

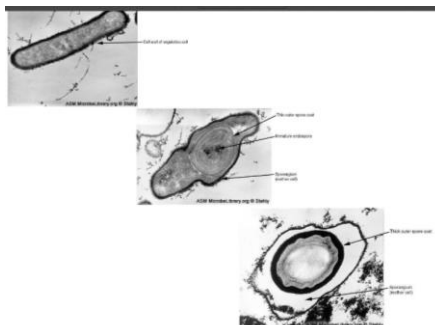
# Mikrobiológia praktické cvičenie 6. týždeň

## Farbenie spór a metachromatických granúl.

### Praktické cvičenie č. 6

#### Spóry a granulá

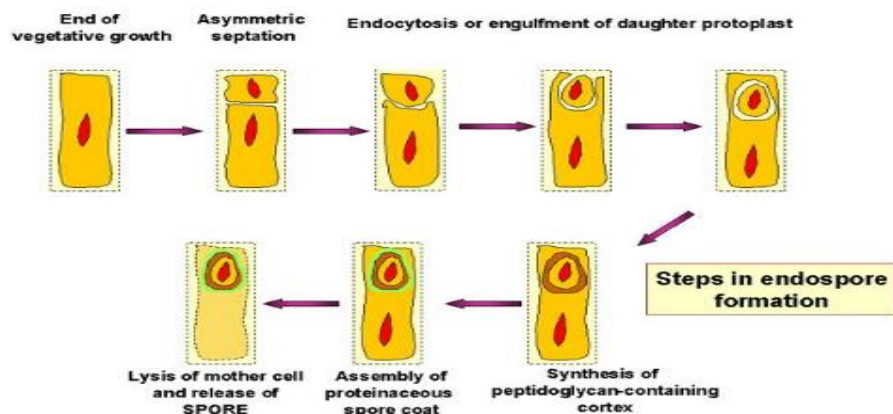
- Niektoré patogénne Gram pozitívne baktérie z rodu *Bacillus*, *Clostridium* - ich uloženie je diagnostické
- Pri nevhodných podmienkach sa zmenia z vegetatívneho štádia na dormantné – vytvoria spóry (sporulácia) - útvary obalené viacerými vrstvami obalov – kabát za zvýšeného príjmu Ca a syntézy kyseliny dipikolinovej
- Výsledkom je odolná častica obsahujúca DNA prežívajúca storočia
- Germinácia – proces návratu do vegetatívneho štádia- začína zvýšeným príjmom vody a rozpadom obalov
- Je spôsobená zmenami v prostredí ( teplota, alanín )



### Bakteriálne spóry (endospóry)

Predstavujú dormantné (kludové, spiace) formy života niektorých bakteriálnych druhov. Z medicínsky významných sú to niektoré G+ baktérie z rodu *Bacillus* a z rodu *Clostridium*.

Predstavujú rezistentné formy života baktérie odolávajúce vysokým teplotám, vyschnutiu, dezinfekčným prostriedkom, vysušeniu. Ich rezistencia voči chemikáliám je podmienená nepriepustnosťou obalov (cortex, kabát). Odolnosť voči vysokým teplotám je spôsobená obsahom dipikolínátov a osmotickou aktivitou kôry, ktorá spôsobuje dehydratáciu endospóry a tým jej rezistenciu voči vysokým teplotám a radiácii. Rezistencia spór voči fyzikálnym a chemickým podmienkam sa používa na kontrolu sterility nástrojov a kontrolu účinnosti nástrojov dekontaminácie.



**Sporulácia** je proces tvorby spóry z vegetatívnej bunky. Trvá približne 15 hodín. Je obvykle podmienená nedostatkami v optimálnom zložení prostredia, predovšetkým chýbaním uhlíka a dusíka. Pri premene dochádza k príjmu vápnika a syntéze kyseliny dipikolinovej.

- replikácia DNA

- vytvorenie membránového septa

- vytvorenie druhej vrstvy cytoplazmatickej membrány okolo jednej z DNA molekúl, ktorá bude súčasťou endospóry

- obidve cytoplazmatické membrány syntetizujú peptidoglykan do priestoru medzi nimi a vytvoria cortex.

- vápenaté soli kyseliny dipikolinovej sa inkorporujú do obalu spóry
- kortex je obkolesený proteínom podobným keratínu
- niekedy sa vytvorí exospórium – vonkajšia membrána zložená z lipidov a proteínov
- zvyšok vegetatívnej bunky sa rozpadne a endospóra sa uvoľní do prostredia

### Germinácia spór

Spóry môžu prežívať celé éry až do doby, keď ich zmena vonkajších podmienok stimuluje ku premene na jedinú vegetatívnu bunku baktérie. Spóry samotné sú neškodné, pokiaľ nedôjde ku germinácii. Germinácia spór alebo ich transformácia na vegetatívnu bunku môže byť podmienená napr. miernou teplotou alebo prítomnosťou alanínu. Po započatí germinácie spóra prijíma vodu, napučíava, stráca obaly a mení sa na vegetatívnu bunku identickú s tou, z ktorej vznikla. Význam spór spočíva v tom, že sa podieľajú na prenose niektorých vážnych ochorení:

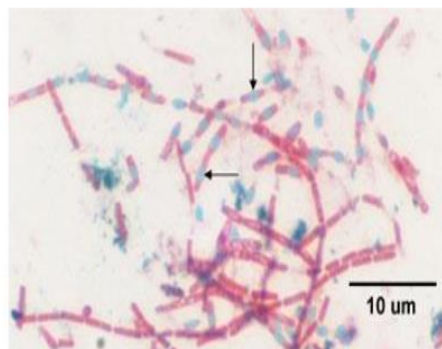
- antrax - *Bacillus anthracis*
- tetanus - *Clostridium tetani*
- botulizmu - *Clostridium botulinum*
- splynová gangréna - *Clostridium perfringens*

Umiestnenie endospór vo vegetatívnej bunke má diagnostický význam. Pri Gramovom farbení sa nezafarbia. Na znázornenie endospór v cytoplazme vegetatívnych buniek sa používa farbenie Wirtz – Conklin.

