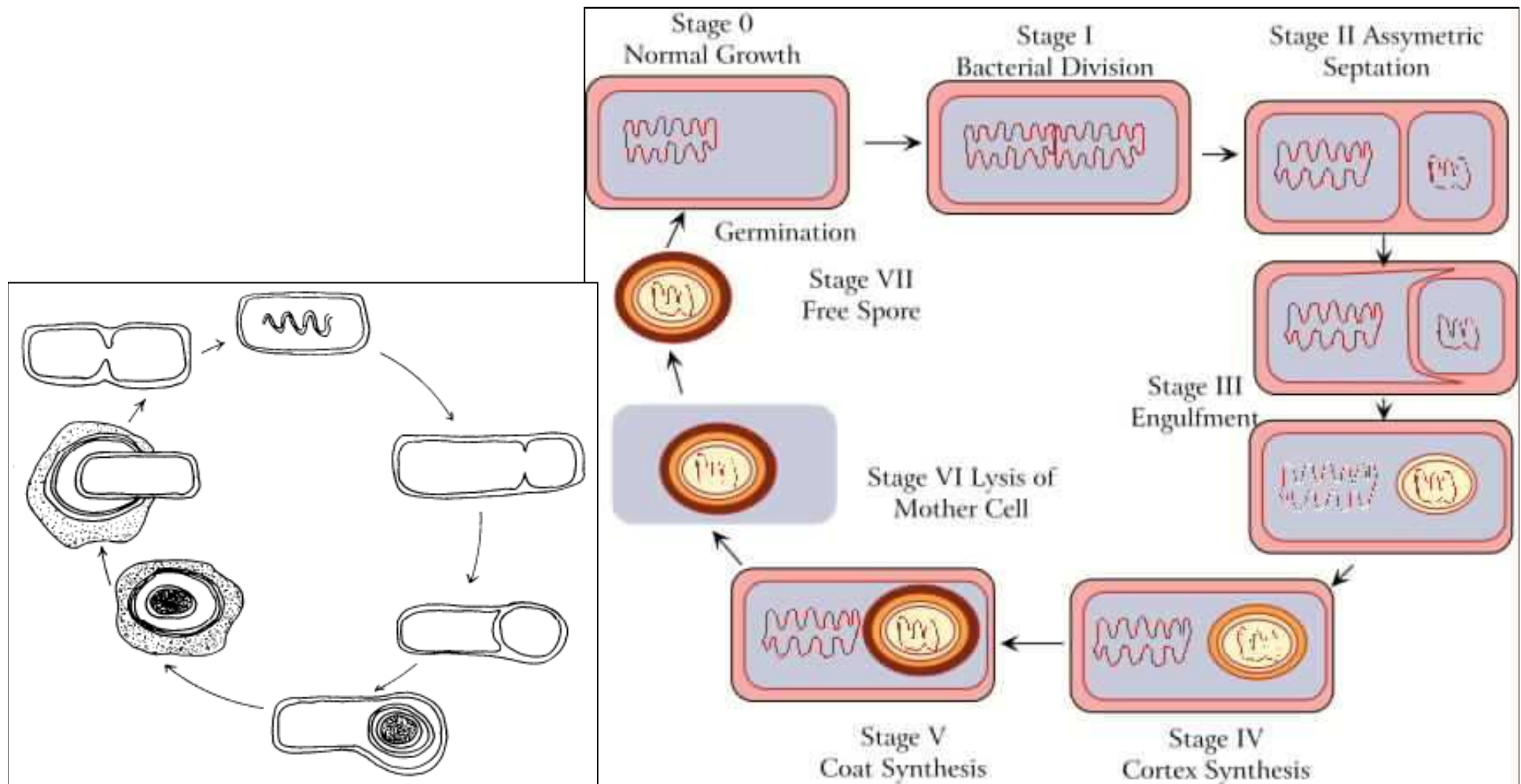
- Růstové cykly
- Asymetrické  
x binární dělení



