



# ÖSSZETETT ÉS SPECIÁLIS FESTÉSI ELJÁRÁSOK

## Mikrobiológia laborgyakorlat

*Molnár Mónika, Tolner Mária,  
Fekete-Kertész Ildikó*

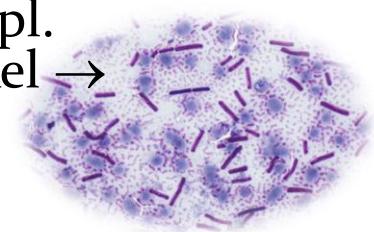
*2019*

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

# Festési eljárások a mikrobiológiában

## *Festett készítmények vizsgálata*

- **Festékek**
  - **Bázikus** – kromofor csoport kation jellegű → kötődés savas karakterű alkotórészekhez (pl. nukleinsavak, fehérjék karboxilcsoport, foszfátszemcsék): metilénkék, kristályibolya...
  - **Savas** – kromofor csoport anion jellegű → kötődés bázikus karakterű alkotórészekhez (pl. fehérjék pozitív töltésű rész, mitokondrium, citoplazma, ): eozin, fukszin...
  - **Semleges** – hidrofób komponensek, lipidek festése: rhodamin B, szudánvörös
- **Pozitív vagy negatív festés**
- **Egyszerű vagy összetett festés** (differenciáló festés)
- **Polikróm festés**
  - egy festék, egyes alkotórészek más-más színűek (pl. *Bacillus anthracis* festés karbolvizes toluidinkékkel → tok rózsaszín, sejt kék)





# Speciális és összetett festési módszerek

- Mikroorganizmusok minőségi vizsgálata

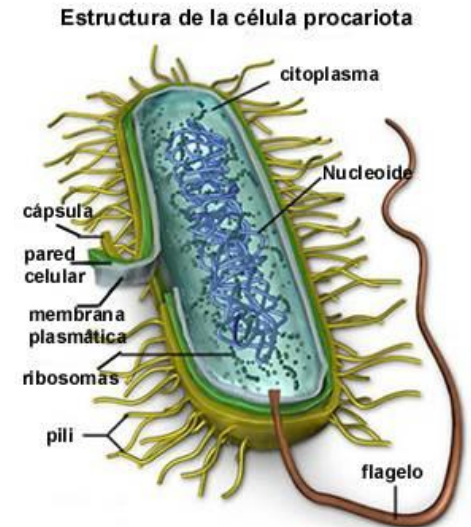
## Célok

- Mikroorganizmus csoportok elkülönítése
- Speciális sejtalkotórészek kimutatása

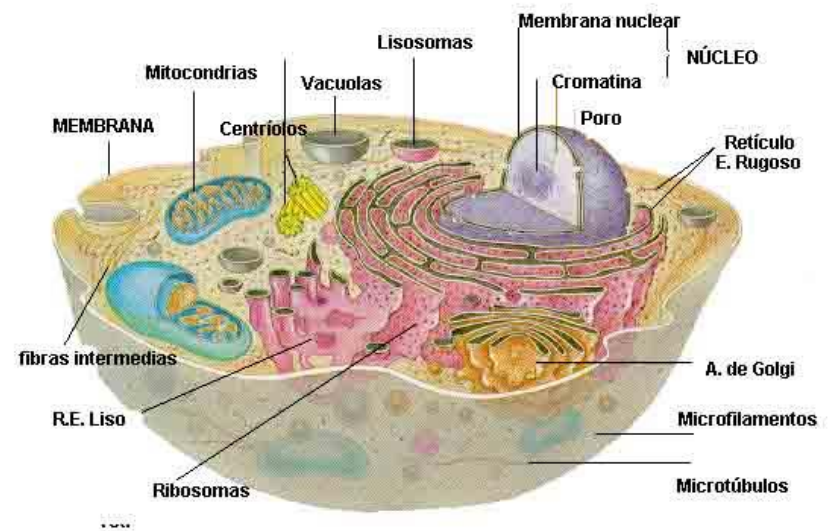
# Laborgyakorlat

## Festett készítmények – baktériumok és gombák vizsgálata

- Gram-festés
- Tok kimutatása
- Mitokondrium kimutatása
- Glikogén kimutatása
- Spóraszínezés



