

**Eötvös Loránd Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Biológiai Intézet
Mikrobiológiai Tanszék**

**KLASSZIKUS ÉS MOLEKULÁRIS
MIKROBIOLÓGIAI
LABORATÓRIUMI GYAKORLATOK**
elektronikus jegyzet

**Budapest
2018**

SZERZŐK

Tóth Erika
Borsodi Andrea
Makk Judit
Romsics Csaba
Felföldi Tamás
Jáger Katalin
Vajna Balázs
Ács Éva
Palatinszky Márton
Márialigeti Károly

ÁBRA KÉSZÍTŐK

Pohner Zsuzsanna
Sipos Rita

SZERKESZTŐ

Borsodi Andrea

SZAKMAI LEKTOR

Kovács Gábor

ISBN 978-963-489-064-5

Minden jog fenntartva
©Borsodi Andrea (szerkesztő) és a szerzők
ELTE Eötvös Loránd Tudományegyetem
2018

Az elektronikus jegyzet az ELTE Oktatási és Képzési Tanács 2018. évi tankönyv- és jegyzettámogatási pályázatának támogatásával valósult meg.

TARTALOMJEGYZÉK

1	Bevezetés	6
2	Munkavégzés a mikrobiológiai laboratóriumban.....	7
2.1	A mikrobák biológiai veszélyességi csoportokba sorolása és a levegővel terjedő fertőzések összefüggése.....	8
2.2	A fertőzés elhatárolás elve, a mikrobiológiai laboratórium berendezése és a legfontosabb laboratóriumi eszközök kiválasztásának szempontjai	9
2.3	Biológiai biztonsági fülke („lamináris box”).....	12
2.4	Viselkedés és munkavégzés a mikrobiológiai laboratóriumban.....	14
2.4.1	Tennivalók fertőző biológiai anyag (2-es rizikócsoportú mikroba) kiömlése esetén	17
2.4.2	Fertőtlenítő kézmosás és fertőtlenítő mosdás	17
2.4.3	Tennivalók veszélyhelyzetben és az laboratóriumi elsősegélynyújtás alapjai	18
2.5	Minőségirányítási rendszer a mikrobiológiai laboratóriumban	21
2.5.1	A minőség, mint a szolgáltatás alapja	21
2.5.2	Az akkreditálás	21
2.5.3	Minőségirányítás a mikrobiológiai laboratóriumban.....	23
2.6	Sterilizálási és fertőtlenítési eljárások	26
2.6.1	Sterilizálás	26
2.6.2	Fertőtlenítés	31
2.7	Sterilizációs berendezések hatásfokának ellenőrzése.....	33
2.8	Fertőtlenítőszeres mikrobiológiai hatásosságának meghatározása	34
3	Mintavételi eljárások a mikrobiológiában.....	36
3.1	Mintavétel diagnosztikai célra.....	36
3.2	Környezeti elemek mintavételezése	36
4	Bevezetés a mikroszkópok használatába.....	44
4.1	Fénymikroszkópia	44
4.1.1	Különböző megvilágítási rendszerek	45
4.1.2	Fluoreszcens mikroszkópos technikák	46
4.2	Elektronmikroszkópia	47
4.2.1	TEM.....	48
4.2.2	SEM.....	53
5	Sejtszámlálás, csíraszámbeclés és biomassza meghatározás.....	59
5.1	Mikroszkópos sejtszámlálási eljárások.....	59
5.2	PCR-alapú sejtszám meghatározás.....	64
5.3	Csíraszám-lálási eljárások.....	65
5.3.1	Telepszám alapú csíraszám beclés.....	65
5.3.2	Határhígításon alapuló csíraszám beclés.....	69

5.4	Biomassza becslési eljárások.....	71
6	Tenyésztésen alapuló eljárások.....	77
6.1	A környezetünkben levő mikroorganizmusok és hatásuk kimutatása.....	77
6.2	Táptalajkészítés.....	80
6.3	Tenyésztési eljárások.....	85
6.3.1	Dúsítás.....	85
6.3.2	Szélesztés, lemezöntés.....	87
6.3.3	Baktériumok izolálása, tisztítása.....	88
6.3.4	Anaerob tenyésztési technikák alkalmazása.....	93
6.3.5	Tenyészetek átoltása, törzsfenntartás, törzstárolás.....	96
6.3.6	Mikrokozmosz rendszerek.....	100
6.4	Törzsek feno- és genotípusos jellemzése.....	102
6.4.1	Telep és sejt morfológiai vizsgálatok, festési eljárások, morfortípus ismeret.....	102
6.4.2	A mikroorganizmusok tenyészfeltételeinek elemzése.....	118
6.4.3	Biokémiai vizsgálatok törzstenyészeteken.....	120
6.4.4	Élettani és ökológiai vizsgálatok törzstenyészeteken.....	130
6.4.1	Baktériumtörzsek kemotaxonómiai vizsgálata.....	143
6.5	Sejtfal összetétel vizsgálata.....	144
6.5.2	16S rDNS bázissorrend homológián alapuló mikrobiális fajmeghatározás.....	156
6.5.3	Egyéb faj- és törzs specifikus genotipizálási eljárások.....	165
6.5.4	Egyéb faj- és törzs specifikus genotipizálási eljárások.....	167
7	Tenyésztéstől független technikák alkalmazása a környezeti mikrobiológiában.....	168
7.1	Taxonómiai diverzitást vizsgáló eljárások.....	168
7.1.1	Kemotaxonómiai markereken alapuló eljárások.....	168
7.1.2	Nukleinsav kivonáson alapuló eljárások.....	170
7.2	Anyagcsere diverzitást és aktivitást vizsgáló eljárások.....	181
7.2.1	Közösségi enzimprofil/szubsztrátbontási vizsgálatok.....	181
7.2.2	Anyagcsere gének vizsgálata.....	184
7.3	Molekuláris eljárások a diagnosztikai és környezeti mikrobiológiában.....	185
7.3.1	'Shotgun' metagenomikai elemzések.....	185
7.4	Fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció.....	186
8	Gyorsdiagnosztikai eljárások.....	187
9	Mikrobiális környezetállapot elemzések.....	191
9.1	Felszíni vizek, szennyvizek mikrobiológiája, higiénés ellenőrzése.....	191
9.2	Talajok mikrobiológiai vizsgálata.....	197
9.3	A nitrogén körforgalomban résztvevő mikroorganizmusok vizsgálata.....	199
9.4	A kénkörforgalomban résztvevő mikroorganizmusok vizsgálata.....	204

9.5	Xenobiotikumok lebontásának vizsgálata	205
9.6	Élelmiszerek mikrobiológiai elemzése	209
9.6.1	Tej és tejtermékek mikrobiológiai vizsgálata	210
9.6.2	Húskészítmények mikrobiológiai vizsgálata	215
9.6.3	Növényi élelmiszerek mikrobiológiai vizsgálata	218
10	Biotechnológiai és fermentációs eljárások laboratóriumi kontrollja	222
11	Alapvető algavizsgálati módszerek	225
12	Adatelemzés	228
12.1	Numerikus taxonómia	228
12.2	Mikrobiológiai és környezeti változók együttes elemzése	229
12.3	Taxoneloszlás, fajszámbecslés és diverzitás indexek	231
12.4	Filogenetikai elemzések	233
12.4.1	Illesztés, rokonok keresése, filogenetikai fák szerkesztése	234
13	Függelék	239
13.1	A Laboval 4 típusú mikroszkópok használata áteső fényben történő, világos látóterű megfigyeléseknél	239
13.2	A mikrobiológiai laboratóriumi gyakorlatok során használt táptalajok	241
13.3	A laboratóriumi gyakorlatok során használt festékek	256
13.4	A laboratóriumi gyakorlatok során használt oldatok, anyagkeverékek és reagensek	258
13.5	Kemotaxonómiai vizsgálatokhoz szolgáló futtató elegyek és reagensek	264
13.6	A laboratóriumi gyakorlatok során alkalmazott mérési módszerek	266
13.6.1	A McCrady féle karakterisztikus szám meghatározása	266
13.6.2	Fenol-index meghatározása spektrofotometriás módszerrel	267
13.6.3	A triklóretén és bomlástermékei koncentrációjának meghatározása gázkromatográfiás módszerrel	268
13.6.4	Anaerob mikrokozmoszokban keletkező metán koncentrációjának meghatározása gázkromatográfiával	268
13.6.5	A hazai gyakorlatban a különféle vizek vízminősítése a-klorofill tartalom alapján	269
13.7	A mikrobiológiai vizsgálólaboratóriumokban alkalmazott szabványokban szereplő leggyakoribb rövidítések és az akkreditációs eljárással kapcsolatos szervezetek elérhetősége	270
14	Irodalomjegyzék	271
15	Gyakorlatok jegyzéke	273

1 BEVEZETÉS

A mikrobiológia tudománya az „alapító atyák” (Pasteur, L. [1822-1895]; Kohn, F. [1828-1898]; Koch, R. [1843-1910] stb.) tevékenységének köszönhetően épp szárnyra kapott, amikor a nagy természetbúvár felfedező kutatóutak eredményei, mai szemmel felbecsülhetetlen és akár már nem is pótolható értékei (gyűjteményei) segítségével bemutatták Földünk távoli sarkainak sokféleségét. Humboldt, A. (1769-1869) amerikai felfedező útjára (1799-1804), ill. Darwin, Ch. (1809-1882) Föld körüli hajóútjára (1831-1836) emlékeztetünk. Mindkettőjük bámulatos növény, állat, ősmaradvány stb. gyűjteménnyel tért haza.

Ez a fajta részletes leíró, feltáró munka a mikrobiológiában, különösen is a bakteriológiában csak az 1870-es években indulhatott meg a Koch iskola tenyésztési módszereinek megjelenésével. A máig érvényes elvi összefoglalást a kórokozók vonatkozásában Koch-féle posztulátumok néven ismerjük. Ebben a korban a nagy természetbúvár felfedezők már általános tudományos elméletek megalkotásával segítették a tudomány haladását. Érdekes, hogy Darwin evolúciós elméletének gyakorlati igazolásában alkalmazott kísérletes, leíró munkák, elsősorban a DNS-elemzésre kifejlesztett molekuláris eljárások köre hozta el a gyakorlati mikrobiológiai kutatások megújulását, a mikrobák ismeretlen világi megismerésének lehetőségét.

Gyakorlati útmutatónk a mikrobiológia területén általánosan alkalmazott eljárásokat írja le. Ezek elsajátítása más tudományterületek alpműveleteinek gyakorlását is segíti. Ilyen módszerek a sterilizálás és fertőtlenítés, az aszeptikus munkavégzés, vagy a tenyészetekkel történő munka. A gyakorlatokat a környezeti mikrobiológia feltáró vizsgálódásainak logikai sorrendjében mutatjuk be. Könyvünk a mikrobiológiai laboratórium felépítésével a mikrobiológiai munkabiztonság kérdéseinek taglalásával indul. Ezt követi a mintafeldolgozást előkészítő műveletek sora (pl. táptalajkészítés, sterilizálás), majd a környezeti mintavétel leírása, a mikroszkópos mintavizsgálatok köre, a tenyésztési eljárások, a törzstenyészetekre alapozott munka. Először a törzsek fenotipikai jellemzése, majd az alapvető molekuláris identifikáció módszerei következnek. Bepillantást nyerhetünk a tenyésztéstől független molekuláris eljárások módszertani alapjaiba is. Könyvünk végén a mikrobiológiai (környezet)analitikai eljárásokból mutatunk be párat, így az elemkörforgalmakban résztvevő fontosabb mikrobiális aktivitások kimutatását, vagy alapvető környezet-egészségügyi (víz)vizsgálati módszereket, és néhány klasszikus biotechnológiai eljárás gyakorlatát.

A gyakorlatokat azonos rendben írjuk le. A kérdéses technika elvének rövid ismertetését a vizsgálat tárgyának bemutatása, a szükséges anyagok és eszközök felsorolása, majd a vizsgálat menetének részletesebb ismertetése követi. Ennek során az értékelés lépéseivel visszacsatolunk a technika alapelveinek bemutatásához. A gyakorlatok az ELTE TTK oktatásszervezési rendszerében heti beosztásban, vagy tömbösítve folynak egy-két hétre összesűrítve. Igyekeztünk a gyakorlatokat ehhez igazodva összeállítani, Egyes gyakorlatok esetében a hallgatók már előkészített anyagokat kapnak, mintegy a gyakorlatok közepén kapcsolódnak be a kivitelezésbe. Más gyakorlatokon szinte minden lépés kivitelezését a hallgatókra bízunk.

A mikrobiológiai laboratóriumi eljárásoknak robbanásszerű fejlődését, bővülését éljük meg. A változások, újabb eljárások bemutatását két módszerrel próbáljuk követni: i. egyes gyakorlatoknál külön elektronikus útmutatót állítunk össze; ii. ezek anyagával időről időre kiegészítjük könyvünket. Várjuk hallgatóink, ill. a könyv további használóinak visszajelzését, hogy útmutatónk minél jobban használható lehessen.

Budapest, 2018. december

A szerzők

2 MUNKAVÉGZÉS A MIKROBIOLÓGIAI LABORATÓRIUMBAN

A fertőzés veszélye miatt a mikrobiológiai laboratóriumok munkabiztonsági rendszere alapvetően különbözik más területek (pl. vegyi, fizikai) laboratóriumi biztonsági előírásaitól. A mikrobiológiai laboratóriumban ugyanis a laboratóriumi munkával kapcsolatos kockázatot jelentő veszélyes vegyszerekkel, anyagokkal végzett műveletek köre kiegészül a mikrobiális fertőzés kockázatával. A fertőző ágensek (törzs és egyéb tenyészetek stb.) és anyagok jelenléte a mikrobiológiai laboratóriumban, valamint az azokkal történő munkavégzés és így a laboratóriumi munkavégzéshez kapcsolódó fertőzés és járvány kialakulásának lehetősége, veszélye miatt szigorú rangsorba rendezett óvintézkedések kialakítása indokolt. Az óvintézkedések rendszerében legelső helyen is az ismert fertőző ágenseket és az azokkal végzett munkát kell figyelembe venni, majd a pontosan nem ismert, de fertőzésveszélyt jelentő anyagok (pl. környezeti minták) kezelését. Ezek függvényében a laboratóriumi műveleteket, valamint az általános és biztonsági felszereléseket, azok minősítését (GLP = good laboratory practices = jó laboratóriumi eljárások; elhatárolási módszerek) kell „megtervezni”; végül pedig a laboratóriumban munkát végzőknek a fertőzésveszély kérdéskörében ismereteit és tudatosságát (viselkedési rendszabályok) megerősíteni. E területek figyelembe vételével kell kiépíteni a laboratóriumot és annak minőségellenőrzési és munkabiztonsági rendszerét.

A mikrobiológiai munkavégzéshez köthető (laboratóriumban stb. szerzett) fertőzések járványtani elemzése (jellegzetes tünetekkel járó és aszimptomatikus [pl. szerokonverziós] események esetében egyaránt) tette lehetővé a mikrobák veszélyességi csoportokba sorolását (az egészségre gyakorolt hatások, a terjedés útjai és a fertőzési kapuk stb. alapján), valamint erre alapozva a laboratóriumokban és egyéb munkahelyeken (pl. állatház, kísérleti vagy termelő üzem) megkövetelt biológiai biztonsági szintek kialakítását (pl. elhatárolási eljárások a laboratóriumi munkavégzés során, biztonsági felszerelés és megfelelő tervezés). Ezek következetes figyelembe vétele és alkalmazása teszi lehetővé a laboratóriumi személyzet és a tágabb környezet megóvását a fertőzéstől.

A fertőzés leggyakrabban bőrön át történhet (perkután oltás éles fertőzött tárgyakkal, kísérleti állatok harapásával, karmolással stb.), vagy aeroszol belélegzésével (pl. véletlen kiömlés során, laboratóriumi keverési, centrifugálási műveletek nyomán, vagy spórás tenyészet kinyitásakor, liofilizátum felbontásakor) és lenyeléssel (pl. szájjal történő pipettázás, vagy a laboratóriumban végzett étkezés során). A fertőzés kialakulása szempontjából kulcsfontosságú az infekciós dózis. (Az infekciós dózis az a sejtszám, amely [emberben] akut fertőzést okoz.) Emiatt a nagy sejtsűrűség létrehozásával járó eljárások (pl. tenyésztés) fokozzák a fertőzés veszélyét. Egyes kolera vibrio törzsek esetében már akár 10 sejt lenyelése betegség kialakulásához vezethet, míg bizonyos *Escherichia coli* törzsekből akár 10^6 sejtet is „el kell fogyasztanunk” a betegség kialakulásához.

A legnagyobb fertőzési kockázatot a laboratóriumokban, egyéb fertőző munkahelyeken dolgozó kutatók, technikusok, diákok viselik, ugyanakkor nem szabad figyelmen kívül hagyni a mosogató, takarító, karbantartó személyzet kitettséget. A laboratóriumi munkavégzés veszélyeinek kockázatelemzése során abból az alapfeltételezésből indulunk ki, hogy az érintettek körét egészséges egyének alkotják. Figyelembe kell venni ugyanakkor, hogy az érintettek egészségi állapota változó és befolyásolja a fertőzés veszélyét. Nem csupán a különböző életszakaszok (pl. idősödés), de bizonyos (akár krónikus) betegségek vagy állapotok, gyógyszerhasználat módosíthatja az egyén védekezési képességét (pl. allergiás tünetek enyhítése; kemoterápia, vagy cukorbetegség miatt kialakuló részleges immunhiányos állapot, terhesség a magzat fertőződésének veszélyével). Meg kell említeni azt is, hogy bizonyos laboratóriumi munkálatok esetén az allergiás reakciók kialakulásának a veszélye is fennáll (pl. aktinobaktériumok spórafehérjei).

A munkavégzéshez köthető fertőzési kockázat tágabban értelmezve kiterjed külső, nem laboratóriumi, vagy üzemi helyszínekre is. Egyik oldalról a laboratórium munkatársával érintkezők körére, másik oldalról pedig a környezeti vagy közegészségügyi stb. mintavételezések is veszéllyel járhatnak. Mindenki átlátja pl. egy kommunális szennyvíztisztító, vagy hulladéklerakó mintázásának a veszélyeit, nem is beszélve az olyan fertőzésveszélyes helyzetekről, amikor tetemet, vagy dögöket kell helyszínen vizsgálni, azokból mintát venni.

2.1 A mikrobák biológiai veszélyességi csoportokba sorolása és a levegővel terjedő fertőzések összefüggése

A mikrobák által okozott betegségek súlyossága alapvető a biológiai veszélyességi csoportokba (risk group) sorolás tekintetében. Ezen túl lényeges a terjedési út figyelembe vétele, hiszen a légi úton (vagyis aeroszollal) terjedő fertőzések ellenőrzése a legnehezebb. A mikrobák veszélyességi szintjéhez illeszkedik a laboratórium (egyéb munkahely) kiépítésének, az alkalmazott eljárások és módszerek körének biológiai biztonsági szintje (biological safety level; BSL). Négy veszélyességi csoportot és ennek alapján négy biológiai biztonsági szintet különböztetnek meg. Az első rizikócsoportba tartozó mikrobák egészséges felnőttekben nem okoznak betegséget, valamint az ezekkel történő munka esetében nem kritikus az aeroszol képződéssel járó folyamatok szigorú elhatárolása. Az ilyen mikrobákkal dolgozó első biológiai biztonsági szintű laboratóriumokban (BSL-1) végezzük az alapszintű oktatást (felsőoktatási szakképzés, egyetemi alapképzés). A BSL-1 laboratóriumokban elegendő biztosítani a kézmosás, ill. fertőtlenítés lehetőségét. A kettes rizikócsoportba tartozó mikrobák legnagyobb részét szájon át fertőznek, vagy tágabban fogalmazva nyálkahártyákon keresztül. Természetesen fertőzéshez vezethet a véletlen önbeoltás, vagy a nagy számban mikrobákat tartalmazó aeroszollal cseppfertőzés is. Ez utóbbi miatt ilyen mikrobákkal dolgozva az aeroszol képződéssel járó laboratóriumi műveletek elhatárolását meg kell valósítani megfelelő biológiai biztonsági fülke használatával („lamináris box”). Emellett személyi védőfelszerelés használata kötelező (védőköpeny, védőkesztyű, freccsenés ellen védőszemüveg vagy maszk stb.). Természetesen előírás a fertőtlenítőszeres kézmosás alkalmazása. A laboratóriumban a veszélyes hulladékok szelektív gyűjtését meg kell valósítani (fertőzött hulladék gyűjtő, pipettahegyek és más kisebb fertőzött eszközök gyűjtésére mikrobicid folyadékkal töltött edények stb.) és rendelkezésre kell álljon a hulladék sterilizálására szolgáló ártalmatlanító autokláv.

A harmas rizikócsoportba sorolt mikrobák emberben megbetegedést okoznak és jellemzően légi úton terjednek, infekciós dózisu k kicsi. Ilyen esetekben minden műveletet, amelyben akár csak feltételezetten fertőzött anyagokkal, tárgyakkal dolgoznak, megfelelő szintű biológiai biztonsági fülkében kell végezni. A harmadik biológiai biztonsági szintű laboratóriumokban (BSL-3) csak az oda kijelölt személyzet dolgozhat, valamint megfelelő légtechnikai rendszer kiépítésével a lehető legkisebbre csökkentik a fertőző aeroszol kiszabadulásának esélyét (a BSL-2 szint esetében már jelzett további védekező intézkedések mellett). A legnagyobb, négyes rizikócsoportba azokat a mikrobákat sorolják, amelyek esetében bizonyított, vagy akár csak feltételezhető, hogy súlyos, ill. halálos kimenetelű emberi megbetegedést okoznak a terjedés módjától függetlenül. Az ilyen mikrobákkal dolgozó BSL-4-es laboratóriumokban a legnagyobb biztonságot nyújtó biológiai biztonsági fülkéket alkalmazzák, valamint a dolgozókat különleges, külső légellátású védőöltözettel biztosítják a fertőzés veszélye ellen.

Megjegyezzük, hogy nemcsak önmagukban a mikrobák, illetve a fertőzés lehetősége jelent veszélyt, de a mikrobiális anyagcseretermékek egy része, ill. az azokkal végzett munka is veszélyes lehet (pl. toxinok; biotranszformációs termékek, mint a vinilklorid). Megfelelő munkabiztonsági intézkedéseket és védőfelszerelést kell használni ilyen jellegű kitettségek

esetén (pl. aktív szén szűrővel ellátott biológiai biztonsági fülke, elszívófülke, légzésvédő maszk).

Különleges biztonsági előírásokkal szabályozzák a nagy térfogatokban (> 10 L) végzett biotechnológiai műveleteket és a rekombináns technológiák alkalmazását. Ez utóbbi esetben lehetőség szerint a jól ismert nem patogén gazdaszervezeteket kell használni és törekedni kell a véletlen rekombinációs események kizárására. A gazdaszervezet mellett az inzertet is pontosan ismerni kell, hogy ne tartalmazzon veszélyes géneket stb. A vektorokat is úgy kell megválasztani, hogy felesleges genetikai információt ne legyenek képesek átvinni a gazdaszervezetbe.

Látjuk, hogy a laboratóriumok biológiai biztonsági szintje igazodik a mikrobák rizikócsoportjaihoz és azon belül is különlegesen figyelnek a fertőzés légi úton, aeroszollal történő átadására. Vegyük ezért szemügyre mindazokat a laboratóriumi műveleteket, folyamatokat, amelyek aeroszol képződéshez vezethetnek. A legtöbb baktérium és élesztő szilárd tápközegen vajszerűen kenhető, egybetapadó sejtömeget képez. A tenyészedény kinyitásával esetükben nem fog aeroszol képződni. Ugyanakkor a sporuláló (konidiospórás) baktérium vagy fonalas gombatelepekből akár csak a Petri-csésze gyorsabb kinyitása hatására is spóra aeroszol szabadulhat ki. Ilyen szervezetekkel dolgozva hosszabb tenyésztési időtartamok esetében célszerű a Petri-csésze fedelét körberagasztani. Mielőtt a tenyészetet kinyitjuk, ellenőrizni kell a sporulációt (léghifa képzést), és a tervezett műveletet biológiai biztonsági fülkében kell végezni. Bár az átlagos mikrobák tenyészetének pusztá kinyitása - mint jeleztük - nem okoz fertőző aeroszol képződést, a tenyészetekkel végzett alapvető munkák, pl. átoltás (a fertőzött oltókacs leégetése), mikroba szuszpenzió készítése (pl. kémcső keverő segítségével), szuszpenziók, leves tenyészetek centrifugálása, pipettázás, késes homogenizálás stb. mind-mind olyan művelet, amikor (fertőző) mikroba partikulumokat (anyagot) tartalmazó kicsiny folyadékcseppek (aeroszol) képződhetnek. Az aeroszol szemcsék sorsa méretüktől függően változatosan alakul. A 150 µm átmérőnél nagyobb szemcsék rövid idő alatt kiülepednek, megszáradnak és (fertőző) porszennyezést képeznek a laboratóriumi asztalokon és a padlón. A 150 µm-nél kisebb részecskék a levegő páratartalmának függvényében még a felületekre történő kiülepedést megelőzően kiszáradhatnak, az aeroszol cseppek „magjai” pedig a laboratórium légterében lebeghetnek. Ezek a kicsiny aeroszol cseppek még az átlagos arcmaszkon is áthatolhatnak. A kiszáradást tűrő mikrobák (pl. *Staphylococcus*, *Mycobacterium* spp., spórák) akár hosszú ideig is életképesek maradhatnak ilyen formában. Egyes fajok UV toleranciája tovább növeli a fertőzés veszélyét, mert a laboratórium légterének UV fertőtlenítése kevésbé hatásos esetükben). Az aeroszol képződéssel járó műveleteket célszerű emiatt biológiai biztonsági fülkében végezni, valamint a fertőzött felszerelést (pl. pipettahegy) pedig fertőtlenítőszer oldatba helyezni. A fertőzött aeroszol cseppek és cseppmagok képződése miatt előírás a mikrobiológiai laboratóriumokban a felületek rendszeres fertőtlenítőszeres tisztítása.

Még az aeroszol képződés lehetőségének is minimálisra csökkentése a jó laboratóriumi munkavégzés alapja. Emiatt a kritikus mikrobák (pl. *Mycobacterium* spp.) átoltása esetében a szokásos gőzégővel történő oltókacs sterilizálás (leégetés) helyett leggyakrabban eldobható (egyszer használatos) oltókacsot alkalmaznak, vagy különleges elektromos kacs sterilizátort (kacs izzító kemence). A centrifugálás esetében pedig (különösen is a nagy fordulatszámon történő műveleteknél) megfelelően záró „aeroszol biztos” edényzet használata és szorosan záró rotorfedő alkalmazása is indokolt.

2.2 A fertőzés elhatárolás elve, a mikrobiológiai laboratórium berendezése és a legfontosabb laboratóriumi eszközök kiválasztásának szempontjai

A fertőző mikrobákkal végzett munka megköveteli a fertőzés kialakulását, terjedését megakadályozó „elhatárolási” gyakorlat alkalmazását. Az elsődleges elhatárolás, vagy a

fertőzés kialakulásának elsődleges gátja a fertőző ágens (minta, törzs, szemét, állat, anyag stb.) környezettől való elzárását jelenti. A tenyészedény (pl. vattadugóval zárt kémcső, Petri-csésze) jelenti az elsődleges elhatárolást. Az edény tudatos (pl. átoltás miatt), vagy véletlen (pl. gondatlan felfordítás) kinyitása fertőzési veszélyt, kitettséget jelent. Ilyen esetekben további elsődleges elhatárolást jelentő eszközök (pl. biológiai biztonsági fülke megfelelő légszűrője, elszívása) akadályozhatják meg a fertőzés tovaterjedését. A tenyészetek véletlen kiömlése után az érintett felületeket az előírásoknak megfelelően fertőtleníteni kell. Vagyis az elsődleges elhatárolási rendszer három elemű: i. biztosítani kell a fertőző ágens, anyag minimális térfogatban történő biztonságos tárolását; ii. meg kell teremteni a fertőzés kialakulását, terjedését gátló biztonságos munkavégzés feltételeit és iii. fertőtlenítési rendszabályok foganatosítása szükséges.

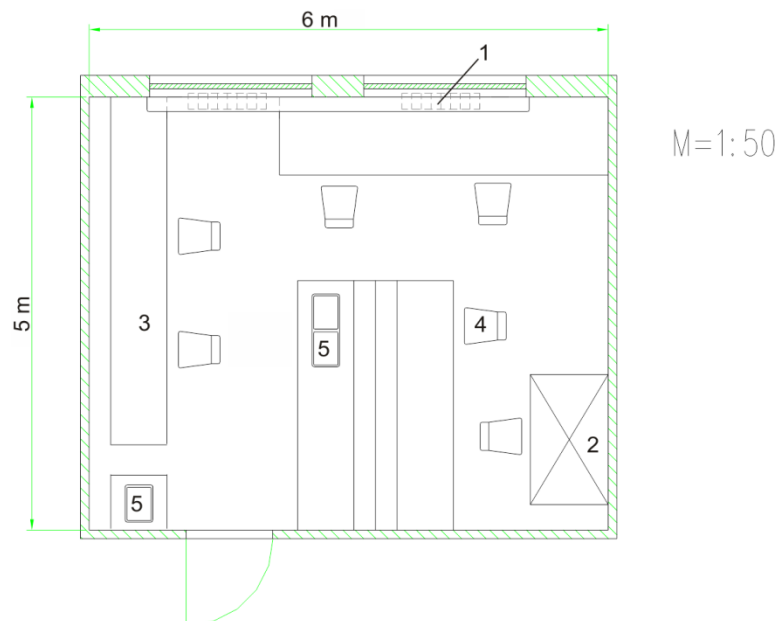
Az elsődleges elhatárolási rendszer hatásosságát fokozzuk megfelelő személyi védőfelszerelés használatával. Így megakadályozhatjuk a személyzet „érintkezését” (bőrfelületen, beléggzéssel) a fertőző ágenssel. A személyi védőfelszerelés leggyakrabban alkalmazott elemei a védőruházat (laboratóriumi köpeny, vagy kezeslábas, védőkötény, védőkesztyű), szemüveg, arcmaszk, légzésvédő maszk, egyszer használatos fej- vagy cipővédő stb. A személyi védőfelszerelést úgy kell megválasztani, hogy ne pusztán a biológiai (fertőzés) veszélyt csökkentse, hanem egyúttal a kémiai, fizikai veszélyek ellen is védjen (pl. toxikus vegyszerek, sugárzások). Legegyszerűbben az egyszer használatos védőkesztyű, vagy a védőköpeny megfelelő típusának kiválasztásával mutathatjuk be ezt a kérdéskört. A fertőzésveszély miatt legáltalánosabban alkalmazott butil gumikesztyűt a mikroszkopizálás során gyakorta használt xilol oldja, de a butil kesztyű nem véd a rákkeltő etidium-bromid DNS-festék, vagy a szintén rákkeltő benzol hatása ellen sem. Ilyen esetekben a megfelelő vastagságú ún. nitril kesztyűk alkalmazása hatásos. Hasonlóan fontos a hagyományos 100% pamutvászon védőköpeny használata, mert nehezen gyullad és a legtöbb laboratóriumi vegszerrel nem lép reakcióba. Elöl, gombolással történő zárása miatt azonban ruházatunkat nem védi tökéletesen. Az egyszer használatos háton záródó poliészter köpenyek elől talán jobban védenének, azonban használatuk hőre olvadó tulajdonságuk miatt tilos. Vagyis célszerű pl. háton záródó pamut anyagú védőköpeny viselete.

Az elsődleges elhatárolási rendszerek feladata tehát a személyzet és a közvetlen laboratóriumi környezet megvédése. A másodlagos elhatárolási rendszerek a tágabb (külső) környezetnek a laboratóriumból kiinduló fertőződése ellen védenek. A rendszer a laboratóriumok, épületek megfelelő kivitelezésének és működtetésének kombinációjából épül fel. Így a laboratóriumokat jellemezze egyszerű és átlátható felépítés, ahol a működtetés és karbantartás a lehető legkönnyebb. Legelőször is már a tervezés és a felépítés során figyelni kell a hosszú távon (akár 30 év) felmerülő helyiséggé igény biztosítására. A zsúfoltság (akár a személyzet, akár az eszközök terén) veszély forrása.

A kivitelezés során szem előtt kell tartani a laboratóriumi személyzet biztonságos munkavégzésének követelményét, az esetleges fertőzés terjedésének hatásos korlátozását, valamint a fertőzés és egyéb kialakuló veszélyes helyzetek kezelésének, felszámolásának lehetőségét. A mikrobiológiai oktató-kutató laboratóriumokat ezért el kell különíteni a kiegészítő feladatokat ellátó laboratóriumi helyiségektől (pl. táptalajkészítés, sterilizálás, mosogatás), valamint a működést segítő helyiségektől (pl. termosztát szobák, műszerszobák, mintaátvétel), a raktárektől és a dolgozószobáktól, vagy az ügyintézés színtereitől. A tervezés nehézségét ugyanakkor az jelenti, hogy a fizikailag különválasztott funkciókat ellátó helyiségeknek mégis egymás közelében, logikus rendben kell elhelyezkedniük. Az előbbieken felsorolt cél szerinti működést biztosító helyiségeken túl külön megfelelően felszerelt szociális helyiségeket kell biztosítani a dolgozók pihenésére, étkezésére; női és férfi öltöző, zuhanyzó és WC is kötelező. A folyosókon nem tárolható semmi (menekülési útvonal) és nem alakítható laboratóriummá, vagy kiegészítő feladatokat ellátó helyiséggé sem (pl. minta

átvétele). A fertőzésveszély elkerülése és a tűzvédelem előírásai ilyen esetekben „kéz a kézben” járnak.

Egy „kétablakos” általános mikrobiológiai laboratórium alaprajzát az 1. ábra alapján mutatjuk be. Megfelelő hely áll rendelkezésre a laboratórium alapfelszerelésének (pl. mikroszkóp, asztali centrifuga, vízfürdő, PCR berendezés) elhelyezésére. A laboratóriumi asztalok alatt szekrények, felettük szekrények és polcok biztosítják a munkához feltétlenül szükséges vegyszerek, üvegáru és fogyó eszközök, anyagok elhelyezését. Megjegyezzük, hogy a laboratórium nem raktár, a ritkán használt vagy felesleges eszközöket, anyagokat nem a laboratóriumban kell tárolni! A bejárat közelében kézmosó és mosogató található. A laboratórium ajtaja kifelé, a folyosóra nyílik. Az ajtó méretét célszerű a laboratórium felszerelési tárgyainak méretéhez alkalmazkodva megválasztani (legalább 1 m nyílás). A biológiai biztonsági fülke helyét az ajtótól és a fűtési, ill. légsere (szellőztető) rendszertől a lehető legtávolabb kell kijelölni, hogy működését a laboratóriumban várható légáramlások ne befolyásolják.



1. ábra Általános mikrobiológiai laboratórium alaprajza a biológiai biztonsági szekrény ideális elhelyezésével

1. fűtés-légsere, 2. biológiai biztonsági fülke, 3. laboratóriumi munkaasztal, 4. szék, 5. mosogató

A BSL-3 és BSL-4 szintű laboratóriumoknak sokkal szigorúbb előírásoknak kell megfelelniük. A teljesség igénye nélkül: nem nyitható ablakok, fekete-fehér öltöző és fertőtlenítő zuhanyzás biztosítása a laboratórium személyzetének be-, ill. kijutásához, zsilipelt anyagforgalom, légtömör ajtók, és megfelelő légnyomásviszonyok az egyes helyiségekben.

A laboratóriumokban könnyen tisztítható felületeket kell alkalmazni. A padló, a falak és a mennyezet esetében vízálló burkolat, ill. festés előírás, ahol a közmű (stb.) áttöréseket hasonló módon szigetelten kell kialakítani. Figyelni kell arra, hogy páralecsapódás, vagy egyéb okból (pl. csepegő hűtőszekrény, mosogató környéke) ne alakuljanak ki folyamatosan nedves felületek, mert ez kedvez a biológiai bevonatok képződésének. A laboratórium bútorzata esetében követelmény a tartós, erős, résmentes kialakítás. A takarítás megkönnyítésére a bútorzat lábon álló, az asztallapok felülete sav-, lúg- és oldószerhatásnak ellenálló, valamint hóálló legyen.

A laboratóriumi bútorzatban ki kell alakítani a megfelelően szerelt, védett közműcsatlakozásokat (220/240 V és 360/400 V elektromos, gáz, víz és csatorna). A laboratóriumi munkavégzést megkönnyíti a központi beépített, folyamatos „tisztított” (desztillált, vagy reverz ozmózzissal kezelt) víz, hűtővíz, sűrített levegő, vákuum hozzáférés,

valamint elszívó rendszer (vegyszeri fülke, vagy helyi elszívós munkahelyek toxikus illékony/kiporzó vegyszerekkel történő munkához) biztosítása. Mikrobiológiai laboratóriumok esetében ilyenkor is figyelni kell a fertőzések terjedésének a lehetőségére (pl. megfelelő szűrők, csapdák beépítésével). Különösen veszélyes kórokozók vagy vegyszerek, anyagok esetében közvetlen közműhálózatra csatolás helyett megfelelően kiépített helyi rendszereket kell használni. A mikrobiológiai laboratóriumokban is szükséges a kémiai laboratóriumok biztonsági felszereléseinek az alkalmazása, így pl. vészszuham beépítése, szemöblítő biztosítása, a gyúlékony és korrozív vegyszerek elkülönített tárolásának megoldása különleges szellőztetett szekrényekben.

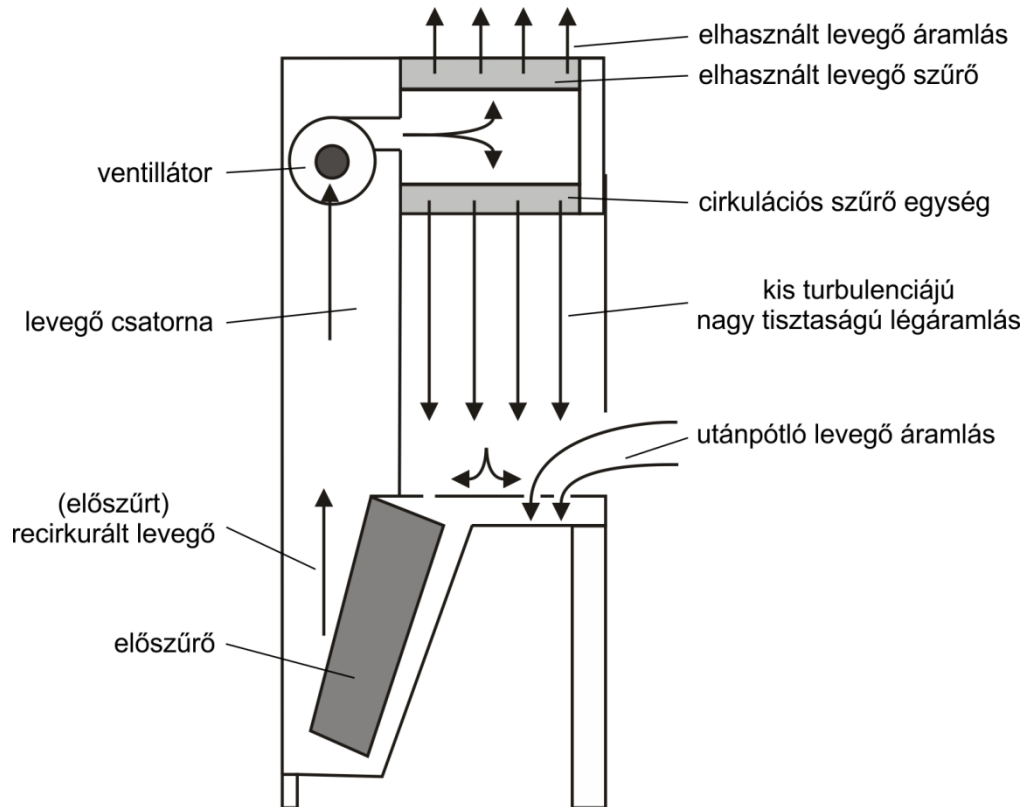
A mikrobiológiai laboratóriumok, ill. munkavégzés esetében gondolni kell a tenyészetek megfelelő hőmérsékleten történő tárolására. Meglehetősen nagy helyigénye van a termosztát szobáknak, vagy a megfelelő hőmérsékletű fűtött és hűtött tárolóknak, fagyasztószekrényeknek, akár folyékony nitrogénes tárolóknak (megfelelő hőmérsékletmérő és riasztó rendszerekkel felszerelve). A mikrobiológiai laboratóriumok további nagy helyigényű kötelező felszerelése a sterilizálást szolgálja: autoklávok, száraz hőlégmentesítő szekrények stb. A „tisztá” sterilizálás (tápközegek, tenyésztő edények, felszerelések) mellett külön rendszert kell biztosítani a fertőzött anyagok, eszközök ártalmatlanítására szolgáló sterilizálására. Így pl. az egyszer használatos műanyag tenyésztő edényekben létrehozott tenyészeteket autokláválni kell a szemétként kidobást megelőzően. A többször felhasznált eszközök mosogatását is megelőzi a sterilizálás. Nem feledkezhetünk meg a (mikro)biológiai oktató-kutató munkavégzés során az állat- és növénykísérletek fontosságáról sem. A lehetőség biztosításához állat- és növényházak fenntartása is szükséges. Ezek ismertetésével jelen jegyzetben nem foglalkozunk.

