

Pozorování bakteriálních endospor v nativním preparátu
(nefixovaný preparát, fázový kontrast)
Zvýraznění buněk rodu *Bacillus* negativním barvením
(nefixovaný preparát, pozorování v jasném poli)

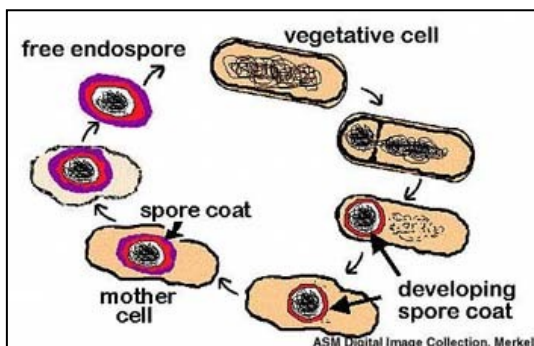
Cíl práce:

Kolik endospor může být přítomno v jedné bakteriální buňce? Proč je jejich barvení problematické? Co má barvení spor společného s barvením acidorezistentním? Které bakteriální rody a které struktury budou mikroskopovány? Jakými typy mikroskopie? Jsou negativním barvením obarveny buňky?

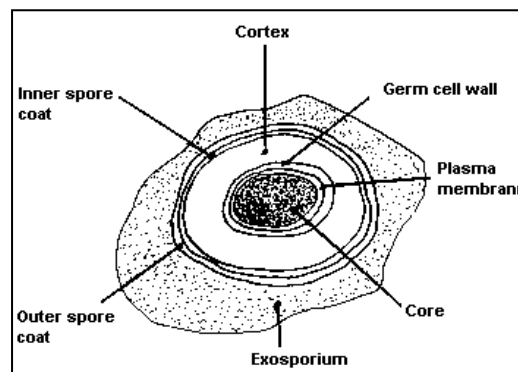
Teoretická část:

Jaké buněčné formy v doménách *Bacteria* a *Archaea* rozeznáváme? Kromě rostoucích a dělicích se **vegetativních forem buněk** zde nacházíme i struktury dovolující přežití nepříznivých podmínek. Jsou to **cysty** odolné proti dehydrataci, ne však proti horku (např. u rodů *Azotobacter*, *Myxococcus*, *Sporocytophaga*, kdy je celá buňka obklopena protektivní vrstvou nad buněčnou stěnou). Rody *Metylosinus* and *Rhodomicrobium* vytváří termostabilní **exospory**. **Konidiami** zase nazýváme termosenzitivní asexuální reprodukční struktury produkované různými rody aktinomycet. Konečně **endospory** jsou odolnými klidovými stadii s několika výjimečnými charakteristikami:

- ❖ Oproti doméně *Eucarya* je v buňce přítomna pouze **jedna endospora**
- ❖ **Peptidoglykan** v kortexu spory je zcela jiného charakteru než peptidoglykan samotné buňky vytvářející sporu
- ❖ Makromolekuly ve spoře jsou stabilizovány přítomností specifických bílkovin, dále ztrátou vody a její náhradou vápníkem (pouze zde unikátní kyselina dipikolinová)
- ❖ Jsou odolné k působení UV a γ záření, vysoušení, lysozymu, teplotním změnám, nedostatku živin a působení mnoha dezinfekčních prostředků. V ethanolu mohou přežít několik měsíců.
- ❖ Vysoká odolnost napomáhá přežít podmínky nevhodné pro život i po tisíce let (?); jsou prostředkem šíření bakterií i na značné vzdálenosti a v různém prostředí. Tvorba spory však **není odpovědí na prostředí, ale přípravou na nepříznivé podmínky.**



Proces vzniku endospory asymetrickým dělením buňky.



endospora

K čemu je barvení endospor užitečné? Diagnostické Gramovo barvení určí G⁺ a G⁻ typ buněčné stěny; souběžné barvení spor u suspektních sporulujících druhů zvýrazní: **tvar a**

umístění spory v buňce, což je dalším charakteristickým znakem napomáhajícím identifikaci. Příkladem jsou vždy **oválné** spory *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *Clostridium botulinum*, **kulaté** spory *Clostridium tetani* či *B. sphaericus*, **cyklindrické** či **elipsoidní** spory dalších druhů. U velikosti spor hodnotíme, **zda a ve kterém místě vyklenuje buňku**.