buněčné formy:  
vegetativní buňka  
spora  
cysta



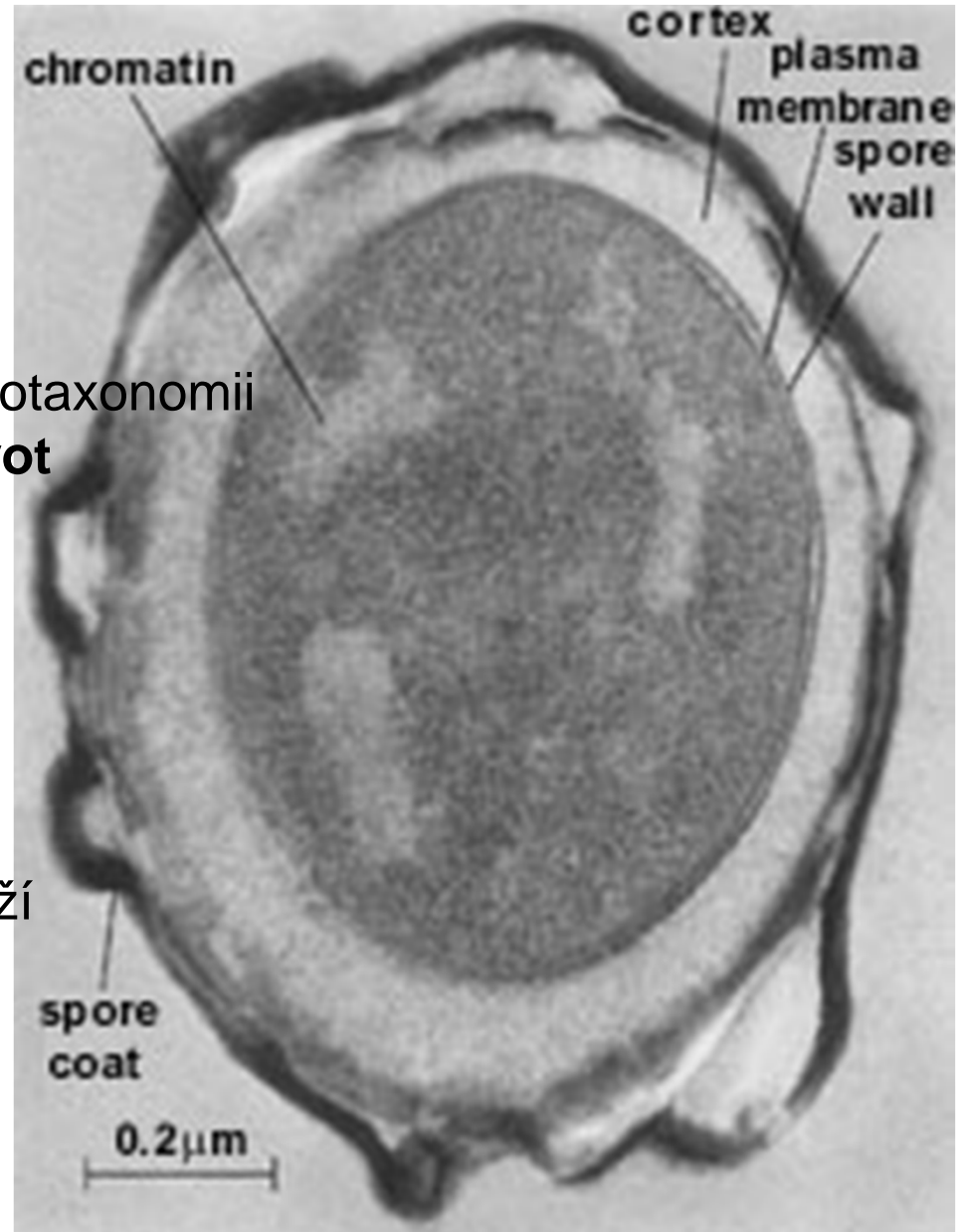
- Sporulace **NENÍ** odpověď na nepříznivé podmínky, ale přípravou na ně!!!!
- sporulují převážně G+ rody