Vegyes használatú épületekben a mikrobiológiai laboratóriumokat lehetőleg jól el kell különíteni a bárki által látogatható területektől. Előnyös a be- és kilépés elektronikus nyilvántartása. Figyelni kell a mikrobiológiai laboratóriumok légterének, szellőző és légkondicionáló rendszerének a megfelelő leválasztására. Fertőzött levegő nem juthat át még egy szomszédos mikrobiológiai laboratóriumba sem, nem is említvén az épület többi részét. A laboratóriumok légkondicionáló, valamint szellőző rendszerét úgy kell kialakítani, hogy a keltett légáramlás ne zavarja a mikrobiológiai munkavégzést. A laboratóriumokban megfelelő hulladék elhelyezési és kezelési rendszert kell működtetni, amelyben rendelkezünk az átmeneti tárolás és a különböző hulladékfajták (kommunális, fertőző, kémiai, biológiai hulladék) kezelésnek módozatairól. Az épületüzemeltetés során figyelni kell a rovar- és rágcsalóirtásra.

2.3 Biológiai biztonsági fülke („lamináris box”)

A mikrobiológia „hőskorában” (egészen az 1960-as évekig) a legveszélyesebb (pl. aeroszol képzéssel járó) laboratóriumi műveleteket (pl. átoltás, szuszpenziók kezelése, centrifugálás) a laboratóriumokból leválasztott fülkékben (oltószoba) végezték, ahol a levegő fertőtlenítése UV fény segítségével történt. Ez jelentette az elsődleges elhatárolás rendszerét. A kémiai laboratóriumok biztonsági rendszere ugyanakkor már nagyon korán tartalmazta a biztonsági (vegyszeri) fülkéket. Ezek továbbfejlesztése vezetett végül a (mikro)biológiai biztonsági fülkék kifejlesztéséhez, amelyekben a zárt kialakítás lehetővé teszi a könnyű fertőtlenítést, ablak véd a freccsenő fertőzött folyadékoktól, repülő üvegszilánkoktól, valamint folyamatos légelszívás véd az aeroszol fertőzéstől (az elszívott levegőt is fertőtlenítik). Ma a biológiai biztonsági fülkéket általánosan használjuk. Három alapvető biztonsági szintjüket szokás megkülönböztetni és felszerelésük szervesen hozzátartozó eleme a HEPA szűrő (high efficiency particulate arrestance – nagyhatékonyságú részecske-visszatartás), amely különösen tiszta („részecskementes”, gyakorlatilag steril) levegőjű munkateret biztosít a szűrés és a lamináris áramlás kombinálásával. A HEPA szűrők működtetéséhez a

rendszerekben kellően kialakított ventilátorokat építenek be. A fülkék hulladék levegőjét leggyakrabban a laboratóriumba engedik, de vannak elszívó rendszerbe kötött típusok is. Megjegyezzük, hogy a hulladék levegőt legtöbbször HEPA szűrők segítségével dekontaminálják, ill. más biológiai veszélyek (pl. toxinok), vagy veszélyes kémiai anyagok eltávolítására aktív szén szűrőt építenek akár a berendezésbe, akár az elszívó rendszerbe.



2. ábra Kettes osztályú biológiai biztonsági fülke keresztmetszeti vázlata

A vegyi fülke kettős feladatot lát el: mind a dolgozót, mind pedig a környezetet védi (az elszívással, ill. az elszívott levegő szűrésével, hígításával). A HEPA szűrővel felszerelt biológiai biztonsági fülkék feladata is kettős. Védik a laboratóriumi műveletet, ill. a termék-előállítást (aszéptikus, ill. steril műveletet tesznek lehetővé a munkaterükben) és ugyanakkor az elsődleges elhatárolás eszközei (a fertőzött levegő nem jut ki a laboratóriumba). Megjegyezzük e ponton, hogy a nagy tisztaságú környezetben történő munkavégzés céljaira kifejlesztett függőleges, vagy vízszintes légáramlású rendszerek (gyakran használják ezeket biológiai laboratóriumokban is, pl. sejtenyészetek kezelésére) nem védik a dolgozót a fertőzéstől, sőt a művelet során a termékből stb. származó különböző fertőző, allergén, toxikus stb. anyagok szétterítése a laboratóriumban növelik kitétséget. Ilyen, különösen is a vízszintes légáramlású („szembefúvó”) rendszereket mikrobiológiai laboratóriumban tilos használni!

Az első biológiai biztonsági osztályú fülkék csak a dolgozót védik, nem feladatuk a termék, illetve a művelet védelmének biztosítása. A laboratórium levegőjét átszívják a fülkén, majd az elszívott levegőt dekontaminálják (HEPA/aktív szén stb. szűrővel), mielőtt a környezetbe kibocsátanák.

A BSL-1 és BSL-2 szintű laboratóriumokban leggyakrabban a nem elszívásos kettős osztályú biológiai biztonsági fülkéket használják, ahol a hulladék levegőt HEPA szűrőn át dekontaminálva visszajuttatják a laboratórium légterébe (2. ábra). Ezek a fülkék a dolgozót és a műveletet egyaránt védik. A 2a osztályú fülkében a ventilátorral forgatott levegő 70%-át recirkulálják és HEPA szűrőn keresztül a munkaterbe jut. A fennmaradó 30%-os levegő

térfogat úgyszintén HEPA szűrten a laborlevegőbe távozik. A munkaasztal peremén a rendszer (0,4 m/s áramlási sebességgel) 30% friss levegőt szív be. Így akadályozza meg a laboratórium levegőjének a fertőződését. Természetesen a rendszerből származó 70%-nyi szennyezett levegőt is elszívják a munkaasztalon át. Vagyis a berendezés a HEPA szűrőn keresztül részecskementes (majdnem steril) lefelé irányuló kevésbé turbulens (~ lamináris) légáramlást hoz létre a munkaasztal feletti légtérben. A „hulladék” levegő elszívása hatására a munkaasztal peremén a védőablak alatti munkanyílásban folyamatos befelé irányuló légáramlás alakul ki (a munkanyílás magasságát 20-30 cm közöttire kell beállítani használat közben). A berendezés működését zavarja minden olyan tárgy, eszköz, amely a szinte lamináris légáramlást turbulenssé teszi. Így pl. a munkatérben használt gázegő felfelé irányuló légáramlása működészavarhoz vezethet (csak a gyártó által ajánlott égők alkalmazhatók, kifejezetten csak a sterilizálási művelet idejére bekapcsolva), vagy a munkaasztalon szétszórt felesleges tárgyak is gátolják a megfelelő légáramlást.

A 2b osztályba sorolt biológiai biztonsági fülkékben a peremelszívás sebessége nagyobb (0,5 m/s) és a felesleges levegőt az épületen kívülre vezetik. Megjegyezzük, hogy a 2b rendszereknek többféle altípusát építik, akár olyanokat is, amelyek esetében az elszívott levegőt nem recirkulálják. Ilyen rendszereket használnak pl. a karcinogén anyagokkal végzett munkákhoz.

A 3 osztályú biológiai biztonsági fülkék a maximális elhatárolást teszik lehetővé, ez a BSL-4-es laboratóriumok felszerelése. Ilyenek pl. a kesztyűs benyúlású, elszívással ellátott fülkék. HEPA szűrés biztosítja a tiszta levegőjű munkatérrel, az anyagokat, eszközöket zsiliprendszeren keresztül juttatják a munkatérbe, az elszívott szennyezett levegőt pedig a szabadba juttatás előtt megfelelő rendszerekkel dekontaminálják.

A biológiai biztonsági fülkék munkatérében alapfelszerelés az UV lámpa. Ez teszi lehetővé munkaszünetben a légtér fertőtlenítését. A rendszerekben kiépíthető a laboratóriumi közműellátás. A munkatérben leggyakrabban gázcsap van, de egyéb célra is lehetnek szelepek (sűrített levegő, vákuum, víz stb.). Ezeket korrózióálló anyagokból kell kialakítani, hogy a vegyi hatásoknak ellenálljanak és szivárgásmentesen kell beszerelni. A fülkék valamennyi felszerelésének ki kell bírnia a szűrőcserét, vagy egyéb javítást megelőzően végzett formaldehid gáz (gőz) sterilizálást (a munkatérrel és a légiáratokat formaldehid gőzzel telítik).

A nagy fertőzésveszéllyel járó laboratóriumi (vagy ipari) műveletek (centrifugálás, tömegtenyésztés fermentorban, egyes autoklávok, keverő és feltároló rendszerek, állatkísérletek stb.) esetén gyakorta ezek köré épített biológiai biztonsági rendszerek, nagy tisztaságú munkahelyek, területek kialakításával oldható meg a kellő biztonság.

2.4 Viselkedés és munkavégzés a mikrobiológiai laboratóriumban

A jó laboratóriumi eljárások (GLP) és a felelősségteljes viselkedés a laboratóriumban önmagában is alkalmas lehet a legtöbb munkavégzéshez kapcsolódó fertőzés megelőzésére. A második biológiai biztonsági szintű laboratóriumokban kötelező és ugyanakkor az alapszintű laboratóriumokban ajánlott alapvető biztonságos mikrobiológiai munkavégzési előírásokat, eljárásokat a következőkben ismertetjük.

- A laboratóriumi gyakorlatokat megelőzően a hallgatóknak munkabiztonsági oktatást kell tartani, amelyben felhívják figyelmüket a lehetséges veszélyekre, valamint a megelőzési eljárásokra. Az általános oktatást kiegészíti a (fertőzés)veszélyes eljárások, műveletek végzését közvetlenül megelőző emlékeztető, ismétlő figyelmeztetés. A laboratórium munkatársai esetében a munkakörbe belépéskor és évi rendszerességgel ismétlődő munkabiztonsági, a veszélylépcsőkre kiterjedő oktatás tartása kötelező. Ilyenkor fel kell hívni a figyelmet az esetleges jogszabályi változásokra, az új műszerekkel, eljárásokkal kapcsolatos veszélyekre, sőt különösen veszélyes műveletek esetében nem fertőző ágenssel végzett

gyakorló munkavégzés is indokolt. Az oktatás megtörténtét a törvények, rendeletek, helyi szabályzatok előírásai szerint dokumentálni kell.

- A laboratóriumban - különösen a mikróbatenyészetekkel végzett munka időszakában - csak az oda beosztott személyzet és hallgatók tartózkodhatnak. A fokozott fertőzésveszélynek kitett (pl. terhes és szoptató anyák, gyengült immunállapotú) személyek kizárhatók a laboratóriumi munkavégzésből!

- Köpeny (100% pamutvászonból készült) viselése kötelező, ezen kívül további egyéni védőfelszerelés használata fontos. Védőkesztyű viselése kötelező kézsérülés esetén. A megfelelő kritikus műveleteknél laboratóriumi védőszemüveg, -maszk és kötény viselése előírás. A gyakorlat, ill. a laboratórium felelős vezetője felhívását mindig figyelembe kell venni! Az egyéni védőfelszerelést le kell venni és a kijelölt helyére kell tenni a laboratórium elhagyásakor. A védőfelszerelést a gyakorlat végén ki kell dobni, vagy az intézményben mosni, vasalni, fertőtleníteni kell.

- A hosszú haját be kell kötni, laza, lebegő ruhát becsukni, összefogni. A mikrobiológiai laboratóriumban viseljük zárt cipőt. Az ápolt, levágott köröm is segít a fertőzés megelőzésében.

- Ne végezzünk veszélyes munkát egyedül a laboratóriumban, mindenképpen legyen jelen a szűkebb laboratóriumi környezetben riasztható, segítő munkatárs. A fertőző anyagokkal mindig különleges figyelemmel kell dolgozni. A fertőző, veszélyes anyagokkal, eszközökkel történő munkavégzést, műveleteket előre tervezzük meg. Minden esetben alkalmazzuk és tartjuk be a kiömlés, lecseppenés elkerülésére, ill. a dekontaminálásra vonatkozó előírásokat. Minden műveletet óvatosan végezzünk, hogy elkerüljük az aeroszol képződést.

- A munkaasztal felületét munkavégzést megelőzően és azt követően is fertőtlenítsük.

- Tilos szájjal pipettázni! Használjunk a művelethez illő pipettázó felszerelést. Figyeljünk arra, hogy a pipettából ne cseppenjen ki folyadék. A pipettában levő folyadékot úgy eresszük ki, hogy a pipetta hegyét hozzáérintjük valamilyen „felülethez” (pl. kémcső fala). Fertőző anyag pipettázása során tilos a pipetta(hegy) „kifújása”, mert aeroszol képződik. Különösen figyelni kell éles tárgyak (fecskendőtü, szike, törött üvegedény stb.) használata esetén.

- Tilos beszélni a tenyészetekkel történő munkavégzés során, legfeljebb a legszigorúbban szükséges esetben (pl. segítségkérés) lehet. Tartózkodjunk a munkát megzavaró viselkedéstől, tréfáktól. Minden olyan esemény veszélyes, amely a munkavégzéstől elvonja a figyelmet!

- A munka végeztével mossunk kezet. A kézmosás egyes műveletek után is hasznos. A laboratóriumban tilos étkezni, inni, dohányozni, vagy „piperézkedni” (kozmetikumok használata). Ne vegye a szájába a tollat, ceruzát, vagy egyéb tárgyakat. Tilos a laboratóriumban élelmiszert tárolni. A laboratóriumban ne végezzen kontaktlencséjével „műveleteket” (ki-, vagy behelyezés, igazítás). A mennyiben kontaktlencsét visel, használjon védőszemüveget vagy álarcot.

- A tenyészeteket, fertőzött tárgyakat, anyagokat kidobás előtt dekontaminálni (pl. autoklávozással) kell. A hulladékot a laboratóriumon kívüli dekontaminálásra szivárgásmentes, fedeles edényekben kell gyűjteni, és zárt tartályokban, zsákokban szállítani az ártalmatlanító autoklávozásra.

- A tenyészetek kiömlését, egyéb baleseteket azonnal jelenteni kell a laboratórium/gyakorlat vezetőjének.

- A vegyszeres edényeken, tenyészeteken, egyéb felszerelésen a tartalmat megfelelő felirattal kell jelölni. A munkafelületeket mindig tartjuk tisztán, a felesleges eszközöket rakjuk el. A szükséges eszközöket a használat sorrendje által megkövetelt rendben helyezzük el.

- A mikrobiológiai laboratóriumban tenyészetekkel történő munkavégzés során szinte mindig használjuk a gázégőt (Bunsen-égőt). A műveletek között az üvegedények száját, a kupakokat stb. mindig égessük le.

A mikrobiológiai laboratóriumokban a legváltozatosabb vegyi anyagokkal dolgoznak (pl. oldószerek, savak, lúgok, karcinogén szerek, mutagén anyagok), amelyek a kémiai veszélyek sokaságát jelenthetik. Különös figyelmet kell fordítani a vegyszerek megfelelő, biztonságos használatára. A laboratóriumokban csak az aktuális munkához szükséges mennyiségű vegyszert tarthatjuk. A használt vegyszerekről a laboratórium, vagy egység (tanszék) szintjén vezessünk készletnyilvántartást (leltár) és különösen veszélyes vegyszerek esetében csak a legszükségesebb mennyiséget tároljuk. A laboratóriumban hozzáférést kell biztosítani az egyes vegyszerek, anyagok biztonsági adatlapjához.

A következőkben csak az alapvető, legfontosabb kémiai laboratóriumi biztonsági előírásokat soroljuk fel:

- Ismerjük az egyes vegyi anyagok biztonsági kockázatait jelölő figyelmeztető és azonosító jeleket, amelyet a csomagoláson feltüntetnek (pl. akut mérgező anyag, oxidálószer, gyúlékony vegyszer). A laboratóriumban csak a legkisebb szükséges mennyiséggel dolgozunk. Figyeljünk arra, hogy a vegyszerek ne kerüljenek a bőrfelületünkre. Tilos a vegyszereket megszagolni!

- Az elektromos laboratóriumi berendezések használatánál tartsuk be a biztonságos használatra vonatkozó előírásokat!

- Illékony anyagokkal vegyi fülkében, megfelelő elszívás mellett dolgozunk!

- Mielőtt a laboratóriumban munkához látunk, azonosítsuk a helyiség biztonsági felszereléseinek (pl. vészszuhany, szemmosó felszerelés, elsősegély szekrény) helyét, az eszközök használati módját. Figyeljünk az egyes laboratóriumok ajtaján, vagy egyes eszközökön elhelyezett, a személyi védőfelszerelések viselésére figyelmeztető jelek és feliratok utasítására, használjuk az előírt felszerelést.

- Higanyt, vagy egyéb toxikus nehézfémeket tartalmazó, valamint gyúlékony, toxikus stb. anyagokat tilos a lefolyóba kiönteni! Tartsuk be a hulladék-elhelyezési előírásokat, használjuk a megfelelő külön gyűjtőedényeket!

- Figyeljünk az égési sérülések megelőzésére! Forró berendezések (pl. autokláv, hőlégmentilizátor), vagy nyílt láng (Bunsen-égő) mellett különös óvatosság indokolt. Égési sérülést okoz a szárazjég, vagy cseppfolyós nitrogén is. Szárító, vagy égető kemencét, főzőlapot hőszigetelő alátétet kell elhelyezni, működtetni. Használjunk megfelelő védőfelszerelést, ha sűrített levegővel, vagy vákuummal dolgozunk (pl. szűrésnél), így pl. védőkosarat.

- Mindig viseljük szem-, ill. arcvédő felszerelést, amikor UV fényt alkalmazunk (pl. transzilluminátort DNS munkáknál)!

- Az egyedi laboratóriumi berendezések használatánál (pl. autoklávok, centrifugák, vákuum szárító berendezés) először olvassuk el a használati utasítást (a berendezésre rögzített „egylapos” utasítást minden körülmények között). Tartsuk be az utasításban leírtakat! Ha kétség merülne fel, kérdezze meg a gyakorlat/laboratórium vezetőt.

- Tartsuk be a laboratóriumi palackos gázok használati előírásait. A palackokat megfelelően rögzítve, függőleges helyzetben használjuk. Az üres, vagy nem használt palackokat tilos a laboratóriumban tárolni. A palackok csatlakoztatásánál figyelembe kell venni a műszer használati utasításában rögzített előírásokat (pl. oxigéngáz esetében tilos a kenőanyagok használata).

- A mikrobiológiai laboratóriumokban rendszeresen használunk nyílt lángot (pl. oltókacs sterilizálására, szélesztőbot alkoholos leégetésére). Ne hagyjunk éghető anyagokat a nyílt láng közelében.

- A laboratóriumban ki kell helyezni a biztonsági felszerelések (pl. tűzoltópalack, elsősegély felszerelés) helyét jelölő, a biztonsági figyelmeztetéseket (pl. biológiai veszély, viseljen UV védő maszkot), valamint a vészhelyzeti telefon hívószámokat tartalmazó jelzéseket.

- A laboratóriumban annak tűzbiztonsági szintjének megfelelő tűzoltókészülék(ek) elhelyezése kötelező. Figyeljük meg munka előtt a tűzoltókészülékek elhelyezkedését és ismerjük meg a berendezések használati módját. Nagyobb tűz kialakulása esetében értesítsük a laboratórium/gyakorlat vezetőjét és/vagy hívjuk a tűzoltóságot (105), vagy az európai egységes segélyhívószámot (112). A 2.4.3 pontban részletezett módon járunk el.

- Amennyiben bőrre erős sav, vagy lúg cseppen, azonnal bő vízzel öblítse le. Savak esetében 3%-os nátrium-hidrogénkarbonát (nátrium-bikarbonát), lúgok esetében pedig 3%-os bórsav oldatot használjunk a semlegesítésre. Ezt követően végezzünk szappanos kézmosást. Ha égést okozott a sav, vagy lúg, járunk el a 2.4.3 pontban leírtak szerint. A szembe freccsent sav esetében 2%-os borax (nátrium-tetraborát) oldattal végezzünk szemöblítést, majd pedig ezt fiziológiás sóoldattal öblítsük ki. Lúg szembe fröccsenése esetén 2%-os bórsav oldattal öblítsünk, majd ezt követően használjunk fiziológiás sóoldatot. Feltétlenül szemorvoshoz kell fordulni!

- A munka során bekövetkezett balesetet, váratlan, veszélyes eseményeket azonnal jelenteni kell a gyakorlat/laboratórium vezetőjének. A munkavégzésből történő kieséssel, táppénzzel járó baleseteket jelenteni kell az intézmény munkabiztonsági megbízottjának, jegyzőkönyvet kell felvenni és az eseményt ki kell vizsgálni. Életveszélyes helyzetek esetében a baleset helyszínét - lehetőség szerint - érintetlenül kell hagyni a helyszíni kivizsgáláshoz.

2.4.1 Tennivalók fertőző biológiai anyag (2-es rizikócsoporthú mikroba) kiömlése esetén

- Figyelmeztessük a kiömlés közvetlen környezetében dolgozó munkatársakat, majd jelentsük az eseményt a laboratórium/gyakorlat vezetőnek.

- Vegyünk fel megfelelő személyi védőfelszerelést (pl. védőkesztyű, szemüveg, kötény)!

- Fedjük be jó nedvszívó képességű anyaggal a kiömlött anyagot (pl. papírvatta).

- Öntsünk frissen készített vizes nátrium-hipoklorit oldatot (2-5%; háztartási hipó) a papírvattára a peremektől közép felé haladva. Kerüljük el a freccsenést!

- Hagyjunk 20 perc behatási időt!

- Szedjük a papírvattát szemeteszsákba, használjunk friss papírvattát a felület gondos feltörlésére. Ügyeljünk arra, nehogy a szennyezést ne szétkenjük. A feltörlést a szélektől a szennyezett terület közepe felé haladva végezzük.

- Tisztítsuk meg az érintett területet általános laboratóriumi fertőtlenítőszerrel is, majd „mossuk fel”.

- A hulladékot autoklávozással sterilizáljuk.

2.4.2 Fertőtlenítő kézmosás és fertőtlenítő mosdás

Ha bármely okból kimegyünk a laboratóriumból (pl. munka végén, étkezés/dohányzás céljából, mellékhelyiségbe), mindig mossunk kezet. Mossunk kezet akkor is, ha a biológiai biztonsági fülkében befejeztük a munkavégzést, vagy fertőzés következhetett be. A fertőtlenítő kézmosás általános menetét a következőkben foglaljuk össze.

- Először fertőtlenítsük a kezünket: pár milliliternyi fertőtlenítőszerrel egyenletesen oszlassunk el a kezünkön. Figyeljünk az ujjak közötti területekre és amennyiben szükség van rá, az alkart is fertőtlenítsük! Hagyjuk a kezünkön a fertőtlenítőszerrel az előírt behatási ideig (általában legfeljebb 5 perc; olvassuk el a fertőtlenítőszer leírását, vagy kövessük a gyakorlat/laboratórium vezető utasítását).

- Végezzünk gondos szappanos kéz- és alkarmosást meleg vízben.

- Szárítsuk meg a kezünket papírtörülközővel, vagy használjunk kézszáritót.

Amennyiben ruhánk, és/vagy más testtájunk fertőződik, először vegyük le a ruhát, majd testtájunkat az előbb ismertetett módon fertőtlenítsük és mossuk meg. A hámsérüléseket ezen felül megfelelő fertőtlenítőszerrel kell kezelni (pl. Betadine – polivinil pirrolidon-jód

komplex). Mélyebb sérülések, sebek esetében azonnal forduljunk orvoshoz. A fertőzött ruhát fertőtlenítőszeres áztatással, vagy más eljárással (pl. autoklávozás) kell csíramentesíteni.

A szembe freccsent fertőző anyagot tilos dörzsöléssel „szétkenni”! Azonnal öblítsük ki a szemet kézmeleg folyóvízzel, vagy fiziológiás sóoldattal. Amennyiben a szem sérülése is feltételezhető (pl. fertőzött üvegszilánk hatására), azonnal szemorvoshoz kell fordulni!

Abban a ma már szinte elképzelhetetlen esetben, ha a szájunkba jut fertőzött anyag, azt azonnal ki kell köpni (mosogatóba, vagy akár egy zsebkendőbe). Ezt követően öblítsünk szájat vízzel két-háromszor egymás után, majd végezzünk 1-2 perces toroköblítést („gargarizálás”) frissen készített 1%-os vizes hidrogén-peroxid oldattal. Használhatunk száj-, vagy torokfertőtlenítő készítményeket is. A fertőzött anyag lenyelésének gyanúja esetében teáskanálnyi húskivonat port oszlassunk el nyelvünkkel a szájüregünkben, majd nyeljük le. Végül pedig igyunk meg 8-10 ml 10%-os vizes sósavoldatot. Ne igyunk vizet! A húskivonat hatására a gyomorban beinduló intenzív fehérjeemésztés a mikrobákat is el fogja pusztítani. Forduljunk orvoshoz! Mérgező anyagok esetében aktív széntablettát oszlassunk el vízben (5-10 tablettát 10-20 ml vízben) és fogyasszuk el, és azonnal hívjuk a mentőket (104), vagy az európai egységes segélyhívó számot (112). Kövessük a 2.4.3 fejezet – Mérgezés részében írtakat!

2.4.3 Tennivalók veszélyhelyzetben és az laboratóriumi elsősegélynyújtás alapjai

A laboratórium kötelező felszereléseibe körébe tartozik az elsősegély szekrény, amelyet általában a mosdó környékén kijelölt helyen találhatunk. Az elsősegély szekrény felszerelésébe a következő anyagok tartoznak: steril kötszer (nedvszívó sebpárna, mull-lap, mull-pólya, nyomókötszer stb.), sebtapasz, olló, steril védőkesztyű, Betadine, aktív széntabletta, 10%-os vizes sósavoldat, 2 tömeg% bórsavoldat pipettás üvegben, 2 tömeg%-os boraxoldat pipettás üvegben, 3 tömeg%-os nátrium-hidrogénkarbonát oldat, húskivonat, szemmosó pohár/készlet. Célszerű, hogy legyen hozzáférhető (külső) defibrillátor legalább az épületben.

Veszélyhelyzetben maradjunk nyugodtak, őrizzük meg higgadságunkat. Figyelmeztessük a veszélyhelyzet környezetében levőket, hogy hagyják el az érintett területet. Értesítsük a laboratórium/gyakorlat vezetőt. Súlyos baleset esetén azonnal kezdjük meg az életmentő beavatkozást.

A mentőszolgálatot a 104-es, vagy 112-es (európai egységes segélyhívószám) telefonszámon lehet hívni. A mentőszolgálat hívásakor a következőképpen járjunk el.

- Mindenekelőtt is mutatkozzunk be, nevünk után adjuk meg annak a telefonnak a hívószámát, amelyről hívunk, ahol szükség esetén visszahívhatók vagyunk.
- Adjuk meg a baleset pontos helyét és ismertessük az épület elérhetőségét a telephelyen belül, valamint azt, hogy az épületben hogyan lehet a helyszínre jutni.
- Adjunk rövid, pontos leírást a veszélyhelyzet okáról, a körülményekről, a sérültek számáról és állapotukról (vérzés, égés, fájdalmak, eszméletlenség stb.).
- Jelezzük, amennyiben a tűzoltóság segítségére is szükség van (ez esetben nem szükséges őket külön riasztani, a mentőirányító fogja értesíteni őket).
- Ne tegyük le a telefont, mert a mentőirányító kérdéseket tehet fel, kiegészítő információt kérhet. Lényeges azt is tudnunk, hogy telefoni segítséget, eligazítást kaphatunk az elsősegélynyújtáshoz.

2.4.3.1 Tűzeset és égési sérülések

Mindenekelőtt is kíséreljük meg eloltani a tüzet. Amennyiben valakinek a ruházata, haja ég, használjunk tűzoltó takarót a tűz elfojtására. Az égő személy is segíthet a tűz elfojtásában: feküdjön le a földre és hemperegve gátolja az égést. Az égési sérülést szenvedett, égett bőrfelületet takarjuk le hideg vízzel megnedvesített mullal, vagy tartsuk

folyóvíz alá (pl. égett kézsérülést). Az égett felület mérete és az égés súlyossága szerint forduljunk orvoshoz, ill. hívjuk a mentőket. Az orvosi ellátásig, ill. a mentők megérkezéséig folytassuk a terület hűtését. Amennyiben a sérült öntudatlan i. ellenőrizzük a légzését, ii. nyissuk ki a száját a fej hatra billentésével és iii. alkalmazzon mesterséges lélegeztetést (pl. szájból szájba) (lásd a 2.4.3.6. - **Eszméletlen állapot** -szakaszt).

Égési sérülést okozhatnak vegyszerek is. Folyadékok esetén az érintett területet öblítsük le bő vízzel és távolítsuk el a szennyezett ruhát. Folytassuk az égett terület hideg vizes öblítését a mentők megérkezéséig. Amennyiben az égést szilárd vegyszer okozza, pl. pamut konyharuhával tisztítsuk le a ruháról, bőrről a vegyszert, majd távolítsuk el a ruhát is az érintett területekről és az előbbieken írtaknak megfelelően kezdjük neki az égési sérülés hűtésének hideg vízzel.

Áramütés esetén első feladat az áramtalanítás. Ha ez a vészkapcsoló segítségével nem lehetséges, akkor használjunk szigetelő anyagból készült tárgyakat a sérültnek az áramkörből történő eltávolítására (pl. fa, vagy műanyag eszközzel). Ezután kezeljük az áramütés okozta égést a korábbiak szerint.

A fagyás is égési jellegű sérülést okoz. Laboratóriumban elsősorban nagyon hideg tárgyakkal, folyadékokkal történő érintkezés (pl. folyékony nitrogén) okozhatja. Először távolítsuk el az érintett területről a ruhát, majd áztassuk a fagyott részt langyos (~ 40°C) vízben. A megmelegedett testrészt borítsuk steril mull lappal a mentők megérkezéséig.

2.4.3.2 Vérzéssel járó sérülések

Vigyázat, vérző vagy váladékozó személyek ellátásánál (vagy vérrel, váladékokkal szennyezett tárgyakkal dolgozva) mindig viseljük eldobható védőkesztyűt! A szennyezett tárgyak, felületek fertőtlenítéséhez alkalmazzunk megfelelő fertőtlenítőszer, pl. áztassuk egy órára háztartási hipóba, mielőtt a takarítást folytatjuk.

Külső vérzések ellátásakor gyakoroljunk folyamatosan határozott nyomást a sebre pl. nedvszívó nyomókötszer segítségével, vagy akár a kesztyűs kezünkkel. Egyidejűleg fordítsuk a sérültet olyan helyzetbe, hogy a vérző testrész a szív fölé emelkedjen (pl. a kezét emeljük fel). Erőteljes vérzésnél fektessük le a sérültet és lábait emeljük fel mintegy 30 cm magasra. Ne adjunk a sérültnek enni, vagy inni! A sérülés mértékétől függően intézkedünk a szakorvosi ellátás (mentők) iránt.

A belső vérzés életveszélyes állapotot is jelenthet. Vér hányása, vagy vér felköhögése (vér jelenléte a vizeletben, vagy székletben) egyaránt a belső vérzés jelei. Fektessük le a sérültet és lábait támasszuk fel mintegy 30 cm magasra. Ne adjunk a sérültnek enni, vagy inni! Kérjük a mentők segítségét!

2.4.3.3 Mérgezés

Amennyiben feltételezhető, hogy valaki mérgező anyagot nyelt, azonnal hívjunk mentőt és kérjük segítséget. A Nemzeti Népegészségügyi Központ keretében működik az ingyenes zöld számon (06-80-201-1199) a nap 24 órájában hívható Egészségügyi Toxikológiai Tájékoztató Szolgálat (NNK – ETTSZ), ahol a kérdéses vegyszer hatásairól, valamint a teendőkről egyaránt érdeklődhetünk. Budapesten a Péterfy Sándor Utcai Kórház – Rendelőintézet és Baleseti Központ, Sürgősségi Betegellátó Osztály és Klinikai Toxikológia részlege (36-1-3-215-215) is hívható.

Amennyiben a sérült eszméletlen, fekszik és hány, fektessük az oldalára és meg kell tisztítani a száját, a garatot a hányadéktól. Egyidejűleg ellenőrizzük a légzését! Ha nem észlelünk légzést, kezdjük mesterséges lélegeztetést maszkos-ballonos lélegeztetővel. Tegyük félre minden olyan tárgyat, anyagot, amely a mérgező anyag azonosítását elősegítheti.

2.4.3.4 Teendők görcsroham kialakulása esetén

Különböző okok vezethetnek roham (görcsös rángásokkal, zavartsággal, eleséssel, eszméletvesztéssel járó „esemény”) kialakulásához, pl. mérgezés, magas láz, epilepszia. Roham alatt győződjünk meg arról, hogy az érintett nem sérti meg magát valamiben (fej védelme), segítsünk ruházatának meglazításában. Kíséreljük meg lefektetni és oldalára fordítani. Beszéljünk az érintetthez és próbáljuk megnyugtatni. A roham közben az érintett akár csak időnként is, de felfogja, felfoghatja a beszédet és még irányítható, segíthető is. Ne hagyjuk egyedül! Amennyiben a roham rövid idő alatt (4-5 perc) nem enyhül, hívjuk a mentőket. Rohamok során előfordulhat lélegzetkihagyás is. Amennyiben nem tér vissza az érintett légzése, alkalmazzunk mesterséges lélegeztetést, ahogyan az az **Eszméletlen állapot** (2.4.3.6. szakasz) ellátásánál olvasható.

2.4.3.5 Fulladás, nehézlégzés, légszomj

A légzés 3-4 perces kiesése a légutak elzáródása következtében életveszélyes helyzetet teremt.

Amennyiben a „fulladozó” személy tud beszélni és köhög, ne avatkozzunk be. Ha a fulladás nem szűnik, a helyzet nem enyhül, végezzünk 3-5 erőteljes ütést az érintett hátára a lapockák között. Távolítsuk el az ételmaradékot a szájból. Amennyiben ez nem segít, alkalmazzuk az ú.n. Heimlich-féle műfogást. Álljunk a sérült mögé és két karunkkal fogjuk át a mellkasa alatt. Egyik kezünket szorítsuk ökölbe és helyezzük a sérült szegycsontja és köldöke közti területre, majd másik kezünkkel ragadjuk meg ökölbe szorított kezünket. Hirtelen mozdulattal rántsuk fel és hátrafelé a sérültet, így alkalmazva gyomortáji nyomást. A fulladási tünetek megszűnéséig alkalmazzuk a két eljárását felváltva.

Amennyiben a személy eszméletét veszti, segítsük a padlóra és fordítsuk oldalfekvésbe. Folytassuk a hát „verését”. Távolítsuk el a szájából az ételmaradékot, majd fordítsuk a hátára a sérültet és a szegycsontra gyakorolt gyors nyomásokkal (2-4 alkalom) kíséreljük meg segíteni rajta. Hívjuk a mentőket!

2.4.3.6 Eszméletlen állapot

Az eszméletlen állapot különböző betegségek, illetve sérülések következtében alakulhat ki. Eszméletlen állapotban a sérült légzése és keringése működik, de nem tudunk kapcsolatot létesíteni az érintettel. Legelőször is kíséreljük meg beszélni a sérülttel. Ennek érdekében vállainál fogva rázzuk meg és kiáltsunk rá. Csak akkor rázzuk a sérültet, amennyiben nincs gerincsérülése. Stabilizáljuk a sérült állapotát oldalfekvésben, valamint a száj- és garatüreg kitisztításával biztosítsuk a szabad légzést, és takarjuk be, nehogy kihűljön.

Rendszeresen ellenőrizzük a légzést részben a légzési hangok (szuszogás) megfigyelésével, illetve a mellkas mozgásának kontrollálásával. Ellenőrizzük a szívműködést, ill. a keringést is a pulzus tapintásával. Két vagy három ujjunkkal a nyakon az ádámcsutka mellett a nyaki ütőér tapintása a legbiztosabb. Ha a sérült nem lélegzik, kezdjük meg a lélegeztetést maszkos-ballonos lélegeztetővel.

A pulzus hiányában azonnal hívjunk külső szívkompressziós beavatkozásban gyakorlott személyt. Az ELTE Természettudományi Kar Lágymányosi Kampusz Déli Épületében (Pázmány Péter sétány 1/c.) az Északi Portán félautomata külső defibrillátor berendezés rendelkezésre áll. A berendezés utasításai szerint járjunk el, ill. felváltva folytassuk a lélegeztetést és a külső szívkompressziót a mentők megérkezéséig.

2.4.3.7 Szívinfarktus, szívroham

A szívinfarktus tünetei i. a szorító mellkasi fájdalom, ii. légszomj, iii. erőteljes izzadás; iv. émelygés, hányinger és hányás; v. szédülés, bágyadság, gyengeség érzése; vi.

szorongás. Amennyiben a tünetek bármelyike felmerül, hívjunk mentőt azonnal. A mentő kiérkezéséig lazítsuk meg az érintett ruháit és ismételten biztosítsuk, hogy a mentők már úton vannak. Ültessük le a sérültet, hogy a légzését könnyebbé tegyük. Bízassuk nyugodt légzésre.

Amennyiben a sérült elveszti az eszméletét, ellenőrizzük a légzés és a keringés meglétét. Kérjünk segítséget megfelelően képzett személytől és használjuk a félautomata külső defibrillátort (lásd előbb).

2.5 Minőségirányítási rendszer a mikrobiológiai laboratóriumban

2.5.1 A minőség, mint a szolgáltatás alapja

A minőségi szolgáltatás célja, hogy a szervezet az általa nyújtott szolgáltatásban, termék előállításakor a minőségi követelmények teljesítésével megteremtse a bizalmat a vevőben. A minőségi szolgáltatásnak részei a minőségirányítás, a minőség-ellenőrzés, a minőségszabályozás valamint a minőségpolitika.

A minőségirányítás egy szervezet felső vezetése által szervezett és tervezett, erőforrásokkal támogatott, a vevők megelégedését célzó minőségirányítási rendszer kialakítása és működtetése. Ennek a stratégiának része az állandó felügyelet alatt, rendszeresen végzett minőség-ellenőrzés.

A minőség-ellenőrzés célja a termékek, szolgáltatások megfelelőségének vizsgálata. A termékek, szolgáltatások megfelelősége az a tulajdonság, hogy a jellemzők mennyire felelnek meg a vonatkozó jogszabályok (nemzetközi-, nemzeti szabványok, szakmai előírások, helyi eljárási rendek, útmutatók), szerződések, ellenőrzési utasítások, dokumentációk és a vevők követelményeinek.

A minőségszabályozás a minőségi követelmények teljesítésére alkalmazott eszközöket, módszereket és tevékenységeket foglalja magába.

A minőségpolitika egy szervezet működési területén, fejlesztési irányában a vevők megelégedése érdekében kifejtett minőségbiztosítási törekvések, fejlesztések meghatározása.