Uložení v buňce: **terminální** = na konci tyčinky (*C. tetani* jakoby paličky),

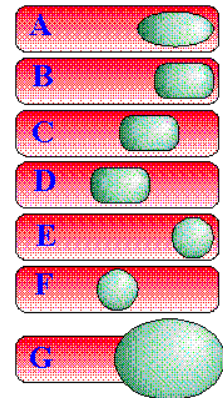
B. stearothermophilus

centrální (*C. histolyticum*, *C. novyi*, *C. septicum*, *B. anthracis*, *B. cereus*)

subterminální = paracentrálně = mezi středem a pólem buňky, většinou.
(*C. botulinum*, *C. sporogenes*, *B. brevis*)

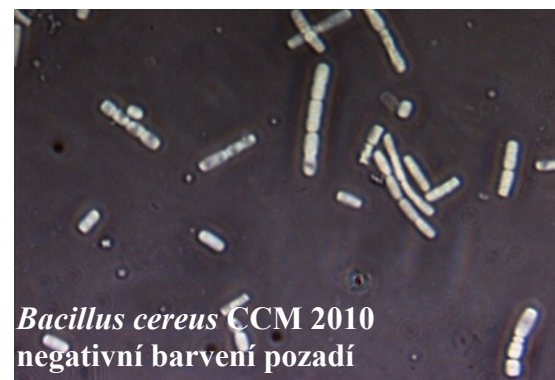
Endospory jsou vytvářeny malým počtem **převážně G+ bakterií** rodů *Bacillus* (aerobní tyčky), *Clostridium*, *Thermoactinomyces*, *Desulfotomaculum* (anaerobní tyčky), *Sporosarcina* (aerobní koky), *Sporolactobacillus*, *Oscillospira*, *Thermoactinomyces*... Výjimečně však endospory nacházíme i u některých G- bakterií! (Př: *Coxiella burnetii*, původce Q-horečky).

Pozorovat neobarvené endospory můžeme **fázovým** (zářící spory) a **Nomarského kontrastem** (plastický povrch buňky); **jednoduchým barvením** nevidíme spory samotné (obarvíme pouze buněčnou stěnu), jen vyklenutí buňky (způsobené přítomností spor). **Přímo obarvit endosporu** ve stadiu vzniku kortexu je možné pouze **za horka** (prospora je však pro barvivo ještě propustná!).



Možné umístění endospory a případné vyklenutí buňky jako identifikační znak

Strukturální barvení se používá k identifikaci a studiu bakteriálních struktur, kupříkladu endospor, pouzder, bičíku, inkluzí... Bakteriální **spory špatně přijímají barvivo** vzhledem k rigidnímu špatně propustnému obalu, proto se obarví až během **varu** (stejně jako např. acidorezistentní bakterie - *Mycobacterium*, které bychom Gramovým barvením neobarvili vzhledem k obsahu mykolových kyselin v buněčné stěně). **Negativním barvením** obarvíme **okolí buněk**, nikoli buňky samotné. Využívá se pro měření **přesné velikosti** bakteriální buňky. Nabarví se totiž jen pozadí (sklíčko), nikoli buňka samotná. Tím **není velikost buňky deformována** fixací ani barvivem.



Materiál a použité mikroorganismy:

- **Bakteriální kmeny: *doplnit***
- podložní a krycí skla, bakteriologická klička
- stříčka s vodou
- filtrační papír
- sterilní destilovaná voda
- nigrosin (negativní barvení)
- kahan
- pinzeta
- mikroskop (Z 1000x)

Postup:

A. Negativní barvení buněk nigrosinem

NEFIXOVANÝ PREPARÁT

- asepticky přeneseme 1 kličku bakteriálních buněk do malé kapky destilované vody, vedle se přidá malá kapka nigrosinu
- kapky se rozmíchají kličkou a rozetřou se jemným tahem druhého sklíčka (přiloženého pod úhlem 45° po celé ploše podložního skla), druhé sklíčko ožihneme
- bez oplachování se nechá zaschnout na vzduchu
- důležité: vytvořit jen tenký film barviva s dostatečně zředěnými buňkami.
- pozorujeme pod imerzí (Z 1000x)

Pozorování: neobarvené buňky na šedém pozadí



Bacillus cereus CCM 2010
nigrosin

Co ovlivňuje výsledek: tloušťka vrstvy barviva (silný nános může po zaschnutí praskat), koncentrace barviva.