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



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

# Prokarióta sejtfaltípusok - példák

Szervezet	Sejthatároló felület összetétele	Speciális jellemzők
<i>Mollicutes</i> (pl. <i>Mycoplasma</i> sp.), L-forma, szferoplaszt, protoplaszt (pl. <i>Bacillus megaterium</i> ), <i>Archea</i> ( <i>Thermoplasma</i> , <i>Ferroplasma</i> )	Citoplazma-membrán	Nincs sejtfal
Gram-pozitív baktériumok	Sejtfal, citoplazma-membrán	Vastag peptidoglikán (murein) réteg, teichosavak, lipoteichosavak, Mg-ribonukleát
Gram-negatív baktériumok	Sejtfal, citoplazma-membrán	Vékony peptidoglikán réteg, lipoproteinek, külső membrán, lipopoliszacharidok
<i>Archea</i> (pl. <i>Halobacterium</i> sp.)	S-réteg (proteinek /glikoproterinek) / heteropoliszacharid, citoplazma-membrán	Nincs peptidoglikán (kiv. metanogének pszeudopeptidoglikánja)
<i>Mycobacterium</i> sp. (saválló baktériumok)	Mikolsavak (viaszos réteg), citoplazma-membrán	Vékony peptidoglikán, arabinogalaktán, mikolsavak, lipidek
<i>Lampropedia hyalina</i>	Külső kettős köpeny, cementálóréteg, sejtfal, citoplazma-membrán	?

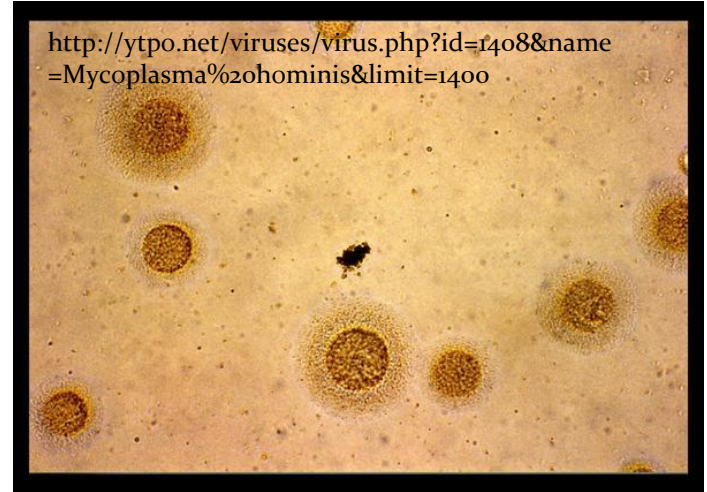
# Különleges „sejtfalszerkezetek”