Az MSZ EN ISO 9001:2015 szabvány szerinti minőségirányítási rendszer az alábbi alapelveket határozza meg:

Vevőközpontúság

Vezetőség elkötelezettsége a jó minőség elérésében

Munkatársak bevonása

(a dolgozók legyenek érdekelték a minőségi munka megvalósításában)

Folyamatközpontúság (nem szakaszaiban nézzük a tevékenységeket)

Rendszerszemléletű irányítás

(globálisan kell átlátni a folyamatokat, nem a részleteket kiragadva)

Folyamatos tökéletesítés

(ellenőrzés, mérés, visszajelzések gyűjtése a jobbítás érdekében)

Tényszerű döntéshozatal

(adatgyűjtésre és elemzésre alapozott döntéshozatal)

Kölcsönösen hasznos szállítói kapcsolatok

(beszállítókkal jó munkakapcsolatokra kell törekedni)

2.5.2 Az akkreditálás

Az akkreditálás annak hivatalos elismerése, hogy egy szervezet, természetes személy alkalmas bizonyos megfelelőségértékelési tevékenységek (vizsgálat, kalibrálás, mintavétel, tanúsítás, ellenőrzés stb.) elvégzésére. Az akkreditálás célja az egységes európai elvekre épülő akkreditálási rendszerekben elismerést nyert szervezetek iránti bizalom növelése, a vizsgálati, tanúsítási és ellenőrzési tevékenység megbízhatóságának emelése, a vizsgálati eredmények és tanúsítványok kölcsönös elfogadásának elősegítése, megteremtve ez által az ismételt

vizsgálatok ki-küszöbölését és a kereskedelem műszaki akadályainak elhárítását. Az Európai Parlament és a Tanács 765/2008/EK rendelete (2008. július 9.) alapján az akkreditálás célja egy szervezet megfelelőség-értékelési tevékenységek elvégzésével kapcsolatos felkészültségének hiteles megállapítása. Az akkreditálás az alkalmazandó követelményeknek való megfelelőség értékelésére és biztosítására irányuló átfogó rendszer része, amelybe beletartozik a megfelelőségértékelés és a piacfelügyelet is.

Az Országgyűlés annak érdekében, hogy biztosítsa az európai és a nemzetközi gyakorlatnak megfelelő hazai akkreditálási rendszer működését, az akkreditálás, mint közhatalmi tevékenység ellátását, a megfelelőségértékelésre vonatkozó nemzetközi megállapodások végrehajtását, valamint elősegítse a magyar nemzetgazdaság szereplői versenyképességének növelése és a kereskedelem indokolatlan műszaki akadályainak elhárítása érdekében a termékek és szolgáltatások többszöri megfelelőségértékelésének kiküszöbölését, a nemzeti akkreditálásról megalkotta a 2015. évi CXXIV. törvényt, mely hatályon kívül helyezte a 2005. évi LXXVIII. törvényt. A Nemzeti Akkreditáló Hatóságról (a továbbiakban: NAH) és az akkreditálási eljárásról a 424/2015. (XII. 23.) Korm. rendelet, az Akkreditálási Tanácsról a 1956/2015. (XII. 23.) Korm. határozat rendelkezik (<http://nah.gov.hu/>).

Az akkreditált státusz megszerzése egy szervezet számára előnyt jelent, hiszen ezáltal általában nő a vevők bizalma a szervezet eredményeinek megbízhatósága, pontossága tekintetében mind hazai mind nemzetközi viszonylatban, ami a szervezethez érkező megbízások számának emelkedéséhez és a vevők körének bővüléséhez vezethet. Az akkreditálás ugyanakkor megnöveli a szervezet üzemeltetési költségeit a minőségirányítási rendszer bevezetése és működtetése, valamint az akkreditálási és felügyeleti eljárások költségei miatt.

Az akkreditáló szervhez (NAH-hoz) akkreditálás iránti kérelmet vizsgálólaboratórium, mintavevő szervezet, kalibrálólaboratórium, jártassági vizsgálatot szervező szervezet, terméktanúsító szervezet, irányítási rendszereket tanúsító szervezet, személyzettanúsító szervezet, ellenőrző szervezet (a hatóságok kivételével), referenciaanyag-gyártó szervezet, a környezetvédelmi vezetési és hitelesítési rendszert hitelesítő szervezet vagy természetes személy, az üvegházhatású gázok közösségi kereskedelmi rendszerében és az erőfeszítés-megosztási határozat végrehajtásában történő részvételtől szóló törvény szerinti hitelesítő szervezet nyújthat be. Az akkreditálás önkéntes és nyitott minden szervezet, illetve természetes személy számára, amely/aki tevékenységét pártatlanul és szakszerűen végzi, továbbá eleget tesz a felkészültségre vonatkozó követelményeknek.

Az akkreditálási eljárás értékelési és döntéshozatali szakaszból áll.

Az értékelési szakasz során az akkreditáló szerv szakértőként minősítőkből és az akkreditálási kérelemmel érintett területen szakértelemmel rendelkező személyekből álló értékelő csoportot rendel ki.

A döntéshozatali szakaszban az akkreditáló szerv határoz az akkreditálásról vagy az akkreditálás iránti kérelem elutasításáról. Az akkreditált státusz öt évre szól. Az akkreditáló szervnek az akkreditált státuszra vonatkozó határozata elismeri és igazolja, hogy a szervezet vagy természetes személy alkalmas meghatározott megfelelőségértékelési feladat elvégzésére.

Az akkreditált státusz 5 évre érvényes, azzal a feltétellel, hogy a szervezet a felügyeleti vizsgálatokon továbbra is megfelel az akkreditálás követelményeinek. Az akkreditált státusz alapjául szolgáló körülmények fennállását, valamint az akkreditált szervezet, illetve természetes személy alkalmasságát felügyeleti vizsgálat keretében, indokolt esetben rendkívüli felügyeleti vizsgálat keretében ellenőrizni kell. A felügyeleti vizsgálati eljárás is értékelési és döntéshozatali szakaszból áll. Az akkreditált szervezet az első felügyeleti vizsgálat iránti kérelmet az akkreditált státusz első megadásától számított egy éven belül, azt

követően legfeljebb két évente köteles benyújtani úgy, hogy a helyszíni szemlék között két évnél hosszabb idő nem telhet el.

A Nemzeti Akkreditáló Hatóság nyilvántartást vezet az akkreditált szervezetekről és természetes személyekről. Ez a nyilvántartás tartalmazza az akkreditált szervezetek és természetes személyek nyilvántartási számát, az akkreditált szervezetek, szervezeti egységek cégnevét és természetes személyek nevét, az akkreditált szervezetek, szervezeti egységek székhelyét, telephelyeit és természetes személyek lakóhelyét, az akkreditált tevékenységet és tevékenységi területet, az akkreditált státusz kezdeti és lejáratú időpontját. A nyilvántartást az akkreditáló szerv a honlapján közzéteszi (<http://nah.gov.hu/>).

A Nemzeti Akkreditáló Hatóság NAR jelzéssel általános, illetve a különféle szervezetek akkreditálására vonatkozó specifikus szabályzókat dolgozott ki és alkalmaz (pl. NAR-01, Az akkreditálási, bővítési, rendkívüli felügyeleti és felügyeleti vizsgálati eljárás értékelési szakaszának szabályzata).

A mikrobiológiai vizsgálólaboratóriumok előkészítését az akkreditálási eljárásra a „Vizsgáló- és kalibrólaboratóriumok felkészültségének általános követelményei (ISO/IEC 17025:2017)” című MSZ EN ISO/IEC 17025:2018 hivatkozási számú szabvány szabályozza.

A szabvány olyan műszaki (technikai) dokumentum, amely egy tevékenységre vagy annak eredményére vonatkozik, és olyan általános és ismételten alkalmazható szabályokat, útmutatókat vagy jellemzőket tartalmaz, amelyek alkalmazásával a rendező hatás az adott feltételek között a legkedvezőbb. A szabványok mindig egy elismert szervezet által alkotott vagy jóváhagyott, közmegegyezéssel elfogadott dokumentumok. A magyar szabványokat az 1995. évi XXVIII. törvény szabályozza. Hazánkban a Magyar Szabványügyi Testület a szabványosítás letéteményese. A szabványosítás a felhasználó és a fogyasztó érdekében végzett szabályozó, egységesítő tevékenység. A szabványosítás fő célja a rendszeresen ismétlődő műszaki-, gazdasági feladatokra egységes és következetes megoldási módok alkalmazása. A szabványosítás tárgya a termelés korszerűsítése, a szolgáltatások színvonalának javítása általános, ismételten alkalmazható eljárások, műszaki megoldások kibocsátásával. A nemzetközi szabványosítás célja a nemzetgazdasági igények érvényesítése, a kereskedelem műszaki akadályainak elhárítása, műszaki fejlesztés eredményeinek széleskörű bevezetése, az élet, az egészség, a környezet, a vagyon, a fogyasztói érdekek védelme és biztonsága, a megfelelés tanúsítás követelményrendszerének kialakítása.

2.5.3 Minőségirányítás a mikrobiológiai laboratóriumban

Az akkreditálási eljárást megelőzően a mikrobiológiai vizsgálólaboratóriumnak ki kell dolgoznia a saját minőségirányítási rendszerét. A minőségirányítási rendszer jó működéséhez nélkülözhetetlen a felső vezetés elkötelezettsége és részvétele a laboratórium akkreditálásának előkészítésében és lebonyolításában, továbbá szükséges a minőségirányításért felelős megfelelő képzettséggel rendelkező személy kiválasztása és a laboratóriumi személyzet tájékoztatása és bevonása a folyamatba.

A vizsgálólaboratóriumok minőségirányítását meghatározó általános követelmények (pártatlanság, bizalmasság) arra irányulnak, hogy a laboratóriumi szervezet, erőforrások (beleértve a személyzetet, a létesítményeket és környezeti körülményeket, a berendezéseket, a metrológiai visszavezethetőséget, a külső forrásból biztosított termékeket és szolgáltatásokat), folyamatok (melyek magukban foglalják az ajánlatkéréseket, a módszerek kiválasztását, a mintavételt, a vizsgálati minták kezelését, a műszaki feljegyzéseket, a mérési bizonytalanság meghatározását, az eredmények érvényességének biztosítását, az eredmények közzétételét, a panaszok, nem-megfelelések kezelését, az adatok-, és információkezelés felügyeletét) és az irányítási rendszer megfeleljenek a hazai és/vagy nemzetközileg elfogadott feltételeknek.

Mindezeket a követelményeket a vizsgálólaboratóriumnak a Minőségirányítási Kézikönyvben teljesszűrt, írásban dokumentálni kell annak érdekében, hogy a laboratórium

személyzete tevékenysége során megismerje és kövesse a Minőségirányítási Kézikönyv tartalmát, továbbá, hogy kellő szakmai információ álljon rendelkezésre a minőségirányítási rendszer belső és külső szakértői felülvizsgálatához (auditáláshoz).

2.5.3.1 Az MSZ EN ISO/IEC 17025:2018 szabvány szerinti szervezeti követelmények

A laboratórium vezetősége, mint jogi személy felelős azért, hogy a laboratóriumban folyó tevékenység megfeleljen az MSZ EN ISO/IEC 17025:2018 szabványban előírt követelményeknek, a vevők igényeinek, a szabályozó hatóságoknak és az elismerést nyújtó szervezeteknek. A laboratórium személyzetének rendelkeznie kell a feladatai ellátásához szükséges hatáskörrel és erőforrásokkal.

2.5.3.2 Az MSZ EN ISO/IEC 17025:2018 szabvány szerint az erőforrásokkal kapcsolatos követelmények

A laboratóriumi személyzetnek munkavégzése során pártatlannak és felkészültnek kell lennie, dokumentálnia kell minden a tevékenység eredményét befolyásoló körülményt, és tevékenységét az irányítási rendszerrel összhangban kell végeznie. A vizsgálólaboratóriumban meghatározott mikrobiológiai tevékenységet (pl. a vizsgálati feladatok elvégzését, a berendezések üzemeltetését, az eredmények kiértékelését vagy a vizsgálati jegyzőkönyvek kiadását) önállóan csak megfelelő képzettségű és szaktudású, tapasztalt és megfelelő feljogosítással rendelkező személyzet végezhet.

A létesítményeknek és a környezeti körülményeknek alkalmasnak kell lenniük a laboratóriumi tevékenységhez és nem befolyásolhatják hátrányosan az eredmények érvényességét. A vizsgálólaboratóriumnak a létesítményekre és a környezeti körülményekre vonatkozó követelmények dokumentálása mellett (monitorozni) folyamatosan figyelemmel kell kísérni a környezeti körülmények megfelelőségét a vonatkozó előírásoknak, módszereknek vagy eljárásoknak.

A vizsgálólaboratóriumnak rendelkeznie kell a tevékenységi körébe tartozó feladatok megfelelő elvégzéséhez szükséges berendezésekkel, és biztosítania kell, hogy a berendezésekre vonatkozó követelmények teljesüljenek. A laboratóriumnak biztosítani kell mérési eredményeinek a metrológiai vagy egy megfelelő hivatkozási alapra való visszavezethetőségét.

A vizsgálólaboratóriumban ezért a teljes munkafolyamat során (a mintavételtől vagy a minták érkezésétől egészen az eredmények kiadásáig, illetve a minták ártalmatlanításáig) folyamatosan ellenőrizni kell és fel kell jegyezni a környezeti feltételeket (pl. a laboratóriumban való tartózkodás és munkavégzés megfelelőségét, a sterilitás biztosítását), a műszerek, berendezések megfelelő üzemeltetését (lásd 1. GYAKORLAT).

2.5.3.3 Az MSZ EN ISO/IEC 17025:2018 szabvány szerint a folyamattal kapcsolatos követelmények

A laboratóriumnak eljárással kell rendelkeznie az ajánlatkérések, ajánlatok és szerződések átvizsgálására vonatkozóan.

A vizsgálólaboratóriumnak megfelelő, a vevői igényeket kielégítő és lehetőség szerint a legfrissebb érvényes módszerrel kell a tevékenységi körébe tartozó valamennyi feladatot (pl. mintavétel, kezelés, szállítás, tárolás, előkészítés, minta feldolgozás) elvégeznie. Az akkreditált laboratóriumokban előnyben kell részesíteni a nemzetközi, regionális vagy nemzeti szabványokban megfogalmazott módszereket (lásd 2. GYAKORLAT). A vizsgálólaboratóriumnak bevezetés előtt dokumentáltan igazolnia (verifikálnia) kell, hogy a kívánt teljesítmény eléréséhez szükséges módszereket megfelelően tudja alkalmazni. A vizsgálólaboratórium érvényesíteni (validálni) köteles a nem szabványos módszereket, a saját

maga által kidolgozott vagy más laboratóriumoktól átvett módszereket és azokat a szabványos módszereket, melyeket az alkalmazási területükön kívül kíván alkalmazni. A validálás annak a megerősítése objektív bizonyíték szolgáltatásával, hogy az adott szándék szerinti használathoz vagy alkalmazáshoz előírt követelmények teljesülnek.

A laboratóriumnak a tevékenységi körébe tartozó mintavétel elvégzéséhez mintavételi tervvel és módszerrel kell rendelkeznie, és a vizsgálati eredmények értelmezését elősegítő mintavétellel kapcsolatos feljegyzéseket meg kell őriznie.

A laboratóriumnak biztosítania kell, hogy az egyes laboratóriumi tevékenységekre vonatkozó műszaki feljegyzések tartalmazzák az eredményeket, a jelentést és elegendő információt ahhoz, hogy megkönnyítsék a mérési eredményeket befolyásoló tényezők azonosítását és a mérési bizonytalanság meghatározását.

A vizsgálólaboratóriumnak eljárással kell rendelkeznie az eredmények érvényességének figyelemmel kísérésére (monitorozására). A vizsgálati eredmények minőségbiztosítása érdekében a mikrobiológiai laboratóriumokban folytatott vizsgálatok során (pl. a táptalajok, kitek ellenőrzésére) rendszeresen használni kell nemzetközi törzsgyűjteményekből származó referencia törzseket. A mikrobiológiai laboratóriumoknak eredményeik állandóságának és megbízhatóságának biztosítása érdekében tevékenységüket folyamatosan kontrollálni kell (pl. műminták alkalmazásával, párhuzamos vizsgálatokkal történő) belső és (pl. laboratóriumok közötti összehasonlító vagy jártassági vizsgálatokon való részvétellel megvalósuló) külső minőségellenőrzési programokban való sikeres részvétellel.

A vizsgálati eredményeket a vizsgálati jegyzőkönyvben vagy a mintavételi jelentésben mindig pontosan, világosan, egyértelműen és objektíven kell megadni. A vizsgálati jegyzőkönyveknek ki kell térnie minden az eredmények értelmezéséhez szükséges és az alkalmazott módszer által megkívánt, továbbá a vevővel egyeztetett információra.

Az eredmények közlésére szolgáló dokumentumnak ezért tartalmaznia kell a dokumentum megnevezését (pl. vizsgálati jegyzőkönyv), a laboratórium nevét és címét, a vizsgálati jegyzőkönyv egyedi azonosítóját, a vevő nevét és elérhetőségét, az alkalmazott módszer azonosítóját, a vizsgált minta leírását, állapotának jellemzőit, egyedi azonosítóját, a mintavétel helyét, időpontját, a mintavételi körülményeket, a laboratóriumi vizsgálat végrehajtásának dátumát, a vizsgálati eredményeket a mértékegységek megadásával, annak a személynek a nevét és azonosítóját, aki a vizsgálati jegyzőkönyvet jóváhagyta, a jelentés kiadásának dátumát, továbbá szükség szerint egy nyilatkozatot arról, hogy az eredmények csak a vizsgált mintára vonatkoznak.

2.5.3.4 Az MSZ EN ISO/IEC 17025:2018 szabvány szerint az irányítási rendszerrel kapcsolatos követelmények

A Minőségirányítási Kézikönyv irányítási követelményei meghatározzák az akkreditált mikrobiológiai laboratórium jogállását, valamint megnevezik az irányító és műszaki személyzetet, melynek révén biztosított, hogy a laboratórium tevékenysége a vonatkozó jogszabályoknak és az egyéb előírásoknak megfelelően szolgálja a vevői igények kielégítését. Az irányítási rendszer kiterjed a laboratórium teljes tevékenységére; a laboratórium eszközeivel végzett vizsgálatokra és az ezzel összefüggő adminisztrációra.

A laboratórium vezetőségének politikát és célokat kell meghatározni a laboratórium felkészültségével (kompetenciájával), pártatlanságával és következetes működésével kapcsolatban, bizonyítania kell, hogy elkötelezett az irányítási rendszer fejlesztése érdekében és ehhez minden a laboratórium tevékenységébe tartozó dokumentációt, folyamatot, rendszert és feljegyzést beilleszt az irányítási rendszerébe, továbbá biztosítania kell, hogy a laboratóriumi személyzet számára hozzáférhető legyen a felelősségi körükbe tartozó dokumentáció. Ennek érdekében a laboratóriumnak felügyelet alatt kell tartani az irányítási rendszerhez kapcsolódó belső és külső dokumentumokat és feljegyzéseket, meg kell

határozni a tevékenységével összefüggő kockázatokat és intézkedéseket, továbbá a fejlesztési lehetőségeket.

Ha a laboratóriumi munkavégzés során nem-megfelelések fordulnak elő, a laboratóriumnak olyan dokumentált hibajavító tevékenységet kell folytatnia, mely alkalmas a feltárt nem-megfelelés hatásainak kezelésére és kiküszöbölésére. A laboratóriumnak meghatározott időközönként dokumentált belső auditot és vezetőségi átvizsgálásokat kell végeznie az irányítási rendszerben foglalt célok és követelmények teljesüléséről.

1. GYAKORLAT

Mintafeldolgozás a laboratóriumba érkezéstől az eredmények kiadásáig

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

víz minta legvalószínűbb csíraszámának (MPN) meghatározása

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

számítógép Microsoft programmal

A vizsgálat menete

1. Minta beérkezésének beiktatása, adatainak rögzítése.
2. A mikrobiológiai laboratóriumi dokumentáció létrehozása.
3. Egy számítógépes adatrögzítő és eredménykiadó program megismerése, használata előnyeinek és hátrányainak bemutatása.
4. A minta útjának nyomonkövetése egy mikrobiológiai laboratóriumban.
5. A vízmikrobiológiai laboratóriumokban alkalmazott rutinvizsgálatok megismerése (összcsíraszám meghatározás, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* és *Clostridium perfringens* kimutatási módszerek).
6. Az eredmények kiértékelése és a vizsgálati jegyzőkönyv összeállítása

2. GYAKORLAT

Egy szabványos módszer áttekintése és alkalmazása

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

MSZ EN ISO 16266:2008 „Vízminőség. *Pseudomonas aeruginosa* kimutatása és megszámlálása membránszűréssel”

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

MSZ EN ISO 16266:2008 szabvány leírása alapján

A vizsgálat menete

1. A szabványban szereplő táptalajok, módszerek, kiértékelések, határértékek bemutatása elméletben és gyakorlatban.
2. A 10.1 fejezet *Pseudomonas aeruginosa* kimutatása gyakorlat során kapott adatok értelmezése.

2.6 Sterilizálási és fertőtlenítési eljárások

2.6.1 Sterilizálás

Sterilizálásnak (csíramentesítésnek) nevezzük azt az antimikrobiális eljárást, amelynek során különböző fizikai, kémiai, vagy kombinált eljárások alkalmazásával a csíramentesítésre kerülő anyagon és anyagban elpusztítjuk, illetve irreverzibilisen inaktíváljuk a mikrobákat, valamint ezek összes nyugvó formáit.

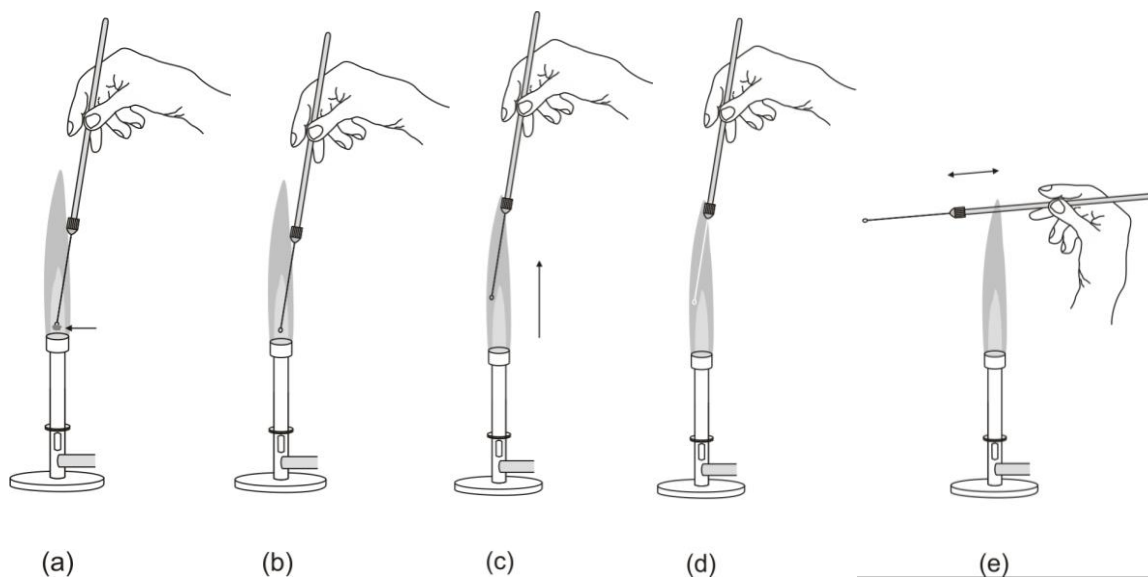
A mikrobák a különböző fizikai, kémiai hatásokra igen eltérő módon reagálnak, de a kezelés hatékonysága sok más tényezőtől (pl. a mikrobák sűrűségétől, kondíciójától, a hatóanyag-koncentrációjától, a környezeti feltételektől) is függ.

A sterilizálást sokféle módon végezhetjük (hővel, szűréssel, sugárzással, kémiai anyagokkal). A módszert a kívánalmaknak megfelelően, az alkalmazott anyagok és eszközök anyagi minőségének és a sterilizálási eljárás rájuk gyakorolt hatásának figyelembe vételével kell megválasztanunk.

2.6.1.1 Sterilizálás hővel

A száraz hő hatása alapvetően a sejtek víztartalmának eltávolításán és anyagainak ezt követő oxidációján alapszik.

Nyílt lánggal történő sterilizálás olyan esetekben alkalmazható, ha a csírátlánítandó tárgy a lánggal közvetlenül érintkezve nem károsodik. Különböző laboratóriumi fém és üveg eszközök (pl. oltókacs, szélesztőbot, csipesz) nyílt lángon áthúzva gyorsan és biztosan sterilizálhatók (3. ábra és 4. ábra).



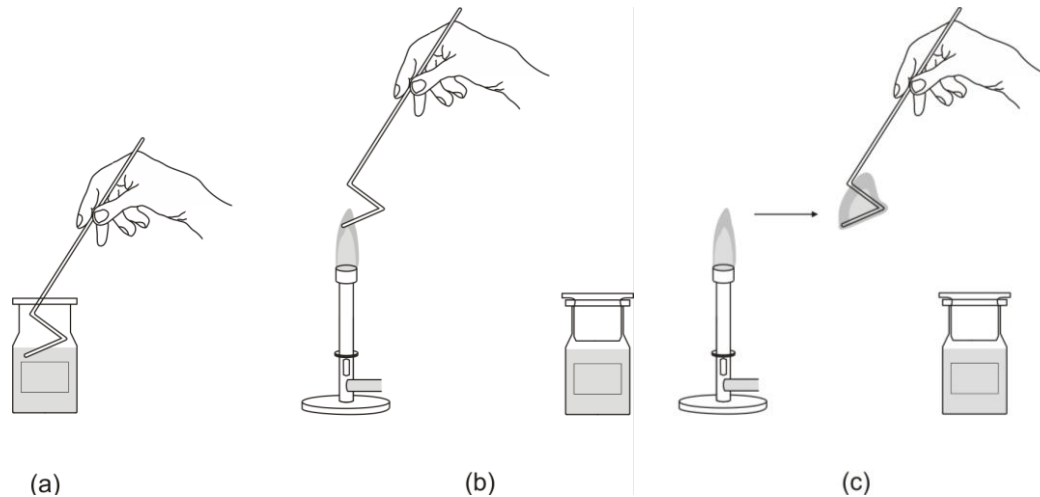
3. ábra Az oltókacs sterilizálása a Bunsen-égő lángjában

(a) A mikrobákkal fertőzött oltókacs kacs részét először a gázláng hideg magjában megszáritjuk. Ezzel elkerülhetjük, hogy a kacson lévő fertőző anyag, a hirtelen felhevüléskor, még életképesen szétfröccsenjen. (b) A száraz fertőzött oltókacs kacs részét először a gázláng hideg magjában megszáritjuk. (c) A kacsot a lángban egyre feljebb emeljük, és átizzítjuk (d). Ennek során az oltókacs nyelét meredeken (60-80°-os szögben) a láng felett tartjuk, miközben finoman emeljük. (e) Magát a fémnyelet csak a szorítógyűrűnél égessük le, ott is csak rövid áthúzással, nem pedig sokáig izzítva.

A száraz hővel történő sterilizációt hőlégmenterizátorokban végezzük. Ezek termosztátos rendszerű, meghatározott hőmérsékletre beállítható elektromos szekrények. Az egyenletes hőmérséklet gyors kialakulását ma ventilátoros keveréssel biztosítják ("légkavarásos" hőlégmenterizátor). Száraz hővel csak hőálló fém-, üveg-, porceláneszközök, glicerin, vazelin, olajok, zsírok és hőstabil porok sterilizálhatók, amelyek az endospórák baktériumok biztos elpusztításához szükséges hőmérsékleteket kibírják: 160 °C-on 45 perc; 180 °C-on 25 perc; 200 °C-on 10 perc.

A víz hővezetése sokszorosa a levegőének, így a nedves meleg víz vagy a vízgőz jelenlétében alkalmazott hőhatás lényegesen gyorsabban és hatásosabban sterilizál, mint a száraz hő.

A nedves hő alkalmazásának legegyszerűbb és legrégebbi módja a kifőzés. A forrásban lévő víz hőfoka normál légköri nyomás mellett a 100 °C-ot nem haladja meg, ezért a különösen ellenálló endospórák baktériumok a 10-15 perces kezelésnél nem pusztulnak el, így sterilizáló hatás a kifőzés során nem várható.



4. ábra Sterilizálás alkoholos leégetéssel

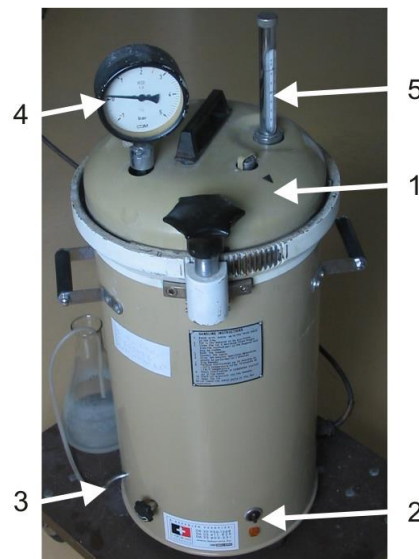
(a) A sterilizálandó eszközt (szélesztöböt, csipeszt, szikét stb.) alkoholba mártjuk, majd a Bunsen-égő lángjában az alkoholt meggyújtjuk (b) és a tárgyat a lángból kivéve megvárjuk, amíg az alkohol elég (c).

A pasztörözés részleges csírátlánítás nedves meleggel. A tejet sok mikrobától mentesíthetjük egy alkalommal végrehajtott, 30 perces 65 °C-os vagy 5 perces 85 °C-os melegítéssel, de a kezelést nemcsak egyes endospóras baktériumok, hanem hőre kevésbé érzékeny szervezetek, mint pl. a *Mycobacterium* sejtjei is túlélnek. Ultrapasztörözés esetén azonban a tej, illetve a tejszín a 135-150 °C-on 2 mp-es hőtartással való kezelés során gyakorlatilag csírátlanná válik.

A tindállozás (frakcionált csíramentesítés) során a sterilizálásra szánt táptalajt vagy oldatot, naponta egy alkalommal, négy napon át 60 °C feletti hőmérsékletre melegítik, majd a következő kezelésig termosztátban inkubálják. Az egyes melegítések alkalmával a vegetatív alakok elpusztulnak, feltehetőleg az utolsó melegítés már az utolsónak kicsírázott endospórákat pusztítja el. Hőérzékeny táptalaj komponensek esetén (pl. zselatin) alkalmazhatjuk ezt az eljárást.



(a)



(b)

5. ábra Sterilizálás hővel – autoklávok

Nagyméretű automatikus üzemű autokláv (a). Asztali, ún. gyógyszerészeti sterilizáló autokláv (b)
1. fedő, 2. áramellátó kapcsoló, 3. levegőtető szelep, 4. nyomásmérő, 5. hőmérő.

Sterilizálásra a leghatásosabb módszer a túlnyomáson, telített vízgőz jelenlétében alkalmazott nedves hő (lásd 3. GYAKORLAT). Széles körben elterjedt ez hétköznapijainkban, amikor is az otthoni kuktákban, nyomás alatt, gőzben főzzük az ételeinket. Ilyen nagyméretű kuktáknak foghatók fel a laboratóriumi autoklávok (5. ábra). Ezek lényegében hermetikusan záró, nagy belső nyomást kiálló tartályok, melyekbe behelyezve a sterilizálandó tárgyakat abban gőzt fejlesztenek. Az autokláv zárt terében a nyomás növelésével párhuzamosan emelkedik a hőmérséklet, így pl. az 1 atm túlnyomás elérésekor a telített gőz hőfoka eléri a 121 °C-ot. Ezt a hőmérsékletet a legtöbb mikroba nem képes 10 percen túl elviselni (kivétel pl. prionok, egyes hipertermofil baktériumok). Biztonsági okokból a sterilizációs idő ennél hosszabb, általában 20-30 perc.

3. GYAKORLAT

Autokláv (gyógyszertári sterilizáló) üzemeltetése

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus
tápagar lombikban

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

desztillált víz

cérnakesztyű

autokláv (gyógyszertári sterilizáló)

A vizsgálat menete

1. Nyissuk ki az autoklávot, és ellenőrizzük, hogy van-e benne megfelelő mennyiségű desztillált, vagy ioncserélt víz. Szükség esetén pótoljuk.

2. Helyezzük a munkatérbe a megfelelően csomagolt sterilizálandó anyagokat (pl. laboratóriumi eszközöket, táptalajt).

3. Zárjuk le a szorítófejjel az autokláv fedelét.

4. Ellenőrizzük, hogy a légtelenítő szelep nyitva van-e.

5. Kapcsoljuk be az autokláv fűtését. Ennek megindulását a jelzőlámpa világítása jelzi.

6. Amikor a légtelenítő szelep kivezető csőcsomóján át intenzív gőzkiáramlást (sűrű, tejfehér gőzt) észlelünk (a munkatér hőmérséklete elérte 100 °C-t), várjunk 4-5 percet, majd zárjuk le a légtelenítő szelepet (légtelenítés).

7. Az autokláv fűtését csak akkor kapcsoljuk ki, amikor a munkatérben lévő anyagoknak az előírt hőmérsékleten, nyomáson való kezelési ideje (csírátlanítás) megtörtént (pl. 1 atm túlnyomáson, 121 °C-on, 20 perc).

8. Az elektromos fűtés megszüntetése után a készüléket hagyjuk lehűlni legalább 60-70 °C-ra (túlnyomás megszüntetése).

9. A túlnyomás megszűnése után, a munkatér kinyitása előtt nyissuk ki a légtelenítő szelepet. Vegyük ki a sterilizált anyagokat. *Vigyázat, a felcsapódó 60-70 °C-os gőz égés/forrázás veszéllyel járhat!*

Fontos szabály, az autokláv bekapcsolásának (üzembe helyezésének) időpontjától a csírámentesítési ciklus végéig a kezelő személy köteles a készülék környezetében tartózkodni, és a sterilizációs folyamatot rendszeresen ellenőrizni!

2.6.1.2 Sterilizálás sugárzással

Csírántlanításra elterjedten használt energiafajták a különböző sugárzások (UV-, röntgen-, radioaktív-sugárzás) is, melyeknek előnyük, hogy hőérzékeny anyagok esetében is alkalmazhatók.

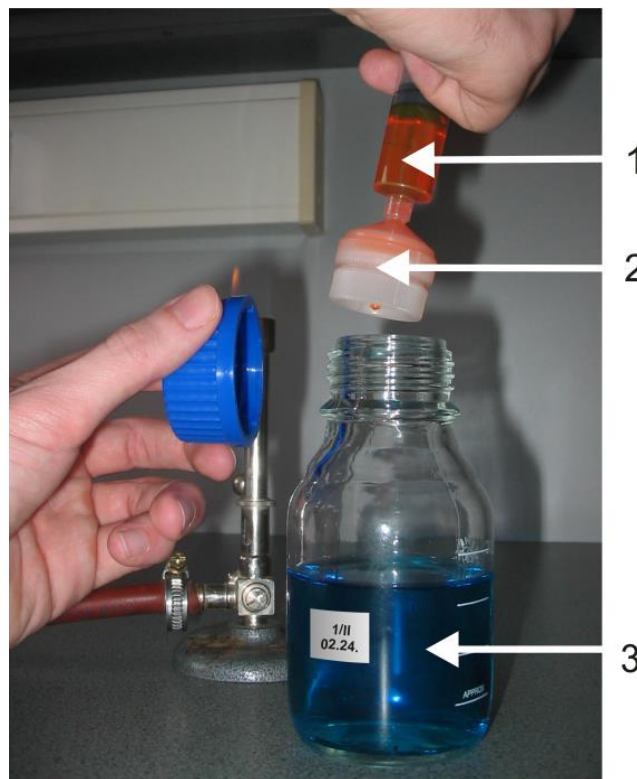
Az UV-sugárzás teljes spektruma (4-400 nm) károsíthatja a sejteket, de tartományának csupán szűk része felelős az ún. germicid hatásért. 265 nm környékén igen erőteljes „csíráölő” hatás érhető el, mert ennél a hullámhossznál van a DNS abszorpciós maximuma. A

sejtpusztulás legfőbb oka pirimidin dimerek képződése a nukleinsavakban. A nukleinsavakat ért károsodásokat a baktériumok különböző hibajavító mechanizmusokkal képesek kijavítani, azonban a károsodások bizonyos szintje felett az enzimszerek kapacitása már nem elégséges, és így a mutációk felhalmozódása a sejt pusztulását okozza. Az UV (germicid)-lámpákat elterjedten alkalmazzák laboratóriumokban a légtér és felületek csíraszegényté tételére. Alkalmazhatóságának határt szab, hogy hatékonysága a fényforrástól távolodva négyzetes arányban csökken, áthatolóképesége kicsi, és hatékonyságát a felületeken található szennyeződések a sugárelnyelés révén jelentősen csökkentik.

A nagy energiájú ionizáló sugárzások közül ipari méretekben a jó áthatolóképeségű, rendszerint ^{60}Co -izotópból származó gamma-sugárzást használják egyszer használatos injekciós tűk, fecskendők, kötszerek, gyógyszerek és egyes élelmiszerek (pl. fűszerek) sterilizálására. A gamma-sugárzás előnye, hogy a csomagoláson is áthatol, hátránya, hogy – mint minden radioaktív sugárzás – permanens, és minden irányba szóródik, ezért csak speciális körülmények között alkalmazható. Élelmiszerekben akár a fogyasztóra káros hatású kémiai reakciókat is kiválthat.

2.6.1.3 Sterilizálás szűréssel

A mechanikus úton történő csíramentesítés legáltalánosabban alkalmazott módszere a szűrés, amikor is a sterilizálandó folyadékot vagy gázt olyan pórusméretű szűrőfelületeken préseljük át, amely a mikroorganizmusokat visszatartja és ezáltal a szűrlet sterilé válik (6. ábra). Ez a módszer hatását tekintve nem felel meg teljesen a sterilizálás alapelveinek, mert a mikroorganizmusok a szűrés során nem pusztulnak el. A szűrők vastagságát, pórusainak átmérőjét úgy kell megválasztani, hogy azon a baktériumok és más sejtes elemek ne juthassanak át.



6. ábra Sterilizálás szűréssel – fecskendőszűrő használata

Vitamin oldatot (1) fecskendőszűrőn (2) sterilizálva adunk az előzetesen autoklávban csíramentesített tápközeghez (3).

A mikroorganizmusok szűrésére korábban elsősorban adszorpciós elven működő, pl. Seitz-féle azbeszt- vagy különböző üvegszűrőket alkalmaztak. A modern membránszűrők általában cellulóz-észter, poliészter, polikarbonát, teflon típusú anyagokból készülnek, működésük részben a mikrobák adszorpcióján, részben mechanikus szitahatáson alapul. A tisztán szitahatáson alapuló szűrők előnyösek, mivel azok nem változtatják meg a szürendő oldat összetételét. A baktériumok eltávolítására a 0,22 µm átmérőjű membránszűrők a legalkalmasabbak, ám ezek a vírusokat áteresztik, utóbbiak kiszűrésére még finomabb pórusméretű (0,02-0,05 µm) szűrőket alkalmaznak.

A membránszűrők biológiailag semlegesek, nem akadályozzák a szűrőn fennmaradt mikroorganizmusok élettevékenységét, nem gátolják az enzimműködésüket, az anyagok jól diffundálnak a membránon keresztül, így a baktériumok könnyen tenyészthetők is rajtuk különféle táptalajokra helyezve. Ezen kívül festhetők, fénymikroszkóp alatt megvizsgálhatók.

2.6.1.4 Sterilizálás kémiai módszerekkel

A kémiai anyagok széles köre alkalmas a mikrobák gátlására (lásd 6.4.4.2 fejezet). Az anyagok egy része csupán szaporodásában gátolja a baktériumokat (bakteriosztatikus hatás), más része viszont előli (baktericid hatás). Az, hogy egy anyag sztatikus vagy cid hatású, az anyagi minőségen kívül függ a koncentrációtól és a behatási időtől is. Kémiai sterilizációra csak cid hatású anyagok alkalmasak. Ezekkel szembeni követelmény, hogy hatásuk legyen széles spektrumú, ne legyenek toxikusak a magasabbrendű szervezetekre, ne lépjenek káros reakcióba a kezelendő anyaggal, ne legyenek bomlékonyak, legyenek környezetkímélők, könnyen kezelhetők és gazdaságosak.