B. – Nativní preparát - fázový kontrast

- V kapce vody nesuspendujeme kličku buněk, překryjeme krycím sklíčkem
- Pozorujeme pod fázovým kontrastem objektivem 100x, pod imerzí

Pozorování:

- 1) **negativní barvení**použité kmeny a výsledek

- 2) **nativní preparát - fázový kontrast** použité kmeny a výsledek

Závěr:

Význam barvení spor:

Používá se na diferenciaci spor bacilů a klostridií i na rozlišení askospor kvasinek. Spory se velmi těžko barví i po fixaci, neboť mají 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 (např. alkoholem), čehož se využívá k diferenciaci spor. Barvitelnost spor ovšem záleží na jejich vývojovém stádium, je podmíněna stářím kultury, kvalitou živné půdy, individuálními vlastnostmi mikrobů, a proto nelze barvicích metod používat schematicky. Barvitelnost spor se také (podobně jako u plísní) zlepšuje použitím sporulačních médií (s přídavkem manganu).

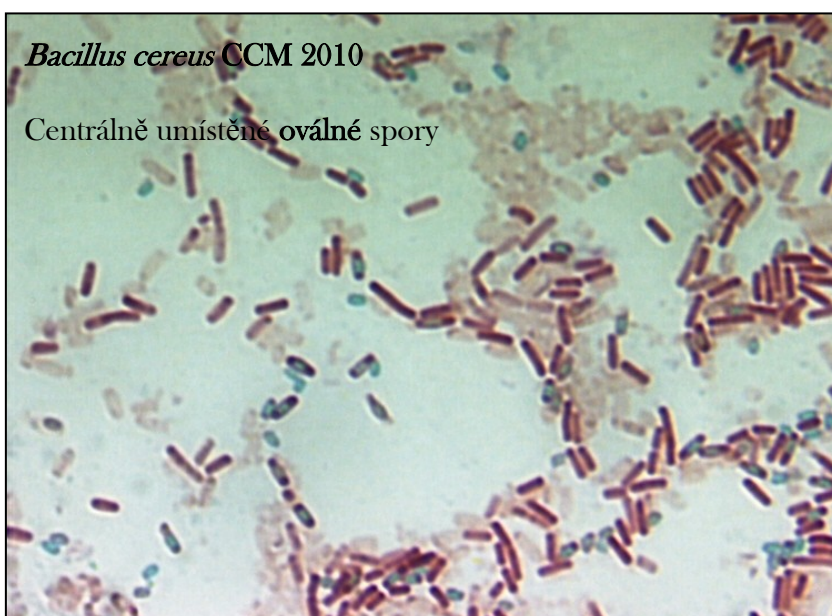
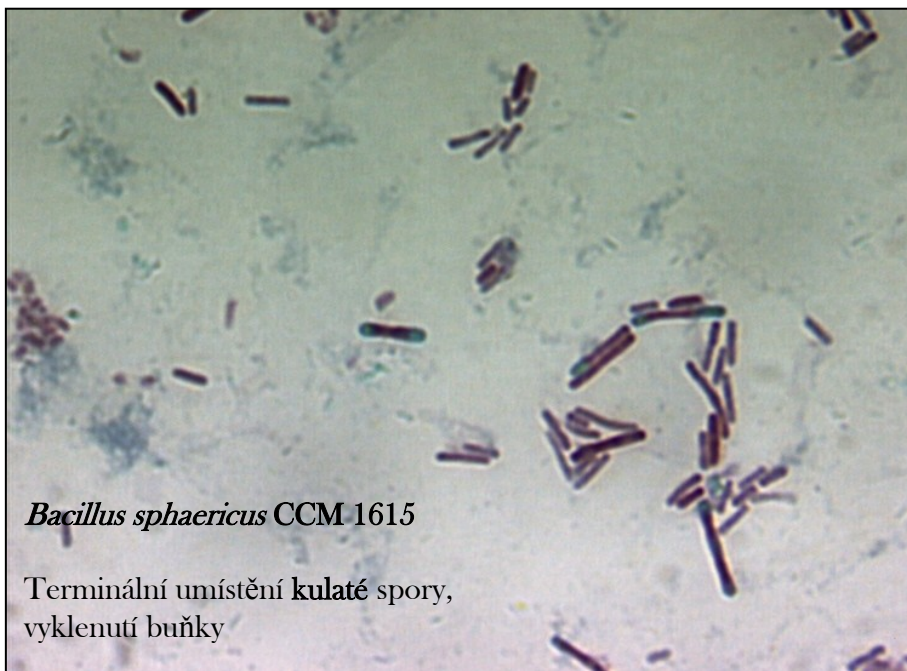
Barvení spor malachitovou zelení - Schaefferova-Fultonova metoda

