

Mikroszkópos vizsgálatok II.

Mikroorganizmusok mikroszkópos vizsgálata.

A mikroorganizmus elnevezés gyűjtőfogalom; különböző szerveződési fokon álló élőlények csoportjai tartoznak közéjük.

Tágabb értelemben tárgykörébe tartozik minden élőlény, amely azonos technikával - vagyis fénymikroszkópos módszerrel - tanulmányozható, tehát a besorolás alapja tulajdonképpen a méret.

Szűkebb értelemben ide tartoznak a vírusok, a baktériumok és a gombák. E három csoport a fejlődés igen eltérő fokán áll.

Az élőlények alapvető strukturális fejlődési fokozatai a következők: 1. vírusok

2. baktériumok

3. egysejtűek: gombák
algák
állatok

4. többsejtűek.

Ezek a csoportok az energiafelezabító és bioszintetikus folyamatokat is különböző szinteken hordozzák. Ezek a csoportok differenciálódással mind jobban alkalmazkodtak a külső környezethez, függetlenedtek attól.

A vírusok olyan fehérje-nukleinsav komplexumok, melyeknek sejtes szerkezete nincs. Csak az élő sejten belüli vírusok tekinthetők élőnek, mert csak a gazdasejt struktúrelméivel kiegészülve érik el az élőkre jellemző kritikus szerveződési fokot. Emiatt strukturparazitáknak is nevezik őket.

A baktériumok az élő anyag legegyszerűbb szerveződésű sejtes formái. Valódi sejtmaggal és sejtszervekkel nem rendelkeznek, csupán azok funkcióját hordozó sejtszervecskével pl. sejtmagokvivalens /nukleoid/, mitokondriumekvivalens, flagelloid stb. Struktúrelméik nagyfokú variabilitása miatt szinte minden természetes szerves anyagot le tudnak bontani /valamelyik baktériumcsoport képes lebontani/, tehát életfo-

lyamataikhoz szubsztrátként felhasználni. Tehát óriási biokémiai kapacitás, azaz enzimtermelőképeség jellemzi őket.

Az egysejtű szervezetek valódi sejtmaggal és sejtszervekkel rendelkező szervezetek. Az evolúció során sejten belüli morfológiai differenciálódás megy végbe, szemben a baktériumokkal, ahol a differenciálódás biokémiai. Ebbe a csoportba tartoznak a fototrof algák és a kemotróf egysejtű állatok, valamint az élesztőgombák, melyek a fonalas alakok egysejtű szintre redukálódott formái. Valódi sejtmaggal rendelkeznek ez lehetővé teszi a valódi ivaros szaporodást. Az egysejtű szervezetekre jellemző a haploid és diploid állapot váltakozása, a nemzedékváltakozás.

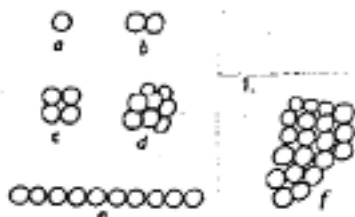
A többsejtű szervezetek valódi sejtmaggal, sejtszervekkel rendelkező sejtek minőségileg magasabb szintű csoportosulása. A rendszeren belül a sejtek egymásra vannak utalva. A sejtek morfológiailag differenciálódnak már a gombák esetében is, a növények és állatok esetében szöveteket, szerveket és szervrendszereket hoznak létre.

A mikroorganizmusok morfológiája

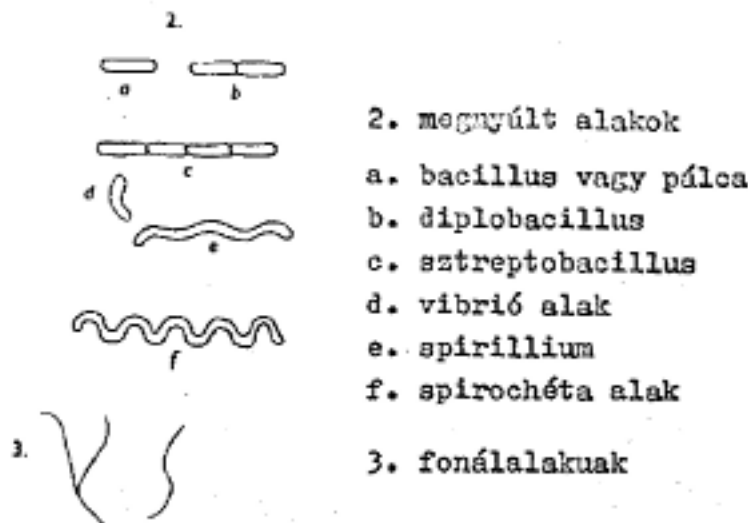
Az alak, a nagyság, a struktúrális felépítés igen nagy változatosságot mutat. Jellemző a mozgás megléte, vagy hiánya, milyensége.