A kémiai sterilizációra használt anyagok lehetnek folyékony vagy gáz halmazállapotúak. A folyékony szereket főként felületek sterilizálására használják. A gáz halmazállapotú vegyületek jelentőségét az ún. gázsterilizáló berendezések adják. Sokféle antimikrobiális hatású gázt ismerünk, de a legelterjedtebbek a béta-propiolaktonnal, illetve formaldehid gőzökkel működő berendezések. Ezek a vegyszerek alkiláló hatásuk révén a mikrobiális fehérjéket és a nukleinsavakat károsítva a mikrobák pusztulását okozzák. A sterilizálandó eszközöket, anyagokat úgy kell megválasztani, hogy ne károsítsák, ezért különösen a kötszerek és a hőre lágyuló műanyagok sterilizálásában van nagy jelentőségük. A gázokkal és gőzökkel sterilizált anyagok és eszközök nem használhatók fel azonnal, hanem meghatározott ideig szellőztetni kell azokat, hogy toxikus, szövetkárosító hatásuk megszűnjön. A gázsterilizátorok alkalmazása nagy körültekintést igényel, mert az alkiláló hatású vegyületeknek erőteljes rákkeltő hatásuk van.

2.6.2 Fertőtlenítés

Fertőtlenítés (dezinfekció) minden olyan eljárás, amely a fertőző forrásból a külső környezetbe kikerült kórokozók elpusztítására, illetőleg fertőzőképességük megszüntetésére irányul. Fertőtlenítő hatásnak nevezzük azokat a kémiai, fizikai-kémiai tényezőket, melyek a mikroorganizmusokkal közvetlenül érintkezve, megfelelő intenzitás, aktivitás mellett, meghatározott időtartam (behatási idő vagy expozíciós idő) alatt azok pusztulását, inaktiválását idézik elő. A fertőtlenítés megvalósulhat azokkal a fizikai módszerekkel (pl. hőenergia, telített és túlnyomásos vízgőz, forrásban lévő víz formájában, UV sugarak), melyek részletes ismertetésére a Sterilizálási és fertőtlenítési eljárások c. 2.6 fejezetben került sor, valamint kémiai szerekekkel, amikor is az antimikrobiális tulajdonsággal rendelkező vegyületek oldatként, aeroszol, vagy gázhalmazállapotban fejtik ki mikrobaölő hatásukat.

A fertőtlenítésre alkalmas kémiai anyagokat kémiai szerkezetük és hatásmechanizmusuk szerint is csoportosíthatjuk.

Az alkoholok közül az etanolt és az izopropanolt széleskörben használják fertőtlenítőszerként. Kitűnő antiszeptikus tulajdonságokkal 50-70%-os vizes oldatuk

rendelkezik. Hatásmechanizmusuk függ az alkalmazott koncentrációtól. Az 50-95%-os alkoholos oldatok lipid-oldékonyságuk miatt dezintegrálják a membránokat. A megváltozott áteresztőképességű membránon át sejtbe jutó alkohol denaturálja a fehérjéket, továbbá vízelvonó hatása van. Az abszolút alkohol (100%-os) vízelvonó hatása a legjobb, de nem koagulálja a fehérjéket. Az alkohokok 70%-os hígításban a leghatékonyabbak. Megölik a baktériumok és gombák vegetatív alakjait, de a spórákat kevésbé károsítják, és a vírusok közül is sok kibírja ezt a kezelést.

A fenol (karbolsav) egyike a legelőször alkalmazott (Lister) dezinficienseknek. Fehérjéket denaturál, irreverzibilisen inaktíválja a membránhoz kötött oxidázokat és dehidrogenázokat. Ma már a fenolt kedvezőtlen fizikai, kémiai és toxikológiai tulajdonságai miatt nem használják, de szubsztituált (alkilált, halogenizált) származékait sokszor tenzidekkel, vagy alkoholokkal kombinálva alkalmazzák (pl. krezol, hexaklorofén, klórhexidin).

A halogének (F, Cl, Br, I) és vegyületeik nagyon hatásos fertőtlenítő- és antiszeptikus szerek; elsősorban nem ionos formáiknak van antimikrobiális aktivitásuk. Minthogy a fluor és a bróm veszélyesebbek, mint a klór és a jód, s mert a mikroorganizmusokra ugyanolyan mértékben toxikusak, mint a másik két elem, így rutinszerűen az utóbbiakat használják.

A klórgázt csaknem kizárólag ivóvíz, illetve egyéb vizek fertőtlenítésére alkalmazzák. Különböző vegyületei (pl. klór-dioxid, klórmész, Kloramin-B, nátrium-diklór-izociánurát) azonban a legszélesebb körben elterjedt fertőtlenítőszer készítmények. A nátrium-hipoklorit (Hypo: 8% NaClO és 1% NaOH keveréke) az egyik legrégebben használt kiváló fehérítő, szagtalanító és fertőtlenítőszer. A klór és vegyületeinek hatása azon alapszik, hogy vizes oldataikban bomlás közben erős oxidálószer, naszcensz (atomi állapotú) oxigén ('O') szabadul fel. A naszcensz oxigén nagyon reakcióképes, egyaránt alkalmas a baktériumok és endospóráik, valamint a gombák és a vírusok elpusztítására.

A jód széles körben elterjedt fertőtlenítő- és antiszeptikus szer. Kétféle készítménye ismert: a jód-tinktúra (5% jódot tartalmazó alkoholos kálium-jodid oldat) és a jodoforok (különböző természetes detergensekkel képzett komplexeinek vizes oldatai). Alkoholos oldatban bőr fertőtlenítésére, vizes oldatban sebészeti bemosakodásra is alkalmas. Szulfhidril- és a hidroxil-csoportokkal, valamint a diszulfid hidakkal reagálva szétroncsolja a fehérjéket. Baktericid és az entero- és hepatitisz vírusok kivételével virucid hatása is van. A jód esetenként allergiás reakciót válthat ki.

Az aldehidek széles spektrumú fertőtlenítőszer, leggyakrabban a formaldehidet és a glutáraldehidet alkalmazzák, műszerek, eszközök fertőtlenítésre. A formaldehid gáz 34-38%-os vizes oldata a formalin. Hatását a fehérjék alkilezése útján fejti ki.

A nehézfémek, mint a higany, az arzén, az ezüst, az arany, a réz, a cink és az ólom, és különféle vegyületeik jó hatással alkalmazható fertőtlenítők, de túl ártalmasak ahhoz, hogy élő szövetek kezelésére felhasználhatók legyenek. Fertőtlenítéshez kis koncentrációban kerülnek alkalmazásra. Ilyenkor a sejtekbe jutva általában a szulfhidril-csoportokhoz kötődve hatnak, és főként a fehérjéket károsítják. Szerves vagy szervetlen sóik formájában; elsősorban ezüst- és higanytartalmú készítmények vannak forgalomban. Nagy hatékonyságúaknak bizonyulnak nanoezüst tartalmú fertőtlenítőszer, illetve a nanoezüst bevonatú orvosi eszközök, implantátumok, valamint a nanoezüstöt tartalmazó kötszerek, krémek nagyban elősegítik a gyógyulást és a sebfertőzések megelőzését. A nehézfém tartalmú készítmények baktericid, fungicid és virucid hatásúak.

A detergensok, vagy felületaktív anyagok olyan szerves molekulák, melyeket egy hosszú hidrofób szénlánc és egy hidrophil "fej" alkot. A szénlánc töltése alapján megkülönböztethetünk nem ionos, valamint anion- és kationaktív detergenset. A nem ionos felületaktív anyagoknak nincs számottevő biocid hatásuk, és az anionos detergensok is csak korlátozott mértékben használhatók gyenge hatékonyságuk miatt. Ebbe a csoportba tartoznak

a szappanok, amelyek hosszú szénláncú karbonsavak (zsírsavak) nátrium- vagy káliumsói. Önmagukban nem fertőtlenítenek, de zsíroló hatásuknál fogva hatékony tisztítószer. A három csoport vegyületei közül a kationaktív detergensok a legjobb fertőtlenítőszer. Közéjük tartoznak a kvaterner ammóniumsók. A felületaktív anyagok hosszú szénláncukkal a sejtmembrán belső lipidrétegébe süllyednek, míg poláros, vízdékony fejük a felszínen marad, melynek hatására a sejt felületi feszültsége csökken. Ez többek között a sejtmembrán szelektív permeabilitásának elvesztését eredményezi, és ennek következtében a sejttartalom akadály nélkül kiáramolhat a sejtől. A kvaterner ammóniumvegyületek ezen kívül képesek a fehérjéket is denaturálni. A bőrön és nyálkahártyákon alkalmazva alig toxikusak. Jó nedvesítő tulajdonságuk miatt főképpen tisztításra, műtétek előtti bemosakodásra használhatók. Hatásspektrumuk szűk, inkább csak bakteriosztatikus hatásuk van, azonban a spórákra hatástalanok.

2.7 Sterilizációs berendezések hatáskörének ellenőrzése

A sterilizáló berendezések hatáskörének ellenőrzésére többféle módszer áll rendelkezésünkre: műszeres ellenőrzés, kémiai indikátorok használata, biológiai ellenőrzés spórapreparátumokkal.

Műszerekkel a sterilizáló berendezésekben a gőznyomás, a hőmérséklet és a behatási idő folyamatosan ellenőrizhető. Segítségükkel jól tájékozódhatunk arról, hogy a sterilizálás elvi feltételei a munkatérben érvényesülnek-e.

A rakományban a kémiai indikátorok, ha a hőmérséklet és az időtartam elegendő a hatásos sterilizálásra, általában színüket megváltoztatva informálnak. A Browne-féle üvegszögek eredetileg piros színű indikátoroldatot tartalmaznak, amely elégtelen hőhatásra sárgás színűre, kielégítő sterilizálás esetében zöld színűre változik. Az indikátoros ragasztószalagokat a rakományra ragasztva helyezzük el. A szalagok színváltozása vagy valamely felirat megjelenése (pl. „OK” vagy „STERIL”) jelzi, hogy a sterilizálás megtörtént. Kémiai indikátorok használata csak biológiai próbával előzőleg minősített készülékekben javasolt. A kémiai indikátorok inkább csak azt jelzik, hogy a kívánt hőmérsékletet az adott idő alatt a sterilizáló készülék elérte.

A biológiai indikátorok használata a legmegbízhatóbb módszer a sterilizáló berendezések hitelesítésére, időszakos ellenőrzésére (lásd 4. GYAKORLAT). E célra az adott sterilizáló eljárásához kidolgozott, standardizált baktérium (spóra) készítményeket, ún. teszt-preparátumokat kell használnunk. A sterilizálás műveletével szemben a teszt szervezetek (pl. *Geobacillus stearothermophilus* spórapreparátum) rezisztensebbek, mint a legtöbb mikroorganizmus. Ha a sterilizálás hatásköré elégtelen, a tesztmikroba életképes marad (pl. a spórák csírázóképesége megmarad).

A sterilizáló berendezések ellenőrzéséhez alkalmazott bioindikátorok leggyakrabban a következő baktériumtörzsek spóráit tartalmazzák: *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 autoklávokhoz; *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 hőlégt sterilizátorokhoz; *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 etilénoxidos gázsterilizátorokhoz; *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 10149 formaldehides gázsterilizátorokhoz.

Sterilizáló berendezések mikrobiológiai ellenőrzése a következő esetekben kötelező: új, vagy felújított készülék üzembe állításakor; üzemelő berendezésnél legalább félévenként; mikrobiológiai hatáskörvizsgálat nem megfelelő eredménye és az azt követő műszaki felülvizsgálat után; minden olyan javítás, vagy alkatrész csere után, mely a berendezés sterilizáló hatását befolyásolhatja; indokolt esetben soron kívül (pl. járvány, kórházi fertőzés); formaldehides gázsterilizátorok esetében negyedévenként.

A **gőzsterilizátorok mikrobiológiai ellenőrzésére** a *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 törzs spóráiból készített bioindikátoros spórakészítménye $1,2 \times 10^6$ TKE-nak megfelelő mennyiséget tartalmaz. Ezt a mennyiséget a megfelelő hatékonyságú autoklávzási

ciklus képes elpusztítani. A mikroorganizmusok elpusztulása, vagy életben maradása folyékony táptalajban való tenyésztéssel mutatható ki.

A vizsgálandó autokláv munkaterében elhelyezhető bioindikátoros spórákészítmények száma a készülék munkaterének térfogatától függ. Ennek megfelelően 60 l munkatér fogat alatt 4 db, 60-100 l munkatér fogat között 5 db, 100 l munkatér fogat felett 10 db tesztpreparátum szükséges. A spórákészítményeket – egyenletesen elosztva – az autokláv munkaterének hőtechnikailag jellemző pontjain (ún. hidegpontokon), a sterilizálandó rakomány közé helyezzük el.

4. GYAKORLAT

Gőzsterilizátorok (autoklávok) mikrobiológiai ellenőrzése *Geobacillus stearothermophilus* spórapreparátum túlélési próbájával

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Geobacillus stearothermophilus ATCC 7953 törzs spórákészítmény

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

TS tápleves
steril olló
steril fémcsipesz
autokláv
Bunsen-égő
55-60 °C-os termosztát

A vizsgálat menete

1. A spórákészítményeket helyezzük el az autokláv kamraterének megfelelő pontjaira.
2. Végezzük el egy sterilizálási ciklust az autoklávval (lásd 3. GYAKORLAT).
3. A sterilizálási ciklus befejeztével a spórákat tartalmazó tasakokat steril ollóval nyissuk fel, és steril csipesszel helyezzük a spórapreparátumot a TS táplevesbe.
4. A mintákat tartalmazó tápleveseket termosztáljuk 55-60 °C-on 1 hétig.
5. Az inkubáció elteltével figyeljük meg a baktériumnövekedést, vagy annak hiányát.

2.8 Fertőtlenítőszer mikrobiológiai hatásosságának meghatározása

A bakteriológiai laboratóriumok a járványügyi munkában, a gyógyító megelőző intézményekben, vagy az élelmiszer- és gyógyszeriparban a megelőző-, folyamatos-, vagy zárófertőtlenítésre alkalmazott fertőtlenítő oldatok antibakteriális hatását szűrőpróbaszerűen, vagy aktuális járványügyi esemény (pl. járvány, fertőzések halmozódása) bekövetkeztében ellenőrzik. A **fertőtlenítőszer hatástani vizsgálatok** alapelve, hogy a vizsgálandó fertőtlenítőszeret tesztbaktérium szuszpenzióval elegyítjük, majd meghatározott időtartam eltelte után a baktérium-fertőtlenítőszer elegyből kacs segítségével mintát veszünk és táptalajra oltjuk (lásd 5. GYAKORLAT). Az előírt inkubációs idő letelte után a szubkultúrában bekövetkezett szaporodásból, vagy a szaporodás elmaradásából következtetünk arra, hogy adott expozíciós idő alatt a fertőtlenítőszer a tesztbaktériumokat elpusztította-e, vagy sem.

5. GYAKORLAT

Fertőtlenítőszer mikrobiológiai hatásosságának meghatározása

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

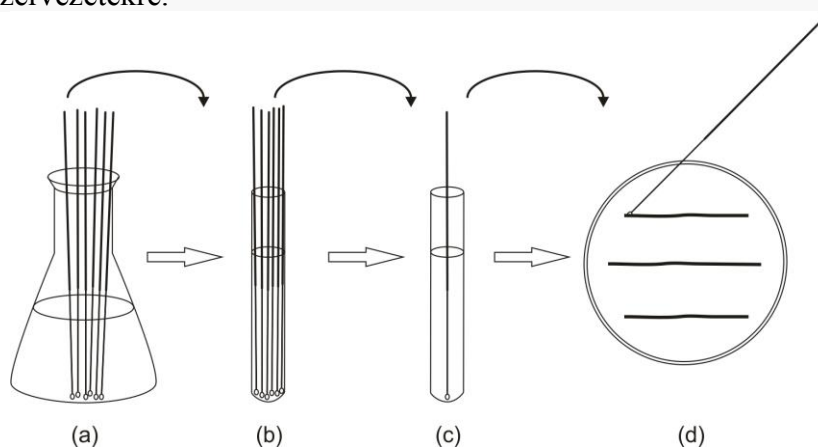
Staphylococcus aureus 24 órás tenyésztete 50 ml TS táplevesben
Pseudomonas aeruginosa 24 órás tenyésztete 50 ml TS táplevesben
Bacillus subtilis 24 órás tenyésztete 50 ml TS táplevesben

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

TS tápleves
 pipetta, steril pipettahegyek
 kémcsőkeverő (vortex)
 vízfürdő
 TS tápagar lemezek
 fertőtlenítőszer: 1% és 2% (V/V) Na-hipoklorit-oldat
 egyéb kereskedelemben kapható fertőtlenítőszer (pl. Domestos, Clorox)
 kontroll oldat: 0,9% (m/V) NaCl-oldat
 steril műanyag oltókacs
 9 ml steril desztillált víz kémcsőben
 steril kémcsövek
 Bunsen-égő
 termosztát

A vizsgálat menete

1. Készítsünk kísérleti tervet, majd ezek alapján gyűjtsük össze a szükséges anyagokat és eszközöket. Végezzük el az egyértelmű feliratozást (hígítási fok, idő, táptalaj, dátum, név), majd kezdjük hozzá a gyakorlat végrehajtásához.
2. A fertőtlenítőszer-koncentrátumból elkészített oldatokból, illetve a kontroll oldatból 9-9 ml-nyi mennyiséget mérjük szét steril kémcsövekbe, majd a kémcsöveket helyezzük 25°C-os hőmérsékletű vízfürdőbe.
3. A steril műanyag oltókacsokat helyezzük 10 percre a tesztbaktériumok szuszpenzióiba.
4. Ezután a tesztbaktériumokkal fertőzött műanyag oltókacsot tegyük át a fertőtlenítőszer oldatokba, illetve a kontroll oldatba.
5. Meghatározott idő elteltével (1, 5, 15, 30, 45 és 60 perc) a műanyag oltókacsot a fertőtlenítőszerből emeljük ki, és merítsük 1 percre steril vízbe (a maradék fertőtlenítőszer eltávolítására).
6. A műanyag oltókaccsal ezután végezzünk szélesztést (lásd 25. GYAKORLAT) TS táptalajon (7. ábra).
7. A fertőzött tápagar lemezeket tartalmazó Petri-csészéket fordított helyzetben (tetejükkel lefelé) inkubáljuk 28 °C-os termosztátban 1 hétig.
8. A baktériumnövekedés mértékét a kontrollok viszonylatában ötfokozatú skálán értékeljük (-, ±, +, ++, +++). Hasonlítsuk össze a különböző fertőtlenítőszer hatását a vizsgált tesztorganizmumokra.



7. ábra Fertőtlenítőszer hatását ellenőrzése

(a) Steril műanyag oltókacsot fertőzünk a tesztmikroba szuszpenziójával. (b) A „fertőzött tárgyat” (oltókacsot) a fertőtlenítőszer oldatába helyezzük változó időtartamra. (c) A fertőtlenítőszerrel megfelelő ideig kezelt „fertőzött tárgyat” (oltókacsot) steril vízben mossuk. (d) Csikoltással tápagarlemezt oltunk a „fertőzött tárggyal” (oltókaccsal).

3 MINTAVÉTELI ELJÁRÁSOK A MIKROBIOLÓGIÁBAN

A rendszerint laboratóriumban végzett mikrobiológiai elemzéseket, vizsgálatokat, tenyésztéseket megelőzően a vizsgálati objektumból mintát kell vennünk. A mintavételt a vizsgálat céljának megfelelően kiválasztott helyen, steril eszközökkel végezzük. A különböző környezetek (pl. torokváladék, vér, talaj, szennyvíz) mintázása esetén természetesen eltérő módszereket és eszközöket használunk. A mintavételt a kutatási, vizsgálati cél ismeretében mindig meghatározott ismétlésben végezzük. A mintavétel mellett a minták laboratóriumba történő szállítási módja is meghatározó fontosságú a további mikrobiológiai vizsgálatok sikeressége szempontjából.

3.1 Mintavétel diagnosztikai célra

A mikrobiológiai diagnosztikai vizsgálatok eredményességének, tehát a patogén (kórokozó) mikroorganizmusok minél eredményesebb kimutatásának alapvető előfeltétele a szakszerű mintavétel, és a vizsgálati anyagok laboratóriumba való eljuttatásának sebessége. Más és más eljárásokat használunk a különböző minták (pl. szövet, vizelet, széklet, vér) esetén, azonban az értékelhetőség szempontjából fontos, hogy a mintában minél kevesebb szennyező, a kórokozót esetlegesen elfedő mikroorganizmus legyen. A vizsgálati mintákat mindig a minta jellegének megfelelő tartályba, szerelékbe (pl. „F-tartály” székletmintákhoz, „Ty-tartály” széklet, vér, vagy vizelet mintához, „D-tartály” vattatamponos mintákhoz), pontosan, egyértelműen jelölve kell elhelyezni, és biztonsággal laboratóriumba szállítani.

3.2 Környezeti elemek mintavételezése

Az atmoszféra a mikroorganizmusoknak nem élettere, azonban a levegőn keresztül terjednek, szóródnak a bioszférában. Az emberi hámfelületekre, a levegővel érintkező nyálkahártyákra tehát folyamatosan mikroba-tömegek záporoznak, és ott megtelepedve sokféle betegséget okozhatnak. A levegőben levő mikroorganizmusok vizsgálata azonban nemcsak közegészségügyi, hanem gazdasági szempontból is fontos. A nyersanyagok, termékek és termelési folyamatok szennyeződésének potenciális veszélyforrásai az üzemi légtérben található mikroorganizmusok. A mikrobiológiailag szennyezett anyagok használatának a következményei igen súlyosak lehetnek, a levegő minőségének ellenőrzése tehát kritikus eleme a gyógyszeripari, kozmetikai, valamint élelmiszer-ipari termékek biztonságos előállításának.

A levegő mikrobiológiai ellenőrzésének többféle módszere terjedt el. Legegyszerűbb a **“Koch-féle” szedimentációs módszer**, amely a jól ülepedő partikulumok mikroba terhelésének kimutatására szolgál (lásd 6. GYAKORLAT). Szűréssel (megfelelő lyukméretű szűrőt választva) nemcsak mikrobákat (pl. gomba, vírus), de pl. sejttermelékeket is kimutathatunk. Elterjedt még az ún. részecskebefogók használata, amelyekben szűk csatornában légáramlást hoznak létre és a levegő útját megfelelő úton megtörve érik el a "tehetetlen" aeroszol részecskék kiülepedését, ütköztetését.

6. GYAKORLAT

Laboratóriumi levegő mikrobiológiai vizsgálata szedimentációs módszerrel

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

laboratóriumi levegő

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

húspepton tápagar lemez

keményítő-kazein tápagar lemez

termosztát

A vizsgálat menete

1. A laboratórium eltérő helyeire helyezük ki a megfelelő táptalajt tartalmazó Petri-csészéket, és fedetlenül exponáljuk 5, 10, 15 percig.
2. Az expozíciós idő elteltével zárjuk le a Petri-csészéket, és feliratozzuk.
3. A fertőzött tápagar lemezeket fordított helyzetben (fedelükkel lefelé) helyezük 28 °C-os termosztátba, és inkubáljuk 1 hétig.
4. A tápagar lemezek felületén kifejlődött telepeket számoljuk meg, és hasonlítsuk össze a különböző helyekről származó és eltérő expozíciós idővel végzett vizsgálatok eredményeit. Végezzünk telep morfológiai megfigyeléseket (lásd 53. GYAKORLAT).
5. Hasonlítsuk össze az eltérő levegő-mintavételezési eljárásokkal nyert adatainkat.

Ipari (pl. gyógyszeripar, élelmiszeripar) használatra általában **ütköztetési**, volumetrikus **levegő-mintavevő eszközöket** alkalmaznak (lásd 7. GYAKORLAT és 8. GYAKORLAT). Elterjedt típusok: Mas-100, AES Sample Air-MK2, RCS Plus (8. ábra). A **MAS-100** és az AES Sample Air-MK2 egyenes áramú ütköztetési eszközök egy perforált lapon keresztül szívják át a levegőt. A részecskéket tartalmazó légáramlatot szabványos Petri-csésze agaros felületére irányítják. A rendszer méri a beszívott levegő térfogatát és úgy szabályozza, hogy az átszívott levegő állandóan 100 liter/perc sebességgel áramoljon. Az **AES Sample Air-MK2** mintavevő vezérlőegysége 2 mintavevő modult is képes vezérelni.

7. GYAKORLAT

Laboratóriumi levegő mikrobiológiai vizsgálata MAS -100 készülékkel

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus
laboratóriumi levegő

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök
húspepton tápagar lemez
keményítő-kazein tápagar lemez
MAS -100 készülék
termosztát

A vizsgálat menete

1. A megfelelő tápagar lemezt behelyezzük a készülékbe. A laboratórium különböző helyeiről vegyünk 250 l levegőmintát a készülék alkalmazásával, mindig friss tápközeg behelyezésével.
2. Az exponált Petri-csészéket zárjuk be, és feliratozzuk.
3. A fertőzött tápagar lemezeket fordított helyzetben (fedelükkel lefelé) helyezük 28 °C-os termosztátba, és inkubáljuk 1 hétig.
4. A tápagar lemezek felületén kifejlődött telepeket számoljuk meg, és hasonlítsuk össze a különböző helyekről származó vizsgálatok eredményeit. Végezzünk telep morfológiai megfigyeléseket (lásd 53. GYAKORLAT).
5. Hasonlítsuk össze az eltérő levegő-mintavételezési eljárásokkal nyert adatainkat.

8. GYAKORLAT

Laboratóriumi levegő mikrobiológiai vizsgálata AES Sample Air-MK2 készülékkel

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus
laboratóriumi levegő

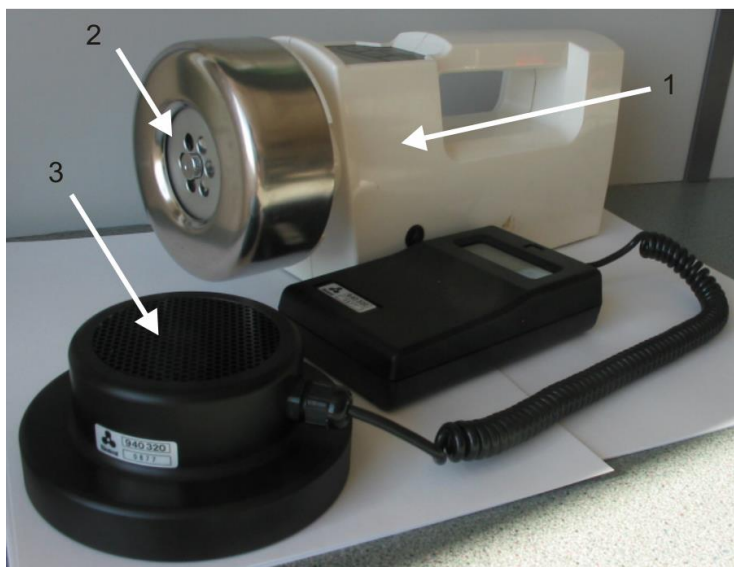
A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök
húspepton tápagar lemez

keményítő-kazein tápagar lemez
AES Sample Air-MK2 készülék
termosztát

A vizsgálat menete

1. A megfelelő tápagar lemezt behelyezzük a készülékbe. A laboratórium különböző helyeiről vegyünk 250 l levegőmintát a készülék alkalmazásával.
2. Az exponált Petri-csészéket zárjuk be, és feliratozzuk.
3. A fertőzött tápagar lemezeket fordított helyzetben (fedelükkel lefelé) helyezzük 28 °C-os termosztátba, és inkubáljuk 1 hétig.
4. A tápagar lemezek felületén kifejlődött telepeket számoljuk meg, és hasonlítsuk össze a különböző helyekről származó vizsgálatok eredményeit. Végezzünk telepmorfológiai megfigyeléseket (lásd 53. GYAKORLAT).
5. Hasonlítsuk össze az eltérő levegő-mintavételezési eljárásokkal nyert adatainkat.

Az **RCS Plus** centrifugális ütköztetést alkalmazó készülék (8. ábra) a létrehozott – részecskéket és mikroorganizmusokat tartalmazó – centrifugális légáramlatot speciális tápagar-csíkok felületére irányítja (lásd 9. GYAKORLAT). A mintavevő percenként 50 l levegőt szív be.



8. ábra Centrifugálás ütköztetést alkalmazó automatikus levegő mintavevő készülék

RCS Plus levegő mintavevő (1), autoklávozható forgórész a tápközeggel (2), anemométer berendezés (3) az átszívott levegő térfogatának ellenőrzéséhez.

9. GYAKORLAT

Laboratóriumi levegő mikrobiológiai vizsgálata RCS Plus készülékkel

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus
laboratóriumi levegő

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök
eltérő táptalajokat tartalmazó tápagar-csíkok
RCS Plus készülék
termosztát

A vizsgálat menete

1. A megfelelő tápagar-csíkot helyezzük a készülékbe. Különböző helyekről vegyünk 250 l levegőmintát a készülék alkalmazásával.

2. Az exponált tápagar-csíkokat zárjuk le, és feliratozzuk.
3. A fertőzött tápagar-csíkokat helyezük 28 °C-os termosztátba, és inkubáljuk 1 hétig.
4. A tápagar-csíkokon kifejlődött telepeket számoljuk meg, és hasonlítsuk össze a különböző helyekről származó vizsgálatok eredményeit. Végezzünk telepmorfológiai megfigyeléseket (lásd 53. GYAKORLAT).
5. Hasonlítsuk össze az eltérő levegő-mintavételezési eljárásokkal nyert adatainkat.

A **talajmintavételt** a táj, a növényzet stb. szemrevételezése alapján kiválasztott, ökológiai szempontból jellemzőnek tekintett helyen feltárt talajszelvényben a talajhorizontoknak megfelelően, aerob vagy anaerob mintavételnek megfelelő technikával, steril eszközökkel végezzük (lásd 10. GYAKORLAT).

10. GYAKORLAT

Talaj mintavétel mikrobiológiai vizsgálatokhoz

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

talaj

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

ásó

steril spatula

steril mintavevő-kanál

fecskendő

150 ml-es steril, széles szájú, vattadugóval zárt Erlenmeyer-lombik

50 cm³-es egyszer használatos fecskendő

steril szike

anaerob edény

hűtőtáska

A vizsgálat menete

1. A megfelelő talajhorizontok közép régióiban ásóval készítsünk friss felületet, majd steril spatula segítségével alakítsunk ki érintetlen felszín a talajrögök, morzsák lepattogatásával.

2. Aerob mintavétel esetén csíramentes spatula, vagy kanál segítségével 150 ml-es, feliratozott Erlenmeyer lombikba tegyünk kb. (~50 cm³) mintát (a látható talajállatokat és a gyökértömeget lehetőség szerint kerüljük ki).

3. Anaerob mintavétel során vágjuk le a fecskendő tücsatlakozós végét steril szikével, majd húzzuk ki a dugattyút. Az így nyert hengert nyomjuk bele a talajszelvény felületébe. A kiszűrt talajhengert, miután egyértelmű felirattal elláttuk azonnal helyezzük anaerob edénybe (lásd 47. GYAKORLAT)

4. A mintákat lehetőség szerint azonnal, lehűtve (5-10 °C), a legrövidebb idő alatt szállítsuk laboratóriumba.

Jellemző **víz minta nyerése** az egyik legnehezebben kivitelezhető környezeti mintavételi feladat (lásd 11. GYAKORLAT). Áramló folyóvízben kiszámíthatatlan a keveredés, állóvizekben pedig a vízmélységgel változó rétegzettség nehezíti a mintavételt. Áramló vízben, kereszt-szelvényben a sodorvonalból és csendes folyású partközeli részről is, míg állóvíz esetében vízközépről és part mellől egyaránt vegyünk mintát. Legegyszerűbben felszíni víz minta nyerhető, amelyet a felszín alatt 10 cm-rel bemerítéssel veszünk. Mélységi mintavételezés során speciális mintavevőt alkalmazhatunk (9. ábra). Fitoplankton minta gyűjtéséhez gondosan kimosott műanyag edény is megfelel. Vezetékes víz esetén a mintavétel előtt a vizet jól ki kell folytatni (2-5 perc). A vízminőség mikrobiológiai elemzéssel történő

meghatározásához szükséges mintavétel körülményeit az MSZ EN ISO 19458:2007 szabvány rögzíti.

11. GYAKORLAT

Vízmintavétel mikrobiológiai vizsgálatokhoz

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

felszíni víz

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

mintavevő bot

250 ml-es steril szűk nyakú, vattadugóval zárt Erlenmeyer-lombik

250 ml-es Meyer-palack (műanyag zsinórra erősítve)

250 ml-es steril széles szájú Erlenmeyer lombik

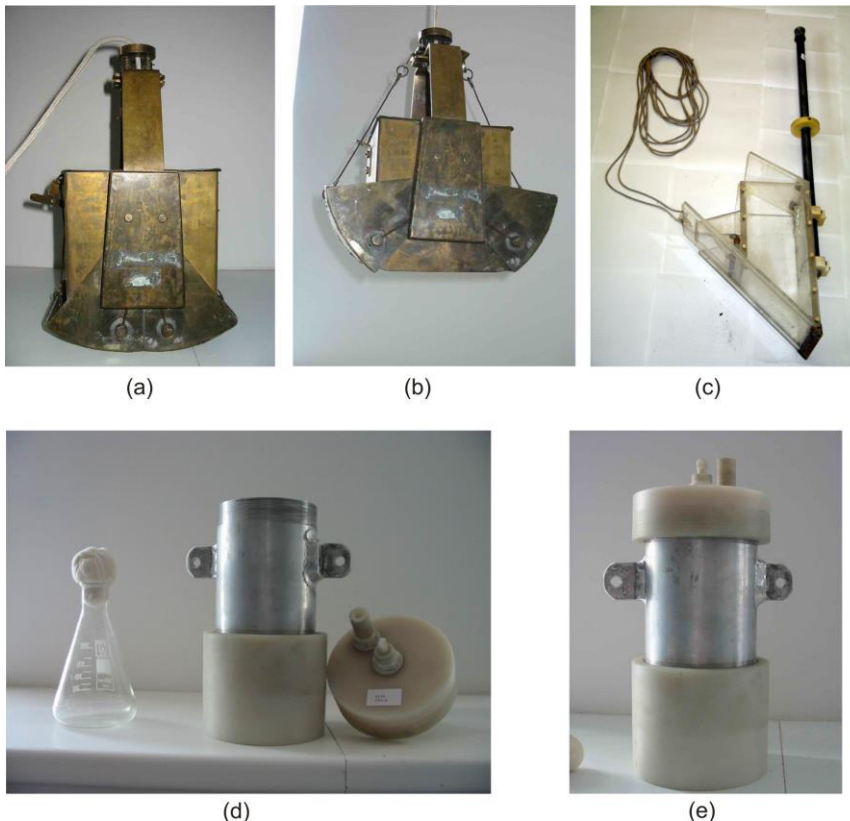
hűtőtáska

A vizsgálat menete

1. Partközeli mintavételnél az Erlenmeyer lombikot lássuk el a minta típusára és a mintavétel idejére utaló jelzéssel, majd helyezzük a mintavevő botba. Vegyük ki a dugót, és nyomjuk a lombik száját lefele tartva a víz alá kb.10 cm-re, majd fordítsuk meg. Miután a lombik félig megtelt vízzel vegyük ki, és zárjuk le.

2. Parttól távolabbi mintavétel esetén vegyük ki a dugót a műanyag zsinogra erősített Meyer-palackból, majd a partról dobjuk be kb. 20-30 m-re. Ha a palack megtelt vízzel, húzzuk ki és a vízmintát öntsük át steril 250 ml-es Erlenmeyer lombikba. Lássuk el a lombikot a minta típusára és a mintavétel idejére utaló jelzéssel.

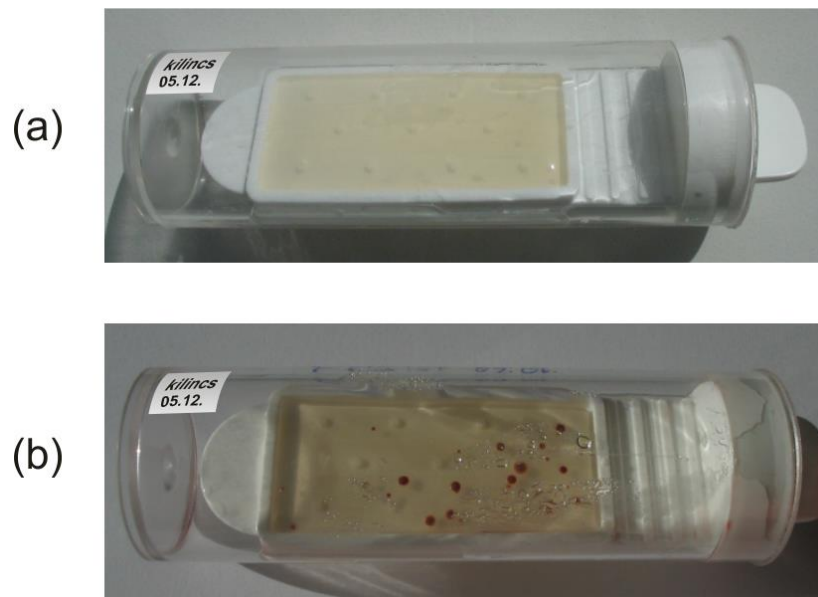
3. A mintákat lehetőség szerint azonnal lehűtve (5-10 °C), a legrövidebb idő alatt szállítsuk laboratóriumba.



9. ábra Környezeti mintavevő eszközök

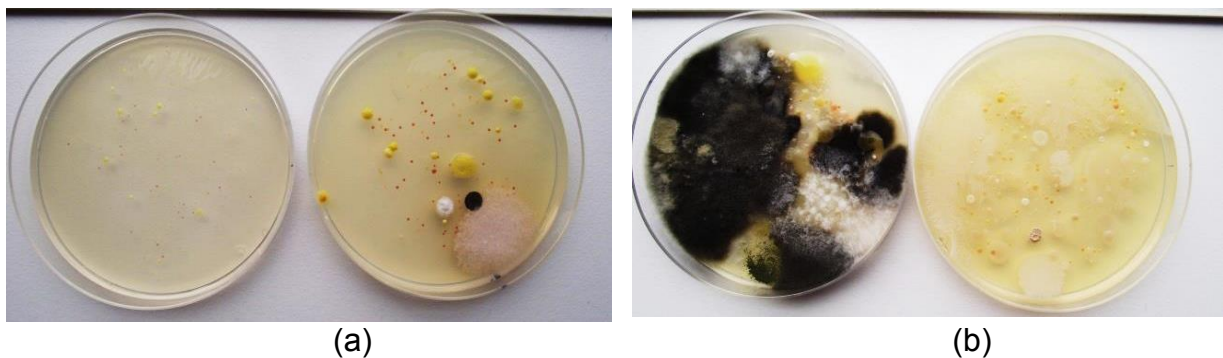
Ekman-Birge üledék mintavevő zárt (a) és felajzott (b) állapotban. Hargrave-féle finomszemcsés üledék mintavevő (c). Mélységi vízmintavevő szétszerelt (d) és bevetésre kész (e) állapotban (kötélzet nélkül).

Tárgyról, felületekről steril nedves vattatamponos törléssel, vagy speciális lenyomati mintavevőkkel (Contact Slide lemezek, Dip-Slide lemezek) (10. ábra) tudunk egyszerűen mintát venni (lásd 12. GYAKORLAT). A mintavétel során mindig figyelembe kell vennünk a vizsgálandó tárgy alakját, méretét és használatának rendeltetését (11. ábra).



10. ábra Felületek szennyezettségének ellenőrzése (Fotó: Romsics Cs.)

Steril „contact slide” lemez mintavétel előtt (a). Ajtókilincs felületi mintavételezése nyomán kifejlődött tenyészet (b).



11. ábra Mintavétel felületekről mikrobiológiai vizsgálatokhoz (Fotó: Romsics Cs.)

Laboratóriumi munkaasztal felületéről vett mintából szélesztett tenyészet (a).