### POSTUP:

#### Wirtz Conklin farbenie spór

- Diferenciačné farbenie na spóry
- Sporoforné baktérie – červené
- Spóry – zelené
- Suspenzia sa usuší na vzduch, zafixuje teplom a preleje 5% malachitovou zelenou. Zahrieva sa do výstupu pár 3-6 minút. Opláchne pod tečúcou vodou 0,5% vodný roztok safranínu sa použije na dofarbenie (30 sek.) Preparát sa opláchne tečúcou vodou, vysuší a prezerá pri zväčšení 400-1000 násobnom zväčšení



**Zafarbite fixovaný preparát z kultúry *B. cereus* podľa Wirtz-Conklina, mikroskopujte.**

Wirtz-Conklin je diferenciačné farbenie na spóry, sporoforné baktérie sú červené, spóry zelené. Baktériová suspenzia sa usuší na vzduchu, zafixuje teplom a preleje 5% malachitovou zelenou. Zahrieva sa 3-krát do výstupu pár (3-6 minút), opláchne pod tečúcou vodou. 0,5% vodný roztok safranínu sa použije na dofarbenie (30 sekúnd). Preparát sa opláchne pod tečúcou vodou, vysuší a mikroskopuje (imerzia, objektív 100x). Príslušníci rodu *Bacillus* majú centrálné uložené spóry, ktoré nedeformujú telo pôvodnej vegetatívnej bakteriálnej bunky.

### METACHROMATICKÉ GRANULY

*Zásobné látky, granuly*

Cytoplazmatické zásobné granuly (glykogénu, škrobu), volutínové granuly – metachromatické granuly (fosfátové granuly), sírové granuly (napr. *Corynebacterium*) Okrem významu v metabolizme baktérie majú význam diagnostický.

## Farbenie na metachromatické granuly

- Volutínové zásobné granuly v cytoplazme
- Farbia sa bazickým farbivom
- Toluidínova modrá, metylénová modrá
- Sú svetlolomné, acidorezistentné
- Odlíšenie patogénnych *C. diphtheriae* od saprofytických korynebaktérií
- Farbenie podľa Alberta

## Metachromatické farbenie

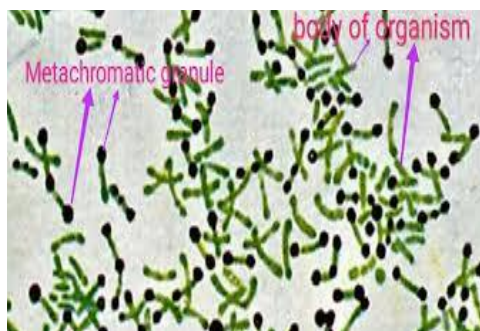
- Farbivo aplikované na bunku alebo tkanivo dáva iný farebný výsledok ako je ono samo
- Ernst Babesove inklúzie – metachromatické granuly – volutínové granuly – *Corynebacterium diphtheriae*
- Volutínový – nukleoproteínový komplex – nachádza sa v cytoplazme niektorých baktérií, plesní a parazitov vo forme zásobných granúl

Granuly sa označujú aj ako metachromatické, pretože pri farbení je výsledná farba granúl odlišná od farby použitého farbiva a obvykle aj od okolia. Je to spôsobené chemickými reakciami fosfátových molekúl a použitých farbív - farbenie podľa Alberta.

### POSTUP:

#### Albertovo farbenie

- Zafixovaný preparát
- Zafarbiť Albertovým roztok
- Preliat' Lugulovým roztokom
- Opláchnuť
- Telá baktérií – zelené, granuly modré



<https://mltgeeks.com/albert-staining-of-metachromatic-granules-ideal-for-corynebacterium-diphtheriae/>

**Zafarbte fixovaný preparát z kultúry *C. diphtheriae* podľa Alberta, mikroskopujte.**

U *C. diphtheriae* je možné identifikovať metachromatické telieska (polyfosfátové granuly, tzv. Ernst-Babesove granuly). Termín „metachromatický“ označuje odlišnosť farby intracelulárnych fosfátových granúl v porovnaní so zvyškom bunky.

### ZDROJE:

Kompaníková Jana, Elena Nováková, Martina Neuschlová: Mikrob Learning - Mikrobiológia nielen pre medikov. Multimediálna podpora výučby klinických a zdravotníckych disciplín :: Portál Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského [online] , [cit. 26. 03. 2020]. Dostupný z WWW: <https://portal.ifmed.uniba.sk//clanky.php?aid=248>. ISSN 1337-7396.

Kompaníková Jana, Elena Nováková, Martina Neuschlová: Mikrobiológia nielen pre medikov - 2. upravené a doplnené vydanie. Multimediálna podpora výučby klinických a zdravotníckych disciplín :: Portál Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského [online] , [cit. 26. 03. 2020]. Dostupný z WWW: <https://portal.ifmed.uniba.sk//clanky.php?aid=398>. ISSN 1337-7396.