1. A baktériumsejt vizsgálata

1.1. A baktériumsejtek alakja és mérete; a baktériumsejtek általában 1-2 μ széles és 4-5 μ hosszú sejtek. A leggyakoribb alakok a következők:



1. kokkuszek:
 - a. mikrokokusz vagy sztafi-
lokokkusz alak
 - b. diplokokkusz
 - c. gaffia alak /négyes/
 - d. szarcina alak /nyolcas/
 - e. sztreptokokkusz /lánc/



2. meggyűlt alakok

a. bacillus vagy pálcá

b. diplobacillus

c. sztreptobacillus

d. vibrió alak

e. spirillum

f. spirochéta alak

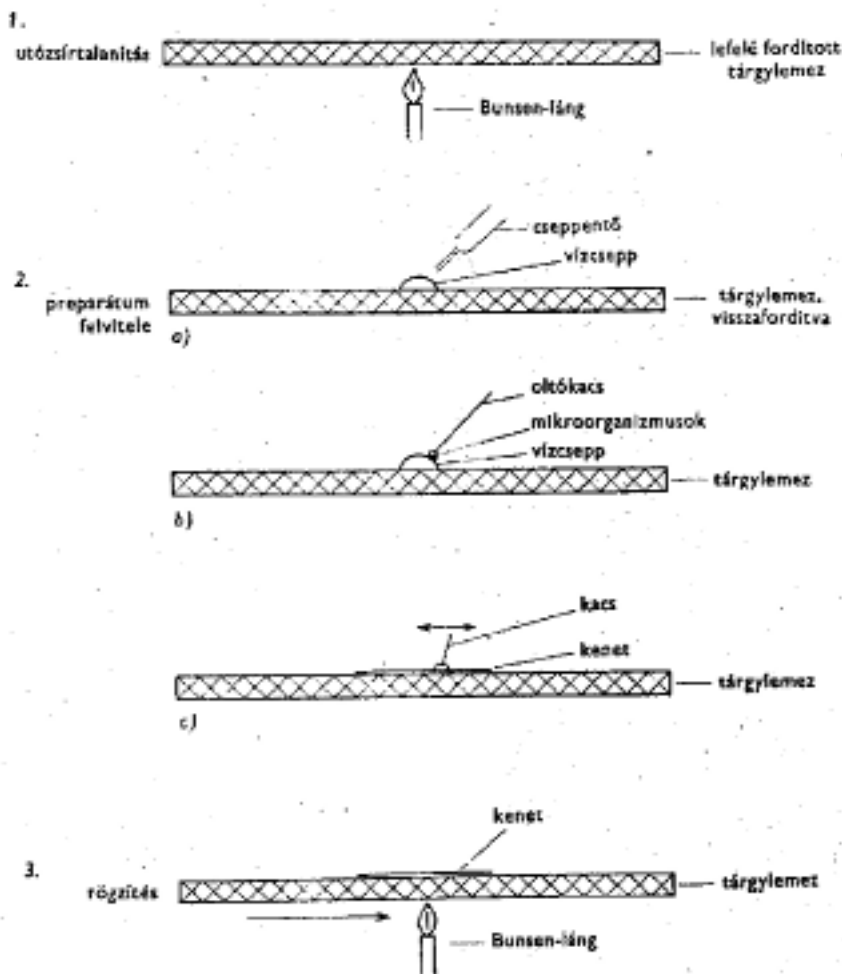
3. fonálalakuak

A baktériumok mikroszkópos megfigyelését segíti a sejtek megfestése, ilyen módon kontrasztosabb kép nyerése. Baktériumok egyszerű festéséhez leggyakrabban metilénkék vagy karbolfukszin oldatot használunk.

A baktériumok /és általában a mikroorganizmusok/ egyszerű festésének a menete a következő:

1. Az alaposan megtisztított tárgylemezt zsirtalanítás céljából húzzuk néhányszor át a Bunsen-égő lángja felett.
2. Helyezzünk egy csepp vizet az előzőleg zsirtalanított felületre.
3. A lángban sterilizált oltótűvel, vagy kaccsal a baktériumtelep egy parányi részletét kivesszük a tenyészedényből és alaposan eloszlatjuk a vízcseppben..
4. A hig emulziót egy kb. 15x15 mm-es területen vékony film formájában szétkenjük.
5. Hagyjuk a vékony réteget megszáradni.
6. A sejteket hővel rögzítjük a tárgylemezhez. A tárgylemezt 3-4-szer áthúzzuk a láng felett : a sejtek plazmájában lévő fehérjék denaturálódnak és közben az üveg lemezhez tapadnak. Vigyáznunk kell, hogy rögzítéskor a sejtek ne zsugorodjanak össze.

A kenet rögzítése nem csak hővel történhet, hanem bármilyen fehérjekicsapó szerrel is, pl. etanollal, vagy etanol-éter eleggyel.