Cipőtalp felületéről vett mintából szélesztett tenyészet (b).

12. GYAKORLAT

Mintavétel felületekről mikrobiológiai vizsgálatokhoz

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

vizsgálandó felületek, tárgyak

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

steril nedves vattatampon

húspepton tápagar lemez

keményítő-kazein tápagar lemez

Contact Slide lemezek (10. ábra)

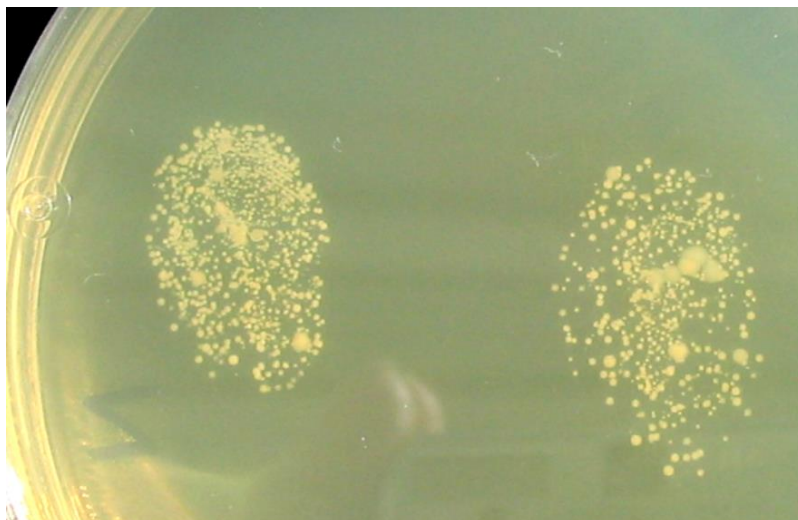
Dip-Slide lemezek

termosztát

A vizsgálat menete

1. Nagyobb tárgyak, felületek mintázásánál a tárgyak és eszközök felületének kb. 1 dm²-ét gondosan töröljük le a steril nedves vattatamponnal.
2. Az inokulált tamponnal szélesszűnk megfelelő tápagar lemez felületére (lásd 25. GYAKORLAT). Lássuk el a Petri-csészéket a minta típusára és a mintavétel idejére utaló jelzéssel.
3. A fertőzött tápagar lemezeket fordított helyzetben (fedelükkel lefelé) helyezzük 28°C-os termosztátba, és inkubáljuk 1 hétig.
4. Az inkubációs idő elteltével számoljuk meg a kifejlődött telepeket, végezzünk telep morfológiai megfigyeléseket (lásd 53. GYAKORLAT).
5. Hasonlítsuk össze és értékeljük az eltérő felületek mikrobiológiai vizsgálatának eredményeit.
6. Contact Slide lemezek használata esetén a mintavétel előtt ellenőrizzük a lejáratási időt, valamint a lemez állapotát (ép-e a csomagolás, nincs-e beszáradva vagy befertőződve stb.). A lemezzáró fóliát egyik sarkánál tépjük fel kb. 2 cm hosszan, majd a nyíláson keresztül húzzuk ki a lemezt.
7. A táptalajt tartalmazó flexibilis lapocskát az agar felszínével lefelé tartva nyomjuk rá a vizsgálandó felületre 5 másodpercig. Mintavétel után a táptalaj lapocskát helyezzük vissza a védőfóliába (az agar felszíne lefelé legyen) és a mellékelt záróelemmel zárjuk le. Lássuk el a minta típusára és a mintavétel idejére utaló jelzéssel.
8. A fertőzött lemezeket helyezzük 28 °C-os termosztátba, és inkubáljuk 1 hétig.
9. Az inkubációs idő elteltével számoljuk meg a kifejlődött telepeket, végezzünk telep morfológiai megfigyeléseket (lásd 53. GYAKORLAT).
10. Hasonlítsuk össze és értékeljük az eltérő felületek mikrobiológiai vizsgálatának eredményeit.

Számos esetben – pl. tiszta terekben, betegellátó intézmények egyes helyiségeiben, élelmiszer előállító üzemekben – csíraszegény és lehetőleg patogén mikroorganizmusoktól mentes környezetet kell biztosítani. Ehhez szorosan hozzátartozik az ott dolgozó **személyzet higiénés ellenőrzése** is. Ilyenkor leggyakrabban hámfelületekről, kézfejről, kézujjakról vesznek mintát tamponos (lásd 13. GYAKORLAT) vagy lenyomat (lásd 14. GYAKORLAT) mintavétellel. Egyszerű módszerrel ellenőrizhetjük a szappanos vagy fertőtlenítőszeres **kézmosás hatásosságát** is (12. ábra).



12. ábra Személyi tisztaság ellenőrzése kontakt mintával (Fotó: Vajna B.)

Ujjlenyomat mintából kifejlődött tenyészet húspepton agarlemezen.

13. GYAKORLAT

Mintavétel személyi tisztaság ellenőrzésére I.

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus
kéz hámfelülete

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök
steril nedves vattatampon
húspepton tápagar lemez
keményítő-kazein tápagar lemez
termosztát

A vizsgálat menete

1. A steril nedves vattatamponnal alaposan töröljük le mindkét kéz ujjfelszíneit, ujjbegyeit, a körömágyakat és a tenyérrészt.
2. Az inokulált tamponnal szélesszünk megfelelő tápagar lemez felületére (lásd 25. GYAKORLAT).
3. A feliratozott fertőzött tápagar lemezeket fordított helyzetben (fedelükkel lefelé) helyezzük 28 °C-os termosztátba, és inkubáljuk 1 hétig.
4. A tápagar lemezek felületén kifejlődött telepeket számoljuk meg, és hasonlítsuk össze a különböző helyekről származó vizsgálatok eredményeit. Végezzünk telepmorfológiai megfigyeléseket (lásd 53. GYAKORLAT).

14. GYAKORLAT

Mintavétel személyi tisztaság ellenőrzésére II.

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus
szappanos vagy fertőtlenítőszeres kézmosás hatásossága

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök
szappan
fertőtlenítőszer
húspepton tápagar lemez
keményítő-kazein tápagar lemez
termosztát

A vizsgálat menete

1. A Petri-csésze alján elhelyezett jelöléssel osszuk három részre a felhasználandó tápagar lemezt és számozzuk meg (1-3).
2. Kézmosás előtt valamelyik ujjunkkal érintsük meg az 1-gyel jelölt részen a táptalaj felszínét.
3. Szappanos kézmosás után érintsük meg ugyanazon ujjunkkal a táptalaj felszínének 2-vel jelölt részét.
4. Fertőtlenítőszeres kézmosás után az előzőleg már vizsgált ujjunkkal érintsük meg a táptalaj 3-mal jelzett részét.
5. A fertőzött tápagar lemezeket fordított helyzetben (fedelükkel lefelé) helyezzük 28 °C-os termosztátba, és inkubáljuk 1 hétig.
6. A tápagar lemezek felületén kifejlődött telepeket számoljuk meg, és hasonlítsuk össze a különböző helyekről származó vizsgálatok eredményeit. Végezzünk telepmorfológiai megfigyeléseket (lásd 53. GYAKORLAT). Elemezzük a kézmosás hatékonyságát (12. ábra).

4 BEVEZETÉS A MIKROSKÓPOK HASZNÁLATÁBA

4.1 Fénymikroszkópia

A mikroszkóp a mikroorganizmusok μm -es nagyságrendjéből következően a mikrobiológiai gyakorlatok egyik legfontosabb eszköze. A fénymikroszkóp részei: szemlencse (okulár), tubus, tárgylencsék (objektívek, forgatható revolverszerkezetben), tárgyasztal, kondenzor, fényforrás, állványzat (statív) és beállító csavarok (makro- és mikroszavar) (lásd 13.1 fejezet). Működésének lényege, hogy a vizsgálandó tárgyat az objektív egyszeres és kétszeres fókusza között helyezük el, így a tárgyról érkező és az objektíven áthaladó fénysugarak az objektív másik oldalán, a kétszeres fókusz távolságon kívül, a tárgy nagyított, fordított állású, valódi képét hozzák létre. Az okulár olyan távolságra van az objektívtől, hogy az objektív által alkotott kép az okulár fókuszán belül keletkezik, így a szemlencsébe nézve ennek a valóságos, nagyított fordított állású képnek a még tovább nagyított, egyenes állású, de látszólagos képét látjuk. A mikroszkóp össznagyítása az objektív saját nagyításának és az okulár saját nagyításának a szorzata.

Az objektív több lencséből álló lencserendszer: első tagja a frontlencse, a tárgy felé néző lencse, ettől függ a nagyítás és a feloldóképesség, a többi lencse feladata a lencsehibák kiküszöbölése. Az objektív által alkotott kép sajátosságai a tárgylencserendszer optikai tulajdonságaitól függenek. Az objektív rajzolóképessége az a tulajdonság, hogy a tárgy képét mennyire élesen rajzolja meg. A kép tökéletlenségét, így élettenséget is a lencsehibák (aberrációk) okozzák. A szférikus aberráció (gömbi eltérés) abból ered, hogy az optikai tengelytől távolodva a lencse egyre erősebben tör a rajta áthaladó fénysugarakat, így egy pontszerű tárgynak a képe a szélén elmosódó lesz. A kromatikus aberráció (színi eltérés) oka abban rejlik, hogy a különböző hullámhosszú fénysugarak gyújtópontja az optikai tengelyen nem esik egybe, a kisebb hullámhosszú sugarak közelebb, a nagyobb hullámhosszúak pedig távolabb egyesülnek. Fehér fény alkalmazásakor így módon nem kapunk éles képet és a kép színes (szivárvány) szegéllyel rendelkezik. Korrekciójára a domború lencséhez íomtartalmú, nagyobb diszperziójú flintüvegből készült homorú lencsét ragasztanak (akromát lencse: két szín korrekciója, apokromát lencse: három szín korrekciója).

Az objektív feloldóképessége a tárgylencsének az a tulajdonsága, hogy a tárgyról mennyire részletes képet rajzol. A feloldóképesség számszerű mértékét azzal a legkisebb távolsággal jellemezhetjük, amely távolságban fekvő két pontot egymástól még éppen megkülönböztet az objektív. Az optikai tengellyel párhuzamos megvilágítás esetében a feloldóképesség (d) függ: a tárgy megvilágítására használt fény hullámhosszától (λ), az objektív fél nyílásszögétől (α) és a fedőlemez és a frontlencse közti anyag törésmutatójától (n):

$$d = 1,22\lambda / (2n \cdot \sin\alpha).$$

A feloldóképesség annál nagyobb, minél kisebb a d értéke. Ez az alkalmazott fény hullámhosszának csökkentésével, az objektív nyílásszögének növelésével, vagy a fedőlemez és a frontlencse közötti anyag törésmutatójának növelésével érhető el. Valójában fénymikroszkóp használata esetén csak ez utóbbi változtatására van lehetőségünk. Erre a célra a cédrusolaj (immerziós olaj) a legalkalmasabb, mivel fénytörése csaknem azonos az üvegével, így a fény gyakorlatilag homogén közegben halad. A fenti képlet nevezőjében szereplő $n \cdot \sin\alpha$, a numerikus apertúra (NA), értéke 0,20 és 1,4 között változhat (az objektíven mindig fel van tüntetve).

$$NA = n \cdot \sin\alpha$$

A vizsgálandó tárgyról az okulár rajzol közvetlen képet. A mikroszkópban megfigyelt kép szerkezeti finomsága, a reális kép részletgazdagságától függ, amit viszont az objektív

feloldóképessége határoz meg. Ez a kép azonban szabad szemmel nem látható, az okulár nagyítása teszi láthatóvá.

4.1.1 Különböző megvilágítási rendszerek

A megfigyelés tárgyára vonatkozó információk növelése érdekében különböző észlelési módszereket és elrendezéseket fejlesztettek ki. Ezekre leginkább akkor van szükség, ha az általánosan használt, centrális világos látóterű áteső fényes megvilágítás mellett a mikroszkópos kép nem eléggé kontrasztos, vagyis ezek a módszerek legtöbbször különböző kontrasztnövelő eljárások.

Centrális világos látóterű megvilágítás esetén a direkt fény az optikai tengellyel párhuzamosan lép be a mikroszkóp objektívébe. Ez az elrendezés leginkább a vizsgált minta átlátszósági tulajdonságait adja vissza. A gyakorlat nyelvére lefordítva kontrasztos, jól és kevésbé átlátszó részleteket tartalmazó mikroszkópi tárgyakról ad jó minőségű képet (13. ábra). A **mikrobák megfigyelése centrális világos látóterű áteső fényű elrendezésben** talán kissé nehézkes, mivel ezek a sejtek általában kevésbé kontrasztosak. Előnye viszont a festésekkel ellentétben, hogy ebben az esetben természetes alakjukba, szerkezetükbe és életfolyamataikba nem avatkozunk be (lásd 15. GYAKORLAT).

15. GYAKORLAT

Természetes vizek mikrobaközösségének mikroszkópos vizsgálata áteső fényben

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

természetes vizek baktérium és egysejtű közössége

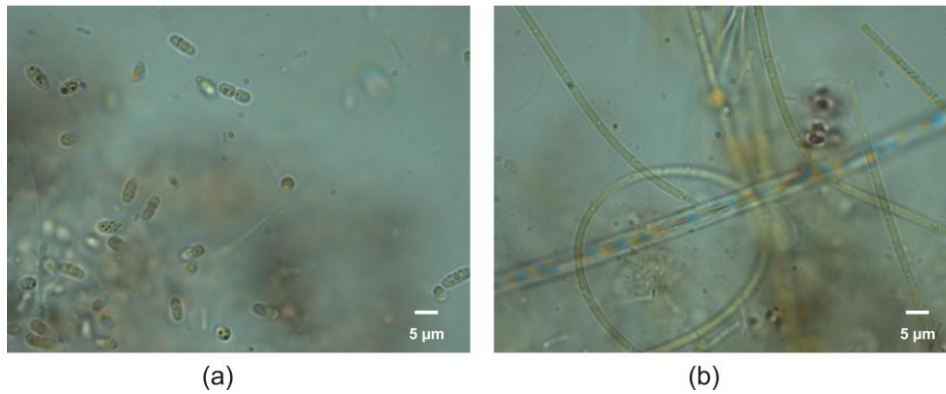
A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

környezeti vízminta (pl. tó, patak, akvárium)
tárgylemez
fedőlemez
Bunsen-égő
szemcseppentő
alkohol (zsírtalanításhoz)
fénymikroszkóp

A vizsgálat menete

1. Zsírtalanítsuk a tárgylemezt alkohollal történő leégetéssel (lásd 54. GYAKORLAT)
2. Feliratozzuk a tárgylemezt.
3. Cseppentsünk a mintából egy cseppet a tárgylemezre.
4. Fedjük le a mintacseppet előzetesen zsírtalanított fedőlemezrel.
5. Helyezzük a mikroszkóp alá a mintát, és keressük meg a fókuszsíkot. Először 16 x-os vagy 40 x-es nagyítású objektívet használjunk.
6. Figyeljük meg a mikrobák alakját és mozgását, a protisták és eukarióta algák esetében próbáljuk azonosítani a különböző sejt szervecskéket (pl. kloroplasztisz, lüktető üröcske). Megfigyeléseinkről készítsünk rajzot.

Sötét látóterű megvilágításnál a direkt, „el nem hajlított” sugarakat kizárják a megvilágításból, így a képalkotásban csak a vizsgált minta részletein „elhajlított” fénysugarak vesznek részt. Épp ezért általában jó erős fényforrásra van szükség. Kontraszt nélküli és egyéb módszerekkel észrevehetetlenül kicsi mikroszkópi tárgyak megfigyelésére alkalmas. A sötét látóterű megvilágítás többféleképpen megvalósítható: (i) megfelelő kondenzor esetén annak apertúra-rekesztét decentrálva elérhető, hogy a direkt fény elkerülje az objektív nyílását, (ii) gyűrű alakú fényforrás használatával (pl. a kondenzor szűrőtartójába helyezett kör alakú átlátszatlan tárggyal). Vékony, fonálszerű vagy a mikroszkóp feloldóképességénél kisebb tárgyak ennél a megvilágításnál teljes egészükben világítanak.



13. ábra Természetes víz mikrobiótája (Fotó: Makk J.)

Áteső fényű, világos látóterű felvétel. Pálca alakú (a) és fonalas (b) baktériumok egy halastóból vett vízmintában.

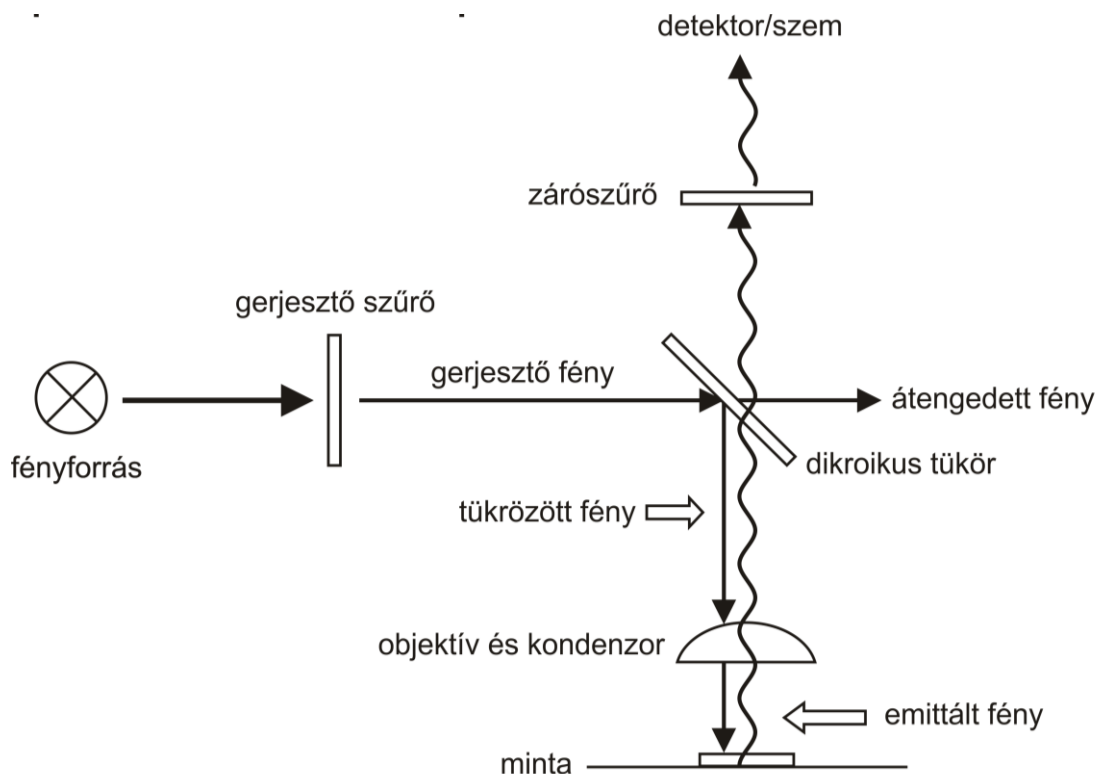
A fordított mikroszkópok olyan speciális elrendezésű eszközök, amelyeknél a fényforrás és kondenzor helyezkedik el felül és az objektívek tárgyasztal alatt találhatók. A fénysugarak menetében az előzőekben ismertetettekhez képest semmilyen elvi eltérés nincsen. Áteső és ráeső fényben végzett vizsgálatokhoz is készülnek ilyen berendezések, vagyis átlátszó és átlátszatlan tárgyak megfigyelését is végezhetjük a megfelelő fordított mikroszkópos elrendezéssel. Átvilágítás esetében a tubus a képalkotó elemekkel a tárgyasztal alatt, míg a megvilágító rendszer a fölött helyezkedik el. Az ilyen, áteső fényes elrendezést jól lehet használni, ha a vizsgálati minta rétegvastagsága nagy (pl. főzőpohárban vagy Petri-csészében található). A ráeső fényben működő fordított mikroszkópok pedig olyan esetekben használhatók jól, amikor nagyméretű minta felületi struktúráját vizsgáljuk, hiszen itt a tárgyasztal felett sincs semmilyen optikai és mechanikai mikroszkóp alkotóelem, ami korlátozná a minta geometriai méretét.

Egyéb, itt nem részletezett speciális mikroszkópos észlelési rendszerek a teljesség igénye nélkül: fáziskontraszt mikroszkópia, interferencia mikroszkópia, polarizációs mikroszkópia. A képalkotásban részt vevő fény típusa szerint is léteznek speciális technikák: infravörös mikroszkópia, ultraibolya mikroszkópia, fluoreszcens mikroszkópia.

4.1.2 Fluoreszcens mikroszkópos technikák

Bizonyos anyagokat, ha nagyenergiájú, kis hullámhosszú fényvel világítunk meg (gerjesztő fény), akkor azok más, kisebb frekvenciájú (nagyobb hullámhosszú, kisebb energiájú) fényt bocsátanak ki. Ezt a jelenséget fluoreszcenciának nevezzük. Számos anyag rendelkezik ilyen tulajdonsággal, ásványok és szerves molekulák egyaránt, az élő sejtek (pl. sejtalkotók, makromolekulák) pedig különböző fluoreszcens festékekkel is megfesthetők. (Ha a mintának előzetes festés nélkül is van fluoreszcens tulajdonsága, azt autofluoreszcenciának nevezzük.) Mivel a kibocsátott fény hullámhossza (színe) eltér a gerjesztő fényétől, a fluoreszcens mikroszkóppal alkotott képen általában csak a vizsgálni kívánt (megfestett) rész látható. A módszer igen elterjedt a modern biológiai tudományokban, mivel nagyon érzékeny és segítségével kis molekulák is kimutathatók.

A fluoreszcens mikroszkópok a közönséges mikroszkópoktól fényforrásukban és fényszűrőit tekintve különböznek, optikai felépítésük viszont nagyon hasonló (14. ábra). A felhasznált abszorpciós szűrők a fény spektrumából csak egy meghatározott, szélesebb vagy keskenyebb sávot engednek át. Mivel a különböző struktúrák (különböző színű festékekkel festve vagy autofluoreszcencia alapon) ideális esetben különböző hullámhosszú fényvel gerjeszthetők és szintén eltérő hullámhosszú fényt bocsátanak ki, ezeket egy mintán párhuzamosan is lehet vizsgálni, megfelelő hullámhosszú gerjesztő fényt és fényszűrőt alkalmazva.



14. ábra Az epifluoreszcens mikroszkóp működési elve

A transzmissziós (áteső fényes) fluoreszcens elrendezésnél a minta részecskéi a gerjesztő sugaraknak csak egy részét abszorbeálják, jelentős részük az objektíven keresztül a detektorba, ill. a szembe kerül. Ennek kiküszöbölése érdekében ún. zárószűrőket alkalmaznak, amelyek a gerjesztő sugarakat a lehető legnagyobb mértékben, míg a kibocsátott fluoreszcens sugárzást minimálisan abszorbeálják.

Epifluoreszcens (ráeső fényes) elrendezésnél az alkalmazott fény az objektív lencséken keresztül jut a tárgyra, ehhez speciális objektív, és a különböző hullámhosszú fényt átengedő, ill. visszaverő, ún. dikroikus tükörre/szűrőre van szükség. Ez az elrendezés optikai szempontból sokkal szerencsésebb (pl. könnyebb váltani a fluoreszcens és normál, áteső fényes megvilágítás között), emiatt ez a rendszer a transzmissziós elrendezéshez képest jóval elterjedtebb.

A konfokális mikroszkóp alapelve hasonló az epifluoreszcens mikroszkópéhoz, itt viszont két nyílást (apertúra) helyeznek el a fókuszon kívül eső sugarak kizárása érdekében. A két nyílás fókusza azonos (innen a konfokális név), emiatt kizárólag egy meghatározott pontból érkező fény érzékelhető. A mikroszkóppal a kép megalkotásához végig kell pásztáznunk a vizsgálati mintánkat, ez viszont a korábban említett elrendezésekhez képest jobb felbontással és érzékenységgel jár. A mai elrendezéseknél legnagyobb részt lézerekkel végzik a minta pontszerű megvilágítását és általában nem valódi képet látunk, hanem a képalkotás számítógép segítségével történik. További nagy előnye a konfokális mikroszkópoknak, hogy (amennyiben a minta típusa engedi) a pásztázás a minta mélységében is megvalósítható, így végeredményképp háromdimenziós szerkezet rekonstruálható.

4.2 Elektronmikroszkópia

Amikor az elektronokról kiderült, hogy nem csak korpuszkuláris természetű anyagi részecskék, de elektromágneses hullámok is, felmerült azok mikroszkópiában való hasznosítása. Egy elektronforrásként szolgáló izzó katódból (pl. volfrám szálból) kilépő elektronok – a katód és a vele szemben elhelyezett anód között – nagy stabilitással beállított

viszonylag nagy (10-100 kV) feszültség különbséggel erősen légritkított térben, vákuumban felgyorsíthatók. Az anódon lévő nyíláson átrepülő elektronok alkotta elektronsugárzás monokromatikus, hullámhossza az alkalmazott gyorsító feszültség függvénye, és mivel töltött részecskék képezik, elektromágneses lencsékkel fókuszálható. A De Broglie-képlet alapján minél nagyobb a gyorsító feszültség, annál rövidebb hullámhossz érhető el. A rövidebb hullámhossz az Abbe-egyenlet alapján nagyobb felbontóképességet tesz lehetővé. Pl. 60 000 V gyorsító feszültséggel 0,005 nm hullámhosszú elektronsugarak állíthatók elő, ez a hullámhossz öt nagyságrenddel kisebb, mint a fény hullámhossza, azaz az elérhető felbontás nagyságrendekkel (kb. 1000-szeresére) növelhető. Az elektronmikroszkóp segítségével akár a tárgy 0,1 nm nagyságú részleteit is megfigyelhetjük, így pl. a sejtek ultrastruktúrái, vagy a vírusok, sőt egyes makromolekulák (pl. DNS) is láthatóvá válnak. A nagyobb felbontóképesség elérésének azonban nagy „ára” van, technikai jellegüknél fogva az elektronmikroszkópok sokkal bonyolultabb berendezések, mint a fénymikroszkópok, előállításuk és működtetésük költségesebb, sokszor az anyagok vizsgálatra való előkészítése hosszadalmas és technológiailag sokkal bonyolultabb. A biológiai mintáknál különösen nagy a mintaelőkészítés során az anyagokat érő torzító hatások jelentősége és rendszerint csak erősen korlátozott méretű minták vizsgálata lehetséges. A nehézségek és technológiai korlátok ellenére az elektronmikroszkópos vizsgálatok igen hasznosnak bizonyulnak a mikrobák finom-szerkezetének tanulmányozásához, használatuk ma már nélkülözhetetlen.

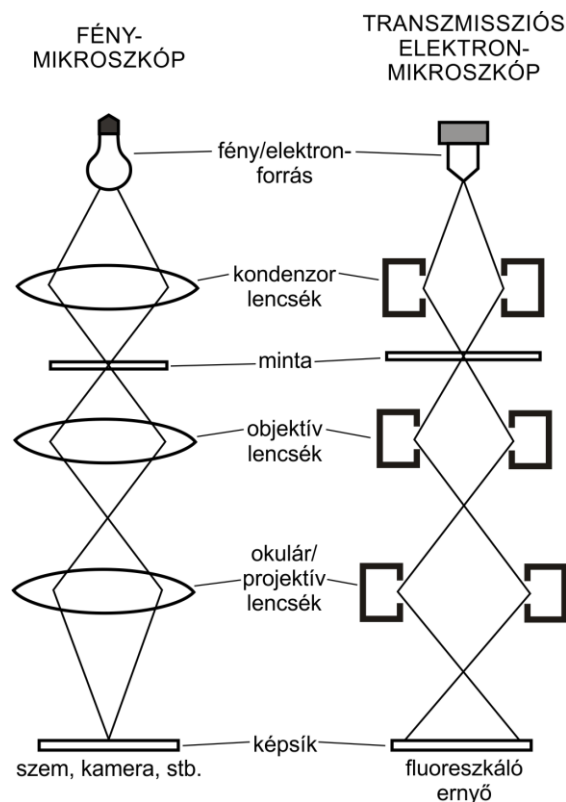
Az elektronmikroszkópoknak több fajtája ismeretes: a legismertebb a transzmissziós elektronmikroszkóp (TEM), ami a tárgy megfigyelését elektronsugárral való átvilágításban végzi, és a pásztázó elektronmikroszkóp (SEM), ami a pásztázó elektronsugárzás hatására a minta felszínéről kilépő elektronok és egyéb jelek segítségével állít elő képet a tárgy felületéről.

4.2.1 TEM

A transzmissziós elektronmikroszkóp felépítésében bizonyos mértékig hasonlít a fénymikroszkóphoz, azonban a fénysugarat nagy sebességű elektronsugár, az üveglencsét pedig mágneses lencsék helyettesítik. Lényeges különbség még, hogy az elektronok terjedéséhez légüres térre van szükség, az elektronmikroszkóp belsejében nagy vákuumot kell létesíteni (10^{-3} - 10^{-7} Pa). Az elektronmikroszkópok fontos tartozéka az ún. elektronagyúban az elektronokat szolgáltató katód. Az elektronagyúból az elektronok a katódból izzítás hatására (izzókatódos forrás) vagy pedig kihúzó elektromos tér hatására (téremissziós forrás) lépnek ki. A katódból kilépő elektronsugarakat elektromágneses lencsék fókuszálják. Az elektronsugár először a kondenzorlencséken fókuszálódik a vizsgálandó mintára, majd ezen átjutva pedig az objektív és a projektor lencséken haladnak keresztül. Végül az erősen felnagyított kép fluoreszkáló ernyőre vetődik, ahol az emberi szem számára is láthatóvá válik (15. ábra). A kép élesre állítását az elektromágneses lencséken átfolyó áram erősségének a változtatásával lehet elérni.

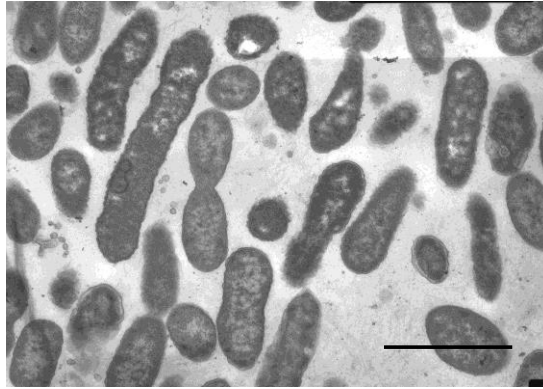
A transzmissziós elektronmikroszkópban a kondenzorrendszer a tárgynak viszonylag nagy területét világítja meg. Amikor a gyorsított elektronsugár a megfelelő vastagságú vizsgálandó preparátumba behatol, a kettő között bonyolult kölcsönhatások lépnek fel. A gyorsított elektronsugarak csak rendkívül vékony anyagokon (50-100 nm vastagú) tudnak áthaladni. A preparátumon az áthaladó elektronsugár egy része irányváltoztatás nélkül megy át, míg mások a minta atomjaival ütközve visszaverődhetnek, irányt változtathatnak, vagy lelassulhatnak. Ha az elektron egy atomot eltalál, az egyik lehetőség az, hogy energiavesztés nélkül, rugalmasan elpattanva megváltoztatja irányát (rugalmas elektronszóródás). Mennyiségük a minta vastagságával, az anyagsűrűségével arányosan nő. Minél nagyobb az alkotóelemek tömegszáma, annál nagyobb a szóródás. Ha viszont az elektronsugár egy elektronja a vékony minta egyik atomjának héján foglalt elektronjával

ütközik, lefékeződhet, energiát veszítve, és bár irányát esetleg nem változtatja meg jelentősen, hullámhossza megváltozik (rugalmatlan elektronszóródás). Kellően vékony minták esetén a rugalmatlanul szóródott elektronok átjutnak a mintán. A képalkotásban elsősorban az eltérített, rugalmasan szórt elektronoknak van szerepük. Ezeket egy igen kis nyílású (15-20 μm) fémrekesz (apertúra) kiszűri a leképző rendszerből, így a nagyobb tömegsűrűségű tárgyponthoz a fluoreszcens ernyőn sötétebb képpontok felelnek meg. A hagyományos TEM lényegében csak ezt a jelenséget tudja hasznosítani a vizsgálati tárgy leképzésében. A rugalmatlanul szórt elektronok megváltozott hullámhosszuk (és így különböző fókusz távolságuk) miatt zavarhatják a képalkotást (kromatikus hiba), ugyanakkor az ütközés miatt veszített energia különféle sugárzások formájában szabadul fel, amelyek jellemzők az illető atomra és felhasználhatók a mintán belül annak azonosítására (elektronmikroszkópos elemzés).



15. ábra Fénymikroszkóp és transzmissziós elektronmikroszkóp sugármenetének összehasonlítása

A TEM csak igen kisméretű, illetve nagyon vékony objektumok vizsgálatára alkalmas. Tömbanyagú minták felülete csak közvetve, időigényes lenyomat készítésével vizsgálható (15. ábra). Ahhoz, hogy egy biológiai mintából elektronsugárral átvilágítható vastagságú metszeteket lehessen készíteni bonyolult, soklépéses minta-előkészítési (mintapreparálás, rögzítés, víztelenítés, gyantába ágyazás) és időigényes mikrotechnikai módszereket (pl. gyantába ágyazott mintákból ultravékony metszetek készítése ultramikrotommal) kell alkalmazni. De az ultravékony metszetek TEM elemzése fontos és nélkülözhetetlen, hiszen számos millió mikrobiótájának megoszlása, csoportosulása, a különböző morfortípusok, a minta egyes sejtjeinek ultrastruktúrája csak ezáltal tárható fel. A mikrobák egyedi sejtjeinek vizsgálata (pl. baktériumok, kovaalga héjak) azonban lehetséges egyszerű minta-előkészítés alkalmazásával. A baktériumok alakjának, csillózatának legegyszerűbb transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálata negatív festési eljárással történhet (16. ábra és 17. ábra).



16. ábra Transzmissziós elektronmikroszkópos metszet (Fotó: Kovács A.)

KingB agar táptalajon növesztett *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica* S5^T sejtek. Méretvonal: 2 μ m.



17. ábra Egy pálca alakú baktérium hosszirányú keresztmetszetének elektronmikroszkópos képe (Fotó: Kovács A.)

A Pannonibacter phragmitetus C6/19^T sejtjének Gram negatív sejtfall szerkezete és mindkét sejtvégen sapka-szerű képletek figyelhetők meg. Méretvonal: 0,5 μ m.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatok során használt tárgytartó rácsok az ún. mikrostélyok (angolul: grids), melyek általában 2,3-3,0 mm átmérőjű fémrostély korongok (pl. nikkel, réz, arany). Használatuk célja a vizsgálandó sejtek, szövet (anyag) tartása, szilárdítása, valamint az elektronmikroszkópos vizsgálat során keletkező hő, továbbá az elektromos töltések elvezetése. Rájtuk a nyílások száma rendszerint 50, 100, 200, 300, 400 vagy esetleg 50-nél kevesebb is lehet. A nyílások általában négyzet alakúak, de téglalap, kör stb. formákat is használnak. Minél nagyobb a rács nyitottsága, annál nagyobb az elektronsugárral átvilágítható része, de egyúttal annál kisebb alátámasztási felületet biztosít a mintának. Ezért felszínüket használat előtt a minták tartását fokozó, igen vékony (5-10 nm) műanyag hordozóhártyával borítjuk be. Ismertesek szerves anyag alapú (kloroformban oldott formvarból vagy kollódiumból készült) és különböző szerves anyagokból (C, Al-Au stb.) előállított hordozóhártyák. Leggyakoribb a **gridek hártázása formvarral** (lásd 16. GYAKORLAT). Esetenként kétféle anyag kombinációja is lehetséges (pl. szénrel bevont formvar film). A szenezés során formvar-hártyás gridet vékony grafitréteggel vonjuk be. A szenezés vákuum-porlasztóban történik egyszerű grafit rudak segítségével.

16. GYAKORLAT

Gridek hártázása formvarral

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus
transzmissziós elektronmikroszkópos mintaelőkészítés

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

0,3% (m/V) formvar kloroformban oldva
gridek
bonctű
üvegkád
tárgylemezek
főzőpohár
parafilm
olló
Petri-csésze
finom fémcsipesz

A vizsgálat menete

1. A tárgylemezt alaposan megtisztítjuk úgy, hogy semmilyen szennyeződés ne maradjon rajta.

2. A tárgylemezt mártsuk bele 0,3%-os formvar oldatba, majd egyenletes, de gyors mozdulattal húzzuk ki.

3. Miután az oldat megszáradt, bonctű segítségével a tárgylemez mindkét oldalát karcoljuk be a szélekkel párhuzamosan, azért, hogy a hártya jól leváljon róla. (A bekarcolást a szélektől 1-2 mm-re, illetve – azon a végén, ahol nem ért bele teljesen az oldatba - a hártya határától 1-2 mm-re végezzük.)

4. Eresszük bele a tárgylemezt lassan és egyenletesen egy desztillált vízzel színültig megtöltött edénybe a vízfelszínre merőlegesen, és a végén engedjük el. Ekkor a hártya leválik a tárgylemezről, és a víz felszínén marad, míg a tárgylemez lesüllyed az edény aljára. Mivel az üveg is, a víz is és a hártya is színtelen, célszerű egy lámpával oldalról megvilágítani a vizet, hogy lássuk a felületén csillogó hártyát.

5. Csipesz segítségével, egymástól megfelelő távolságban (kb. 2 mm) helyezzük rá a grideket a hártyára.

6. A gridekkel megrakott hártyát vékony papír, vagy parafilm csík segítségével vegyük fel. A parafilm csíkot vízszintesen helyezzük rá a grideket tartalmazó hártyára, és hirtelen mozdulattal szedjük fel a hártyát a víz felszínéről.

7. A csíkokat szárítsuk meg levegőn Petri-csészébe helyezve. A száradó hártyát a Petri-csésze tetejével fedjük le, hogy megóvjuk a grideket az esetleges szennyeződéstől, porosodástól.

8. Mielőtt a mintát felcseppentenénk, a gridet bonctűvel óvatosan vágjuk körbe (pontosabban a grid körül vágjuk körbe a hártyát, mivel előfordulhat, hogy a hártya mégsem válik el a papírtól), és csipesszel válasszuk le a szűrőpapírról, vigyázva, hogy a griden lévő hártya ne sérüljön meg. Ezután a grid készen áll a minta felcseppentésére, vagy ráúsztatására.

Ismeretes, hogy a biológiai struktúrákat alkotó elemek legtöbbje kis atomszámú (pl. szén, hidrogén, oxigén, nitrogén), kevésbé szórják az elektronokat, a szerves molekulák többsége alig ad árnyékot transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok során. A csekély elektronszórásbeli különbségeit meg kell növelni a preparátumban, hogy az egyes alkotórészek jól felismerhetők, egymástól elkülöníthetők legyenek. Ez az elektronmikroszkópiában nehézfém tartalmú vegyületekkel történő festéssel érhető el. Az elektronmikroszkópos festés elvi alapja az, hogy a sejtek különböző részei különböző mértékben kötik (adszorbeálják, sókötést képeznek vagy redukálják) a nehézfémionokat, ami elektronszórásbeli különbségek formájában jelentkezik. Az elektronsugárzással átvilágított mintákon a szcintillációs ernyőre vetített képén ezért az elektronáteresztő anyagot tartalmazó struktúrák helye fényleni fog (a róla készült fényképen világos vagy fehér lesz), míg az elektronszóró struktúráknak megfelelő helyeken nem lesz felvillanás, az ernyő sötét marad (a fényképen sötét vagy fekete lesz). Vagyis az elektronmikroszkópi képen a nehézfémek

eloszlása adja az egyes struktúrák képe közötti kontrasztot. Ezért az elektronmikroszkópiában használatos "festékanyagokat" kontrasztosító anyagoknak, magát az eljárást pedig kontrasztosításnak nevezzük. A leggyakrabban használt kontrasztosító anyagok az uranil-acetát, ólom-citrát, foszfor-volfrámsav és ozmium-tetraoxid.

