

ÖSSZETETT ÉS SPECIÁLIS SZÍNEZÉSI ELJÁRÁSOK

Molnár Mónika, Tolner Mária, Nagy Zsuzsanna

*Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék*

Speciális színezési módszerek

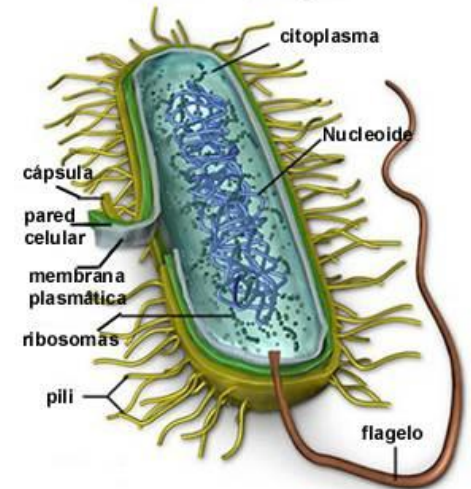
- Mikroorganizmusok minőségi vizsgálata
- Többféle színezék alkalmazása
- Mikroorganizmusok differenciálása
- Speciális sejtalkotórészek kimutatása

Laborgyakorlat

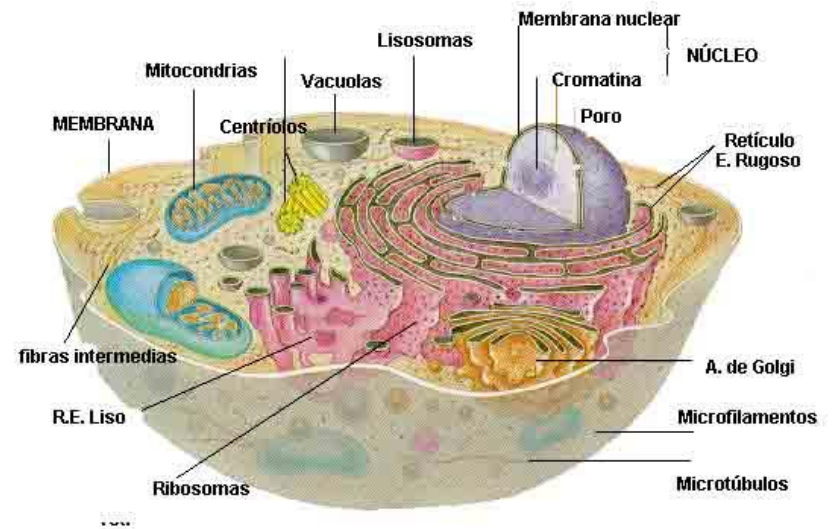
Baktériumok, gombák vizsgálata

- Gram-színezés
- Tok kimutatása
- Mitokondrium kimutatása
- Glikogén kimutatása
- Spóraszínezés

Estructura de la célula procariota



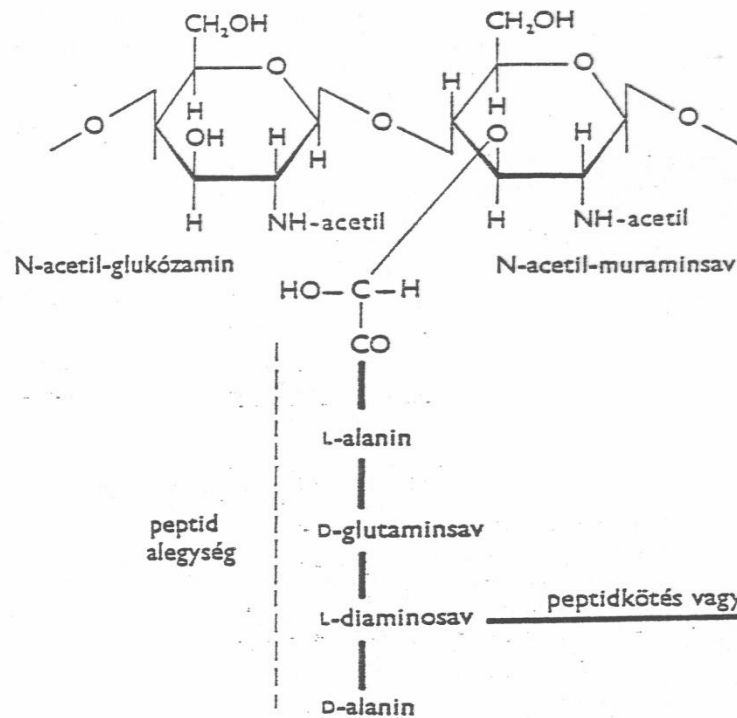
<http://biologia.laguia2000.com/citologia/partes-de-la-celula-procariota>