<http://green-enb150.blogspot.hu/2011/03/extremophiles-animals.html>

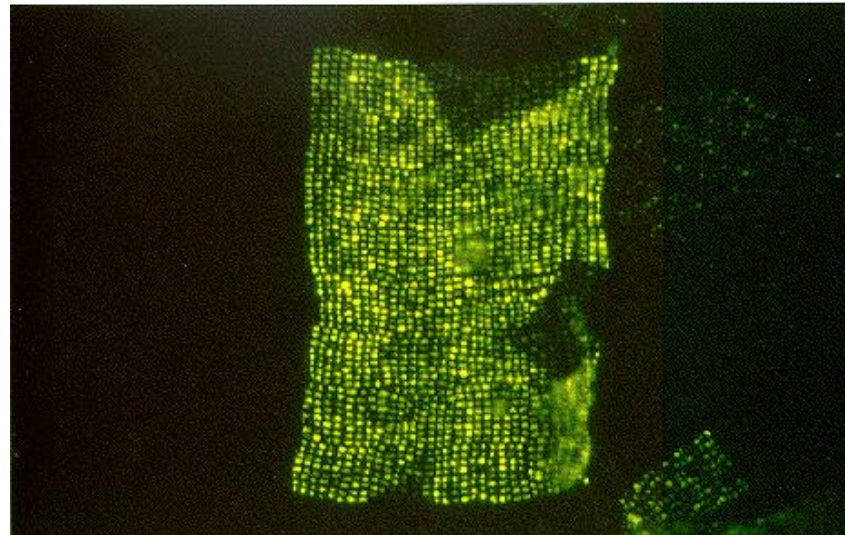


*Halobacterium*, Owens Lake, California

<http://ytpo.net/viruses/virus.php?id=1408&name=Mycoplasma%20hominis&limit=1400>



*Mycoplasma hominis*

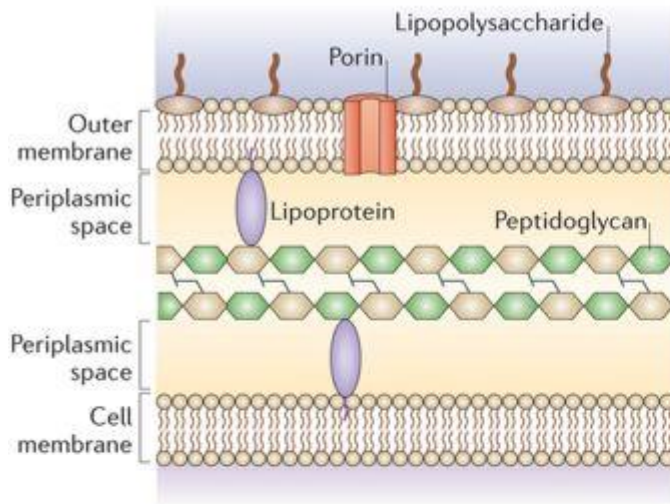


*Lamproedia hyalina* (Blu Nilo festék)

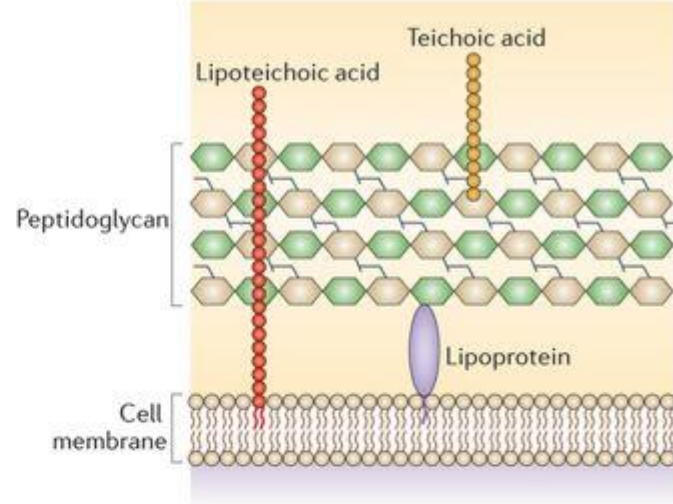
<http://eboals.bologna.enea.it/ambtd/articoli/lamprope.htm>