Baktériumok morfológiájának (sejtalak, csilló) **vizsgálatára** az egyik legegyszerűbb módszer a **transzmissziós elektronmikroszkópos negatív festési eljárás** (lásd 17. GYAKORLAT). Negatív festéskor a vizsgálandó, rendszerint előzetesen fixált mintát elektronszóró anyag (pl. uranil-acetát, foszfor-volfrámsav-oldat) egy cseppjével itatjuk át, amely a makromolekulákhoz kötődik. A sejtek kontrasztjának fokozódása által alakjuk, csillózatuk jobban előtűnik.

17. GYAKORLAT

Baktériumok morfológiájának vizsgálata TEM negatív festési eljárással

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismeretlen baktériumtörzs 24 órás tenyészet táplevesben

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

foszfor-volfrámsav 1% (m/V) vizes oldata (pH 7,0)

3,2%-os formaldehid, 2,5%-os glutáraldehid oldat, 0,2 M kakodilátpufferben

pipetta, steril pipettahegyek

9 ml steril fiziológiás oldat

finom fémcsipesz

formvar-hártyás gridek

transzmissziós elektronmikroszkóp (TEM)

Bunsen-égő

A vizsgálat menete

1. Pipettával steril fiziológiás sóoldat felhasználásával készítsünk hígításokat a táptalajról steril oltókaccsal leszedett 24 órás baktérium telepekből, vagy a táplevesben létrehozott baktérium-tenyészetből.

2. Pipetázzunk a hártázott mikrostély matt felszínére 3 µl-nyi hígított baktériumszuszpenziót.

3. A preparátumot néhány percig hagyjuk száradni, majd a felesleges folyadékot szűrőpapírcsík segítségével óvatosan távolítsuk el.

4. Néhány percnyi száradást követően 3 µl-nyi fixáló oldatot (3,2% formaldehid, vagy 2,5% glutáraldehid, 0,2 M kakodilátpufferben) juttassunk a hártya felszínére, melyet 1-2 percig hagyjunk állni, majd szűrőpapírral távolítsuk el a felesleget.

5. Pipetázzunk 3 µl-nyi 1%-os foszfor-volfrámsavat az immár fixált sejtekre, melyet 3 perc után itassunk le a mikrostély felszínéről.

6. Néhány perc száradást követően vizsgáljuk meg a mintát transzmissziós elektronmikroszkópban. Figyeljük meg a baktériumsejek alakját, esetleg a csillók elhelyezkedését.

A **transzmissziós elektronmikroszkópos preparátum készítése** elengedhetetlen a Centrales, illetve nagyon apró méretű Pennales **kovaalga fajok meghatározásához** (lásd 18. GYAKORLAT), melyek fénymikroszkópos eljárásokkal bizonytalanul identifikálhatók. Transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) vizsgálatához a megfelelő sűrűségű roncsolt minta egy cseppjét használjuk. A mintát rácsra (gridre) cseppentjük, melyet előtte speciális hordozó filmmel (formvar) bevontunk, majd megszáritjuk. Az algavizsgálatokhoz legcélszerűbb 63 µm-es lyukszélességű gridet használni (1 grid 300 lyukat tartalmaz). Az így előkészített minta már vizsgálható a transzmissziós elektronmikroszkópban, mielőtt azonban beletennénk, célszerű fénymikroszkópban ellenőrizni, hogy megfelelő-e a sűrűsége. Ehhez a

gridet óvatosan tárgylemezre tesszük és 400 x-os nagyítás mellett fénymikroszkóppal ellenőrizzük. Ha híg, még egy cseppet tehetünk rá, ha túl hordalékos a minta, sűrű, új preparátumot kell készíteni.

18. GYAKORLAT

TEM preparátum készítése kovaalga vizsgálatok céljából

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

üres kovavázakat tartalmazó roncsolt környezeti minta

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

fémcsipesz

pipetta (50-200 µl-es)

formvar-hártyás gridek

transzmissziós elektronmikroszkóp (TEM)

fénymikroszkóp

tárgylemez

A vizsgálat menete

1. Cseppentsük a roncsolt és desztillált vízzel mosott kovavázakat tartalmazó mintát megfelelő hígításban alkalmazva formvar hártyával bevont gridre (kb. 5 µl mintát).

2. Szárítsuk meg szobahőmérsékleten.

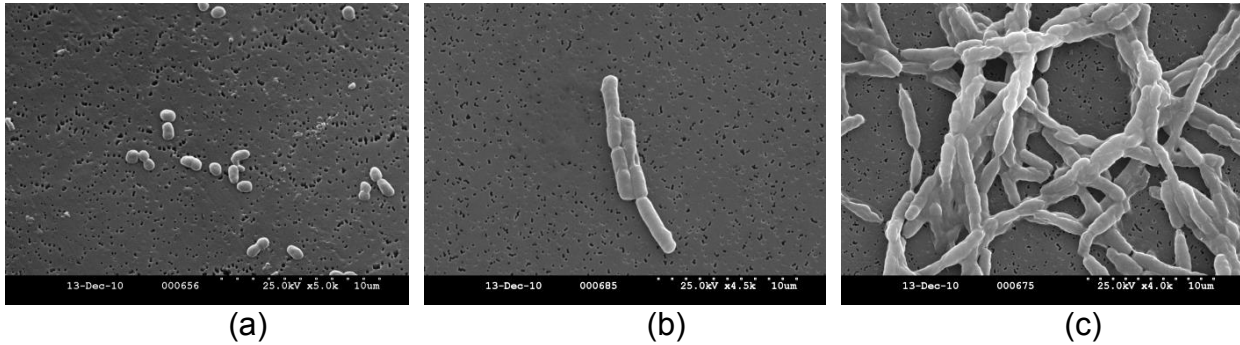
3. A beszárított minta sűrűségét ellenőrizzük tárgylemezre helyezve 400 x-os nagyítás mellett fénymikroszkópban.

4. A megfelelő sűrűségű mintát vizsgáljuk meg elektronmikroszkóppal.

4.2.2 SEM

A hagyományos pásztázó elektronmikroszkóp (scanning/letapogató elektronmikroszkóp, SEM) olyan berendezés, amelyben az elektronágyúból kilépő jól fókuszált elektronsugár a mikroszkóp oszlopában elhelyezett eltérítőtekercs működésének eredményeképp végigpásztazza, mintegy letapogatja a vizsgált tárgy felszínét (18. ábra). Az elektronsugár és a tárgy kölcsönhatásából származó jeleket erre alkalmas detektorok érzékelik, és ezeket megfelelően feldolgozva, az elektronsugár mozgásával szinkronizálva aztán képileg megjelenítik. Mivel az elektronsugár és a tárgy kölcsönhatásaként számos, az anyag adott felületére jellemző típusú jel (mintából kilépő szekunder elektron, visszaszórt elektron, vagy karakterisztikus röntgensugár) keletkezik, különféle detektorokkal lehetővé válik a minta különböző tulajdonságainak képszerű megjelenítése, vagy a vizsgált anyag tulajdonságainak meghatározása. Ilyen módon a vizsgált anyag alaki sajátosságain túlmenően, a készülék felszereltségétől függően számos más tulajdonság (pl. az elem összetétel) is vizsgálható. Mindezek ellenére a pásztázó elektronmikroszkóp legáltalánosabban használt sajátossága az, hogy a vizsgált anyagok felszínének alaki tulajdonságairól nagy felbontású és nagyítású, ugyanakkor nagy mélységélességű háromdimenziós képet tud alkotni. A jobb készülékek felbontóképessége ma már 1-3 nm is lehet, kis nagyítások esetén az élességi mélység elérheti a 3-4 mm-t is.

A hagyományos mikroszkópoknál a szigetelő tulajdonságú biológiai minták felszínét vékony, az elektromosságot jól vezető réteggel szükséges bevonni, hogy a képképzést zavaró feltöltődés ne következzen be a mintában. A gőzölést vákuumban arannyal, vagy arany-platina ötvözetrel, vagy szénnel végzik. Fontos, hogy a vezető réteg egyenletes vastagságú és mennél vékonyabb legyen (8-10 nm), hogy a morfológiailag fontos finom részleteket ne fedje el.



18. ábra Pásztázó elektronmikroszkópos felvétel (Fotó: Makk J.)

R2A táptalajon növesztett *Aquipuribacter hungaricus* tenyészet sejtciklusa során bekövetkező morfológiai változások; 8-18 órás (a), 24-36 órás (b), 72 órásnál idősebb (c) tenyészet.

A pásztázó elektronmikroszkópban a nagy energiával becsapódó elektronok energiája többféle folyamat révén adódik át a besugárzott mintának (pl. elektronokat vált ki belőle, karakterisztikus röntgensugárzás keletkezik). A biológiai minták morfológiai elemzéséhez főleg a szekunder elektronok és a visszaszórt elektronok detektálásán alapuló képalkotás használható. Az 50 eV-nál kisebb energiájú elektronokat egyezményesen szekunder elektronoknak nevezik. Ezek nagy része onnan származik, hogy a besugárzó elektronok a minta atomjaival kölcsönhatásba lépve leszakítja az azok külső elektronhéjain leglazábban kötött elektronokat, a másik része viszont kis energiájú visszaszórt elektron. Mennyiségük nem áll egyszerű összefüggésben a vizsgált felületet alkotó atomok tömegszámával. Kilépési irányuk és mennyiségük erősen függ a vizsgált felület topográfiájától. Energiájuk kicsi, csak a felület legkülső rétegéből tudnak a felszínre jutni (~3-50 nm vastag felszíni rétegből). A szekunder elektronok a minta felszínének geometriai egyenetlenségeiről hordoznak információt, és általuk készíthetjük a legjobb felbontású képeket, tekintettel arra, hogy kis energiájuk miatt kisebb mintapontokból származnak, mint a többi jel.

A minta felszínét elhagyó 50 eV-nál nagyobb energiájú elektronok tartoznak a visszaszórt elektronok csoportjába. Ezek már a felület mélyebb rétegeiből származnak (kb. 200 nm-es mélységből). Mennyiségük a becsapódási felület elemi összetételétől, azaz atomjainak tömegszámától függ, továbbá az elektronok mennyisége és haladási iránya erősen összefügg a becsapódási felület domborzati viszonyaitól is. A visszaszórt-elektron üzemmódban a minta néhány száz nm mélységébe nyerhetünk betekintést.

Ha az elektronsugárral bombázott minta atomjainak belső, kis energiájú elektronhéjain keringő elektronjai rugalmatlanul ütközve a gerjesztő (becsapódó) elektronokkal elhagyják az atommag vonzáskörzetét (az atom ionizálódik), akkor a külső héjakon keringő elektronok elfoglalják az üressé vált pályákat. Ekkor a két pálya energiaszintje közötti energiakülönbség az adott elemre, sőt annak elektronhéjára jellemző ún. karakterisztikus röntgensugárzás formájában szabadul fel. Ezek a sugarak részben elnyelődhetnek a mintában, részben kiléphetnek abból. Az utóbbi sugarak használhatók az analitikai vizsgálatok céljaira, akár biológiai minták anyagi összetételének meghatározására. Ma már a mikroszkópos röntgensugár mikroanalízis elemösszetétel meghatározás a morfológiai vizsgálatokkal való kombinálása sok és érdekes információ megszerzését teszi lehetővé.

4.2.2.1 Mintaelőkészítés pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz

A különböző felületek mikroba-közösségeinek felszíni tanulmányozására alkalmas a pásztázó elektronmikroszkópia (SEM). Legtöbbször a minták előkészítésének három fontos szakaszát különböztetjük meg: a rögzítést, a víztelenítést és vezető bevonat készítését (lásd 19. GYAKORLAT).

A rögzítés (fixálás) célja megőrizni a sejtek szerkezetét és összetételét, a sejteket az élethez lehető legközelebb eső állapotban megtartani, ellenállóvá tenni a mintát a mintaelőkészítés további fázisaiban bekövetkező ártó hatásokkal szemben. Az ideális fixáló gyorsan penetrál, minimális deformálódást okoz.

A formaldehid (formalin) az egyik legismertebb, igen jó fixálószer, diffúziós képessége legnagyobb az aldehidek között. Főként a fehérjéket rögzíti, 4-10%-os pufferolt vizes oldatát szokás használni, nemcsak önmagában, hanem számos rögzítőkeverékben is. A glutáraldehid a formaldehidhez hasonló tulajdonságú kiváló rögzítő, 1-5%-os pufferolt vizes oldatát alkalmazzák. Mint ötszénatomos, két aldehid csoportot tartalmazó molekula a fehérjék oldalláncaival, funkciós csoportjaival gyorsan reakcióba lép. A formaldehidhez képest stabilabb keresztkötéseket hoz létre vagy egyazon molekulán belül, vagy távolabb eső molekulák között. Finom térhálós struktúrát alakítva eredeti helyükön rögzíti a fehérjéket, mielőtt kioldódnának, vagy diffúziós jelenségek lépnének fel. Az ozmium-tetraoxid 0,5-2%-os pufferolt vizes oldatát és gőzeit is gyakran használják sejtek, kenetek, hártypreparátumok rögzítésére. Relatív nagy molekulamérete miatt a diffúziós képessége kicsi, ezért 1 mm³-nél nagyobb anyag fixálására nem alkalmas. Alkalmazzák egymagában, vagy mint második fixálót (elsősorban az aldehidekben történő rögzítést követően). Az aldehides rögzítésre szükség van, mert az ozmiumsav bizonyos mértékű lipidoldó tulajdonságánál fogva megszünteti a membránok ozmotikus aktivitását. Ezt az aldehides rögzítés kivédi. Az ozmiumsav a telítetlen zsírsavláncokkal való addíciós reakciója, valamint a fehérjék szulfidril, hidroxil és egyéb oldalcsoportjaihoz történő kapcsolódása közben könnyen redukálódik. A redukálódott ozmium helyben marad, jó kontrasztot ad.

A biológiai minták esetén a rögzítők pH-ja 6,5 és 8,0 között változhat. A gyakorlatban rendszerint enyhén lúgos pH-jú (7,2-7,4) rögzítőket használnak. Ilyen hidrogénion koncentráció biztosítja ugyanis a makromolekulák, elsősorban a fehérjék legnagyobb hatásfokú megőrzését. A fixálófolyadék pH-jának stabilizálásához (valamint az izoozmózis beállításához) sokféle pufferrendszer használható, de gyakorlatban leginkább a foszfát- és a kakodilát-pufferek terjedtek el.

A kémiai fixálást követően a mintákból alapos mosással távolítják el a fixáló oldat maradványait, erre a célra pufferoldatot használnak. Ezt követi a víztelenítés (dehidráálás). Vízteleníteni kell a mintát, mert a klasszikus elektronmikroszkópban csak teljesen száraz anyagot vizsgálhatunk. Ha víz lenne a mintában, akkor vákuum hatására a víz a sejtek felületéről, illetve a sejtek belsejéből kiforrna, a víz megfogná az elektronokat és feltöltődne a minta, a víz miatt csökkenne a vákuum, így nem távolodnának el az elektronok a katódról.

A levegőn történő szárítást ritkán alkalmazzák (kivétel pl. endospórák, kovaalga héjak tanulmányozásánál), mert a levegőn szárított minta sejtjei oly módon deformálódhatnak, hogy nem lehet belőle használható morfológiai információt nyerni. A gyakorlatban leggyakrabban a kritikus ponton való szárítással (CPD) és fagyasztva szárítással távolítják el a vizet a mintából.

A kritikus ponton való szárítást rendszerint megelőzi a minta kémiai fixálása utáni víztelenítése ún. felszálló alkohol-, vagy aceton-sorban. Ekkor mintáinkat a hígabból egyre inkább a töményebb oldatokba helyezük (20%, 30%, 50%, 70%, 90%-os oldatokban egyszer, cc. oldatokban kétszer, kb. 10-15 percig). Ez a fajta dehidráálás morfológiai, kémiai változásokat okoz a biológiai anyagban, melyekkel, mint elkerülhetetlen torzulásokkal, mindig számolni kell. E változások nagyrészt a lipidek kioldódásából származnak. A minta teljes kiszárítása aztán kritikus ponton való szárítással lehetséges. Ha zárt térben folyadék és annak telített gőzei vannak jelen, létezik egy olyan nyomás és hőmérséklet, amelyen a folyadék és telített gőze azonos sűrűségű. Ez az ún. kritikus pont (pl. szén-dioxid 31,1°C - 72,9 bar). Ezen a ponton a folyadék párolgás nélkül alakul át gázzá, nem jönnek létre a felületi feszültség okozta felszíni károsodások a kiszárítandó mintákban. A kritikus ponton való szárításhoz a

mintákat először amil-acetát oldatba helyezük, amely során a sejtekbe juttatott aceton vagy etanol a víznyomokkal együtt amil-acetátra cserélődik. A kritikus ponton szárító berendezésben aztán a mintákat átítató amil-acetátot több lépésben (nyomás alatt) folyékony CO₂-re cseréljük. A mintatartó tér felfűtésével először az azt kitöltő folyékony CO₂-ot kritikus pont állapotába hozzuk (31 °C, 72,9 bar), majd a nyomás és hőmérséklet fokozatos csökkentésével a CO₂ folyadék-gáz-fázisátmenet hiányában roncsolás mentesen, buborékos forrás nélkül távozik a mintából.

A fagyasztva szárítás (liofilizálás) olyan eljárás, amikor a fagyasztott mintából a jeget vákuumban elszublimáltatjuk. A kritikus ponton való szárításhoz hasonlóan ekkor sem keletkeznek olyan torzulások a mintában, ami a levegőn való szárításkor a felületi feszültség megszűnése okozna. Azonban a jég szublimálása után a korábban vízben oldott komponensek átrendeződhetnek. A liofilizálás előtt még legtöbbször rögzítjük a mintákat, majd kétszer mossuk puffer oldattal. Ezután a fixált mintákat cseppfolyós nitrogénbe merítetjük. A minták pillanatszerű lefagyasztása (-160 °C-on) biztosítja a sejtekben lévő vízmolekulák átkristályosodás nélküli jéggé fagyását (előfagyasztás). A lefagyasztott mintákból aztán a liofilizáló készülékben, vákuumban elszublimáltatjuk a jeget (2×10^{-2} mbar, -60 °C). A szárítás időtartama a minta méretétől függően 5-10 óra.

Vezető bevonat készítésekor a teljesen kiszáradt, mintatartó tuskókra ragasztott mintákat vákuumos fémgőzőlő műszerben (0,05 Pa, 40 mV) vékony aranyfilmmel (vagy arany-palládium keverékével) vonjuk be.

19. GYAKORLAT

Baktériumtenyészetek pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálata

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismeretlen baktériumtörzs tenyészet Petri-csészében

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

steril szike, kés
zsilettpenge
96%-os alkohol
Bunsen-égő
mintatartó edények
finom fémcsipesz
pipetta
5%-os glutáraldehidet tartalmazó 0,1 M-os foszfát puffer oldat (6-8 °C)
0,1 M-os foszfát puffer oldat (pH=7)
Eppendorf csövek
folyékony nitrogén
liofilizáló készülék
vákuumos fémgőzőlő
ezüstragasztó
mintatartó tuskó
pásztázó elektronmikroszkóp (SEM)

A vizsgálat menete

1. A vizsgálandó anyagból kb. 0,9 x 0,9 cm-es blokkokat készítünk éles késsel, szikével vagy zsilettpengével.
2. A vizsgálni kívánt mintát fixáljuk 5%-os pufferolt glutáraldehid oldatban 3 órán át szobahőmérsékleten.
3. A fixálást követően 2 x 10 percig mossuk a mintát 0,1 M-os foszfát puffer oldatban, majd fagyasszuk folyékony nitrogénben.
4. A lefagyasztott mintákat szárítsuk ki liofilizáló készülékben 4-6 órán át, majd

ragasszuk egy mintatartó tuskóra ezüstragasztóval.

5. Aranyozzuk be a mintát vákuumgőzölő segítségével.

6. Az így elkészített mintát vizsgáljuk meg pásztázó elektronmikroszkóppal.

Kovaalga héjak pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatokor (lásd 20. GYAKORLAT) az előzetesen H₂O₂ oldattal roncsolt mintát megfelelő hígításban alkalmazva közvetlenül az elektronmikroszkópban használt mintatartóra, vagy fedőlemezre csöppentjük és meleg helyen lassan beszárítjuk. Fedőlemezre felvitt minták esetén fénymikroszkópban 400 x-os nagyításon ellenőrizzük, hogy megfelelő-e a sűrűsége. Ha híg, még egy cseppet tehetünk rá, vagy a mintát sűrítethetjük szűrővel megfelelő polikarbonát membránfilterre. A fedőlemezre szárított mintát ezüstragasztóval, vagy kétoldalt ragadós szénkoronggal rögzítjük a mintatartó tuskóhoz. A mikroszkópos vizsgálat előtt a mintát fémgőzölő segítségével vékony aranyréteggel vonjuk be (vagy arany-paládium keverékével).

20. GYAKORLAT

Pásztázó elektronmikroszkópos preparátum készítése kovaalga vizsgálat céljából

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

roncsolt kovaalga minta

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

üres kovavázakat tartalmazó minta

desztillált víz

fémcsipesz

pipetta, steril pipettahegyek

50 ml-es műanyag fecskendő

50 ml-es főzőpohár vagy lombik

polikarbonát membránszűrő (3 µm pórusméretű)

szűrőfeltét a membránszűrőhöz

szénkorong (pl. SPI Double Sided Adhesive Conductive Carbon Disc 12 mm)

ezüstragasztó (pl. SPI Ag Colloidal Suspension with Brush Applicator Cap)

mintatartó tuskó

aranyozó berendezés (pl. Polaron SC7630)

pásztázó elektronmikroszkóp (SEM)

A vizsgálat menete

1. Az előzetesen elroncsolt, üres kovavázakat tartalmazó minta aljából ülepítés után pipettával vegyünk ki 1 cseppet és tegyük a főzőpohárban lévő kb. 30 ml-nyi desztillált vízbe.

2. A főzőpohár teljes tartalmát szívjuk fel a műanyag fecskendőbe, majd nyomjuk át a polikarbonát szűrőt tartalmazó szűrőn.

3. Csipesz segítségével vegyünk ki a membránszűrőt, és hagyjuk megszáradni.

4. Ragasszunk egy mindkét oldalán ragadó szénkorongot a mintatartóra.

5. Csipesszel megfogva ragasszuk a szűrőt a mintatartóra ragasztott szénkorong másik oldalára úgy, hogy a szűrőre szűrt alga-minta felfelé nézzen.

6. Cseppentsünk a szűrő szélére 4 helyen ezüstragasztóba úgy, hogy a ragasztó egy része a szűrőre, másik része a mintatartóra jusson, majd legalább egy órát hagyjuk száradni.

7. A mintát vonjuk be arany-paládium réteggel, melyet 105 s-ig 18 mA-en porlasztunk rá az aranyozó berendezéssel.

8. Az így elkészített mintát vizsgáljuk meg pásztázó elektronmikroszkóppal.

Egyes esetekben előfordul, hogy közvetlenül a roncsolatlan mintát csöppentik fel a vizsgálatokhoz. A modern pásztázó elektronmikroszkópok ún. „natural scan” üzemmódban, kis vákuumot alkalmazva erre is lehetőséget adnak. Előnye, hogy nem esnek szét a

kovavázak, pl. az esetleges heterovalvásságot (heterovalvásnak akkor tekintünk egy kovaalgát, ha az egyik valva más mintázatú, mint a másik pl. a monoráfés kovaalgák is ilyenek, egyik valvafélen van ráfé, a másikon nincs) lehet így vizsgálni, hátránya, hogy rosszabb minőségű az így kapott kép az algáról. Roncsolatlan mintát is vizsgálhatunk aranyozva, ha a minta nem túl hordalékos.

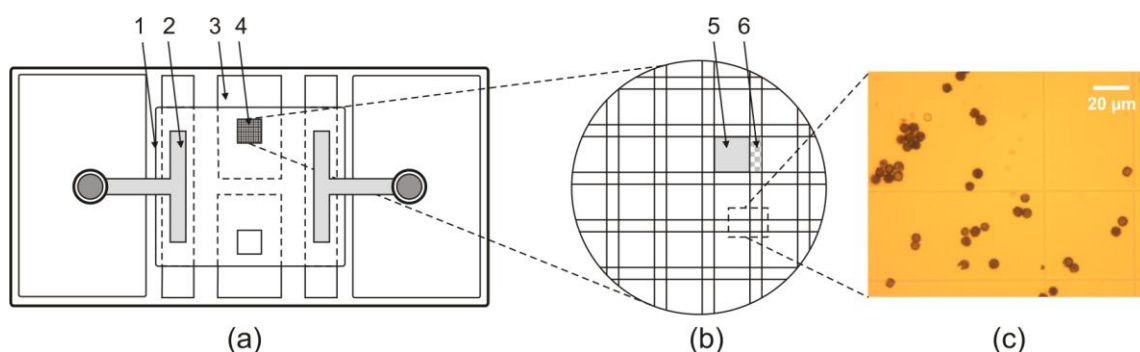
Ha olyan algákat akarunk tanulmányozni, amelyek nem rendelkeznek szilárd vázzal, vagy nagyon törékenyek, esetleg a közösségeket „intakt” módon szeretnénk tanulmányozni (pl. különböző alzatokon kialakult mikroba-közösségek, kovaalga tenyészetek felszíni vizsgálata), erre is alkalmas a pásztázó elektronmikroszkópia. Ekkor azonban bonyolultabb preparálási eljárásokra van szükség, a rögzítés és víztelenítés lépéseket nem hagyhatjuk ki.

5 SEJTSZÁMLÁLÁS, CSÍRASZÁMBECSLÉS ÉS BIOMASSZA MEGHATÁROZÁS

5.1 Mikroszkópos sejtszámlálási eljárások

Meghatározott folyadéktérfogatban szuszpedált részecskék (pl. sejtek, gombaspórák) mennyiségének meghatározásához számláló kamrákat szoktak használni (lásd 21. GYAKORLAT). Ezek olyan tárgylemezek, amikre négyzethálósan csatornákat marnak. Ezeken a helyeken a tárgylemez vékonyabb, így ismert a lefedett folyadékoszlop magassága. Mivel a négyzetháló osztásainak mérete is ismert, pontosan definiált térfogatú tereket kapunk a fedőlemez és a tárgylemez között. Az ilyen fedőlemezek általában a szokásosnál vastagabbak, a deformálódás (és az alatta lévő víz térfogatváltozásának) elkerülése érdekében. A számláló kamrába bevitt folyadék feleslege kis csatornákon keresztül távozhat.

A kamrák négyzethálóinak mérete és alakja sokféle lehet és a számlálandó részecskék nagyságához illeszthető (19. ábra). A Thoma-féle osztásnál egy nagy négyzet területe 1 mm^2 , ezek mindegyike 16 kisebb négyzetből áll, így ezek területe $1/16 \text{ mm}^2$, további osztással pedig a legkisebb négyzet területe $1/400 \text{ mm}^2$. Az általánosabban ismert **Bürker-kamra** (19. ábra) esetében a mintaterék magassága $0,1 \text{ mm}$, a nagy négyzet alapú egység mérete $1/5 \text{ mm} \times 1/5 \text{ mm} = 1/25 \text{ mm}^2$, a téglalap alakú egységé pedig $1/5 \text{ mm} \times 1/20 \text{ mm} = 1/100 \text{ mm}^2$. Ezek mellett számos egyéb számláló kamra, illetve osztás típus ismert (pl. Neubauer-, Türk-, Jensen-, Fuchs-Rosenthal-féle). A helyes eredmény eléréséhez fontos, hogy a számlálást többször, esetleg több (al)mintán is elvégezzük.



19. ábra Bürker kamra rajza

A kamra (a) részei: 1. fedőlemez, 2. leszorító lemez, 3. számláló felület (erre helyezük a mikrobaszuszpenziót), 4. rácshálós terület. A számlálókamra (b) nagyítva: 5. $1/25 \text{ mm}^2$ területű nagyobb négyzet, 6. $1/100 \text{ mm}^2$ területű téglalap. *Aspergillus niger* spórák fényképe (c) a Bürker kamrában.

21. GYAKORLAT

Aspergillus niger spóraszuszpenzió koncentrációjának meghatározása

Bürker-kamrás sejtszámlálással

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Aspergillus niger tenyészet Petri-csészében

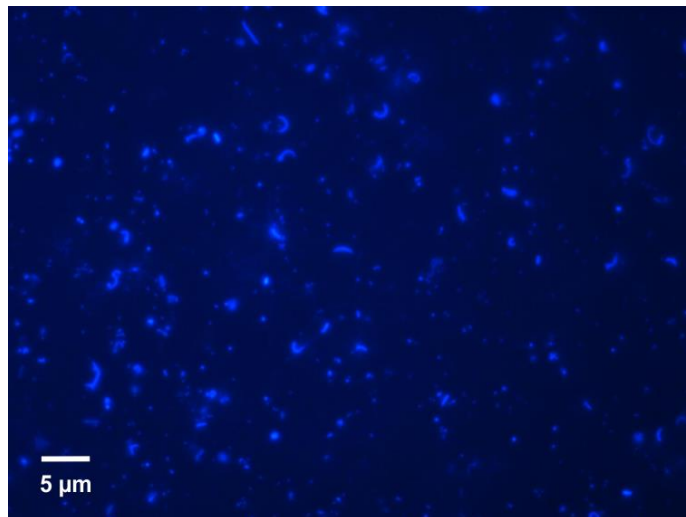
A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

- oltókacs
- steril víz kémcsőben
- Bunsen-égő
- pipetta, steril pipettahegyek vagy szemcseppentő
- Bürker-kamra
- alkohol (zsírtalanításhoz)
- fénymikroszkóp

A vizsgálat menete

1. Készítsünk spóraszuszpenziót *Aspergillus niger* tenyészetéből.
2. Szorítsuk rá a kamrára a fedőlemezt.
3. A spóraszuszpenzióból egy cseppet helyezünk a kamra fedőlemeze mellé. A kapilláris erő hatására a kamra megtelik.
4. Egy-két percet várjunk, amíg a folyadékmozgás megszűnik.
5. Helyezzük mikroszkóp alá a kamrát, és keressük meg a fókuszsíkot. 16 x-os vagy 40 x-es nagyítású objektívvel vizsgáljuk a mintát.
6. Számoljuk meg tíz nagy négyzetben (vagy téglalap alakú egységben) az ott található spórák számát.
7. Számoljuk ki az így kapott értékek átlagát (egy egységre jutó spóraszám), majd a ml-enkénti spóraszámot.

Természetesen a számlálandó sejteket meg is festhetjük, annak érdekében, hogy jobban láthatók legyenek. A klasszikus festési eljárásokról részletesebben a 6.4.1 fejezetben olvashatunk. Környezeti minták vizsgálatánál viszont elterjedten használnak különféle fluoreszcens festékeket a sejtszám meghatározásához (lásd 22. GYAKORLAT). Ilyen például a **DAPI festék** (4',6-diamidino-2-fenil-indol), ami képes keresztülhatolni az intakt sejtmembránon, majd a dupla szálú DNS-hez erősen hozzákötődik. Az így megfestett sejtek egyszerűen vizsgálhatók, ha membránfilterre szűrünk ismert térfogatú vízmintát, és a benne található sejteket festés után epifluoreszcens mikroszkóppal megszámloljuk (20. ábra).



20. ábra DAPI festett baktériumsejtek fluoreszcens mikroszkópi képe (Fotó: Felföldi T.)

A membránszűrőn az ivóvízből koncentrált baktériumsejtek kéken fluoreszkálnak.

22. GYAKORLAT

DAPI festésen alapuló mikroszkópos sejtszám meghatározás

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

felszíni vízminta baktérium közössége

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

természetes vízminta (pl. folyó, tó)

gumikesztyű (a gyakorlat során viselése kötelező!)

laboratóriumi mérleg

paraformaldehid

főzőpohár

mágneses keverő
PBS puffer
50% (m/m) NaOH oldat
szemcseppentő
szűrőkészülék
polikarbonát és cellulóz-nitrát membránszűrőlap
(0,2 vagy 0,45 µm pórusméretű, 45 mm átmérőjű)
fémcsipesz
50 ml-es Falcon-cső
műanyag Petri-csészék (6 cm-es átmérőjű)
szike
pipetta, steril pipettahegyek
DAPI oldat (1 µg/ml, vizes oldat)
80%-os etil-alkohol
steril, kétszeresen desztillált víz
fedőlemez
tárgylemez
Vectashield Mounting Medium (H-1000)
nem fluoreszkáló immerziós olaj
epifluoreszcens mikroszkóp, UV gerjesztő fényel
(ajánlott szűrőkészlet: gerjesztő szűrő: 330-380 nm, dikroikus tükör:
410 nm, zárószűrő: 430-480 nm)
digitális kamera (mikroszkóphoz csatlakoztatva)
számítógép

A vizsgálat menete

1. Oldjunk fel 1 g paraformaldehidet 50 ml foszfát pufferben. (A paraformaldehid belélegezve irritáló hatású, ezért védőfelszerelés használta kötelező vagy a műveletet elszívó fülke alatt kell végezni.) Az oldódást segíti a kevertetés és melegítés (kb. 60 °C-ig, forralni tilos!), illetve néhány csepp tömény NaOH hozzáadása.

2. Állítsuk be a pH-t 7,0-re (1 M NaOH vagy 1 M HCl segítségével).

3. Szűrjük le az oldatot 0,2 µm pórusátmérőjű membránszűrőlappal. Az így elkészített fixáló oldat (2%-os formaldehid) egy hétig tárolható (hűtve 4 °C-on, sötétben).

4. Szűrjük le a vizsgálandó élővíz mintát polikarbonát membránszűrőlapra. A minta típusától függően 2-50 ml szűrése ajánlott (a nagy sejtszámmal rendelkező minták hígítása célszerű a jobb szűrhetőség érdekében). A szűrőkészülék és a preparátum készítéséhez használt membránszűrő közé tegyünk egy 0,45 µm pórusméretű cellulóz szűrőlapot a sejtek egyenletes eloszlása érdekében.

5. Öntsünk Falcon-csőbe fixáló oldatot, majd helyezzük bele csipesszel a szűrőlapot, úgy, hogy a folyadék teljesen ellepje.

6. Inkubáljuk a mintákat egy éjszakán keresztül 4 °C-on (fixálás).

7. Öntsünk Petri-csészébe kevés PBS puffert, majd helyezzük bele csipesszel a szűrőlapot 1-2 percre, úgy, hogy a folyadék teljesen ellepje.

8. Tegyük át csipesszel a szűrőlapot egy üres Petri-csészébe. A Petri-csésze fedelét ferdén nyitva hagyva várjuk meg, amíg megszáradnak a szűrőlapok.

9. Szikével vágjunk le egy darabot a szűrőlapból és pipetázzunk rá kb. 30 µl DAPI oldatot. Ettől a lépéstől ügyeljünk rá, hogy a preparátumot kevés fény érje. A szűrőlap darabka grafit ceruzával feliratozható.

10. Két perc elteltével merítsük a szűrőlap darabot 80%-os etil-alkoholba néhány másodpercre.

11. Ezután merítsük a szűrőlap darabot steril, kétszeresen desztillált vízbe néhány

másodpercre.

12. Szárítsuk meg a szűrőlap darabot a korábban ismertetett módon.

13. Tegyük a darabkát zsirtalanított tárgylemezre, cseppentsünk rá egy-két csepp Vectashield Mounting Medium-ot és fedjük le zsirtalanított fedőlemezzel. Enyhe nyomással távolítsuk el a folyadék feleslegét (célszerű a művelet közben a tárgylemezt papírtörülőbe csavarni).

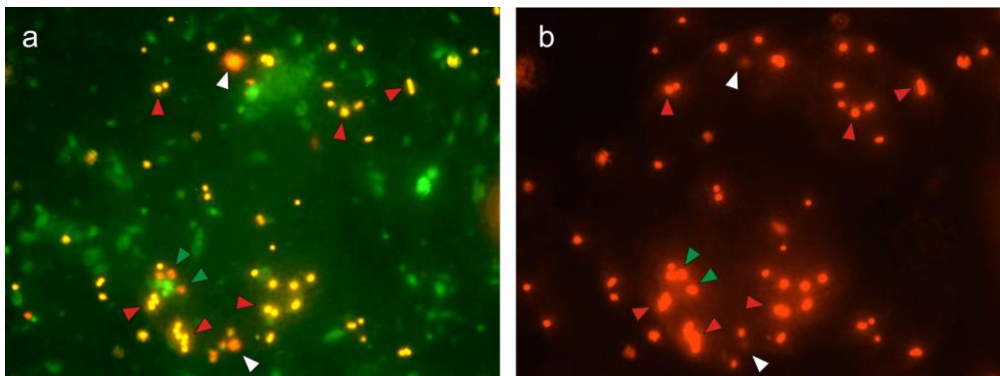
14. Helyezzük mikroszkóp alá a preparátumot és vizsgáljuk 100 x-os nagyítású immerziós objektívvel, UV gerjesztés mellett (A DAPI festék abszorpciós maximuma 358 nm, emissziós maximuma 461 nm.)

15. Fényképezzünk le minimum húsz látóteret digitális kamerával.

16. Számoljuk meg az egyes képeken található sejteket, majd átlagoljunk.

16. A látótér nagyságának, az átszűrt víz mennyiségének és a szűrőlap hasznos felületének ismeretében számítsuk ki a térfogategységnyi vízre vonatkoztatott sejtszám értékeket.

A nagyon kisméretű algasejtek (pikoalgák, $<2-3 \mu\text{m}$) a bennük található pigmentek (főként a klorofill-a és a fikobiliszómát alkotó fikocianin és fikoeritrin) autofluoreszcenciája miatt nem igényelnek festést, és mennyiségük epifluoreszcens mikroszkóppal meghatározható (21. ábra). Mivel hagyományos fénymikroszkópban a parányi sejtek a korábbi vizsgálatok során az esetek túlnyomó többségében nem voltak megkülönböztethetők a heterotróf baktériumoktól, ez a technika különös jelentőséget kapott a fotoautotróf szervezetek ezen csoportjának jellemzésénél. A **pikoalgák ($<2-3 \mu\text{m}$) sejtszámának meghatározásakor** (lásd 23. GYAKORLAT) epifluoreszcens mikroszkópban három fő csoport különíthető el különböző gerjesztő fényeket alkalmazva: fikoeritrin, fikocianin pigment-dominanciájú pikocianobaktériumok és pikoeukarióta algák.



21. ábra A pikofitoplankton három fő típusának megkülönböztetése a sejtek autofluoreszcenciája alapján epifluoreszcens mikroszkóppal (Fotó: Somogyi B.)

Kékesibolya gerjesztőfény (a); zöld gerjesztőfény (b). Fehér nyilak: pikoeukarióta algasejtek, zöld nyilak: PC-, piros nyilak: PE-pigment-dominanciájú pikocianobaktériumok.

23. GYAKORLAT

Pikoalgák sejtszámának meghatározása epifluoreszcens mikroszkóppal

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

felszíni vízminta, pikoalgák

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

szűrőkészülék

fekete polikarbonát vagy fekete cellulóz-acetát membránszűrőlap

(0,2 vagy 0,45 μm pórusméretű, 25 mm átmérőjű)

fémcsipesz
50% (V/V) glicerín (vizes oldat)
szemcseppentő
fémcsipesz
fedőlemez
tárgylemez
nem fluoreszkáló immerziós olaj
epifluoreszcens mikroszkóp;
ajánlott szűrőkészletek: kékesibolya (gerjesztő szűrő: 395-500 nm, dikroikus tükör: 510 nm, zárószűrő: 520 nm) és zöldessárga (gerjesztő szűrő: 520-560 nm, dikroikus tükör: 580 nm, zárószűrő: 590 nm)
digitális kamera (mikroszkóphoz csatlakoztatva)
számítógép

A vizsgálat menete

1. A frissen gyűjtött vízmintát 2-3 órán belül szűrjük le (Lugol-oldattal fixált minták nem alkalmasak fluoreszcens mikroszkópi vizsgálatokra!). A szűrőkészülék támasztófrittje és a preparátum készítéséhez használt membránszűrő közé tegyünk egy 0,45 µm pórusméretű cellulóz szűrőlapot a sejtek egyenletes eloszlása érdekében (polikarbonát szűrőnél mindenképp használjunk ilyen szűrőlapot!). A szűréshez csak gyenge vákuumot használjunk (<5 kPa). A leszűrt minta térfogata a vizsgált vízminta típusától függ. Ezt úgy válasszuk meg, hogy az egy látótérben lévő sejtek száma kb. 20-40 legyen. Célszerű az egész munkafolyamatot sötétben végezni a pigmentek védelme érdekében.