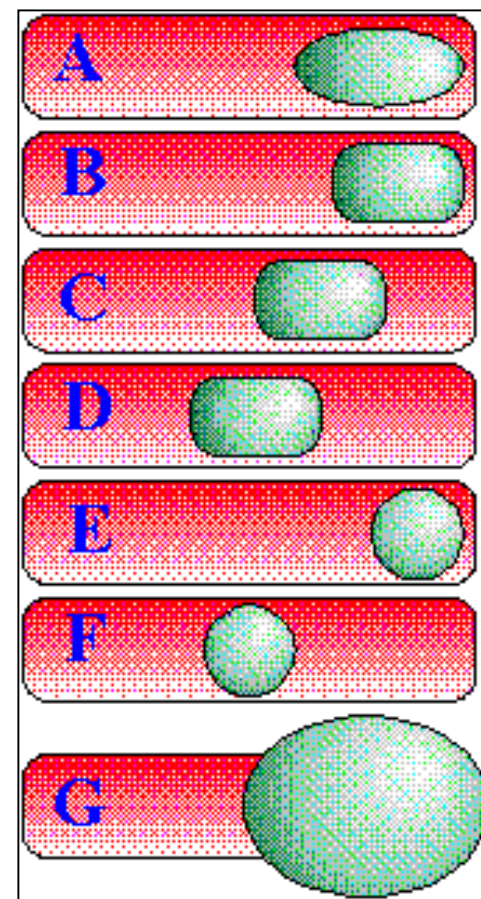
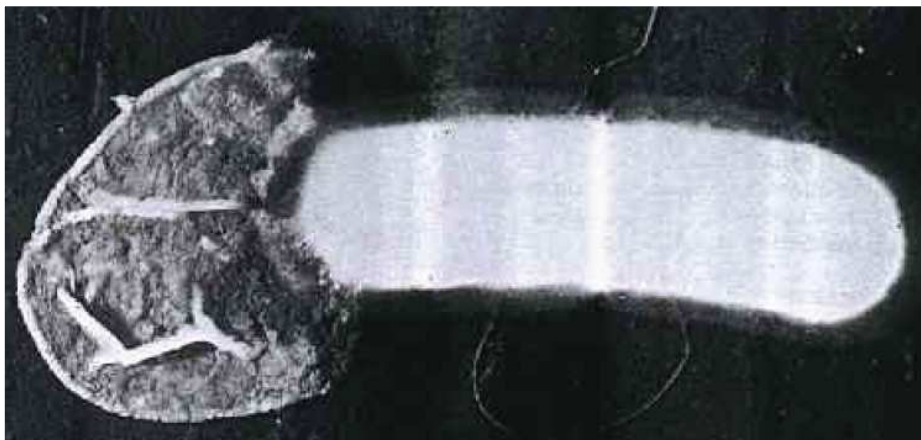
# *Spora – klidové stadium*

Dipikolinát - termorezistence  
Proteiny stabilizující DNA  
Odlišný peptidoglykan  
Reparační enzymy při germinaci

- **bílkoviny pláště** – význam v chemotaxonomii
- **pouze 1 spora v buňce u prokaryot**
- často toxigenní a alergenní (kontaminace potravin), ale i pro vakcinaci, bioinsekticid
- ověření sterilizace  
*B. stearothermophilus* – spory vydrží při 120°C až 12 min
- značná odolnost



- umístění spory a tvar– důležitý taxonomický znak  
*Bacillaceae* – 3 morfologické skupiny

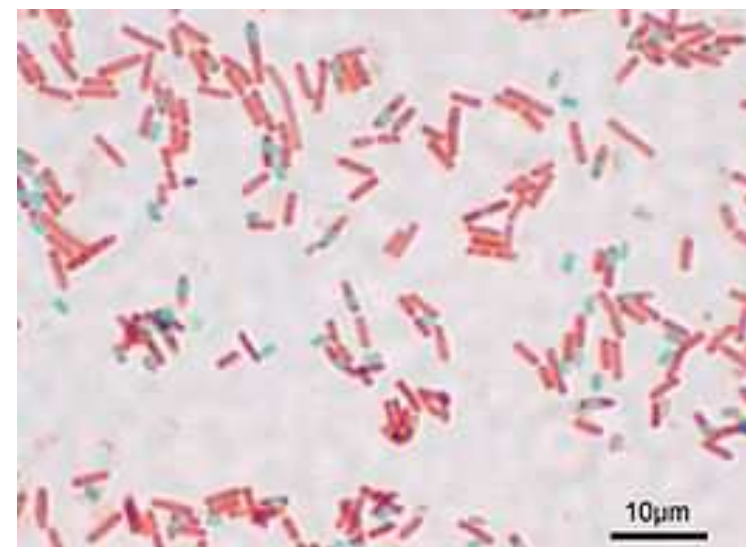
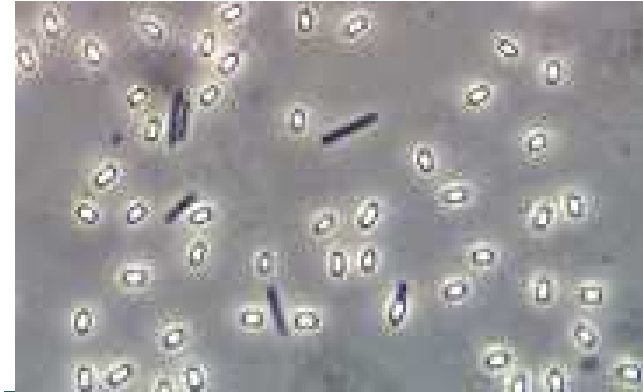