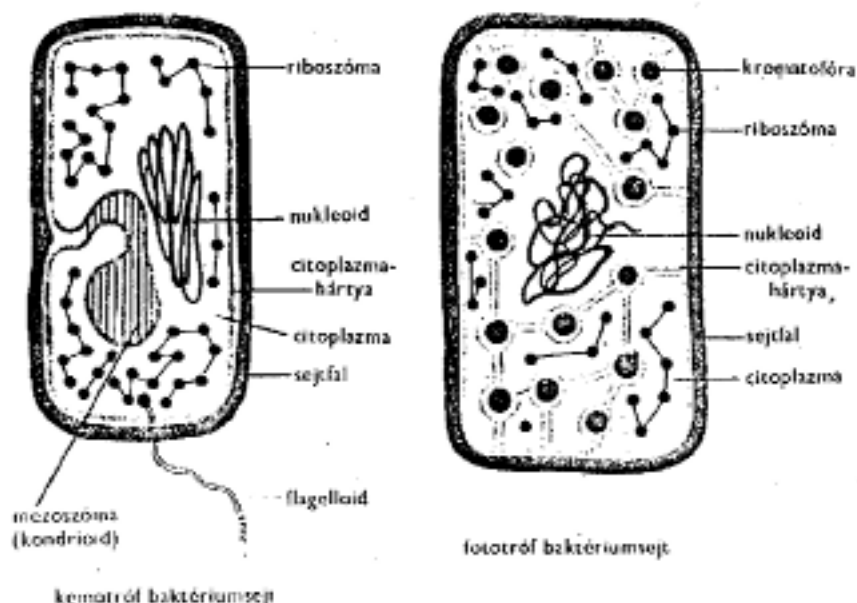


A baktériumkenet készítésének egyes lépései.

A baktériumkenet rögzítése után következik a festés. A kenet-re annyi festékoldatot cseppentünk, hogy az elfedje. Vigyázzunk, hogy hosszabb ideig tartó festés esetén a preparátum ne száradjon be, mindig csepegtessük utána festéket. Karbolfukszinnal 0,5 perces festési időt, metilénkékkel 2-3 perces festési időt tartsunk. A festéket mossuk le óvatosan a rögzített sejtekről, úgy hogy "vizscapból, vagy Espricflaskából" folyamatosan vizsugarat engedünk a preparátum fölé. Lefedés után mikroszkópban vizsgáljuk.

1.2. A baktériumsejt és a sejtalkotók vizsgálata

Egy baktériumsejt vázlatos szerkezetét láthatjuk az ábrán:

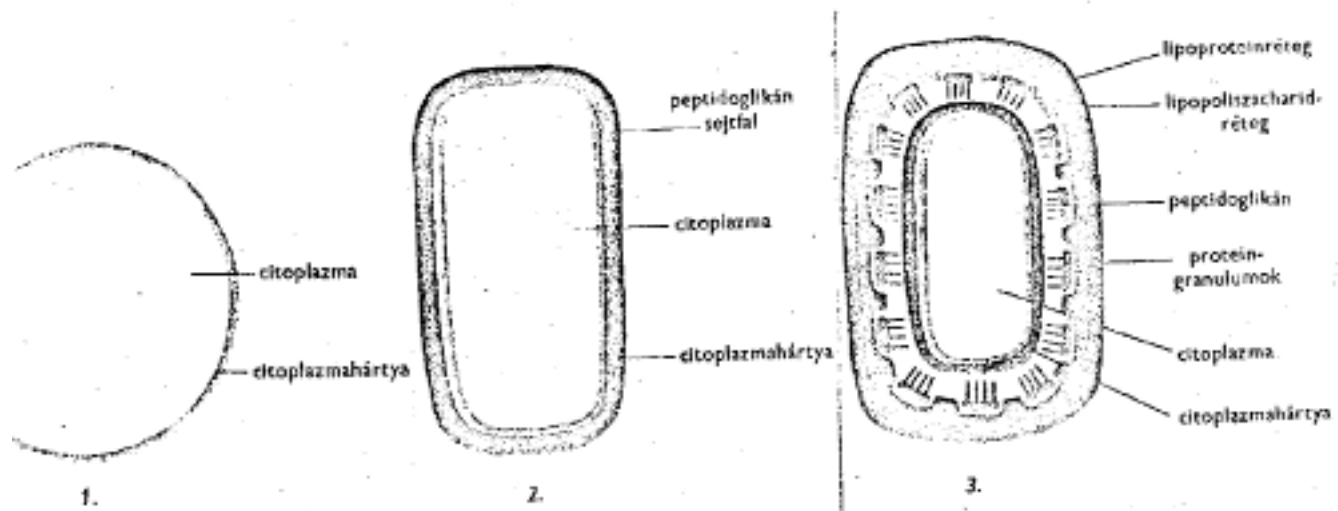


A baktériumsejt eszményi metszete.

A baktérium sejthatároló felületei:

Sejthatároló felület szempontjából 4 csoportot különböztetünk meg:

1. **Nincs sejtfal:** a határoló réteg a citoplazma membrán.
Ilyen a Mycoplasma -típus és a baktériumokból képzett protoplaszt.
2. A Gram + baktériumok sejtfala vastag amorf képződmény, alatta közvetlenül a kétrétegű citoplazmahártya /membrán/ található. A sejtfal merevítését a peptidoglikán tartalom biztosítja.
3. A Gram - baktériumoknak többrétegű sejtfala van, legkívül egy lipoprotein réteg található, ezt egy lipopoliszacharid réteg követi. Utóbbiba proteingranulumok vannak beépülve. Ehhez a réteghöz közvetlenül csatlakozik a citoplazma membrán.
4. Vannak olyan baktériumok, melyek komplex sejtaggregátumot képeznek és a sejtcsoport köré egy közös hálózatos réteget képeznek.