FIXOVANÝ PREPARÁT

- Uchlý nátěr buněk na sklíčko fixujeme trojím protažením v plameni
- Převrstvíme malachitovou zelení, překryjeme filtračním papírem
- Zahříváme 5 minut do výstupu par, doplňujeme barvivo
- Opláchneme vodou
- Dobarvíme kontrastním barvivem - safraninem nebo kongo - červení (převrstvením 30s)
- Opláchnout vodou, usušit, pozorujeme pod imerzí, Z 1000x

Pozorování: Pozorujeme zelené spory uvnitř červených buněk a můžeme hodnotit tvar a umístění spor uvnitř těchto buněk (napomáhá identifikaci sporulujících druhů).

Příklad:



Zajímavosti:

Medicínsky a technologicky 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 jsou inaktivovány po 20' při 121 °C vodní páry při 2atm (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 = bílkovina spor *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

Sporicidní látky: ethylenoxid, beta-propionlakton, koncentrované louhy a kyseliny, formaldehyd při prodloužené expozici, kyselina peroctová - Persteril, jodové preparáty, chloramin.

Sporulací nazýváme proces vzniku (endo)spory.

- ❑ Ke studiu sporulace je používáno bakterií rodu *Bacillus*, hlavně *B. subtilis*
- ❑ Sporulace probíhá i při dostatku živin, hlavně však ve stacionární fázi
- ❑ 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.
- ❑ Proces začíná ve fázi G1, v průběhu vzniku přepážky (na konci G1) je již jasné, zda vznikne vegetativní buňka nebo spora, buňka přechází od binárního dělení ku sporulaci
- ❑ V místě přepážky se dvojitě vchlípí cytoplazmatická membrána
- ❑ Prospora se utváří v tzv. sporogenní zóně. Primárně se přepisují geny, které připraví prostor pro sporu, zvyšuje se kvantum volutinu (= první známka sporulace, zvýšené množství volutinu zjistíme jeho nabarvením). Druhým signálem sporulace je zvýšení množství enzymů. Buňka zvyšuje spotřebu acetátu, zvýšení počtu enzymů Krebsova cyklu a hydroláz
- ❑ Z biochemického pohledu se na procesu sporulace se podílí amylázy, proteázy, fosfatázy, DNázy.
- ❑ Jednou odstartovaný proces sporulace již nejde zastavit.

Fáze O

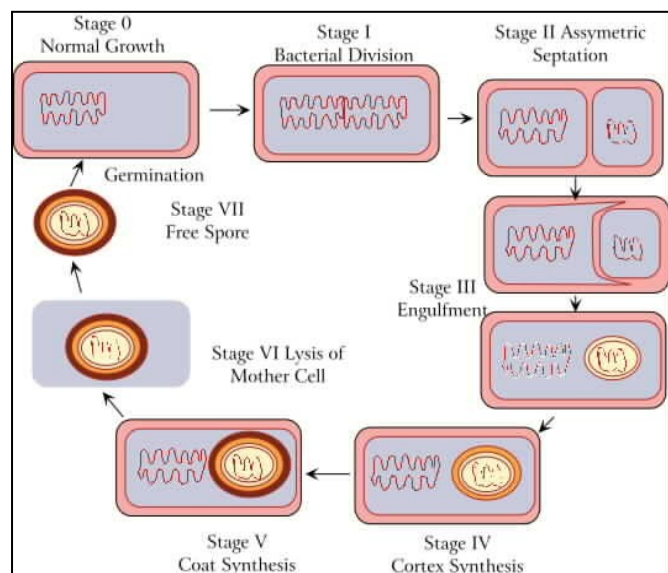
- Mateřská vegetativní buňka (sporangium) přechází z binárního k **asymetrickému dělení**.

Fáze I

- Tvorba axiálních filament k rozbalení nukleoidu do dlouhého vlákna a replikaci.

Fáze II

- Je ukončena replikace buněčného genetického materiálu, a ten se následně **rozestupuje k pólům buňky**. Končí **invaginace**



cytoplazmatické membrány. Přestává fungovat DNA spory, Kroky přebírá druhý nukleoid. Sporogenní zóna je homogenizovaná a zahuštěná. Má vždy jinou hustotu než zbylý obsah buňky.