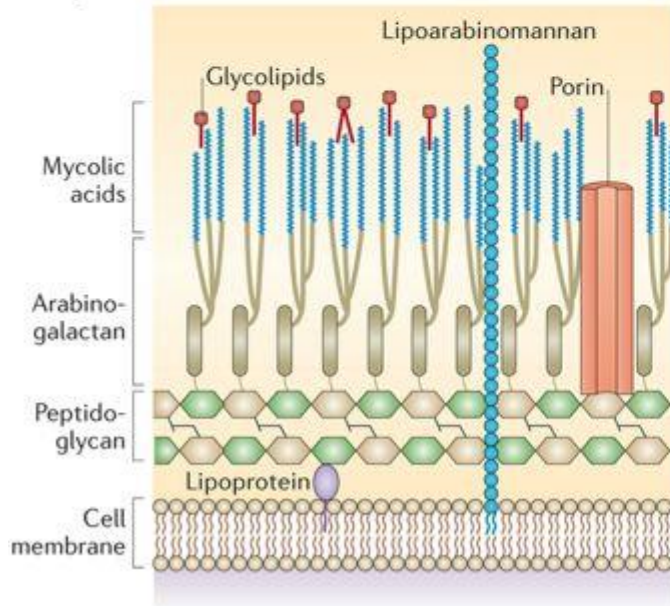
**a Gram-negative bacteria**



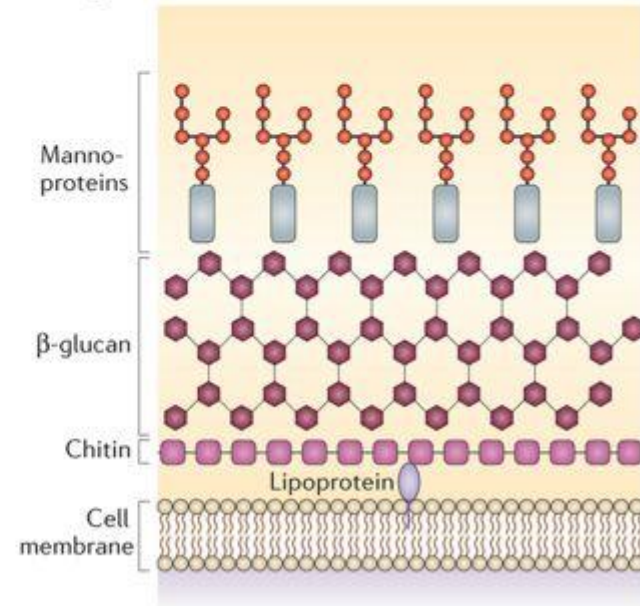
**b Gram-positive bacteria**



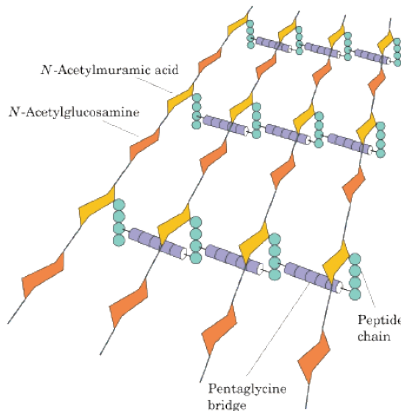
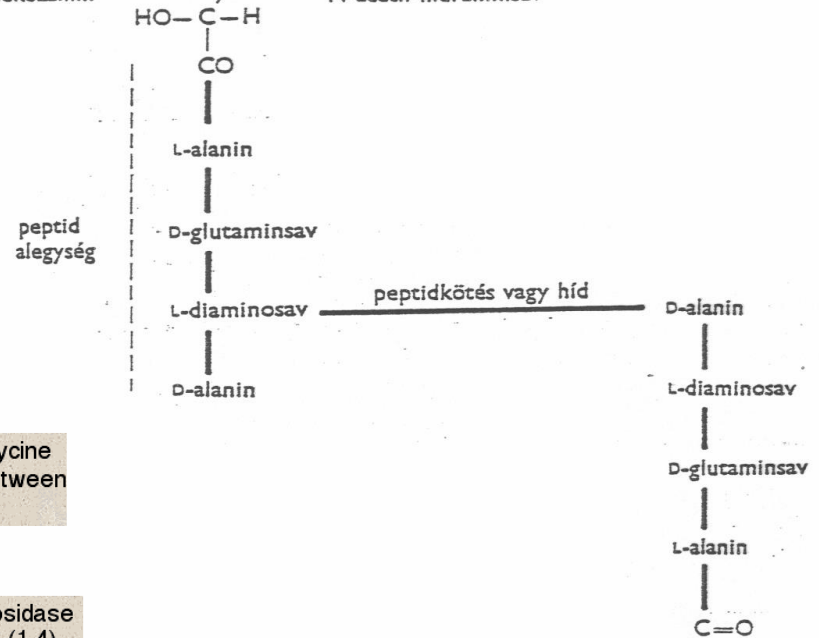
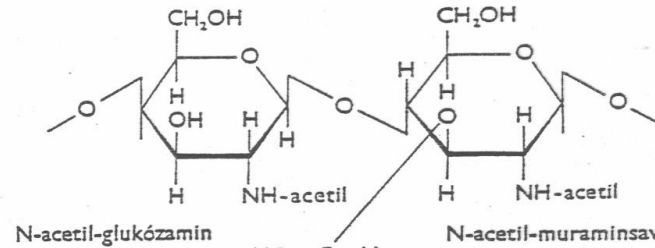
**c Mycobacteria**