Különböző baktérium-sejthatároló felületek vázlata.

A peptidoglikán a baktériumokra jellemző aminocukor, egy heteropolimer. A glikánláncok 10-50 diszacharidból épülnek fel, a glikán láncokat pedig peptidekből álló oldalláncok kötik össze.

A Gram + és Gram - baktériumokat egy speciális festési eljárással különböztethetjük meg. Ez igen fontos eljárás a baktériumok azonosításában, identifikálásában. Mened Christian Gramról nyerte, aki 1884-ben fedezte fel az eljárást. Gram-festéskor a baktériumokat kristályibolyával, vagy genciánibolyával festjük meg. Ekkor valamennyi baktérium lilás színűre festődik. Ezután jóddal /Lugol-oldat/ kezeljük a sejteket. A jód a kristályibolyával jód-pára-rosanilin komplexet képez. Ez a komplex a baktériumok egy részéből kioldható etanolos mosással. Ezek a Gram - baktériumok. A Gram + baktériumokból nem mosható ki a komplex.

A Gram-festés lépései:

1. Készítsünk kenetet a baktériumból, vagy a baktérium keverékből.
2. A rögzített kenetet fessük 2 percig kristályibolya oldattal.
3. A kristályibolya oldatot lecsorgatjuk a lemezről és Lugol-oldatot cseppentünk rá. 1 percig kezeljük Lugol-oldattal.
4. Öblítsük le a kenetet csapvizzel.
5. Cseppentsünk rá etanol-éter elegyet 10 másodpercre.
6. Öblítsük csapvizzel, hagyjuk megszáradni.
7. Vizsgáljuk a kenetet először közepes nagyítással, majd immerziós objektívvel.

A Gram - sejteket karbolfukszinnal utánafesthetjük.

Ha Gram + és Gram - sejtekek keverékét Gram-festjük és után-szinezük karbolfukszinnal, akkor a Gr + sejtek lilás-kék színűek, a Gr - sejtek élénk rózsaszínűek lesznek; egymástól jól megkülönböztethetők.

A baktérium endospórák

A baktériumok egy része, így pl. a Bacillaceae család tagjai endospórákat képez. Ezek a sejten belül képződő spórák igen ellenálló képződmények, legalábbis sokkal ellenállóbbak, mint a vegetatív sejtek. Az endospórák megfelelő táptalajra kerülve ismét vegetatív sejteket hoznak létre. Az endospórák száraz anyagának mintegy 5-15 %-a dipikolinsav, mely a vegetatív sejtekben egyáltalán nem fordul elő.

Az endospórák viszonylag nehezen festődnek meg, ezért igen agresszív módszerekhez kell folyamodnunk. Ha a spóra egyszer már felvette a festéket, akkor viszont nehezen engedi el, így a vegetatív sejtekből kimosva a festéket könnyen megkülönböztethetjük a spórát a vegetatív sejttől.

Spórafestés menete:

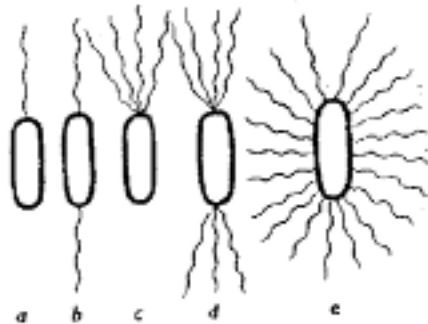
1. Készítsünk kenetet a spóras baktériumokat tartalmazó sejt-tömegből.
2. Cseppentsünk a preparátumra Ziehl-Nielsen féle karbolfukszinoldatot

3. Hevitsük a kenetet a festékoldattal, amíg az gőzölni nem kezd. Ezután még 3 percig hevitsük. Cseppentsünk utána festéket vagy deszt. vizet.
4. Festés után etanollal színtelenítsük a preparátumot.
5. Vizsgáljuk mikroszkóp alatt.

Spórafestés tripaflavinoldattal: A megfelelően előkészített kenetet cseppentsük meg a tripaflavin oldattal, majd hevitsük 2 percig. Vizes mosás után vizsgálhatjuk mikroszkópban.

A baktériumok flagelloidja

A baktériumok mozgását lehetővé tevő, ostorszerű képződményeket nevezünk flagelloidnak, megkülönböztetésül az eukarionták /valódi sejtmaggal rendelkezők/ flagellumától. A baktériumok flagelloidja kb. 20 nm átmérőjű és néhány um hosszú. Globuláris proteinek építik fel.