2. Fogjuk meg a nedves szűrőlapot fémcsipesszel és helyezzük a feliratozott tárgylemezre.

3. Cseppentsünk a szűrőlap felületére egy csepp 50%-os glicerint, majd fedjük le fedőlemezrel. A fedőlemezre gyakorolt enyhe nyomással az esetleges légbuborékok eltávolíthatók.

4. Cseppentsünk a fedőlemez felületére immerziós olajat.

5. Helyezzük mikroszkóp alá a preparátumot, és vizsgáljuk 100 x-os nagyítású immerziós objektívvel.

6. Gerjesszük a mintát először kékesibolya fénnel. Ebben az esetben a pikoeukarióta algák mélyvörös színnel, a fikoeitritin pigment-dominanciájú pikocianobaktériumok sárgán, a fikocianin pigment-dominanciájú pikocianobaktériumok pedig vörösen fluoreszkálnak [Az a-klorofil kékesibolya fénnel (400-450 nm) gerjeszthető és sötétvörösen (670-690 nm) fluoreszkál. A fikocianin (és az allofikocianin) narancsvörös fénnel gerjeszthető (640-660 nm), amellyel átfed élénk-vörös fluoreszcenciájával. A fikoeitritin főként a zöld fényt (540-565 nm) abszorbeálja és sárgás-narancssárgás fénnel fluoreszkál (550-580 nm).].

7. Gerjesszük ugyanazt a látómezőt zöld fénnel. Ebben az esetben a pikoeukarióta algák egyáltalán nem, vagy csak nagyon halványan fluoreszkálnak, a pikocianobaktériumok viszont fikobiliproteinjeiknek köszönhetően erős vörös autofluoreszcenciát mutatnak.

8. Fényképezzünk le minimum húsz látóteret (legalább 400 sejtet) digitális kamerával mindkét gerjesztő fénnel. Így elkerülhető a folyamatos gerjesztés hatására bekövetkező autofluoreszcencia elhalványulás (és megszűnés) – ez a jelenség mérsékelhető a gerjesztő fény intenzitásának csökkentésével (neutrális szűrők alkalmazása).

9. Az elkészült képpárokon számoljuk meg a három különböző sejtípus (fikoeitritines és fikocianinos pikocianobaktériumok, pikoeukarióta algák) mennyiségét.

10. A látótér nagyságának, az átszűrt víz mennyiségének és a szűrőlap hasznos felületének ismeretében számítsuk ki a térfogategységnyi vízre vonatkoztatott sejtszám értékeket.

Az **algaszámlálás** (lásd 24. GYAKORLAT) a biomassza becslés alapját szolgálja, ami a hazai és európai gyakorlatban az a-klorofill tartalom meghatározása mellett egy másik nagyon fontos limnológiai jellemző élővizek vizsgálatánál.

24. GYAKORLAT

Algaszámlálás Utermöhl-féle módszerrel (algaminták mennyiségi vizsgálata I.)

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

merített vízminta, fitoplankton szervezetek

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

inverz mikroszkóp

okulárba helyezett számlálóláló

okulár mikrométer

2 ml-es számlálókamra

Lugol-oldattal tartósított, merített vízminta

papírvatta

A vizsgálat menete

1. Alaposan rázzuk össze a mintát, és töltjük vele színültig a számlálókamrát, majd csúsztassuk a számlálókamra fedelét oldalról a minta tetejére úgy, hogy a kamrában lévő folyadék buborékmentes legyen. A fölösleges vizet itassuk fel papírvattával.

2. Tegyük félre a mintát 1 órára, hogy minden algasejt leülepedjen a számlálókamra aljára. Ezután helyezzük a kamrát a fordított mikroszkóp tárgyasztalára.

3. A számlálókamra egyik átmérője mentén, a szélétől indulva kezdjük el a számlálólálón belül lévő algasejtek számolását úgy, hogy a tárgyasztalt vízszintesen mozgatva haladjunk látótérről látótérre. A számoláshoz a 40x-es objektívet használjuk.

4. Az átmérő végére érve fordítsuk el 60°-kal a kamrát és folytassuk a számolást, majd ismételjük meg ezt a műveletet még egyszer.

5. A három átmérő végigszámolása után kb. 400 egyedet kell leszámolni. Ha a minta algákban gazdag, a számláló háló segítségével inkább keskenyebb látótérsávot számoljunk át, semmint csökkentjük a megvizsgált átmérők számát. Természetesen a sáv szélességet mindig pontosan mérjük le az objektív mikrométer segítségével, hogy ezt az értéket a végső számolásnál használhassuk. Így elérhető, hogy a három sávban kb. 400 egyed számoljunk meg. A mintában lévő nagy testű, kis egyedszámú fajokat vagy nagyobb kolóniát alkotókat (pl. *Ceratium hirundinella*, *Microcystis aeruginosa*, *Botryococcus braunii*) kis nagyítású (10x-es) objektív használatával, a teljes kamrafenék átvizsgálásával számláljuk meg.

6. Az algaszámot a kamra fenéklemezének felülete, a vizsgált sávok felülete, valamint a kamra térfogata és a számlálás során talált egyedszám ismeretében számoljuk ki. Az értékét általában ind/ml-ben adjuk meg (egyed/ml), az alábbi képlet segítségével.

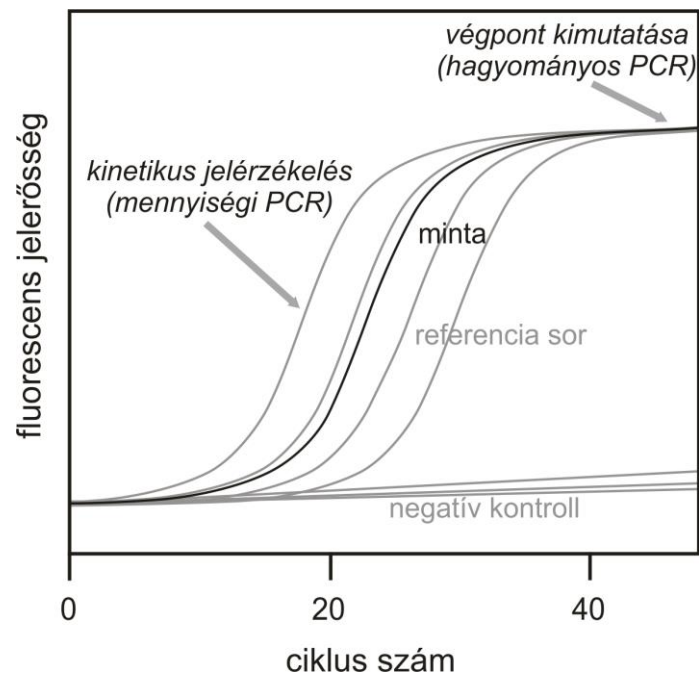
$$\text{algaszám} = \frac{r^2 \pi I}{2 r n a V}$$

ahol r: a kamra fenéklemezének sugara (mm), n: az átszámolt átmérők száma, a: az átszámolt sáv szélessége (mm), I: az átszámolt terület algaszáma, V: a számlálókamra térfogata (ml).

5.2 PCR-alapú sejtszám meghatározás

A real-time (valós idejű) PCR a PCR technika (lásd 7.1.2 fejezet) egy speciális formája, amikor az adott DNS szakasz enzimatiszorosítása során a keletkező termék mennyiségét folyamatosan nyomon követik. Ezt a minta által kibocsátott fluoreszcens jelintenzitás mérésével érjük el. A keletkező DNS mennyiséggel arányos fluoreszcens jel generálásának két elterjedt módja létezik: (1) aspecifikus fluoreszcens festék kötése a kétszálú

DNS-hez, (2) fluoreszcensen jelölt szekvencia-specifikus oligonukleotid próbák alkalmazása (pl. a *Taq* polimeráz enzim 5'-3'-exonukleáz aktivitásának köszönhetően a keletkező DNS-hez hibridizáló próbán lévő fluoreszcens molekula eltávolodik a fluoreszcens jelét addig kioltó, szintén a próbán levő molekulától, így a fluoreszcens jel detektálható lesz). A kiindulási DNS mennyiségére a jelnövekedés korai exponenciális fázisa alapján következtethetünk. Megfelelő referenciasor alkalmazásával tehát meghatározható az adott gén/régió kópiaszáma a kiindulási mintában (22. ábra). Ha pedig ismerjük, hogy a PCR során amplifikált régió hány példányban található meg a vizsgált mikroba génállományában, akkor a kimutatni kívánt csoport sejt száma is becsülhető.



22. ábra Sejtszámlálás valós idejű polimeráz láncreakció (RT-PCR) segítségével

A PCR termék mennyiségének valós idejű (folyamatos) mérésével a baktériumok növekedési görbéjéhez hasonló görbét kapunk. A fluoreszcens jel erőssége a templát kópiaszámával arányos azonos PCR paraméterek esetén.

5.3 Csíraszámolási eljárások

A **tenyésztéses csíraszámolási módszerek** (lásd 25. GYAKORLAT és 26. GYAKORLAT) lehetővé teszik, hogy egy vizsgált közegben a szaporodni képes mikroorganizmusok számát meghatározzuk. Mivel azonban nem létezik olyan univerzális táptalaj, melynek segítségével valamennyi mikroorganizmus tenyésztésbe vonható lenne, adott tápközeg felhasználásával számos közegből a mikrobáknak csak elenyészően kis hányada tenyészthető ki. Általánosan elmondható, hogy a mikroszkóposan számolt sejtszámokhoz képest a tenyésztett csíraszámok vizsgált környezettől függően, nagyságrendekkel lehetnek alacsonyabbak (Great Plate Count Anomaly). A gyakorlatban legelterjedtebben alkalmazott vizsgálati módszerek: a határhígításos eljárás (MPN = Most Probable Number), a telepszámolási módszerek (lemezöntés, szélesztés) és a membránszűrős technika. Általában a minta típusa és annak feltételezett csíraszámja határozza meg, melyik módszert alkalmazzuk.

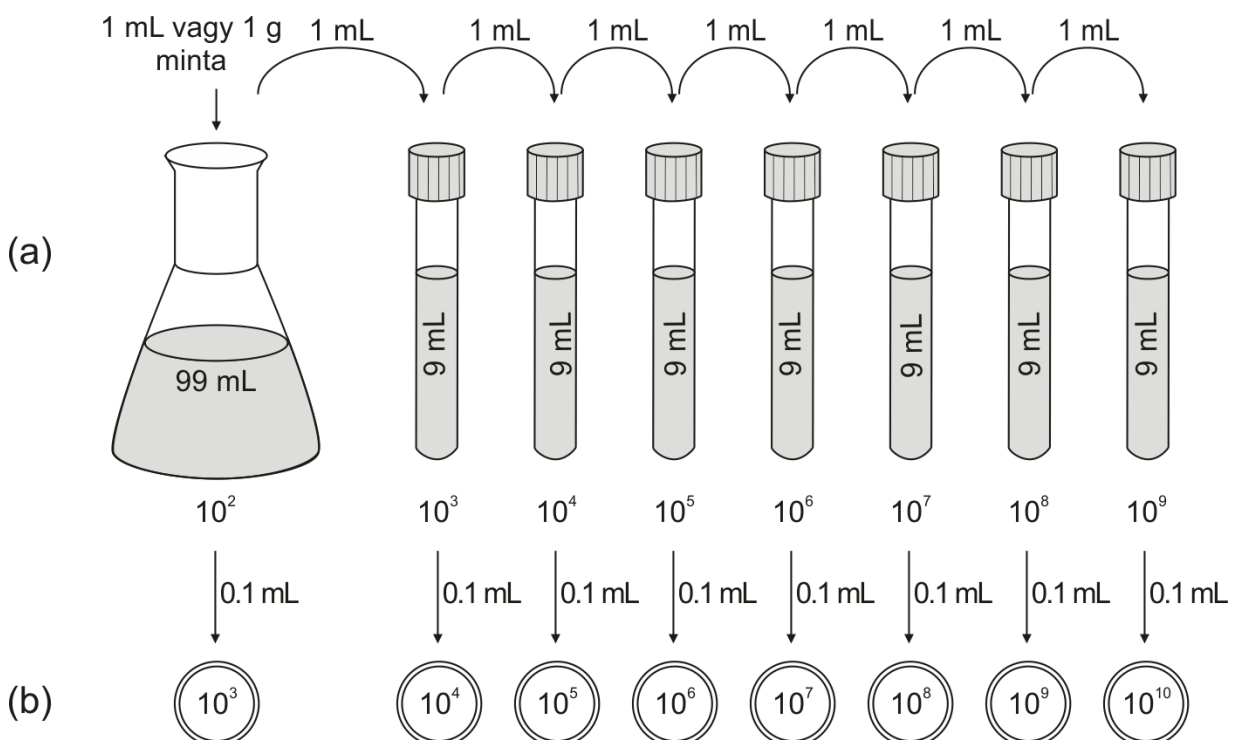
5.3.1 Telepszám alapú csíraszám becslés

A klasszikus hígításos-szélesztéses technikák segítségével a környezetben jelenlévő mikroorganizmusoknak csak igen kis hányadát, egyes becslések szerint mindössze 0,1-1%-át

lehet tenyésztésbe vonni. Ennek számos oka lehet, például nem létezik egyetlen, még olyannyira összetett táptalaj sem, amelynek segítségével minden, az adott mintában jelenlévő szervezet tenyészthető volna. A mintákban a mikrobák jelentős része különböző okok miatt ún. életképes, de nem tenyészthető (VBNC, 'viable but not culturable') állapotban lehet. Így a tenyésztésen alapuló eljárások bár fontos információt szolgáltathatnak egy adott minta mikroba mennyiségéről, mégis rendszerint alábecslik a valós értékeket.

A tenyésztésen alapuló csíraszám becslési eljárás azon a feltételezésen alapul, hogy minden sejtből telep fejlődik és minden telep 1 sejtől alakul ki. Ez a gyakorlatban – számos pl. előbb említett tényező következtében – nem teljesül. A kapott számértéket telepképző egység (TKE) /minta tömeg (térfogat) dimenzióban fejezzük ki. A minták feldolgozásának ismétlésével, illetve a párhuzamos lemezek számának növelésével a kapott értékek egyre jobban közelítik a valós értékeket.

A **hígítási-szélesztési és a lemezöntési csíraszám becslés** (lásd 25. GYAKORLAT és 26. GYAKORLAT) célja a mikroorganizmusok csíraszámának becslése környezeti mintákból (pl. talajból, vízből, élelmiszerekből) különféle tápágar lemezek felhasználásával. A módszer során a mikroorganizmusokat tartalmazó mintából szuszpenziót, majd 10-es léptékű (decimális) hígítási sorozatot készítünk (23. ábra). A hígítási sorozat megfelelő értékeiből ismert térfogatot tápágar lemezekre szélesztünk (24. ábra), vagy a Petri-csészébe pipettázott, adott térfogatú mintához öntjük a felolvasztott táptalajt. A fertőzött lemezeket megfelelő hőmérsékletű termosztátba helyezük. Az inkubációs idő letelte után a kifejlődött baktériumtelepeket megszámloljuk (csak azok a táplemezeket értékeljük, ahol a telepszám 20 és 200 között van), majd a kapott értéket a hígítás fokával megszorozzuk, így a kiindulási minta mennyiségi egységének tenyészthető baktérium mennyisége becsülhető.



23. ábra Hígítási – szélesztési csíraszámbecslés

A mintából steril desztillált vízben tízes léptékű hígítási sorozatot készítünk (a). A hígításokból megfelelő mennyiséget (pl. 0.1 mL) a kiválasztott tápágar lemezekre szélesztünk (b).

25. GYAKORLAT

Környezeti minták heterotróf csíraszámának becslése szélesztéses technikával

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus
környezeti minta

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök
tápagar lemez Petri-csészében
szélesztőbot (sterilizéshez alkohol)
pipetta, steril pipettahegyek
99 ml-es steril víz lombikban
9 ml-es steril víz kémcsőben
Bunsen-égő
termosztát

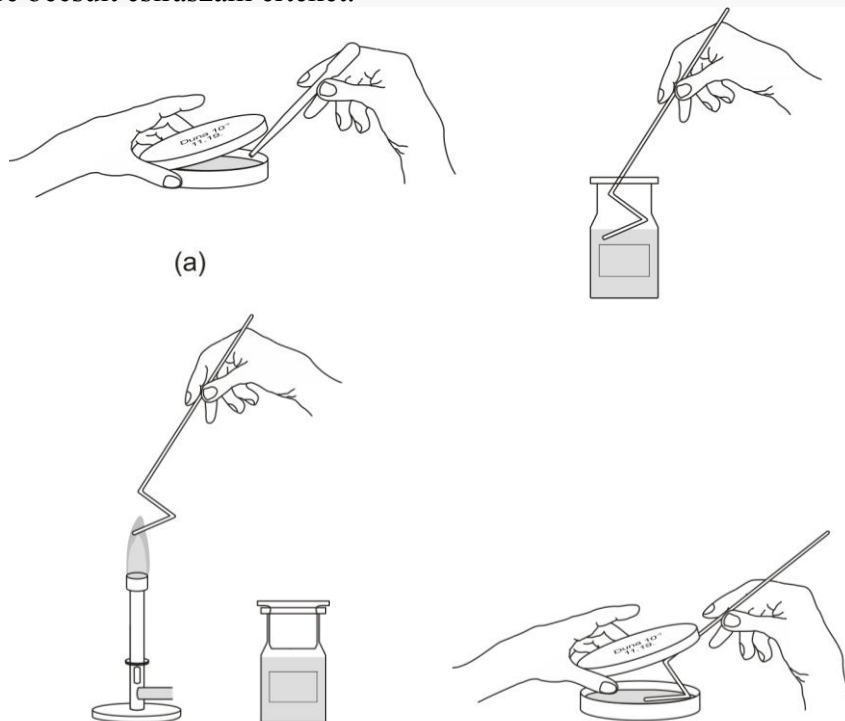
A vizsgálat menete

1. A környezeti mintából steril víz felhasználásával készítsünk 10-es léptékű hígítási sorozatot (23. ábra), az egyes kémcsöveket a hígítási tagoknak megfelelően feliratozzuk.

2. A hígítási sorozat megfelelő tagjaiból szélesztünk ismert mennyiséget a Petri-csészékben lévő tápagar lemezek felületére (lásd 25. GYAKORLAT), a Petri csészéket is lássuk el a megfelelő feliratokkal.

3. A szélesztéssel fertőzött tápagar lemezeket fordított helyzetben (fedelükkel lefelé) helyezük 28 °C-os termosztátba, és inkubáljuk 1 hétig.

4. Az inkubációs idő elteltével végezzünk csíraszám becslést. Ehhez számoljuk meg a tápagar lemezeken kifejlődött különálló telepeket, párhuzamos minták esetén átlagoljuk a kapott értékeket, majd szorozzuk meg a hígítás fokával. A különböző hígítási fokoknál kapott eredmények ismételt átlagolásával kapjuk meg a kiindulási minta egységnyi mennyiségére becsült csíraszám értéket.



24. ábra Agarlemezek fertőzése szélesztéssel

A megfelelő hígításból adott mennyiséget (pl. 0.1 mL) cseppentünk az agarlemez közepére (a). A szélesztőbotot alkoholba mártjuk (b). Meggyújtjuk az alkoholt a Bunsen-égőről (c). A szélesztőboton eléggő alkohol a hőhatással csíramentesít (alkoholos leégetés). A szélesztőbottal egyenletesen elterítjük a hígított mintát az agarlemez felületén (d). A résnyre kinyitott Petri-csészét közben ujjunkkal forgatjuk.

26. GYAKORLAT

Környezeti minták heterotróf csíraszámának becslése lemezöntéses technikával

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus
környezeti minta

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök
steril, üres Petri-csésze
steril olvasztott táptalaj
pipetta, steril pipettahegyek
99 ml-es steril víz lombikban
9 ml-es steril víz kémcsőben
Bunsen-égő
termosztát

A vizsgálat menete

1. A környezeti mintából készítsünk decimális hígítási sorozatot (23. ábra).
2. A megfelelően feliratozott (minta jelzése, hígítás foka) Petri csészékbe pipettázunk a mintából minden hígítási tagjából 1-1 ml-nyi mennyiséget.
3. A steril, de még folyékony (kb. 50 °C hőmérsékletű) táptalajból pipettázunk 20-25 ml-nyi mennyiséget a minta csepre, és a Petri-csésze óvatos mozgatásával keverjük össze a mintát a táptalajjal, majd szobahőmérsékleten hagyjuk megdermedni.
4. A fertőzött tápagar lemezeket fordított helyzetben (fedelükkel lefelé) helyezzük 28 °C-os termosztátba, és inkubáljuk 1 hétig.
5. Az inkubációs idő elteltével végezzünk csíraszám becslést. Ehhez számoljuk meg a tápagar lemezek felületén és belsejében kifejlődött különálló telepeket, párhuzamos minták esetén átlagoljuk a kapott értékeket, majd szorozzuk meg a hígítás fokával. A különböző hígítási fokoknál kapott eredmények ismételt átlagolásával kapjuk meg a kiindulási minta egységnyi mennyiségére becsült csíraszám értéket.

A **membránszűrésen alapuló csíraszám becslést** (lásd 27. GYAKORLAT) általában kis csíraszámú folyadékminták vizsgálatára alkalmazzák. A membránszűrés elve, hogy ismert mennyiségű folyadékot meghatározott pórusátmérőjű membránszűrőn átszűrünk, eközben a folyadékban található mikrobacejtek a szűrő felületén visszamaradnak. A szűrőlapot ezután megfelelő táptalaj felszínére fektetjük (25. ábra). A táptalaj tápanyagai a szűrőlapba diffundálnak és lehetővé teszik a telepképzést. A telepek megfelelő inkubációs idő után megszámlálhatók. Eredményként a telepképző egységek számát (TKE) adjuk meg az átszűrt mintamennyiségre vonatkoztatva (26. ábra).

27. GYAKORLAT

Membránszűrésen alapuló csíraszámbecslés

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus
vízminta

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök
0,45 µm pórusátmérőjű steril szűrő
steril mérőhenger
szűrő
tápagar lemezek
termosztát

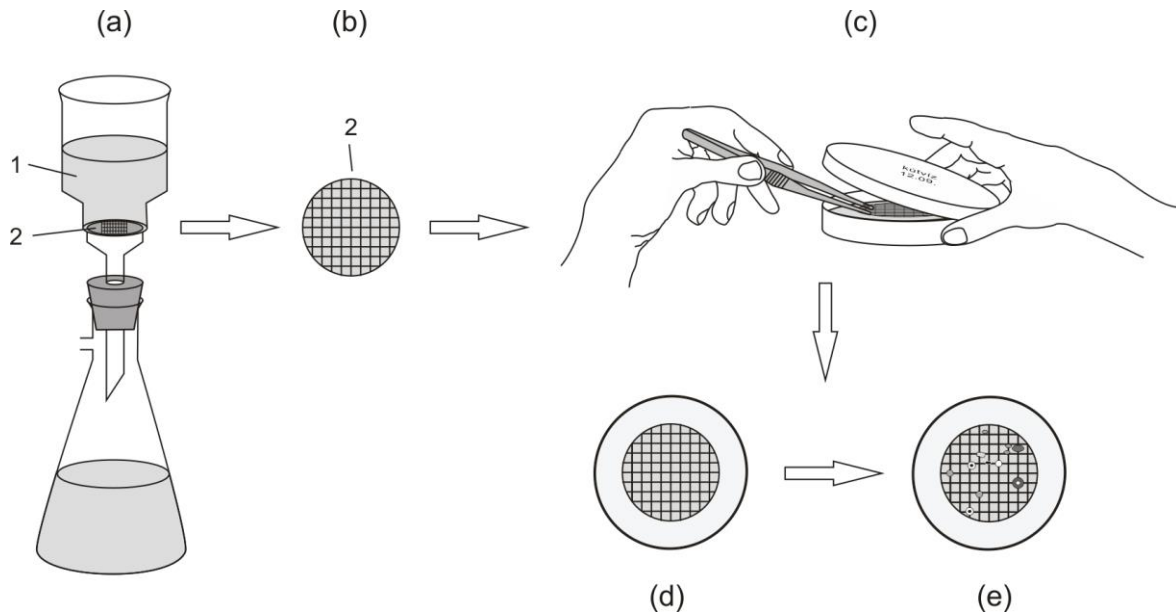
A vizsgálat menete

1. A 0,45 µm pórusátmérőjű steril szűrő felhasználásával szűrjük át 100, illetve 200 ml vízmintát.

2. A szűrőt a rászűrt mintával felfelé (a vizsgálat céljától függően) helyezük általános, szelektív vagy differenciáló tápagar lemezre, majd feliratozzuk a Petri csészét.

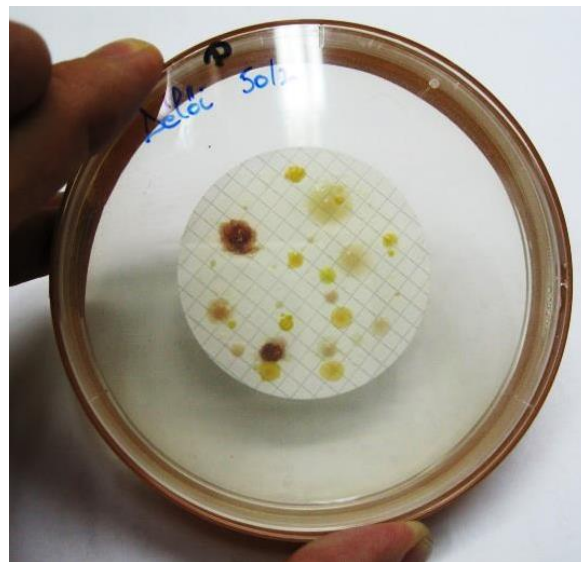
3. A szűrőt tartalmazó tápagar lemezeket helyezük 28 °C-os termosztátba, és inkubáljuk 1 hétig.

4. Az inkubációt követően a telepszámok és a szűrt anyag mennyiségének ismeretében határozzuk meg az 100 ml vízmintában lévő csíraszámot.



25. ábra Csíraszámbecslés membránszűréssel

A minta ismert mennyiségét (1.) leszűrjük a membránszűrőn (2.) (a). A szűrőt (2.) steril csipesz segítségével Petri-csészében tápagarlemezre helyezük (b-c). Megfelelő idejű inkubálást követően telepek fejlődnek ki a membránszűrő felületén (d-e). A telepszám alapján következtetünk a minta csíraszámára.



26. ábra Membrán filteren kitenyészett mikrobák (Fotó: Vajna B.)

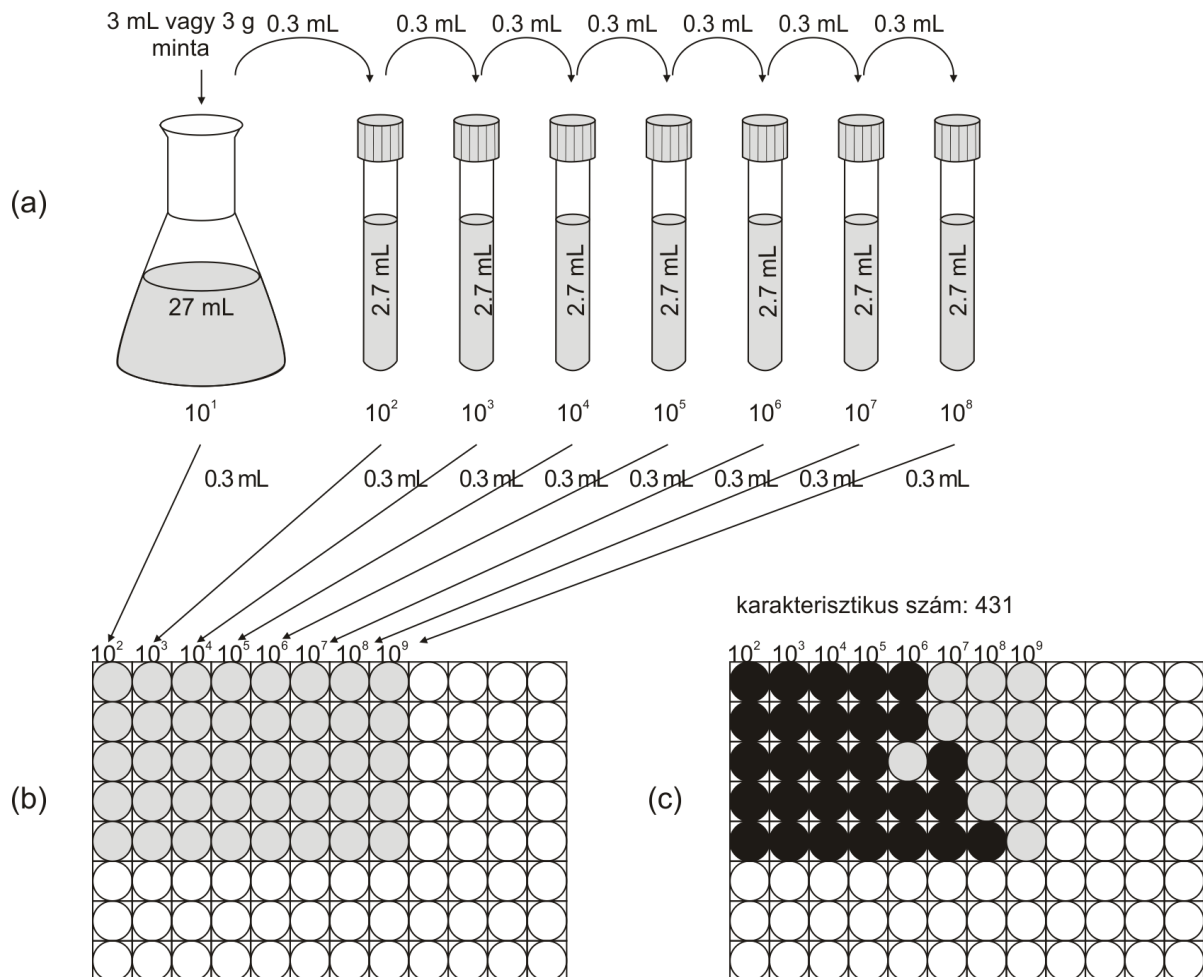
Természetes tóból származó víz (10 mL) átszűrésének eredménye.

5.3.2 Határhígításon alapuló csíraszám becslés

Az **MPN (Most Probable Number = legvalószínűbb élő sejtszám) módszer** (lásd 28. GYAKORLAT) használatakor a mikroorganizmusokat folyékony táptalajban szaporítjuk,

és a mikrobaszaporodást mutató csövek száma alapján, statisztikai alapon következtetünk a keresett mikroorganizmusok számára. Az MPN-módszer alkalmazhatóságnak alapfeltétele, hogy a sejtek eloszlása a táplevesben véletlenszerű legyen, és a folyékony táptalajban már egyetlen élő sejtet tartalmazó inokulum beoltása esetén is észlelhető legyen a szaporodás. Mivel a gyakorlatban általában egyik feltétel sem teljesül 100 %-osan, ezért ez az eljárás is csupán a csíraszám értékének becslésére alkalmas. A határhígításos módszer – a táptalajtól és a tenyésztési technikától függően – egyaránt alkalmazható az összes (aerob mezofil) élő csíraszám és valamely kiválasztott mikrobacsoport vagy mikroorganizmus mennyiségének meghatározására. A módszer alapja, hogy a vizsgálandó mintából hígítási sorozatot készítünk és az adott élettani csoportra jellemző reakciót adó, differenciáló tápleveseket a különböző hígításokból származó szuszpenzió azonos mennyiségeivel oltjuk be (3 vagy 5 párhuzamosot használva) (27. ábra). Az előírt tenyésztési idő után a mikrobaszaporodást mutató (pozitív) tesztsövek számából (amit egyaránt jelezhet az optikai denzitás megváltozása, a pH eltolódása, vagy a redox értékek megváltozása), statisztikai alapon következtetünk a legvalószínűbb élő csíraszámra.

A mezofil (szulfitredukáló), spóraképző anaerob baktériumok alatt azokat a *Clostridium* nemzetségébe tartozó, 30 °C-on, anaerob körülmények között növekvő mikroorganizmusokat értjük, amelyek adott feltételek mellett a szulfidot szulfiddá redukálják.



27. ábra A legvalószínűbb élősejtszám (MPN) meghatározása

A mintát a megfelelő táplevesben hígítjuk és tízes léptékű hígítási sort készítünk a táplevessel (a). A hígítások megfelelő mennyiségeit (pl. 0.3 mL) 5 ismétlésben mikrotiter lemez megfelelő zsebeibe pipettázzuk (b). Kellő idejű inkubálást követően olvashatjuk le az eredményt (c). A fekete szín a pozitív zsebeket (párhuzamosokat) jelöli. A csíraszámot a McCrady statisztikai táblázat segítségével (a Függelékben) adjuk meg.

28. GYAKORLAT

Mezofil (szulfitredukáló) anaerob spórás baktériumok (vegetatív és spórás alak) számának meghatározása MPN-módszerrel

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

talajminta

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

DRCM differenciáló vagy tioglikolát tápleves

pipetta, steril pipettahegyek

vízfürdő

9 ml-es steril víz kémcsőben

paraffinolaj

termosztát

A vizsgálat menete

1. Készítsünk talaj szuszpenziót 1 g talajminta és 9 ml steril víz felhasználásával 2 példányban.

2. Az egyik talajszuszpenziót helyezzük 80 °C-os vízfürdőbe és a vegetatív alakok inaktiválása céljából hőkezeljük a mintákat 5 percig.

3. Ezután mind a hőkezelt, mind a kezeletlen alaphígításból steril víz felhasználásával készítsünk 10-es léptékű hígítási sorozatot (lásd 25. GYAKORLAT).

4. Minden egyes hígításból végezzünk 3-3 párhuzamos leoltást a DRCM vagy tioglikolát táplevest tartalmazó csövekbe.

5. A beoltott csöveket az anaerob körülmények kialakítása érdekében fedjük be 2-3 mm vastagságban paraffinolajjal.

6. A csöveket 44 ± 4 órára helyezzük 30 °C-os termosztátba.

7. Az inkubációs idő elteltével végezzünk csíraszám becslést. Ehhez határozzuk meg a különböző hígítási értékekhez tartozó pozitív csövek számát, ahol a beoltott tápleves fekete elszíneződést mutat. A legvalószínűbb élő csíraszám meghatározására szolgáló McCrady-féle karakterisztikus táblázat (Függelék 13.6.1 fejezet) segítségével következtethetünk az eredeti talajminta és/vagy a baktérium szuszpenzió csíraszámára.

5.4 Biomassza becslési eljárások

Környezeti minták biomasszájának becslésére többféle módszer létezik (lásd 29. GYAKORLAT, 30. GYAKORLAT, 32. GYAKORLAT és 33. GYAKORLAT). Ezek egy része az adott élőhely szerves nitrogén, illetve széntartalmának meghatározásán alapul. Ennek a módszernek vitathatatlan hátránya, hogy sok ökoszisztémában a nem élő szerves anyag mennyisége a domináns. A tenyésztéses eljárások vagy a direkt mikroszkópos sejtszámolás is lehetőséget biztosít a biomassza becslésére. Ilyenkor azonban figyelembe kell venni, hogy a mikrobák jelentős hányada nem tenyésztendő, és hogy a sejtszám nem minden esetben korrelál pozitívan a biomassza mennyiségével. Az inkubációs módszerek (pl. fumigáció-respiráció, SIR) hátránya, hogy nem követhetők nyomon az inkubálás során végbemenő folyamatok. Ezért napjainkban a biomassza becslésére gyakran biokémiai módszereket (pl. foszfolipid foszfát meghatározása, ATP-mérés) használnak, illetve speciális élőlénycsoportok esetén egyéb biomarkerek (pl. klorofill-a, kitin, muraminsav) meghatározására kerülhet sor.

A **csíraszám alapú biomassza becslési módszer** nagymértékű szelektivitása miatt csak korlátozottan alkalmazható, többnyire tájékoztató jellegű adatokkal szolgál. A **direkt sejtszámolási eljárások** alkalmazása során a mikroorganizmusokat natív környezetükben valamilyen módszerrel megfestik, és mikroszkóppal megállapítják a számukat az adott mintamennyiségben. Baktériumoknál méretük, gombáknál pedig az összes hifa hosszúsága alapján számítják ki az összes élő térfogatot, és ez alapján kalkulálják a biomassza értéket.

Fluoreszcens mikroszkópiával lehetőség van az élő/élettelen esetleg az aktív/inaktív sejtek arányának meghatározására az adott környezetben.

A **vízminták sejtszám alapú biomassza becslését** a YABBA-2011 program segítségével végezzük el (lásd 29. GYAKORLAT). Ennek előfeltétele, hogy a DAPI festést követően megfelelő minőségű képek készüljenek a mintákról.

29. GYAKORLAT

Víz minta mikrobiális biomassza becslése sejtszám alapján

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

víz minta

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

DAPI festett filterekről készült képek
számítógép YABBA-2011 programmal

A vizsgálat menete

1. A gyakorlaton előzetesen DAPI festett (lásd 22. GYAKORLAT) filterekről készült képek alapján adott víz minták biomasszájának meghatározását végezzük el számítógép segítségével.

2. YABBA-2011 program használata. Az alapértelmezett beállítások közül a minimális sejtméret (minimal cell area) értéket sokszor indokolt átállítani, különösen, ha a mikroszkopizálás során készült képeken csak apró sejtek láthatóak (Az alapértelmezett 22 pixeles beállítással ugyanis az apróbb sejteket a program nem képes megszámlálni.) Hasonlóan nagyobb sejtek esetén érdemes növelni a minimális sejtméretet, ugyanis sokszor a nagyobb sejteket nem 1, hanem több sejtnek számolja a program. (A program segítségével a szükség esetén a képek kontrasztja is állítható (offset)).

3. A programmal lehetőség van egyesével a képeket értékelni (single imagine), illetve egy víz mintáról készült összes képet is tudjuk a programmal értékelni (all imagine). Javasolt egyszerre egy képet értékelni, így egyesével tudjuk ellenőrizni, hogy a képeken lévő sejteket jól számolta-e a program.

4. Ha beállítottuk minden paramétert, a Start gomb segítségével elkezdhetjük a képek értékelését. A program ekkor elkészít egy olyan fájlt, amin látható az összes által felismert sejt. Generál egy olyan annotált képet, amelyen a sejteket számmal látja el (ezt a képet automatikusan a beolvasott kép mappájába teszi be). (Vizuálisan ellenőrizhető, hogy miket észlel a program sejteknek, a minimális és maximális sejtméret még ekkor is állítható).

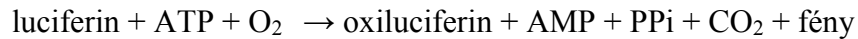
5. Az annotált kép mellett a program generál egy excel táblázatot is, ahol egyesével megadja a képen található sejtek ún. Zeder számát, a továbbiakban ezt kell használni a végső értékeléshez. Abban az esetben, ha a minimális sejtméretet változtatása után sem tökéletes még a program számolása (1 sejtet pl. 2-nek számol), a tévesen számolt sejtek Zeder számát nem vesszük figyelembe az értékelésnél.

6. Biomassza számolása az alábbi képlet segítségével történik:

biomassza [$\mu\text{g/L}$] = Zeder szám x 1 pixel térfogata [μm^3] x (filter felület [μm^2] / képméret [μm^2]) x hígítási fok [L]

A **biokémiai módszereken alapuló biomassza becslést** gyakran alkalmazzák a környezeti minta teljes mikrobiális vagy bizonyos élőlénycsoportok biomasszájának meghatározására. Ehhez olyan biokémiai markerre van szükség, amelyik minden sejtben (esetleg specifikus élőlénycsoportban) jelen van, a sejt pusztulása után gyorsan lebomlik és (a környezeti körülményektől függetlenül) a teljes biomassza állandó részét képezi. Mindemellett fontos az is, hogy legyen megfelelő módszer a **marker kinyerésére** (lásd 31. GYAKORLAT) és tisztítására, továbbá legyen érzékenyen kvantifikálható, akár rutin eljárások keretében is.