**d Fungi**



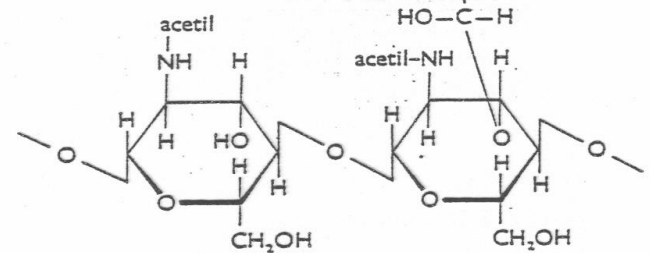
# Peptidoglikán



Note the pentaglycine cross-linkages between the chains

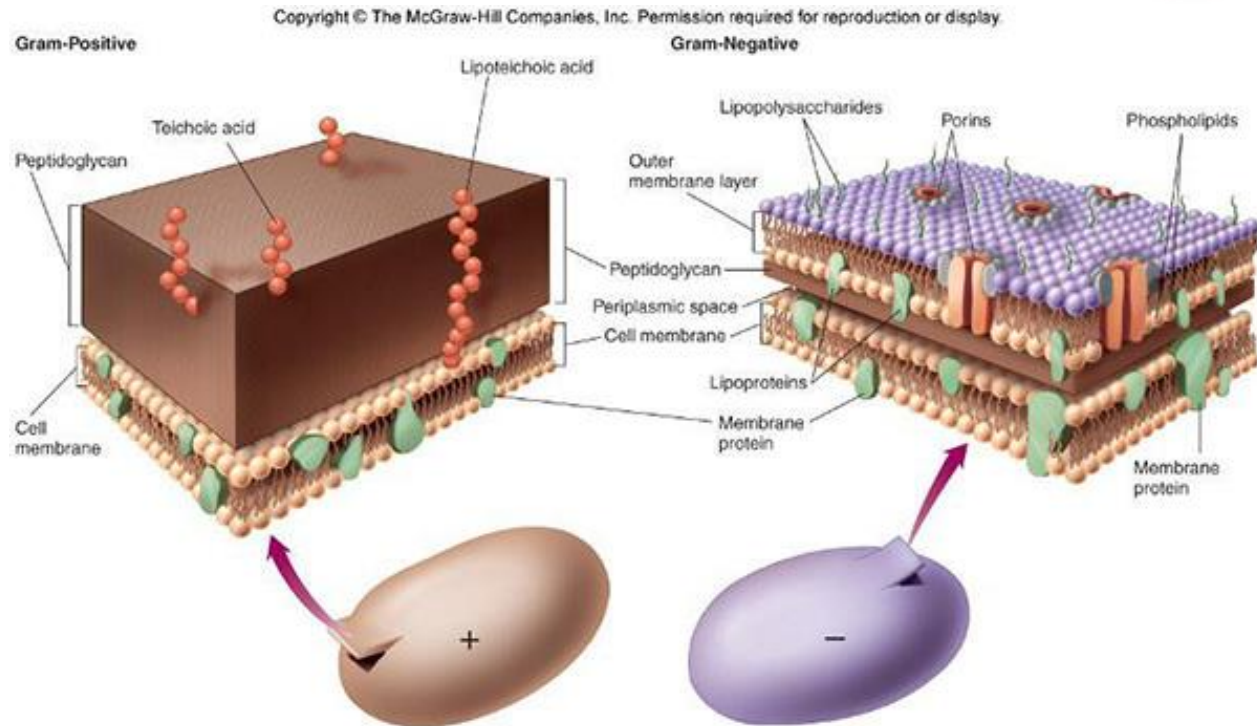
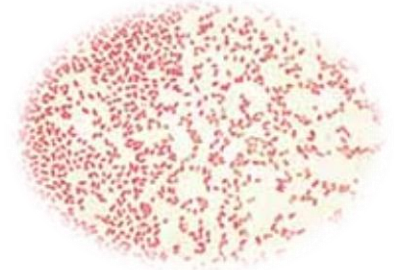
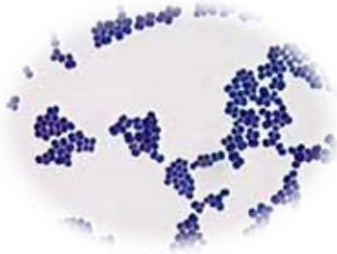
**Lysozyme** a glycosidase that cleaves the  $\beta$ -(1,4) linkages of peptidoglycans

Chemical structure of peptidoglycan: the *S. aureus* bacterial cell wall peptidoglycan





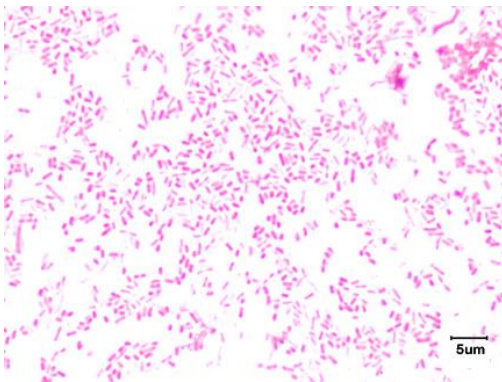
# Gram<sup>-</sup> és Gram<sup>+</sup> sejtfal felépítése