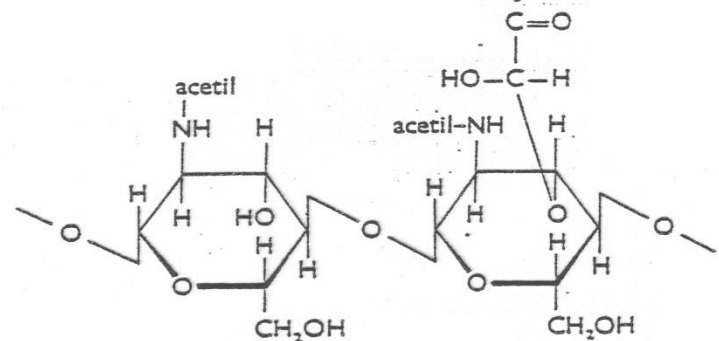
<http://cassany.cat/ESO/celula/eucariota.jpg>

Baktériumok sejtfaltípusai

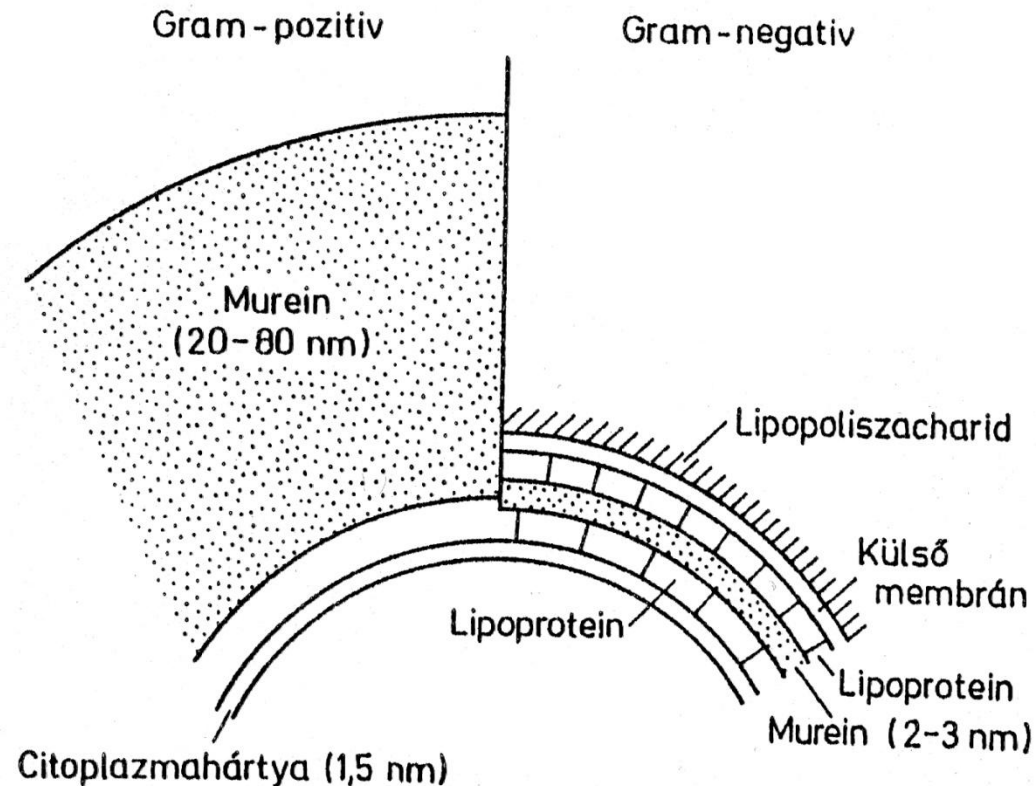
Csoport	Szervezet	Sejthatároló felület összetétele	Speciális jellemzők
1.	<i>Mycoplasma</i> sp., <i>Halobacterium</i> , protoplaszt (<i>Bacillus megaterium</i>)	Citoplazma-membrán	peptidoglikán hiányzik
2.	Gram-pozitív baktériumok	Sejtfal (egyrétegű), citoplazma-membrán	peptidoglikán van
3.	Gram-negatív baktériumok	Sejtfal (több rétegű), citoplazma-membrán	peptidoglikán van
4.	<i>Lampropedia hyalina</i>	Külső kettős köpeny, cementálórég, sejtfal, citoplazma-membrán	?