Fáze III

- Charakterizuje ji **proliferace cytoplazmatické membrány kolem obou vydělených částí buňky**, u prespory dochází k zaobalení dvěma membránami - intina a extina (vchlípením cytoplazmatické). Vchlípením CM se vytvoří septum, které postupně rozdělí buňku na dvě nestejně části. Do obou se rozdělí DNA. Do prespory se vkládá mnoho vápníku a syntetizuje se v ní kyselina dipikolinová, vzniká **prospora**.
- Volutinu ubývá
- Hustotou se blíží hustotě spory
- **Není dosud světlolomná** (refraktilní), nezobrazí se tedy, nesvítí, při mikroskopii ve fázovém kontrastu.

Fáze IV

- Tvoří se **kortex** spóry (tvoří jej aktivní chromozom) s peptidoglykanem o složení lišícím se od peptidoglykanu buněčné stěny. V momentě vzniku kortexu již dovnitř nepronikne nic než voda. Při vzniku kortexu již minimální obsah volutinu.
- Ve spóře obsažena kyselina dipikolinová (syntetizována mateřskou buňkou, transport; malá molekula; množství regulováno - míra termorezistence). Kalcium dipikolínát je charakteristická složka pouze v endosporách. Kyselina stabilizuje kvarterní strukturu DNA (ve vazbách) a velké množství Ca^{++} iontů (pro ně není primární transportní systém, transport antiportem).
- Pod kortexem vzniká další vrstva peptidoglykanu, na povrchu celé spory pak proteinový obal bohatý na cystein. Světlolomnost (fázový a Nomarského kontrast).
- Endospora je již **světlolomná**, se vznikem kortexu již spora nepropustná pro barvivo, obarvitelná až při výstupu par.

Fáze V

- Probíhá syntéza **pláště** - 2 vrstevného, poté dalšího pláště.
- V době vzniku pláště již spora obsahuje minimum vody
- U příslušníků rodu *Bacillus* vzniká **exosporium** složené z deseti proteinů, polysacharidů a lipidů.
- Unikátnost bílkovin pláště: chemotaxonomii

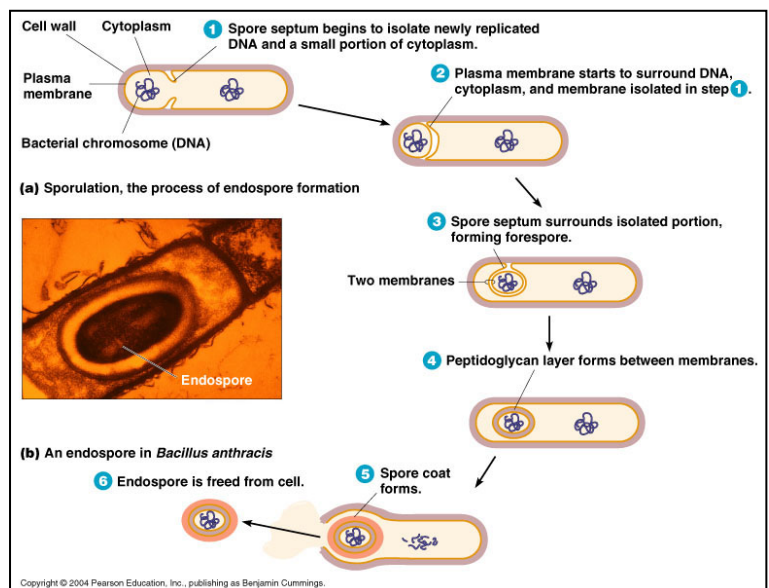
Fáze VI

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

Fáze VII

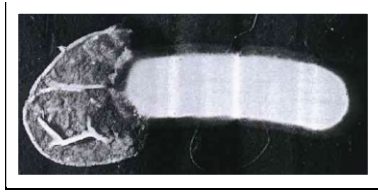
- **Volná** zralá spóra. Vnější architektura, počet a tvar pláště závisí na buňce.

Seznam proteinů zahrnutých do procesu sporulace lze nalézt na adrese <http://expasy.org/cgi-bin/get-entries?KW=Sporulation>.



Germinace

Germinací rozumíme rychlý proces klíčení spory. Začíná spontánní aktivací spory.