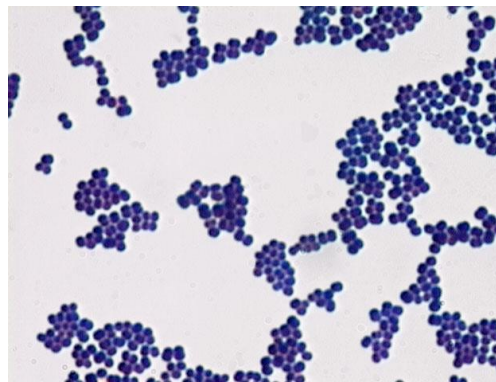
# Gram-festés



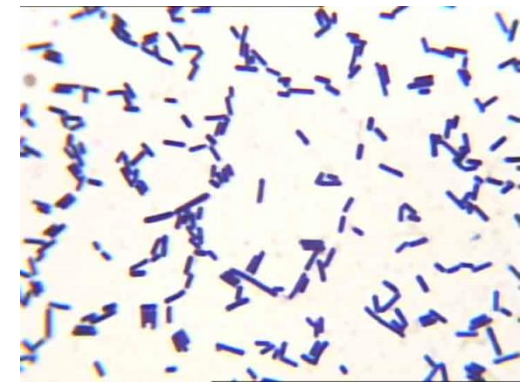
- Hans Christian Joachim Gram (dán kutató)
- Ely: trifenil-metán típusú színezék + jód oldat → jódpararozanilin komplex → Gram+ sejtekből nem mosható ki, Gram- sejtekből igen + kontraszt színezés
- Eredmény



[http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanual/lab6/images/Ecolio1\\_scale.jpg](http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanual/lab6/images/Ecolio1_scale.jpg)



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

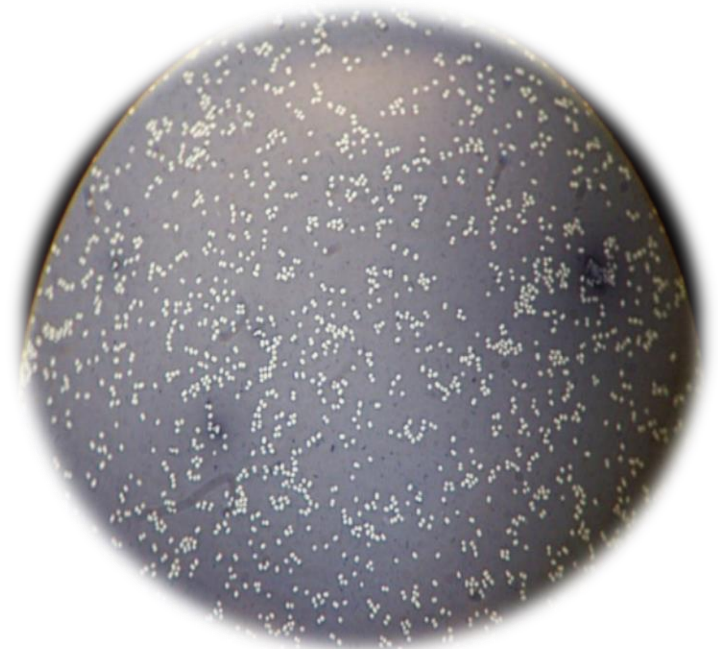
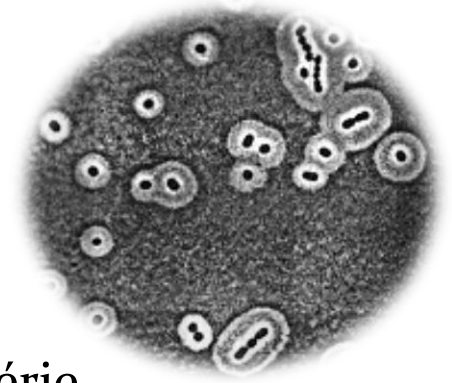


[http://www.path.cam.ac.uk/Microbiology/BI\\_Bacteriology/CL\\_Clostridia/M\\_BI\\_CL\\_20small.jpg](http://www.path.cam.ac.uk/Microbiology/BI_Bacteriology/CL_Clostridia/M_BI_CL_20small.jpg)

- 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 (mitokondriumban oxidált állapotban marad)