81. ábra. Baktériumsejt-típusok a flagelloidok száma és elhelyezkedése szerint: a), c) poláris, b), d) bipoláris, e) peritrich elhelyezkedésű flagelloidok

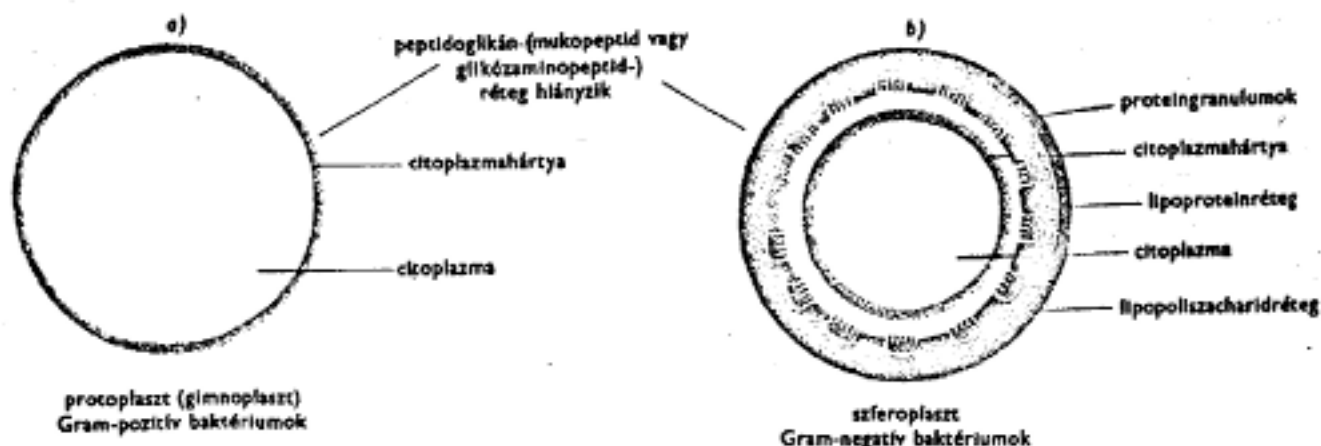
A flagelloidok fénymikroszkópban festés nélkül nem láthatók. A flagelloidok speciális csillófestési eljárással, a megfelelő módon előkészített sejtekből megfesthetők és láthatóvá tehetőek.

Baktériumprotoplasztok vizsgálata

A baktériumok sejtfalát protoplasztok képződése közben leoldhatjuk lizozim típusú enzimekkel. Lizozimet nagyobb mennyiségben a tojásfehérjében találhatunk, előállítására is elsősorban ebből történik. Egyes baktériumok is képeznek lizozim jellegű enzimet és a fágok is valószínűleg ilyen típusú enzimjeik segítségével képesek bejutni a baktériumsejt belsejébe. Lizozim hatására a baktériumok plazmája először a sejt falon belül lekerekedik, majd a sejt fal teljes elbontása után protoplazmagömbökként lebegnek a közegben. A közeg megfelelő ozmózisnyomásáról gondoskodniuk kell. Ha a közeget felhígítjuk a protoplasztok valósággal felrobbannak. Protoplasztnak nevezzük azokat a képződményeket, ahol a fal teljesen eltűnik. Protoplasztokat elsősorban a Gr + baktériumokból nyerhetünk.

Szferoplaszt a neve azoknak a képződményeknek, melyeknél a sejt fal részben, vagy teljes egészében megmarad.

A lizozim a sejt fal merevségét adó peptidoglikán réteget oldja fel..



Protoplaszt és szferoplaszt vázlatos felépítése

Baktérium protoplasztok előállítása

A protoplasztok előállításához valamilyen Bacillus faj 48 órás tenyészetét használjuk.

A lizozimoldatot stabilizátorral készítjük el, ennek össze-

tétele:	szacharóz	0,500 M
	NaCl	0,010 M
	MgCl ₂	0,005 M
	deszt. víz	1000 ml

Ehhez a törzsoldathoz annyi kristályos lizozimet adunk, hogy 100-400 µg/ml koncentrációjú legyen az oldat.

A lecentrifugált és deszt. vízzel kétszer mosott sejtömegből 10-30 mg/ml baktériumkoncentrációt állítunk be.

Tárgylemezre kis darabka fedőlemez ragasztunk vízűveggel.

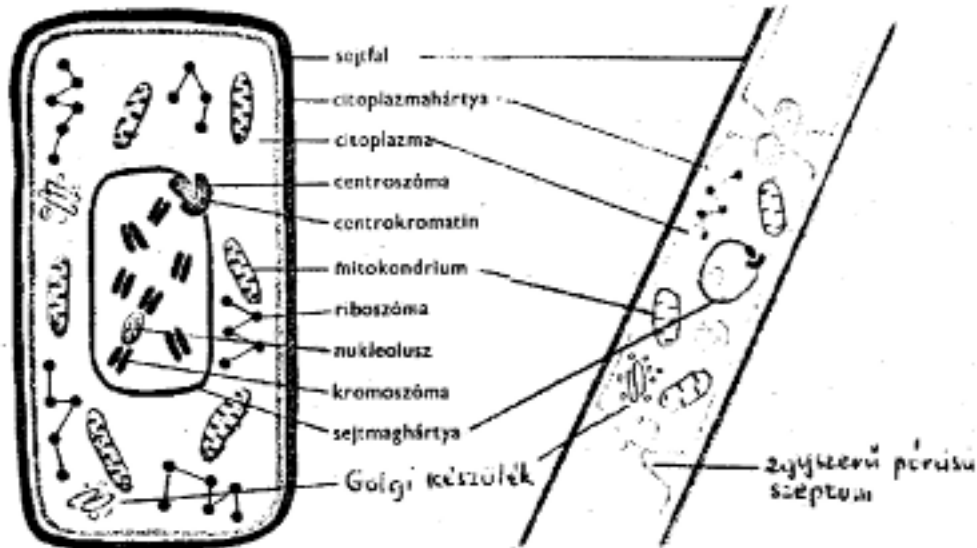
Ezen kiemelkedés köré cseppentjük a lizozimes baktériumszuszpenziót és 30 percig mikroszkóp alatt megfigyeljük.