A peptidoglikán



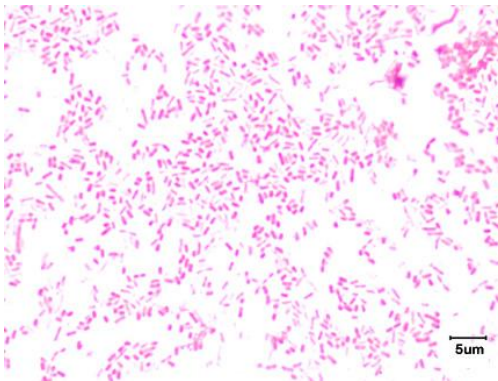
Gram⁻ és Gram⁺ sejtfal felépítése



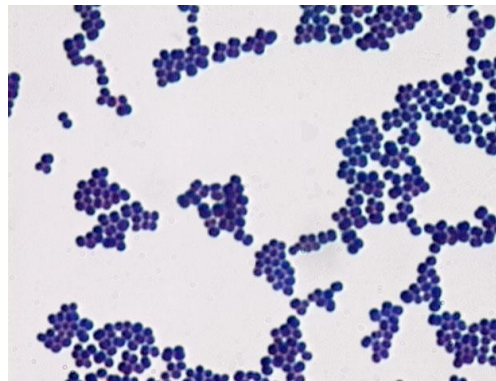
Gram-színezés



- Hans Christian Joachim Gram (dán kutató)
- Ely: trifenil-metán típusú színezék + jód oldat → *jódpararozanilin* komplex → Gram+ sejtekből nem mosható ki, Gram- sejtekből igen + kontraszt színezés
- Eredmény



http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanual/lab6/images/Ecolio1_scale.jpg



<http://homepages.wmich.edu/~rossbach/bios312/LabProcedures/Gramposcocci.jpg>

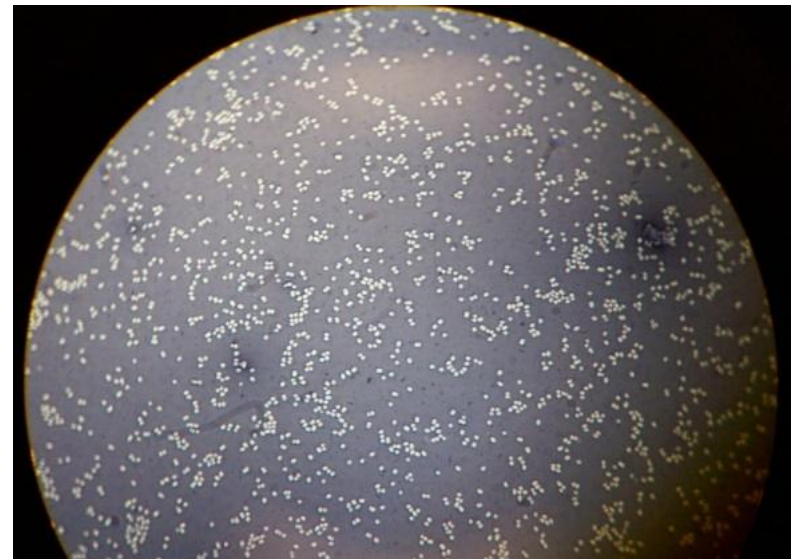


http://www.path.cam.ac.uk/Microbiology/BI_Bacteriology/CL_Clostridia/M_BI_CL_2osmall.jpg

- Japán Gram-próba (40 % KOH)

Tok kimutatása

- **Tok:** nyálkaburok, körülveszi a sejtet
- **Anyaga:** homogén vagy heterogén,
 - poliszacharid, polipeptid, aminocukor, fehérje-lipopoliszacharid
- Egyszerű vagy bordás
- **Szerepe:**
 - patogének virulenciája, véd a fagocitózis ellen
 - véd a kiszáradástól
 - tartalék tápanyag
 - lokalizáció
 - tápanyag-adszorpció
- **Kimutatás:**
 - negatív festés



Mitokondrium és glikogén kimutatása

- Mitokondrium : kémiai energia átalakítása és termelése

Kimutatása:

- Redox festékekkel

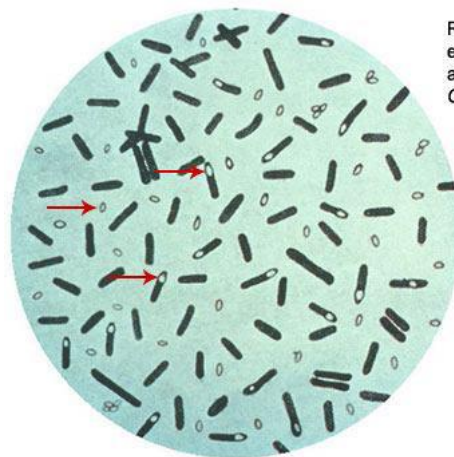
- Glikogén: tartaléktápanyag

Kimutatása:

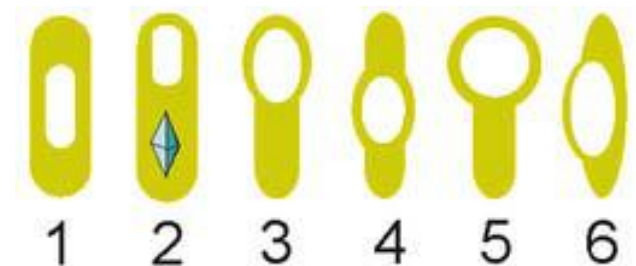
- Lugollal

Endospóráképzés

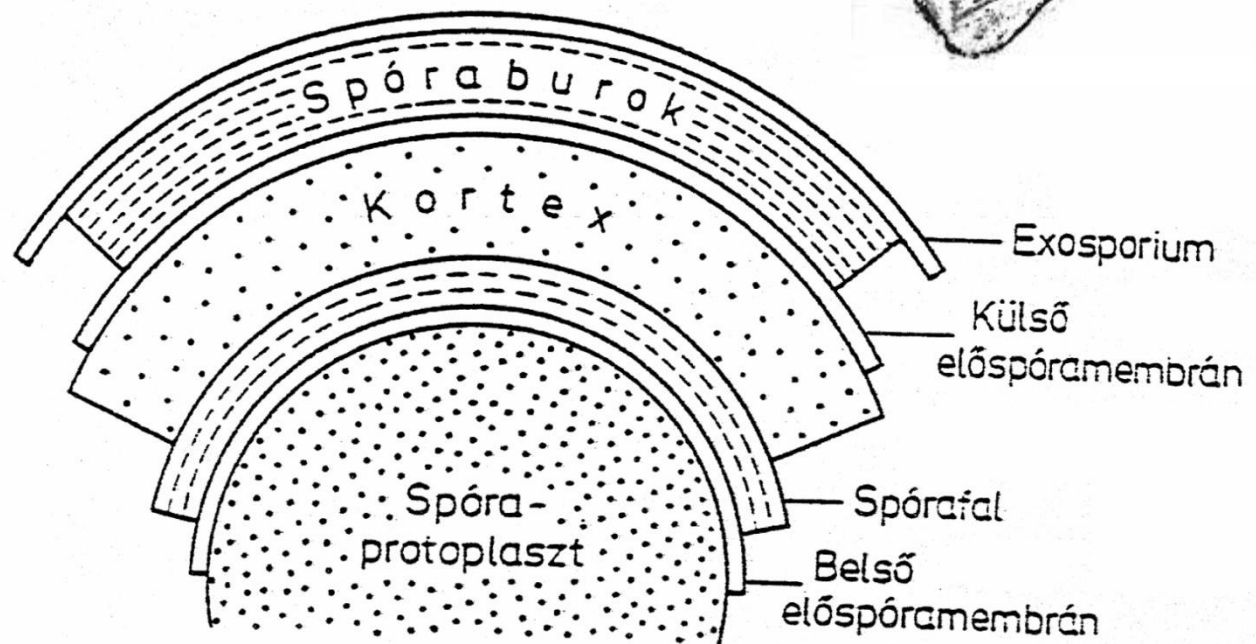
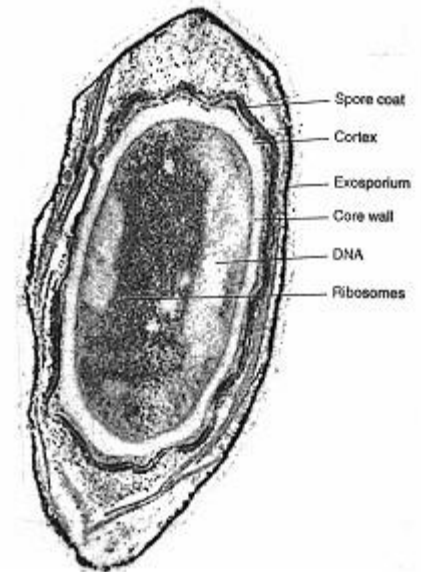
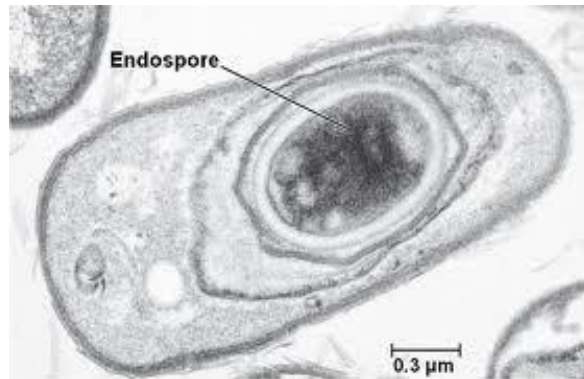
- *Bacillus, Clostridium, Sporosarcina sp.*
- A szülősejt kitartó állapota, nincs anyagcseréje
- A túlélést teszi lehetővé
- Rendkívül ellenálló
- Elhelyezkedés: terminális, centrális, szubterminális,
- Alak: szubtilisz (1,2), klosztrídium (3,4,5,6)