- Glikogén:

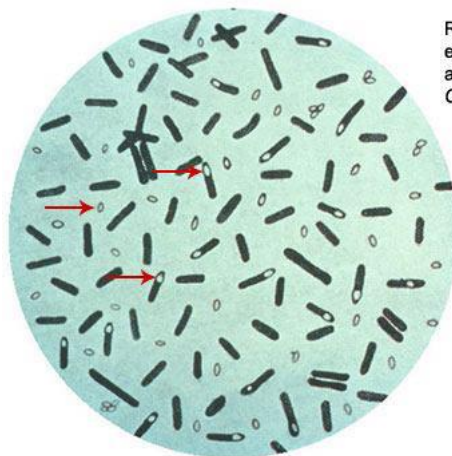
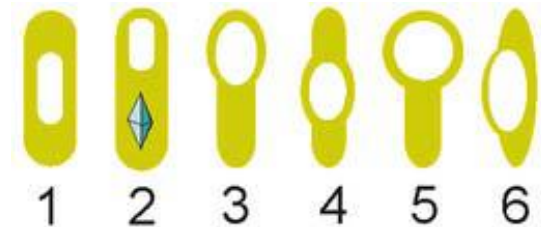
tartaléktápanyag, glükóz poliszacharid, gyorsan mobilizálható tápanyag

Kimutatása:

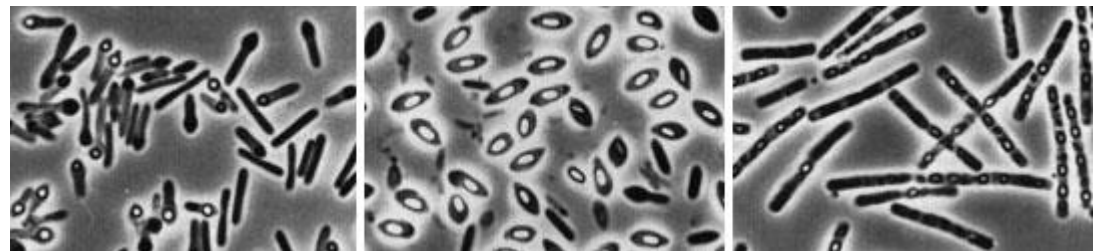
- Lugollal

# Endospóráképzés

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



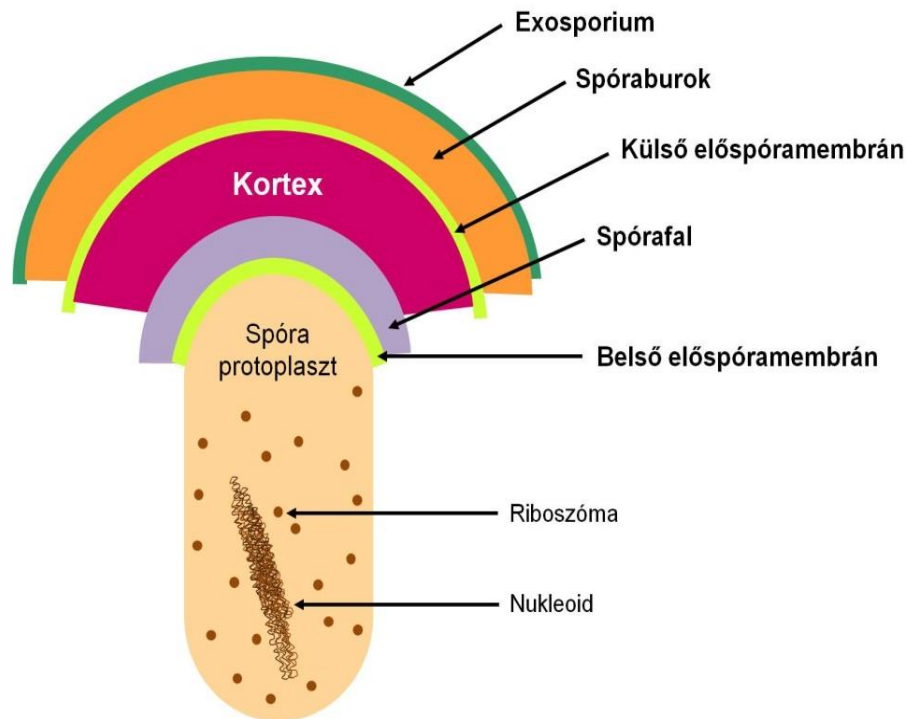
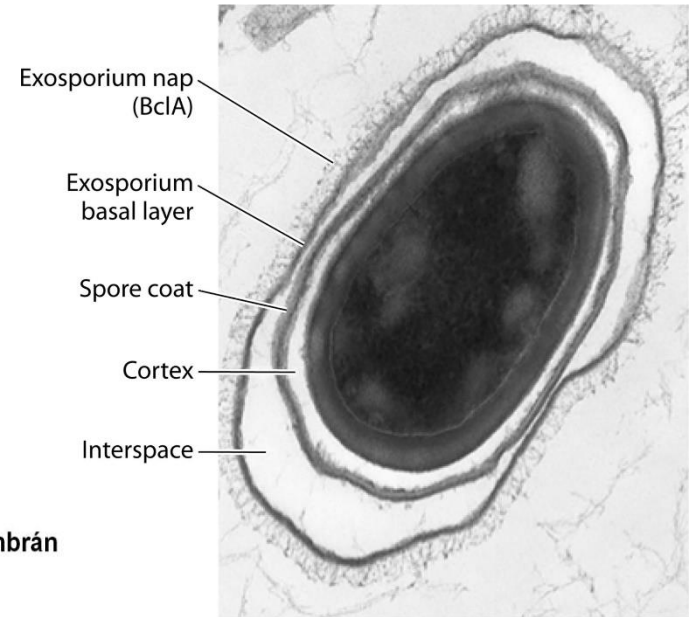
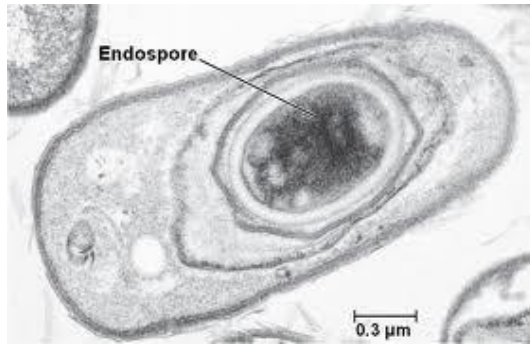
Red arrows indicate endospores and spores of *Clostridium botulinum*



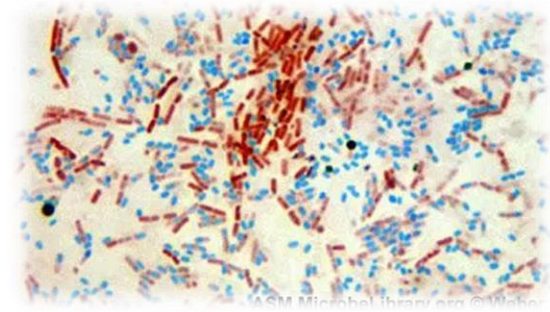
[http://textbookofbacteriology.net/medical\\_1.html](http://textbookofbacteriology.net/medical_1.html)

<http://w3.georgikon.hu/tanszekek/Novtud/Mikrobiologia/agr%20mikro%201.pdf>

# Az endospóra szerkezete



George C. Stewart Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2015; doi:10.1128/MMBR.00050-15





# Módszerek lépésről lépésre

# Gram-festés menete

*Bacillus cereus* Gram (+)  
*Escherichia coli* Gram (-)

1. Kenet készítés
2. Szárítás
3. Rögzítés
4. Festés kristályibolyával 2 percig /leönteni!/  
5. Lugol 2 perc
6. Mosás aceton-etanollal
7. Mosás csapvízzel
8. Festés szafraninnal 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*

*Schaffer-Foulton festés*

## 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*



**KÖSZÖNÖM A FIGYELMET!**

KÖSZÖNÖM A FIGYELMET!

# Gram-színezés

*Bacillus cereus* Gram (+)  
*Escherichia coli* Gram (-)

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

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

# Tok, mitokondrium és glikogén kimutatása

## 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.

A vertical decorative strip on the left side of the slide features a green-tinted microscopic image of various bacteria. Overlaid on this image are several white, semi-transparent circles of varying sizes, some of which are partially cut off by the edge of the frame.

# Irodalom

- Puskás Aurél: Ipari mikrobiológiai gyakorlatok, Műegyetem Kiadó, Budapest, 2001
- Sveiczter Ákos: Mikrobiológia, előadás jegyzet, Műegyetem, Budapest, 2008