Klíčení spory *B. cereus*

Aktivace

- destabilizací pláště - při působení teploty 70-85 °C po 5 - 10 minutách, dalšími aktivátory jsou malé organické molekuly - malé kyseliny, vitaminy, zvýšení počtu bazí, L-Ala, Ado a Ino. V laboratořích zahřátí v přítomnosti vody. Aktivovaná spora přijímá vodu a ztrácí rezistenci - bílkovinné stabilizátory jako vnitřní součásti se začínají rozkládat, vzniklé aminokyseliny slouží jako stavební kameny nových proteinů.
- Nejprve ovlivněna proteosyntéza (hlavně degradační enzymy - proto ve spoře dostatek Mg)
- V době, kdy buňka tvoří energii začíná fungovat regulační aparát chromozomu (ATP= signál aktivace chromozomu)
- První enzymy - glykosidázy - metabolizování kortexu, poté extiny (fosfolipidy+bílkovina+polysacharid)

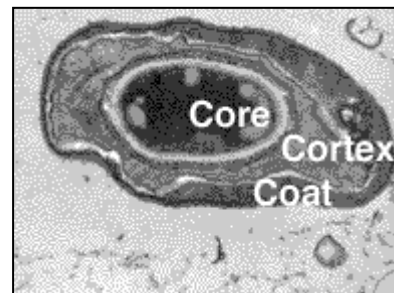
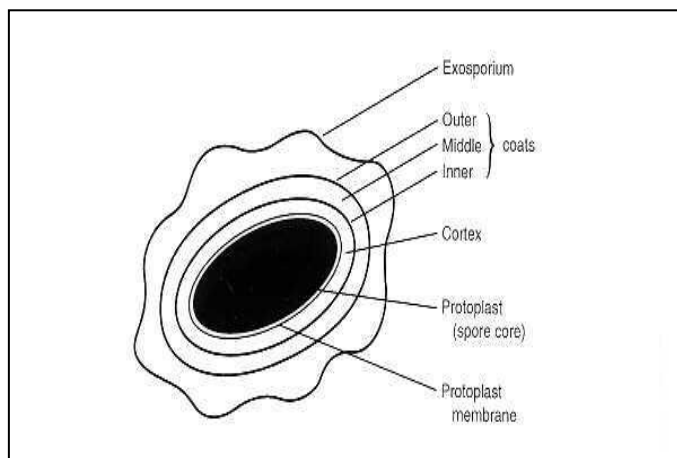
Lytický enzym: p68 => p29 (kortikohydroláza) - depolymerizuje kortex pro nástupný průnik vody. Po dvou hodinách po germinaci spory následuje dělení vegetativní buňky.

Inhibice klíčení: D-Ala, MgCl₂, PMSF

- 1) terminální germinace - na kratším konci spory
- 2) centrální - v podélné ose spory

Stavba zralé spóry

- Jádro - obsahující **sporoplast** či **protoplast** : stroma spóry představuje gelovou matrix, tvořenou bakteriálním jaderným ekvivalentem - nukleoidem,



nebo pyridin-2,6-dikarboxylovou kyselinou, jež nahrazuje vodu při udržování kvarterní struktury při vazbách, polyaminy, aminokyseliny a 3-fosfoglycerát; refrakční index činí 1,54.

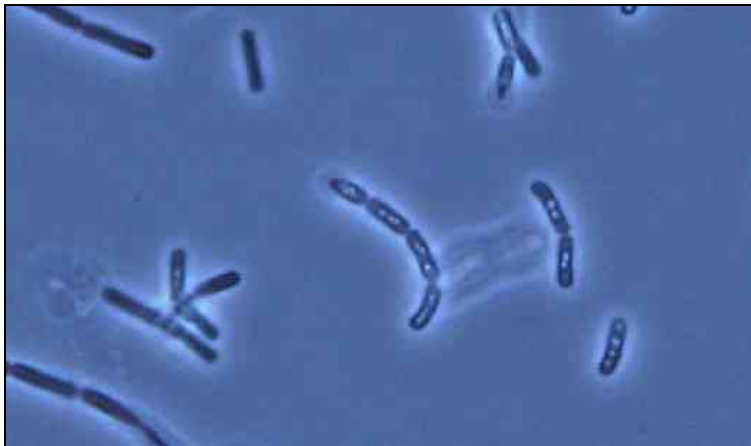
- **Kortex** Rozlišujeme vnitřní kortex (20% kortexu) či stěnu spóry a zevní kortex (80 % kortexu). Zajišťuje nepropustnost (nebarvitelný!), struktury s nízkým obsahem vody jsou barvitelné dle Wirtze. Refrakční

index kortexu činí 1,47. Kortex je tvořen peptidoglykany, leč jen 20-30 % peptidoglykanových jednotek je shodných s jednotkami v buněčné stěně. Zbýlých 50-60 % jednotek představuje N-acetylmuramovou kyselinu modifikovanou na N-acetylmuramyl -laktam, dalších 18-20 % kyseliny N-acetylmuramové je spojeno s L-alaninem namísto tetrapeptidu. Tyto modifikace