A képződött protoplasztokhoz deszt. vizet adva azok azonnal szétesnek. Ha a közeg ozmózisnyomása nem megfelelő, a sejtek spontán lizist szenvedhetnek.

Hőkezeltsejtekből is létrehozhatunk protoplasztokat, de ezek a holt sejtek deszt. vizes kezelés hatására nem változnak.

2. A gombák jellemzése

A gombák valódi sejtmaggal /van magburok/ és valódi sejt-szervekkel rendelkező kemoorganotróf, telepeket képező élőlények. A sejtek fala nem cellulóz típusú poliszacharid. Igen jellegzetes a vegetatív sejtosztódás módja, a "gomba-mitózis", és az ezzel összefüggő morfológiai jellegzetesség, ti. a centroszómának a magburokban való elhelyezkedése. A gombák heterotrófak.



Élesztőgomba sejt és fonalas gomba sejtjének vázlata.

Az élesztőgombák a fonalas szerkezetből leegyszerűsödött, redukálódott alaknak tekinthetők.

A penészgombák telepeit micélium /fonálat/ építi fel, az élesztőgombák telepeit az élesztősejtek.

A fonalas gombák micéliuma /fonala/ lehet:

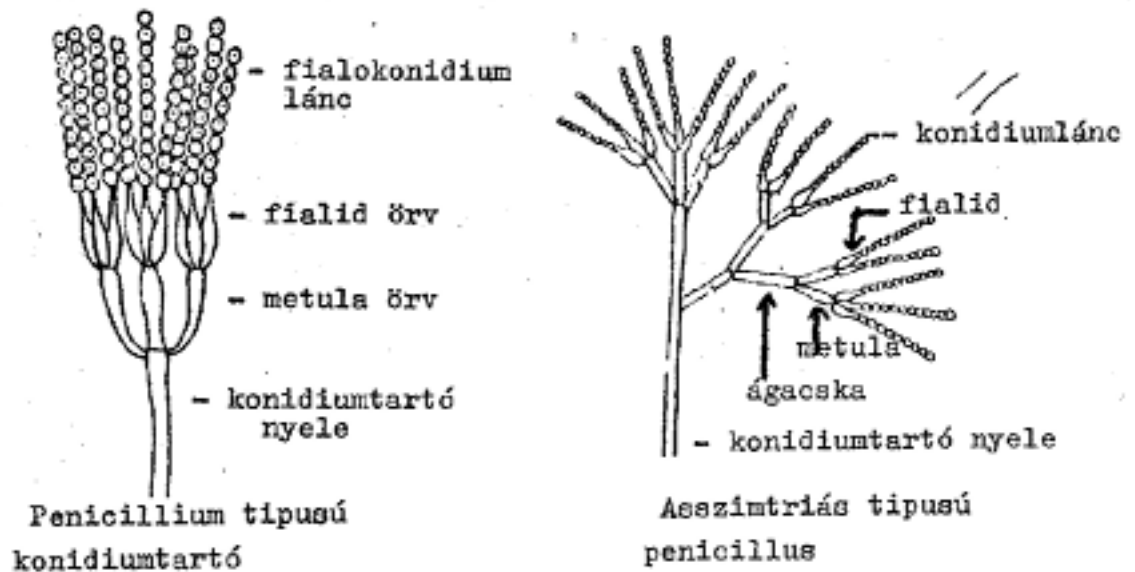
- tápanyagmicélium, mely vagy a táptalajba mélyed, vagy a felületén fut
- légmicélium, mely a táptalajról felemelkedik
- reproduktív micélium, mely a szaporítószerveket hordozza.

A hifák /fonalak/ lehetnek osztottak /szeptált/ vagy osztatlanok, a gomba fajtól függően.

A gombák sejtfala poliszacharid-fehérje komplexből áll. A plazma-membrán lipoid-fehérje komplex.