## Klíčení spory

- přítomnost vody, aminokyselin, vitamínů, zahřátí, ...)
- asi 10 min (aktivace spory, vlastní klíčení, diferenciační fáze)
- inhibice klíčení v mediu: D-alanin,  $MgCl_2$

# Pozorování spor

- Fázový kontrast  
(barvitelné a světlolomné až po vzniku kortexu spory, předtím je při fázovém kontrastu nelze vidět)
- Nomarského kontrast  
– plastický povrch buňky
- barvení buněčné stěny  
– jen pro pozorování vyklenutí
- spory jsou barvitelné za tepla,  
barvení Schaffer-Fulton



# Postup

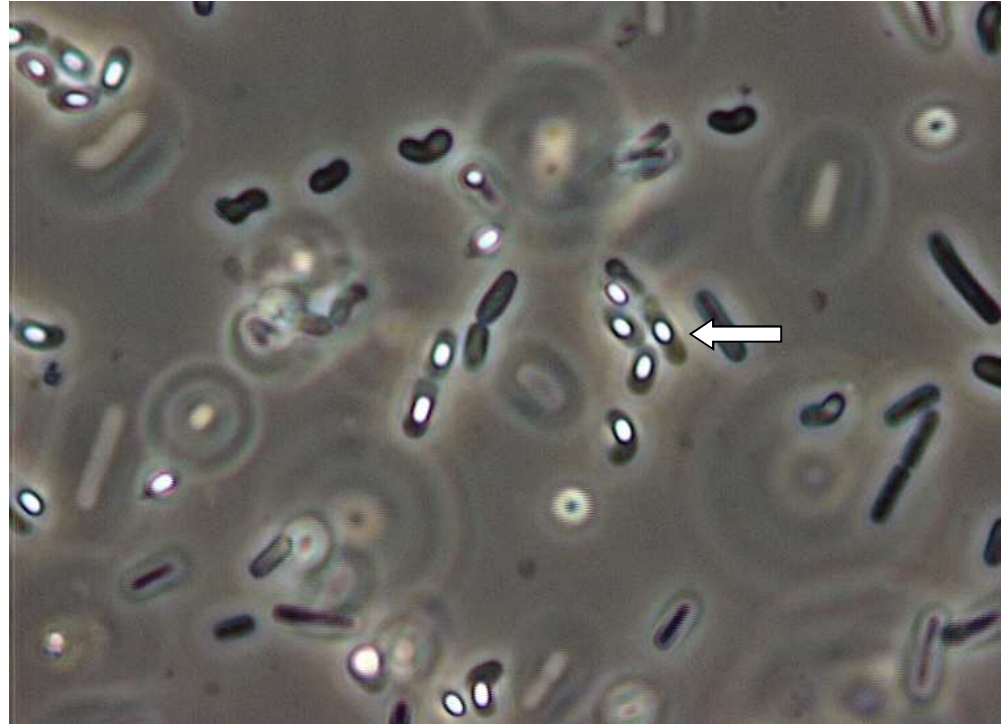
- **Negativní barvení – nigrosin**
  - do kapky vody nanést kličku kultury (*Azotobacter*), přidat kapku nigrosinu
  - rozmíchat, rozetřít druhým sklíčkem a nechat zaschnout
  - pozorovat s imerzí (1000x)
- **Barvení pouzder (*Azotobacter*) Kongo červení**
  - do kapky Kongo červeně nanést bakteriální kulturu a rozetřít po sklíčku
  - po zaschnutí se preparát na několik sekund převrství HCl, která se následně slije
  - preparát se osuší filtračním papírem, převrstvit na 3 min metylenovou modří
  - barvivo slít a pozorovat s imerzí (1000x)
- **Nativní preparát**
  - do kapky vody rozmíchat kličku kultury, přikrýt krycím sklem
  - pozorovat do 5 min