Red arrows indicate endospores and spores of *Clostridium botulinum*



Az endospóra szerkezete



Módszerek lépésről lépésre

Gram-festés menete

<i>Bacillus cereus</i>	Gram (+)
<i>Escherichia coli</i>	Gram (-)

1. Kenet készítés
2. Szárítás
3. Rögzítés
4. Festés kristályibolyával 2 percig /leönteni!/
5. Lugol 2 perc
6. Mosás acetone-etanollal
7. Mosás csapvízzel
8. Festés safraninnal 2-3 perc
9. Mosás csapvízzel
10. Mikroszkópizálás (40x)
11. Szárítás
12. Olajimmerzió

- Gram (+) sejt kék
- Gram (-) sejt piros

Speciális sejtalkotórészek kimutatása

Tok, mitokondrium, glikogén

- **Tokfestés**

Schizosaccharomyces pombe

Egy csepp tusban szuszpendálunk egy kacsnyi 72 órás mikrobát.

- **Mitokondrium festés**

Saccharomyces cerevisiae (T22)

Egy csepp Janus zöld oldatban szuszpendálunk 1 kacsnyi 24 órás T22-t.

- **Glikogén festés**

Saccharomyces cerevisiae (T22)

Egy csepp Lugol oldatban szuszpendálunk 1 kacsnyi 24 órás T22-t.

Spóraszínezés

Malachitzölddel

1. Szuszpenzió készítése
2. Szárítás
3. Rögzítés /láng felett áthúzni 2-3 szor /
4. 10 percig szárítópadkán malachitzölddel melegítjük /ne száradjon be/
5. Mosás 1/2 percig vízzel
6. Szafraninos festés 3 perc
7. Mosás csapvízzel
8. Mikroszkópizálás (40x)

Spóra: zöld

Vegetatív sejt: piros

Karbolfuxinnal

1. Szuszpenzió készítése
2. Szárítás
3. Rögzítés /láng felett 2-3szor áthúzni/
4. 10 percig szárítópadkán Ziehl-Nielsen féle karbolfuxinnal melegítjük /ne száradjon be/
5. Vizes öblítés
6. 10%-os kénsavval mosás
7. Vizes öblítés
8. Festés metilénkékkel 2-3 perc
9. Mosás csapvízzel
10. Mikroszkópizálás (40x)

Spóra: piros

Vegetatív sejt: kék

Irodalom

- BME Vegyészmérnöki Kar Tanszéki Munkaközösség: Ipari mikrobiológiai gyakorlatok, (Szerkesztő: Puskás, A.), Műegyetemi Kiadó, Budapest, 1993
- Szabó István Mihály: A bioszféra mikrobiológiája I-III. kötet, Akadémia Kiadó, 1992