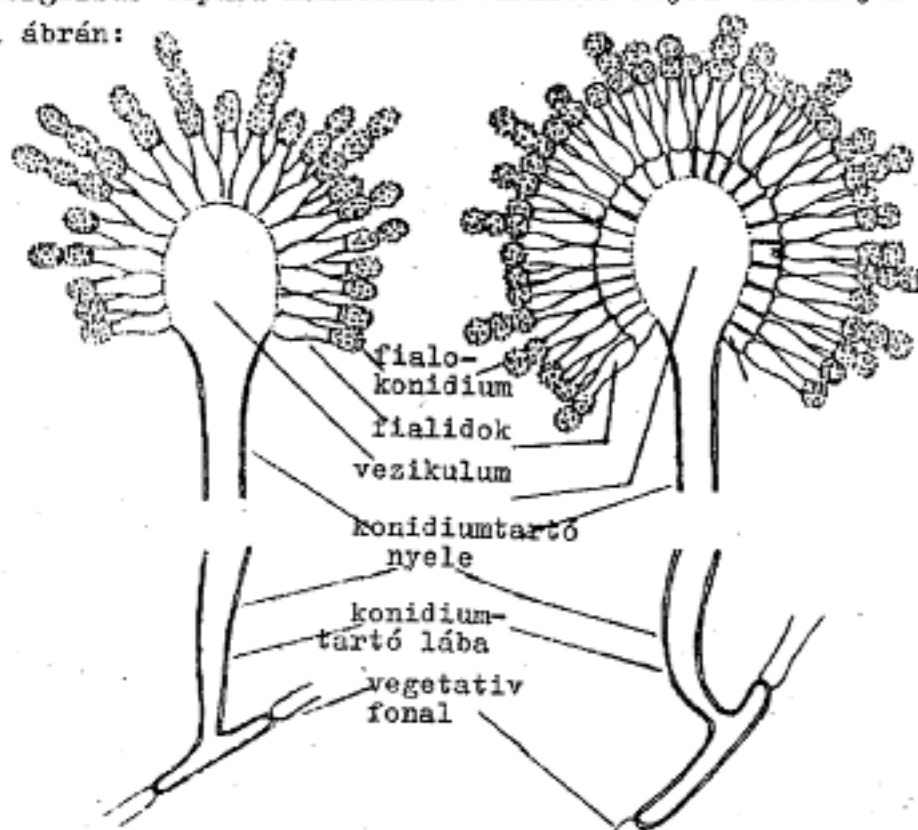
A magasabbrendű élőlények sejtjeiben szokásos sejtszerveken - sejtmag, endoplazmás retikulum, riboszómák, mitokondriumok, vakuolumok - kívül említésre méltó a fal és a membrán közötti térben található lomaszóma: ismeretlen funkciójú feltekeredett membránrendszer és a plazmidok, melyek a citoplazmában elhelyezkedő cirkuláris duplex felépítésű DNS-ek.

A gombák ivartalan szaporodása nagyszámú szaporítóképlettel történik. Ezek a képletek lehetnek konidiumok, vagy ivartalan spórák. A spórasejtek a sporangiummá tágult spóraanyasejtben képződnek. A konidiumok nem egy sejt belsejében, hanem egy specializálódott teleprész felületén, külsőleg képződnek.



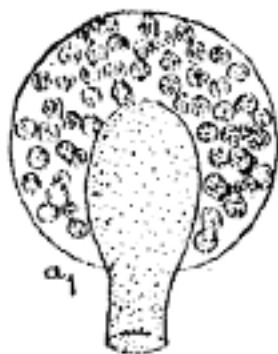
Az ábrán látható konidiumok a Penicillium nemzetségre jellemzők. A konidiumok alakja miatt ezeket ecsetpenészeknek is nevezik.

Az Aspergillus-típusú konidiumok vázlatos rajzát láthatjuk az alábbi ábrán:



egy rétegben álló fialidok két rétegben álló fialidok

A vegetatív szaporítószervek másik típusát, a sporangiumokban kifejlődő spóraszetekeket figyelhetünk meg a járomspórás gombák közé tartozó *Mucor* fajoknál. Az egyetlen nagy csúcsi spóraspórás sporangium helyett egyes fajoknál több bunkó- vagy szivar alakú sporangium is képződhet.