- ***B. sphaericus*** – kulaté, terminální, ztlušťují buňku
- ***B. thuringiensis*** – oválné, subterminální, nevyklenují
- ***B. cereus*** – centrální, oválné, nevyklenují
- ***B. megaterium*** – kulaté, subterminální, nezduřují
- ***Paenibacillus polymyxa*** – centrální, velké, vyklenující

Fázový kontrast

-

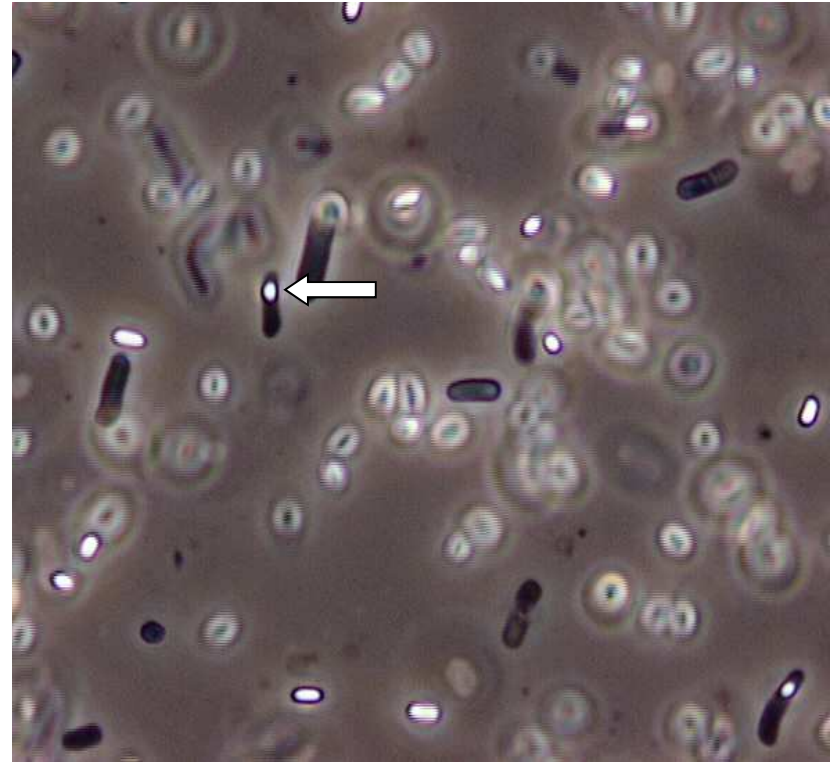
fotky ze cvičení



## *Bacillus cereus*

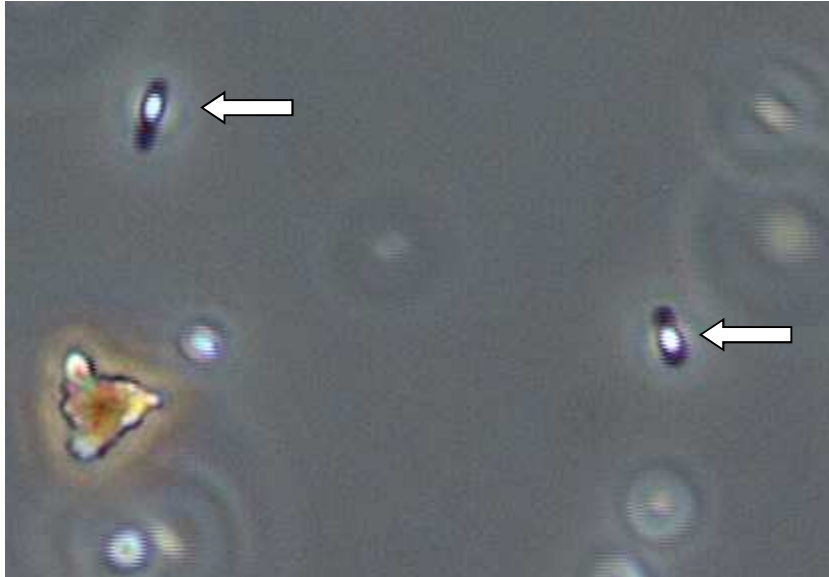
- centrální, oválné, nevyklenují





## *Bacillus megaterium*

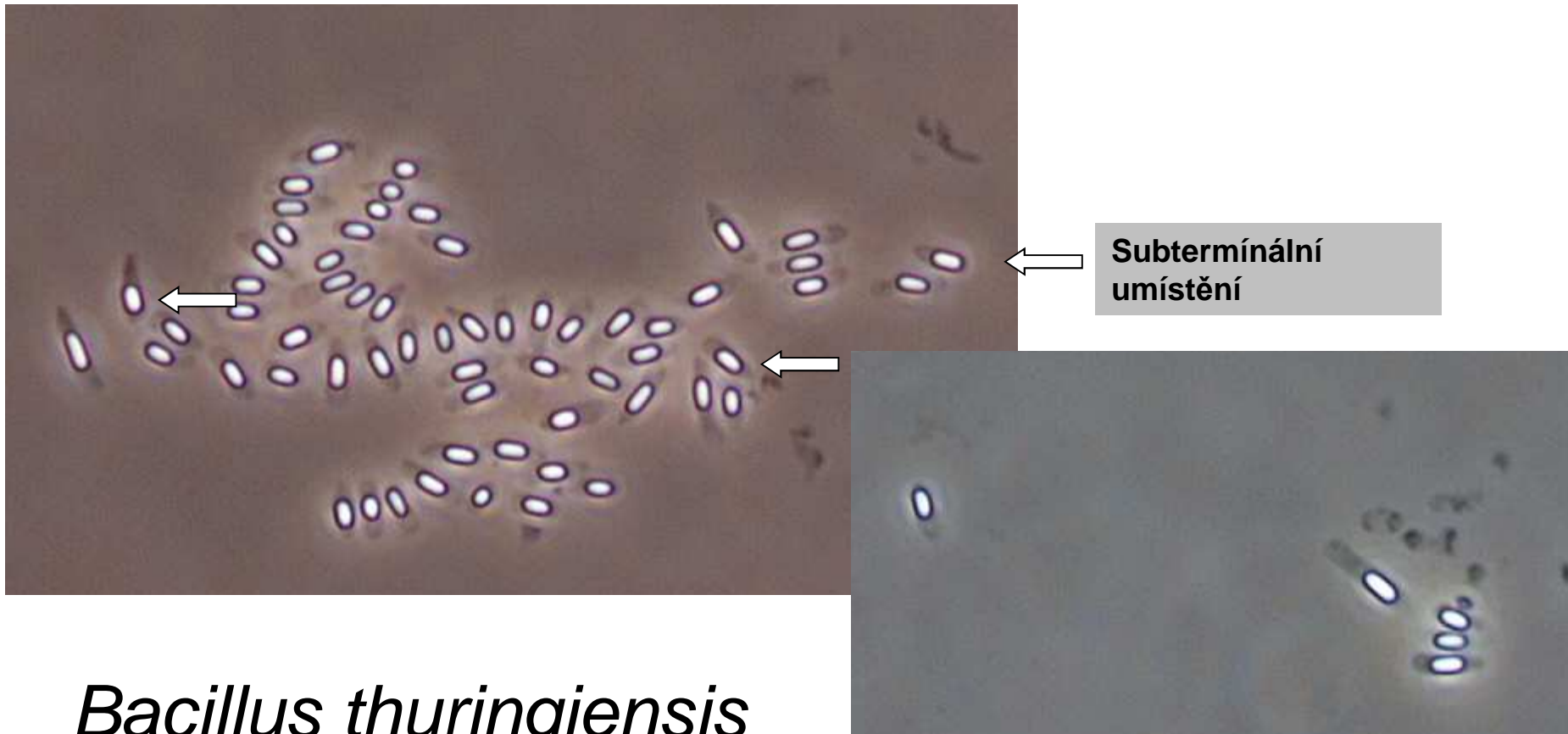
- kulaté, subterminální, nezduřují



## *Bacillus subtilis*

- Oválné, neztlušťuje buňku





*Bacillus thuringiensis*