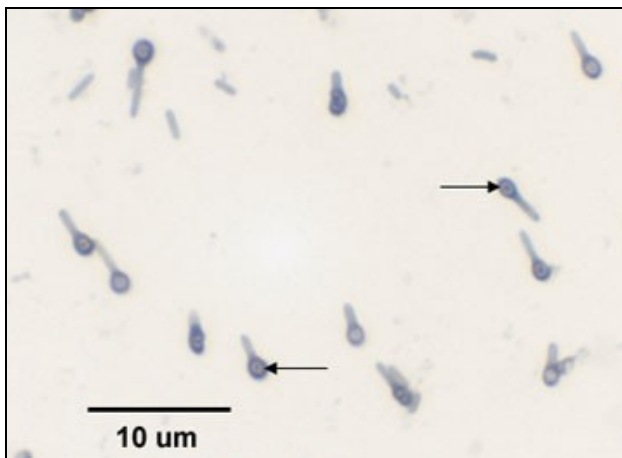
zajišťují enzymy: membránově vázaná Glu-mesoDmp hydroláza a cytosolová Ac-Ala-Glu-mesoDmp lyáza.

- **Perikortikální membrána**
- **Pláště** složené z proteinů bohatých na cystein (a podobných keratinu), zajišťují odolnost spór k působení chemikálií.
- výše zmíněné **exosporium** u rodu *Bacillus*

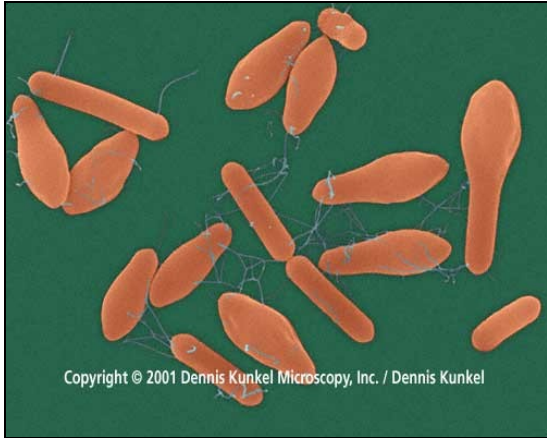
Mikroskopie některých sporulujících druhů bakterií:



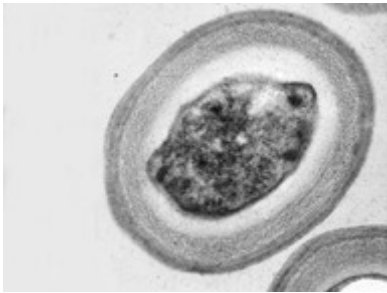
Bacillus cereus



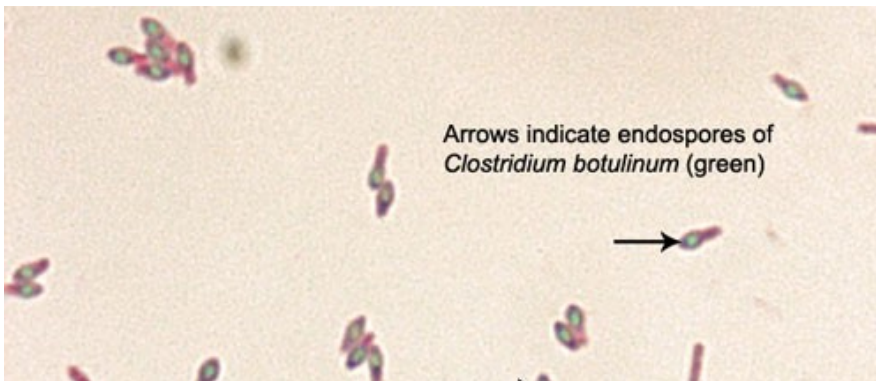
Clostridium tetani - paličky



Clostridium botulinum

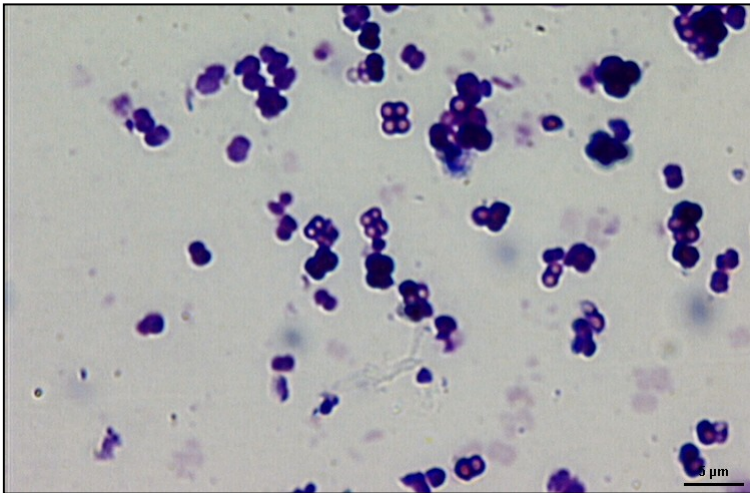
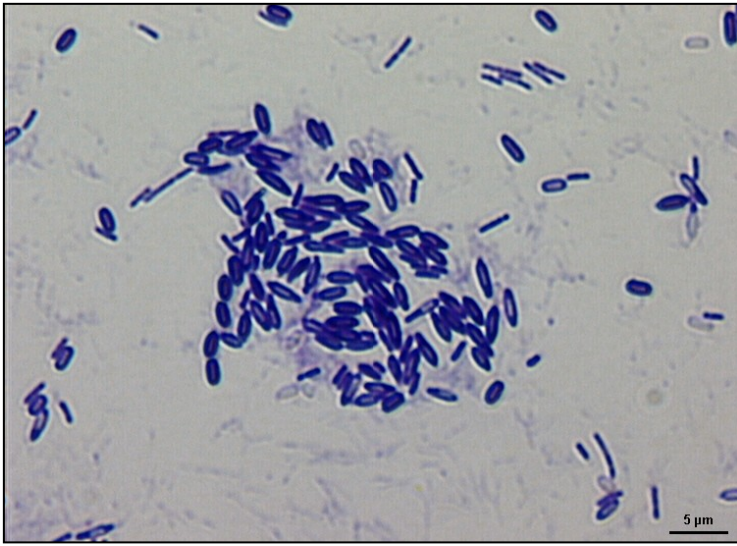


TEM, spora *Bacillus stearothermophilus*



Paenibacillus polymyxa –
oválné, vyklenující spory

v



Sporosarcina ureae –
kulaté spory uvnitř
čtveřice (balíčku) buněk

In that regard, spores expressing certain enzymes, proteins, or peptides on their surface have been presented as a stable, simple, and safe new tool for the biospecific recognition of target analytes, the biocatalytic production of chemicals, and the delivery of biomolecules of pharmaceutical relevance. This review focuses on the application of spores as a packaging method for whole-cell biosensors, surface display of recombinant proteins on spores for bioanalytical and biotechnological applications, and the use of spores as vehicles for vaccines and therapeutic agents.

Spores of the genus *Bacillus* have been used for a long time as probiotics for oral bacteriotherapy both in humans and animals.

Recently, genetically modified *B. subtilis* spores and *B. anthracis* spores have been used as indestructible delivery vehicles for vaccine antigens. They were used as vaccine vehicles or spore vaccine for oral immunization against tetanus and anthrax, and the results were very exciting. Unlike many second generation vaccine systems currently under development, bacterial spores offer heat stability and the flexibility for genetic manipulation. At the same time, they can elicit mucosal immune response by oral and nasal administration. This review focuses on the use of recombinant spores as vaccine delivery vehicles.

Bacillus subtilis spores displaying the tetanus toxin fragment C (TTFC) antigen were used for oral and intranasal immunization and were shown to generate mucosal and systemic response

The robustness and long-term storage properties of bacterial spores, coupled with simplified genetic manipulation and cost-effective manufacturing, make them particularly attractive vehicles for oral and intranasal vaccination.

Unlike many second generation vaccine systems currently under development, none offer the heat stability of bacterial spores or the flexibility for genetic manipulation.

we have developed spores that could be used to vaccinate against *Clostridium perfringens* alpha toxin and that could be used to protect against gas gangrene in humans and necrotic enteritis in poultry. The primary active agent in both cases is alpha toxin. A carboxy-terminal segment of the alpha toxin gene (cpa) fused to the glutathione-S-transferase (GST) gene was cloned in *B. subtilis* such that the encoded GST-Cpa(247-370) polypeptide had been expressed in the following three different ways: expression in the vegetative cell, expression on the surface of the spore coat