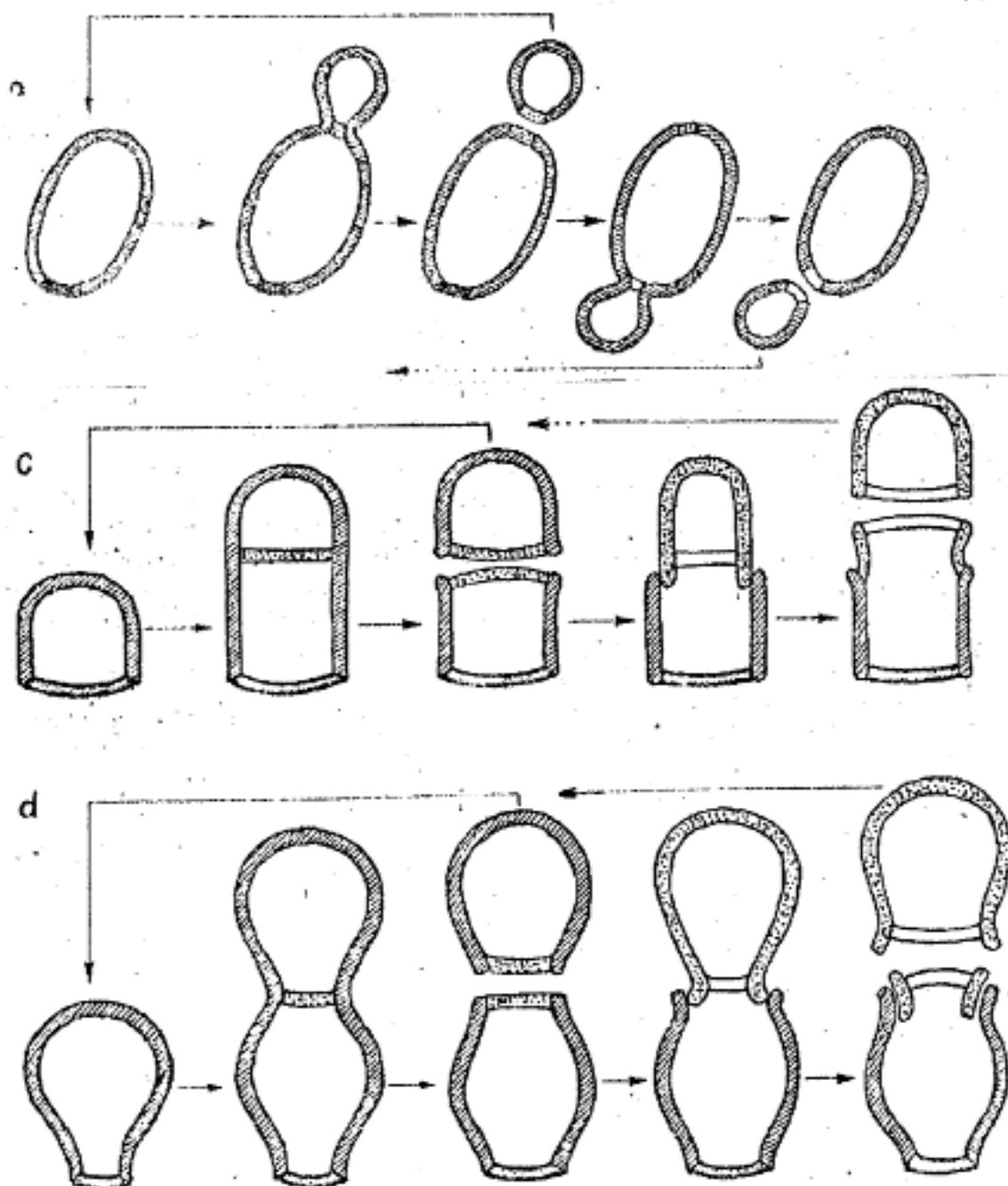
Mucor mucedo sporangium



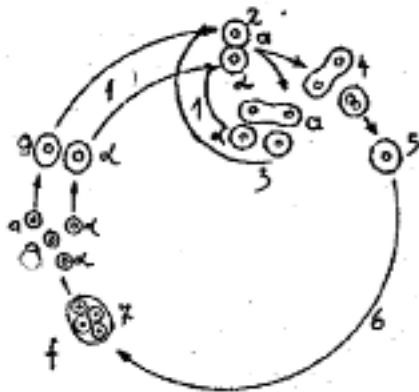
Thamnidium

Sporangiumok

A fonalas szerkezetüket elvesztett élesztőgombák un. zimosporangiumos gombák endospórákat képeznek ivari folyamatuk során. Ivartalan szaporodásuk többnyire a sarjadzás, hasadás, vagy hasadó sarjadzás. Ezen ivartalan szaporodási módokat szemlélteti az alábbi vázlat:



A *Saccharomyces cerevisiae* mutatja az alábbi ábra:



élesztőgomba teljes életciklusát

1. haploid sejtek sarjadzása /mitózisos magosztódással/
2. konjugáció
3. prozigóta szétválása
4. prozigóta keletkezése
5. euzigóta képződése /kariogámia/
6. diploid sejtek sarjadzása
7. meiózis és meiospóráképzés
8. meiospórák
9. vegetatív sejtek /haploid/

A gombák ivaros szaporodása során két különböző ivarú és "n" kromoszómaszámú /haploid/ sejt mag összeolvadásából 2n kromoszómaszámú zigóta keletkezik. Az ivari folyamat 2. szakaszában a diploid zigótából a haploid állapot meiózisos osztódás révén áll vissza. Az élesztők ivari folyamatai általában több lépésben játszódnak le és fajoként igen nagy változatosságot mutatnak. Általában nem szabad ivarsejtek, hanem ivarszervként felfogható sejtkepletek egyesülnek. Más élőlények ivarsejtjeivel itt tulajdonképpen a sejt mag egyenértékű.

A gombák egy része egyáltalán nem képes ivaros szaporodásra, ezeket a gombákat imperfekt gombáknak nevezzük //Fungi imperfecti/. Az ábrán a tömlősgombák és a járomspórás gombák ivari folyamatát láthatjuk a zigóta állapot kialakulásáig.