– oválné, subterminální, nevyklenují

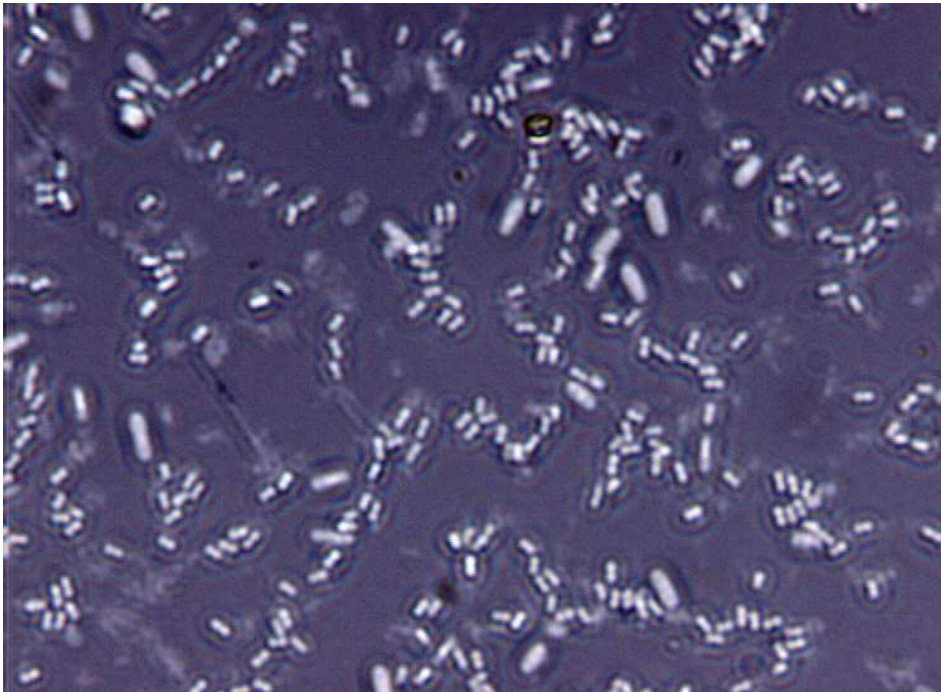


## *Paenibacillus polymyxa*

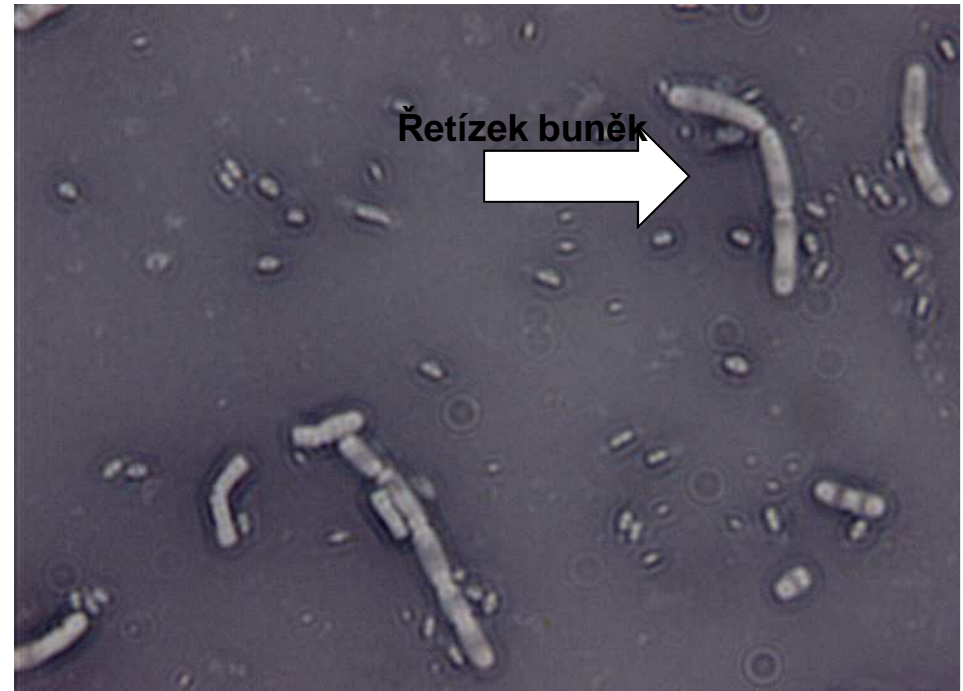
- centrální, velké, vyklenující

# Negativní barvení - nigrosin

*Bacillus subtilis*



*Bacillus thuringiensis*



# Barvení pouzdra – Kongo červeně

## *Azotobacter*