Az **ATP tartalom mérése** alkalmas környezeti minták teljes biomasszájának meghatározására, hiszen minden élő sejtben jelen van, biológiailag labilis (a baktériumsejtekben turnover kevesebb, mint 1 másodperc), ugyanakkor kémiaiilag stabil vegyület. Az ATP-meghatározás a szentjánosbogár világítószervében is meglevő luciferin-luciferáz reakció segítségével lehetséges fotométerrel vagy folyadék szcintillációs számlálóval. A luciferin-luciferáz reakcióból származó lumineszcencia az ATP tartalomtól függ:



30. GYAKORLAT

Víz minta mikrobiális biomassza becslése ATP-tartalom meghatározás alapján

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

víz minta (1-2 l)

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

250 µm-es planktonháló

0,45 µm szűrő

főzőpohár

vízfürdő

pipetta, steril pipettahegyek

tiszta, csavarkupakos cső

parafilm

luciferin-luciferáz reagens készlet (kereskedelmi forgalomban kapható)

Tris puffer (0,02 M, pH = 7,75)

centrifuga

ATP nátrium sója

luminométer

A vizsgálat menete

1. A liofilizáltan tárolt luciferin-luciferáz készítményt a gyártó javaslati alapján oldjuk fel Tris pufferben (0,02 M, pH = 7,75) és tartjuk szobahőmérsékleten (2-3 óráig).

2. A frissen gyűjtött 1-2 liternyi vízmintát (mennyisége a vízminta típusától függően változhat) szűrjük át 250 µm-es hálón (a nagyméretű részecskék eltávolítása céljából), majd 0,45 µm pórusátmérőjű membránszűrőn.

3. A membránszűrőt helyezük főzőpohárba, és öntsük le 3 ml forrásban lévő 0,02 M Tris pufferrel.

4. A főzőpohár tartalmát 5 percig forraljuk vízfürdőben, majd a kivonatot pipettázzuk tiszta, száraz csőbe.

5. 2 ml forrásban lévő Tris pufferrel öblítsük át a főzőpoharat, illetve mossuk le a szűrőt és azt is adjuk a kivonathoz, melynek térfogatát a pufferrel egészítsük ki 5 ml-re.

6. A kivonatot tartalmazó csövet parafilmmel fedjük le, és a mérés megkezdéséig tároljuk fagyaszóban (-25 °C). Minden mintából készítsünk 3 párhuzamost.

7. A luciferin-luciferáz készítményt állás után centrifugáljuk le, és a felülúszót pipettázzuk tiszta, száraz csőbe. Ezt további 1 órán át hagyjuk szobahőmérsékleten állni.

8. A tisztított ATP standard elkészítéséhez oldjunk fel 12,3 mg dinátrium-ATP-t 1 l desztillált vízben és ennek 1 ml-ét hígítsuk 100 ml Tris pufferrel (0,2 ml = 20 ng ATP).

9. A fényintenzitás méréséhez pipettázzunk 2 ml enzimmészítményhez 2 ml vizsgálandó mintát, majd luminométerrel mérjük meg a kibocsátott fény mennyiségét. A kapott értékeket hasonlítsuk össze ismert ATP tartalmú oldatokkal kapott adatokkal (kalibrációs görbe felvétele 1-100 ng ATP/ ml).

10. 1 mg száraz „biológiai anyag” (sejttömeg) anyag 2,4 µg ATP-t tartalmaz, így a

teljes élő biomasszát (B) az alábbi összefüggés alapján kalkulálhatjuk:
 $B \text{ (mg / L)} = \text{ATP} / 2,4 \times 1000$

31. GYAKORLAT

Kemotaxonómiai markerek kinyerése és frakcionálása környezeti mintákból

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

talajminta
üledék minta
szennyvíziszap minta

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

Pasteur pipetták (zsírtalanítva)
üvegtölcsérek (zsírtalanítva)
csavarkupakos kémcsövek (zsírtalanítva, teflonbetéttel ellátva)
vákuum bepárló készülék
bepárló lombikok
oldószeres (diklórometán, metanol, kloroform, foszfátpuffer, aceton)
SPE oszlop
Whatman-papír (2 Chr)
asztali centrifuga
zsírtalanított üveg centrifugacsövek
30 °C-os vízfürdő

A vizsgálat menete

FONTOS! A szerves oldószerekkel dolgozzunk elszívófülke alatt! Az üvegcsoveket minden esetben lássuk el megfelelő feliratokkal!

1. Kevertessük a mintát (10 g) egy éjen át diklórometán-metanol-0,2 M foszfátpuffer (10 g talajminta esetén 7,5 ml diklórometán, 15 ml metanol és 5 ml foszfátpuffer hozzáadása javasolt) elegyben 4 °C-on. (Ha fázisszeparáció figyelhető meg, akkor ez kb. 1-5 ml metanol hozzáadásával megszüntethető.)

2. Másnap adjunk hozzá 7,5 ml diklórometánt és 7,5 ml desztillált vizet, rázzuk össze és még egy éjen át hagyjuk állni. A fázisszeparáció során a lipidek az alsó fázisba (diklórometán) kerülnek.

3. A mintát a következő napon centrifugáljuk (1500 g 2 percig), majd az alsó szilárd és a felső vizes fázis közül pipettával szívjuk ki a diklórometános fázist.

4. A leszívott diklórometános fázist szűrjük át tölcserbe helyezett szűrőpapíron, majd a szűrőpapírt még 3 x 0,75 ml diklórometánnal mossuk át a kémcsőbe.

5. Az átszűrt fázisból különítsünk el 1 ml-t a biomassza becslésre.

A csak biológiai membránokban előforduló **foszfolipid-foszfát meghatározáson alapuló biomassza mérési** technikával (lásd 32. GYAKORLAT) a biológiai aktivitásról ugyan nem kapunk információt, de lehetővé válik a környezeti minták (elsősorban nagy biomasszával jellemezhető környezetek, pl. talajok, szennyvíziszap, biofilm) viszonylag olcsó és gyors mikrobiális elemzése (feltéve, hogy a növények és növényi maradványok a mintából nagy határfokkal eltávolíthatók). A módszer során a teljes biomassza meghatározható a foszfolipidek foszfát tartalmának foszfát ionokká való alakítása, festhető komplexbe vitele és spektrofotometriás mérése révén. Mivel a sejtek lipid-foszfát tartalma erős korrelációt mutat a sejtek szén tartalmával, a kapott foszfát értékek megfelelő konverziós faktor segítségével C/g minta szárazsúlyra számolhatók.

32. GYAKORLAT

Környezeti minták biomasszájának becslése foszfolipid foszfát alapon

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

talajminta
üledék minta
szennyvíziszap minta

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

2-4 ml-es ampullák
Pasteur pipetták (zsírtalanítva)
oldószerek (diklórmetán, metanol, foszfátpuffer)
automata pipetta, pipettahegyek
blokk termosztát
mérő oldat (0,1 mM glicerín-foszfát oldat)
kálium-perszulfát telített oldata
ammónium molibdenát oldat
malachitöld oldat
mérőhenger
főzőpohár
elektromos főzőlap
vákuum exikátor
szűrőpapír
jól zárható üvegcső
spektrofotométer

A vizsgálat menete

1. Az előkészített 1 ml mintából (lásd 31. GYAKORLAT) mérjük 3 párhuzamosban 150-150 µl-t ampullákba és lássuk el a csöveket megfelelő feliratokkal.
2. A kalibrációs görbe felvételéhez készítsünk 0,1 mM glicerín foszfát oldatból hígítási sort (0, 1,5, 3, 6, 9, 12 és 15 nM foszfátot tartalmazzon) és ezeket is tegyük ampullákba.
3. A mintacsövekből és a kalibrációs sorból is párologtassuk el az oldószert ügyelve arra, hogy a már beszáradt minták minél kevésbé érintkezzenek oxigénnel.
4. Adjunk minden ampullához 450 µl kálium-perszulfát oldatot, majd a csöveket zárjuk le szorosan és a foszfát felszabadulás (lipidek oxidációja) érdekében egy éjén át inkubáljuk 100 °C-on blokk termosztátban.
5. Másnap hűtsük a mintákat szobahőmérsékletűre, és adjunk hozzájuk 100 µl ammónium-molibdenát oldatot, majd hagyjuk állni 10 percig (komplex képzés).
6. Ezt követően adjunk a csövekhez 450 µl malachitöld oldatot (komplex megfestése).
7. Értékelés során a standard oldatok és a minták optikai denzitását spektrofotométer segítségével 610 nm-en határozzuk meg, majd a kalibrációs görbe felvétele után számítsuk ki az egyes minták foszfolipid foszfát tartalmát. A foszfát tartalom alapján határozzuk meg a minták szerves szén tartalmát (100 nmol foszfát 191,7 µg szerves C-nek feleltethető meg), amely alapján a biomasszára lehet következtetni.

Az individuum (egyed) fogalma az algológiában pontosan nem tisztázott, s nehezen is tisztázható. Az egysejtű, kolóniát nem alkotó fajoknál az egyedszám és a sejtszám megegyezik. A stabil sejtszámú cönóbiumoknál az egyed azonos a cönóbiummal, ami pl. a *Scenedesmus* fajoknál általában 4 sejt, de pl. a *Coelastrum* és a *Pediastrum* fajoknál 8-16-32-64 sejt cönóbium is előfordulhat egyetlen populációban. Még pontatlanabb az egyed fogalma a fonális algák esetében (pl. *Oscillatoria*, *Ulothrix*, *Cladophora*, *Spirogyra*), ahol a fonalat lehet egyednek tekinteni, de itt néhány sejtől akár néhány száz sejtig is változhat a fonal mérete. Ugyanez a helyzet a laza kolóniát alkotó fajoknál, pl. *Microcystis*,

Gomphosphaeria, amelyek folyóvizekben egy vagy egynéhány sejtes formában is megtalálhatók, míg állóvizekben sok ezer sejt is együtt maradva alkothatja az egyedet. Látszólag pontosabb lehetne a sejtszám/ml érték, de épp az utóbbi fajok esetében igen nehéz a pontos sejtszámot megadni. Mindez növeli a számolás pontatlanságát. A fenti bizonytalanság kiküszöbölhető, ha nem egyedszámot, hanem az egyedszámokból (sejtszámokból) számított, mért biomassza-adatokat közöljük. Az **alga biomassza meghatározás** (lásd 33. GYAKORLAT) mellett szól egy másik lényeges érv is. Az algák mérete, és főleg sejttérfogata, több nagyságrenddel eltér egymástól, s ezek a nagyon eltérő méretű fajok egyetlen mintában megtalálhatók. Mivel az egyedszám/ml érték alapján a különböző vizek fitoplankton tömegének összehasonlítása nehéz a Víz Keretirányelv (VKI) által előírt felszíni vizek ökológiai állapotértékelése során az egyedszám helyett a fitoplankton biomasszáját határozzuk meg, ami a hazai gyakorlatban a klorofil-a tartalom meghatározása mellett a másik „modul” az ökológiai állapotbecslés során (<http://www.vizeink.hu/?module=doklista&f=14>).

33. GYAKORLAT

Térfogatomérése alapján biomassza becslés (algaminták mennyiségi vizsgálata)

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Lugol-oldattal tartósított, merített vízminta, fitoplankton szervezetek

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

fordított mikroszkóp

okulárba helyezett számlálóláló

okulár mikrométer

2 ml-es számlálókamra

papírvatta

A vizsgálat menete

1. Az Utermöhl-féle módszerrel végzett algaszám becslést (lásd 24. GYAKORLAT) azzal egészítjük ki, hogy okulár mikrométer segítségével minden faj esetében lemérjük 10-10 egyed azon méreteit, amelyek szükségesek a térfogatának a kiszámításához (a térfogat kiszámítása érdekében az algát a hozzá legjobban hasonlító mértani testre, vagy testekre egyszerűsítjük). Néhány fontosabb alganemzetség térfogatának kiszámítási módját és az egyes mértani formák térfogatszámítását Ács és Kiss (szerk. 2004) könyvében találjuk meg.

2. Egy-egy alga egyedszámát megszorozzuk annak térfogatával, majd az értékeket fajonként összegezve kapjuk meg az össztérfogatot. Az algák fajlagos tömegét 1-nek véve ez egyben a biomassza is lesz, melyet általában mg/l-ben fejezünk ki.

6 TENYÉSZTÉSEN ALAPULÓ ELJÁRÁSOK

6.1 A környezetünkben levő mikroorganizmusok és hatásuk kimutatása

A természetben nyitott szemmel járó ember már a legkorábbi időkben észlelte a mikrobák szemmel látható képződményeit (pl. teleptesteit, termőtesteit), valamint a mikrobiális anyagcsere eredményét, hatásait, legyenek azok károsak (pl. mérgek, ragályos betegségek), vagy hasznosak (pl. tejsavas erjedés, ecetesedés), bár magukról a mikrobákról nem rendelkeztek kellő ismeretekkel. Egy foltos almán még egy biológus sem feltétlenül tudja megkülönböztetni a baktérium, gombakártevő, vagy éppen rovar hatására kialakult „foltokat”. Sok esetben még az erre szakosodott növénykórtan szakértőnek is speciális vizsgálatokra, műszerekre van szüksége a diagnózishoz. Ugyanakkor az ősi megfigyelések alapján a mikrobiális hatásokra több ezer éve kialakultak hasznosító technológiák. Az alkoholos italok készítése, a savanyítás eljárásai, vagy a mérsékelt égöv rosnövényeiből a szálak áztatásos kinyerése során ősi idők óta mikrobák többé-kevésbé szelektív tenyésztését végezzük, valamint jellegzetes enzimaktivitásaikat használjuk ki. Ezek legtöbbször laboratóriumi körülmények között is megvalósítható és a folyamatokat ma már az abban szerepet játszó mikrobák ismeretében mikrobiológiai módszerek alkalmazásával is nyomon követhetjük (Borsodi és Máriafigeti, 2015).

A **káposztasavanyítás** (lásd 34. GYAKORLAT) során a káposzta növényen és a savanyításhoz alkalmazott eszközeinken megtalálható tejsavas fermentáló baktériumok elsődleges (azaz energetikai) anyagcseréjét használjuk ki. A fermentáció terméke, a tejsav révén kialakuló alacsony pH nemcsak a savanyú káposzta jellegzetes domináns ízét adja, de egyben tartósít is. Megakadályozza a romlást okozó mikroorganizmusok működését, szaporodását. A nyers, sarvált káposzta esetében a tejsavas fermentáló baktériumok megkívánt szelektív szaporodását az erőteljes sózással érjük el. A só a vegyes mikrobaközösség sok tagjának gátlása mellett segít, hogy a káposzta levet eresszen (a sejtekből vizet von el).

A hordókba tömörített sózott sarvált káposztát lezárva (a levegő oxigénjétől elzárva) pincehideg helyen 6-8 hétig érlelik. Ez idő alatt kialakul az ehető savanyú káposzta a következőkben jelzett baktérium élettani csoportok hatására:

- vegyes savas fermentálók, zömében az Enterobacteriaceae család tagjai;
- heterolaktikus fermentálók, pl. *Leuconostoc mesenteroides*;
- homolaktikus fermentálók, pl. *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*.

34. GYAKORLAT

Savanyú káposzta laboratóriumi előállítás

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

a savanyú káposzta készítés jellegzetes fermentáló baktériumközösségei

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

2 kg (sarvált) fejes káposzta

műanyag fedeles erjesztő edény

50 g konyhasó (3 evőkanálnyi)

fűszerek

„káposztakő” (pl. faspátula, kavicsok) a káposzta tömörítéséhez
mikroszkóp

A vizsgálat menete

1. Vágjuk finomra a fejes káposztát.

2. Egy nagy műanyag edényben keverjük össze a káposztát sóval és fűszerekkel (babérlevél, bors stb.) nagyon tisztára mosott kézzel.

3. A műanyag erjesztő edénybe töltjük bele az előkészített káposztát és kézzel jól nyomkodjuk le. Tegyük a tetejére megfelelő méretű tiszta kavicsdarabot és zárjuk be az edényt. Feliratozzuk és helyezzük a hűtőszobába.

4. Szobahőmérsékleten 10-12 nap alatt megérik, 10 °C-os hőmérsékleten 6-8 hétre van szükség. Hetente ellenőrizzük az edényt, a lé tetején kialakult gomba/baktérium bevonatot („fölt”) távolítsuk el (Petri csészébe szedjük le steril vegyszerkanállal). Ha nem elegendő a lé mennyisége (nem fedi el a káposztát), akkor sós vízzel (3 tömeg %-os) pótoljuk.

5. Hetente ellenőrizzük a pH alakulását pH papír segítségével. Amikor a pH 3,5-4,0 közötti, a káposztaléből vett mintán végezzünk Gram festést (lásd 55. GYAKORLAT) és figyeljük meg a baktériumokat. Kóstolással is meggyőződhetünk az érett savanyú káposzta jó ízéről, állagáról.

A pektinek nagy poliszacharid molekulák, amelyek fő alkotórésze a néhány száz polimerizáltsági fokú poligalakturonsav. **Pektináz(ok)**nak a pektin poliszacharidokat bontó változatos enzimeket nevezünk, vagyis egy különböző bontó aktivitású enzimekből álló enzimkeverék. A pektin a növényi sejtfal „kocsonyás” alkotóeleme, amely az egyes sejtek egymáshoz és más sejtfalkomponensekhez (cellulóz rostok) kötéséért felelős, illetve egyes rostok, cellulóz szálak pektin mátrixba ágyazva fordulnak elő a növényekben. A pektináz enzimek (néhány cellulázzal együtt) az érő növényi termésekben jellegzetesen előfordulnak. Hatásukra puhulnak meg, pl. a gyümölcsök. A pektináz enzimeket az iparban is kiterjedten alkalmazzák növényi anyagok „puhítására” (lásd 35. GYAKORLAT), bontására, így pl. gyümölcslevek készítése során, vagy növényi rostok kinyerésére. A leggyakrabban a poligalakturonáz enzimeket használják. Pektinázokat – patogenitási faktor – növényi kórokozók is termelnek. Ezzel segítik elő a növényi sejtekbe való bejutást. Így pl. a *Monilinia fructigena* gomba, vagy a lágyrothasztó *Erwinia carotovora* baktérium is termel pektinázt (lásd 36. GYAKORLAT). Megjegyezzük, hogy a pektináz hatására létrejövő különböző oligoszacharidok a növény védekezési reakcióját váltják ki.

Az *Erwinia carotovora* az egyik legjelentősebb tárolási kártevő. A zöldségfélék lágyrothadását okozza. E Gram-negatív baktérium mellett az ipar évszázadokon át alkalmazta a Gram-pozitív anaerob spórás pálcák (*Clostridium* spp.) pektinbontó hatását a len-, kenderáztatásban a növényi rostok kiszabadítására.

35. GYAKORLAT

Kenderáztatás – pektináztermelő anaerob rothasztó baktériumok kimutatása

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

pektináztermelő talajbaktériumok (pl. *Clostridium* spp.)

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

pamutcérna
kémcső
talajminta
mikroszkóp

A vizsgálat menete

1. 4-5 cm-es len, vagy kendernövény darabokból pamutcérnával kössünk vékony köteget.

2. Öntsünk egy kémcsőbe félig vizet, vegyszerkanállal tegyük bele grammnyi talajt, majd a len, vagy kenderköteget is helyezzük bele. Feliratozzuk a csöveket!

3. Fogjuk kémcsőfogóba a kémcsövet és Bunsen-égővel forraljuk a tartalmát 3-5 percig. Ez idő alatt a növényi anyag átnedvesedik, a talajban pedig a legtöbb nem spóráképző szervezet elpusztul és – nem utolsósorban – a vízből kihajtjuk a benne oldott oxigént.

4. Csináljunk olyan kontrollt is, ahol a talajt csak a forralás után tesszük a kémcsőbe.

5. Egyheti 28 °C-os inkubálást követően végezzünk spórafestést (lásd 57. GYAKORLAT) a kémcsőtenyészetekből (pl. a csipesszel kivett len-, vagy kenderkötegből kipréselt folyadékából). Ellenőrizzük a növényanyag rostokra „foszlását”.

6. Figyeljük meg a spóráképző baktériumok jelenlétét mikroszkóppal.

36. GYAKORLAT

Lágyrothasztó baktérium hatásának tesztelése

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Erwinia carotovora

Escherichia coli

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

burgonya, sárgarépa

szike, vagy kés

steril desztillált víz kémcsőben

pipetta, steril pipettahegy

steril Petri-csésze

steril megnedvesített vattapamat

A vizsgálat menete

1. Mossuk meg a burgonyát, ill. sárgarépát és alkoholos leégetéssel sterilizált (lásd 25. GYAKORLAT) késsel először vágjunk „héj nélküli” tömböt steril Petri csészében, majd frissen leégetett késsel 2-3 mm vastag szeleteket. Helyezzük a szeleteket steril Petri csészébe és tegyük melléjük vattapamatot (2-4 szelet Petri csészénként).

2. Készítsünk kaccsal baktériumszuszpenziót, majd oltuk be 100-100 µL szuszpenzióval a szeleteket. Ne feledjük a Petri-Petricsészék gondos feliratozását (összejelölve az aljat a fedéllel).

3. Egyheti 28 °C-os inkubálást követően ellenőrizzük a zöldségszeleteket. Figyeljük meg a lágyrothadást. Készítsünk mikroszkópi preparátumot, pl. Gram-festés segítségével (lásd 55. GYAKORLAT).

4. Jegyzőkönyvezzük eredményeinket.

A *Clostridium perfringens* a tejben lévő laktózt nagyon gyorsan erjeszti intenzív sav- és gázképződés közben. A képződő sav a kazeint (tejfehérje) koagulálja, az erőteljes gázképződés az alvadékot darabokra szaggatja, és az így létrejövő bizarr alakú kazein csapadék (stormy clot) jellegzetes. Ezt a fajta fermentációt „**viharos**” erjedésnek nevezik (lásd 37. GYAKORLAT). Ha a tej vizsgálata során „viharos” erjedéssel találkozunk, az a tej tisztátlan kezelését, tehéntrágyával, talajjal való fertőzését jelenti.

37. GYAKORLAT

A tej „viharos” erjedése

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Clostridium perfringens szuszpenzió

talaj

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

nyers tej

vazpar

3 steril kémcső

pipetták

vízfürdő

Bunsen-égő

termosztát

Gram-festéshez anyagok (lásd 55. GYAKORLAT)

A vizsgálat menete

1. A kémcsövekre írjuk rá a vizsgálatra vonatkozó azonosító jelzéseket és az átoltás időpontját.
2. Pipetázzunk 10-10 ml tejet a kémcsövekbe.
3. Oltuk be az egyik kémcsövet baktériummal, a másikat talajmorzsával, a harmadik a kontroll.
4. Öntsünk a kémcsövekbe vazpart körülbelül 1 cm magasan.
5. Helyezzük mindhárom kémcsövet 80 °C-os vízfürdőbe 5 percre.
6. A kémcsöveket helyezzük 37 °C-os termosztátba és inkubáljuk 48 óráig.
7. Vizsgáljuk meg a csöveket, majd végezzünk egy-egy mintával Gram-festést (lásd 55. GYAKORLAT).

6.2 Táptalajkészítés

A mikroorganizmusok hagyományos vizsgálata laboratóriumi körülmények között tiszta tenyészeteken történik. Tenyésztésükre különféle összetételű táptalajokat használhatunk. A táptalajoknak fedezniük kell a mikrobák változatos tápanyag- és energiaforrás-igényét, valamint biztosítaniuk kell a megkívánt fizikai-kémiai körülményeket (1. táblázat).

1. táblázat A mikrobiológiai vizsgálatok során használt táptalajok alapvető összetevői

Táptalaj összetevő	Mennyiség
H-donorok és H-akceptorok	1-15 g
C-forrás	1-20 g
N-forrás	0,2-2 g
szervetlen tápelemek (pl. S, P)	50 mg
nyomelemek	0,1-1 mg
növekedési faktorok (pl. vitaminok)	0,1-1 mg
szilárdító anyag (pl. agar)	3-20 g
pufferoló anyagok	g.s.
oldószer (pl. dH ₂ O)	1 000 ml

A mikrobiológiai laboratóriumi gyakorlatok során felhasznált táptalajokat különböző szempontok szerint eltérő csoportokba sorolhatjuk (2. táblázat).

2. táblázat A mikrobiológiai táptalajok csoportosítása

Csoportosítási szempont	Tápközeg típusa
Halmazállapot	folyékony félszilárd szilárd
Összetétel	komplex félszintetikus szintetikus
Felhasználás	alap (fenntartó) differenciáló szelektív dúsító
Oxigén viszony	aerob tenyésztéshez anaerob tenyésztéshez PRAS

A folyékony tápközegek (táplevesek) rendszerint a vizsgált mikroorganizmus növekedéséhez szükséges komponenseket tartalmazó vizes oldatok. A tápleveseket megfelelő mennyiségű szilárdító anyaggal kiegészítve félszilárd, vagy szilárd táptalajokat kapunk. A félszilárd táptalajok kis mennyiségű agarral készülnek, ami a konvekciós áramlásokat és így a reoxidációt is csökkenti. Szilárdító anyag pl. az agar-agar (tengeri algából készülő poliszacharid, amit 0,3-3%-ban használunk, dermedése a koncentrációtól függően 38 °C-on, míg olvadása 85 °C felett történik), a gellángumi (*Sphingomonas* spp. által termelt poliszacharid, ami a szilárdításhoz 0,5-1,0% koncentrációt igényel), a zselatin (polipeptid, 10-30%-ban használatos, dermedése a koncentrációtól függően 35 °C körül történik) és a szilikagél (anorganikus kovásvav gél, amit főként szintetikus táptalajokhoz alkalmazunk).

A komplex táptalajok igen különböző, kémiaiilag – legalábbis részben – pontosan nem meghatározott anyagokból (pl. máj kivonat, hús kivonat, zabpely, kukorica lekvár, burgonya) készülnek. A szintetikus táptalajok minőségi és mennyiségi összetétele is pontosan ismert és meghatározott.

Az alap (fenntartó) táptalajok összetételük alapján a mikrobák fiziológiai csoportjai minél tágabb körének tenyésztésére használhatók, speciális adalékanyagot nem tartalmaznak. A differenciáló táptalajok a különböző mikrobák telepképzés, tenyésztési tulajdonságok alapján történő elválasztására és azonosítására alkalmasak. Általában speciális indikátor anyagokat tartalmaznak, melyek különféle anyagcsere reakciókat jeleznek. A szelektív táptalajok a bennük levő gátló, illetve serkentő anyagok segítségével meghatározott mikroorganizmusok szaporodását, növekedését másokéhoz viszonyítva elősegítik vagy gátolják.

Az anaerob szervezetek tenyésztéséhez szükséges megfelelően kis redoxpotenciál értéket ($E_h < -60$ mV) redukív tulajdonságú vegyületek (pl. nátrium-tioglikolát, cisztein) hozzáadásával érhetjük el. A PRAS (Pre Reduced Anaerobically Sterilized) táptalaj szintén redukív tulajdonságú vegyületeket (pl. ciszteint, aszkorbinsavat) tartalmaz, és sterilizálása az autoklávban anoxikus környezetben (pl. CO₂ atmoszférában) történik.

A mikrobiológiai laboratóriumi gyakorlaton készített **szilárd táptalajok**, – mint a **ferde agar** (lásd 38. GYAKORLAT), vagy a **tápagar lemez** (lásd 39. GYAKORLAT) – jelentősége abban rejlik, hogy a felületükön növő mikroorganizmusok jól megfigyelhetők, elkülöníthetők, és ez által lehetővé teszik a tiszta tenyészetek létrehozását, továbbá segítik a baktériumok élettani, biokémiai vizsgálatát.

38. GYAKORLAT

Mikrobiológiai ferde tápagar készítése

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus
ferde tápagar készítése

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

dH₂O

mérőhenger

lombik

bakteriológiai vegyszerek

laboratóriumi mérleg

vegyszerkanál

bemérő csónak

1 M NaOH

1 M HCl

pH-indikátor papír vagy pH-mérő

táptalaj adagoló

cérnakesztyű
kémcső
kémcsőkupak vagy dugó
kémcsőkosár
ferdítő állvány
autokláv
termosztát

A vizsgálat menete

1. A mikrobiológiai táptalaj szilárd összetevőit a receptúrában meghatározott mennyiségben és sorrendben egyesével (az előző komponens teljes feloldódása után) mérjük be az oldószer 9/10-nyi mennyiségét tartalmazó tiszta lombikba. Ügyeljünk arra, hogy a különböző bakteriológiai vegyszerekhez használjunk mindig tiszta vegyszerkanalat! A szilárd összetevők bemérése után az oldószer hiányzó mennyiségének hozzáadásával egészítsük ki a tápközeg végső térfogatát. Ha a táptalaj hőérzékeny anyagokat (pl. cukrokat) is tartalmaz, akkor azokat külön oldjuk fel, sterilizáljuk szűrővel, és csak ezt követően – aseptikus körülmények között – adjuk hozzá a már autoklávozott és megfelelő mértékben lehűtött alaptáptalajhoz.

2. Az így összeállított és megolvasztott táptalaj megfelelő pH értékét ellenőrizzük indikátor papír vagy pH-mérő segítségével, és szükség szerint (folyamatos ellenőrzés mellett) állítsuk be 1 M NaOH vagy 1 M HCl oldat kis mennyiségének hozzáadásával.

3. Fedjük le a lombik száját vattadugóval és alufóliával, majd helyezzük autoklávba. Végezzük el az autoklávval történő „sterilizálás” műveletét (lásd 3. GYAKORLAT) a sterilizálási idő elhagyásával. (Ennek a műveletnek a során a táptalajt még nem sterilizzük, csak a hőkezeléssel elősegítjük, hogy valamennyi komponens, pl. az agar is feloldódjon.)

4. Ellenőrizzük ismét az így elkészített (kb. 60-70 °C hőmérsékletű táptalaj) pH-ját, majd (óvatosan, nehogy megégessük magunkat) töltsük a táptalajt a lombikból a táptalaj adagolóba (pipettorba). Állítsuk be a táptalaj adagolót úgy, hogy egy-egy kémcsőbe 5-6 ml-nyi táptalaj kerüljön. A kémcsőveket zárjuk le dugóval vagy fémkupakkal, majd helyezzük egy kémcsőtartó fémkosárba.

5. A táptalaj teljes mennyiségének kiadagolása után a fémkosárban lévő, táptalajt tartalmazó lezárt kémcsőveket tegyük az autoklávba és sterilizáljuk 20 percig 121 °C-on (lásd 3. GYAKORLAT).

6. A sterilizálást követően a táptalajt tartalmazó kémcsőveket vegyük ki a kosárból és helyezzük ferdítő állványra, hogy a táptalaj a kémcsőben ferde helyzetben szilárduljon meg.

7. A megszilárdult táptalajokat tartalmazó kémcsőveket jelöljük a táptalaj típusa szerint, és végezzünk sterilitási próbát (24 órára helyezzük 28 °C-os termosztátba).

8. A kész táptalajokat szobahőmérsékleten 1-2 hétig, 12-15 °C-on vagy hűtőszekrényben hosszabb ideig is tárolhatjuk. (Az agart tartalmazó táptalajokat ne tároljuk 4 °C alatt, mert ez a hőmérséklet tönkreteszi a gélstruktúráját.)

39. GYAKORLAT

Mikrobiológiai tápagar lemez készítése

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus
tápagar lemez készítése

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

dH₂O
mérőhenger
lombik
bakteriológiai vegyszerek

laboratóriumi mérleg
vegyszerkanál
bemérő csónak
1 M NaOH
1 M HCl
pH-indikátor papír vagy pH-mérő
cérnakesztyű
autokláv
Bunsen-égő
steril üres Petri-csésze
termosztát

A vizsgálat menete

1. A mikrobiológiai táptalaj összetevőit mérjük össze a 38. GYAKORLAT leírása szerint.

2. Az így összeállított és megolvasztott táptalaj megfelelő pH értékét ellenőrizzük indikátor papír vagy pH-mérő segítségével, és szükség szerint (folyamatos ellenőrzés mellett) állítsuk be 1 M NaOH vagy 1 M HCl oldat kis mennyiségének hozzáadásával.

3. Fedjük le a lombik száját vattadugóval és alufóliával, majd helyezzük autoklávba és sterilizáljuk a táptalajt 20 percig 121 °C-on (lásd 3. GYAKORLAT).

4. A kényesebb táptalajok a sterilizálást követően még – aseptikus körülmények között elvégzett – utólagos pH állítást igényelnek.

5. Cérnakesztyű használatával fogjuk a kezünkbe a még meleg (kb. 60 °C hőmérsékletű) steril tápközeget tartalmazó lombikot, és a táptalajt még a kitöltés előtt óvatosan és egyenletesen keverjük össze a lombik lassú körkörös mozgásával. Vegyük ki a lombikot lezáró dugót, és a lombik száját a lemezöntés előtt égessük le a Bunsen-égő lángjában.

6. Lemezöntéskor – a steril Petri-csésze fedelét az egyik oldalon résnyire megemelve – töltsünk a Petri-csésze aljába kb. 5 mm vastagságban táptalajt (10 cm átmérőjű Petri-csésze esetén ez kb. 15-20 ml-nyi táptalaj/Petri-csésze).

7. A Petri-csészéket a tápagar megszilárdulásáig tartsuk vízszintes helyzetben és ne mozgassuk. A kész lemezeket feliratozzuk a táptalaj típusa és a készítés dátuma szerint, és végezzünk sterilitási próbát (24 órára helyezzük 28 °C-os termosztátba).

8. Amennyiben a tápagar lemezeket hosszabb ideig szeretnénk tárolni, helyezzük azokat steril műanyag zacskóba vagy dobozba, hogy megvédjük a kiszáradástól.

A félszilárd (0,3% agart tartalmazó) táptalajok jól használhatók pl. a baktériumok mozgásképesységének közvetett megfigyelésére. Ezeket a táptalajokat készíthetjük kémcsőben (magas agar), vagy Petri-csészében, szilárd (2% agar tartalmú) táplemezre rétegezve, ún. **rétegzett tápagar lemezekként** (lásd 40. GYAKORLAT).

40. GYAKORLAT

Rétegzett tápagar lemez készítése

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

rétegzett tápagar lemez készítése

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

dH₂O
mérőhenger
lombik
bakteriológiai vegyszerek
laboratóriumi mérleg

vegyszerkanál
bemérő csónak
1 M NaOH
1 M HCl
pH-indikátor papír vagy pH-mérő
cérnakesztyű
autokláv
Bunsen-égő
steril üres Petri-csésze
termosztát

A vizsgálat menete

1. A mikrobiológiai rétegzett táptalaj alsó (szilárd) és felső (félszilárd) rétegéhez külön-külön lombikban készítjük el a táptalajokat (lásd 38. GYAKORLAT), úgy, hogy a szilárd táptalajhoz 2%-nyi, a félszilárd táptalajhoz 0,3%-nyi agart adunk.

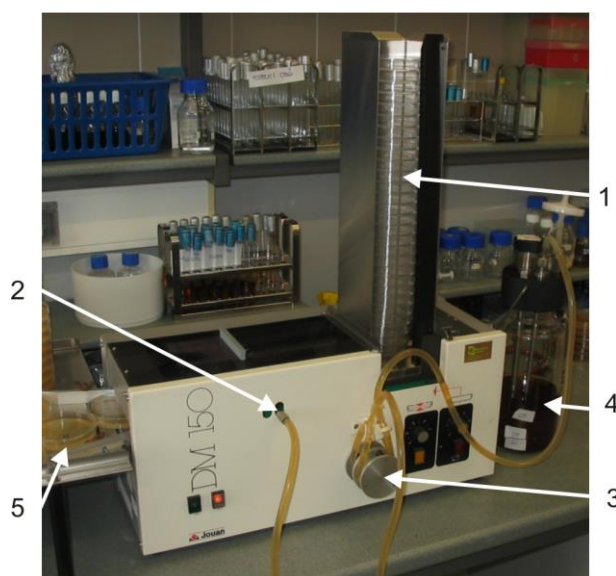
2. Az így összeállított és megolvastott táptalajok megfelelő pH értékét ellenőrizzük indikátor papír vagy pH-mérő segítségével, és szükség szerint (folyamatos ellenőrzés mellett) állítsuk be 1 M NaOH vagy 1 M HCl oldat kis mennyiségének hozzáadásával.

3 Fedjük le a lombikok száját vattadugóval és alufóliával, majd helyezük autoklávba és sterilizáljuk a táptalajokat 20 percig 121 °C-on (lásd 3. GYAKORLAT).

4 Először a steril alsó, szilárd táptalajjal öntsünk tápagar lemezeket (lásd 39. GYAKORLAT). A Petri-csészéket a tápagar megszilárdulásáig tartjuk vízszintes helyzetben és ne mozgassuk. Ezt követően a már szilárd tápagar lemezekre rétegezzük a 45-55 °C-ra lehűtött félszilárd táptalajt 2-3 mm vastagságban.

5 A kész lemezeket feliratozzuk a táptalaj típusa és a készítés dátuma szerint, és végezzük sterilítási próbát (24 órára helyezük 28 °C-os termosztátba).

A tenyésztésen alapuló laboratóriumi munkák gyorsítását és folyamatosságát teszik lehetővé a különböző automata és félautomata eszközök (28. ábra). Ilyen például a minták hígítását és adagolását végző, az inokulumot a táplemez felületén szélesztő (spirál-lemez), valamint a táptalajok készítését, adagolását segítő automata készülék.



28. ábra Félautomata tápagar lemezöntő készülék

Az egymásra rakott zárt Petri-csészék (1.) nyitva esnek a készülék belsejében mozgó szállítószalagra. A csésze és felette a fedője együtt mozog az adagolócsőhöz (2.), ahol megáll. Az adagolócsővön (2.) keresztül perisztaltikus szivattyú (3.) juttatja a felolvasztott steril táptalajt (4.) a Petri-csészébe. A szállítószalag a megtöltött Petri-csészét a hűtő lemezre (5.) továbbítja, miközben a fedő ráesik a lemezre. A töltési művelet során a csíramentességet UV fény biztosítja.

A gyakorlaton használt **tápagar lemezöntő automata készülékben** (lásd 41. GYAKORLAT) szállítószalag mozgatja a Petri-csészéket, és egy beépített perisztaltikus szivattyú szállítja az adagolandó táptalajt a rendszerbe. A táptalaj adagoló szilikoncső megfelelő vastagsága és a sok görgőt tartalmazó speciális perisztaltikus szivattyúfej megakadályozza a buborékok keletkezését a táptalajban. A töltőteret UV lámpa, a táptalajt tartalmazó palackot levegőszűrő védi a fertőzéstől.

41. GYAKORLAT

Táptalaj készítése automata készülékkel

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

tápagar lemez készítése

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

dH₂O

mérőhenger

lombik

bakteriológiai vegyszerek

laboratóriumi mérleg

vegyszerkanál

bemérő csónak

1 M NaOH

1 M HCl

pH-indikátor papír vagy pH-mérő

cérnakesztyű

autokláv

steril üres Petri-csésze

termosztát

A vizsgálat menete

1. A táptalaj összetevőit mérjük össze a 38. GYAKORLAT leírása szerint.
2. A táptalajt olvasszuk meg és megfelelő pH értékét ellenőrizzük indikátor papír vagy pH-mérő segítségével, és szükség szerint (folyamatos ellenőrzés mellett) állítsuk be 1 M NaOH vagy 1 M HCl oldat kis mennyiségének hozzáadásával.
3. Az összemért táptalajt töltsük az automata rendszerhez tartozó palackba, majd helyezzük autoklávba és sterilizáljuk 20 percig 121 °C-on (lásd 3. GYAKORLAT).
4. A sterilizált táptalajt tartalmazó palack tetején, az e célra speciálisan kialakított csőre helyezzük fel a steril szűrőt, ami a tápközeg csökkenésével egyidejűleg a rendszerbe kerülő levegőt szűri meg.
5. Rögzítsük a táptalajt szállító szilikoncső egyik végét a palacktetőhöz, a másikat (amelyen az adagoló cső van) csatlakoztassuk a töltő automatához. Helyezzük a steril Petri-csészéket a lemeztartóba.
6. Kapcsoljuk be a készüléket (és az UV lámpát is). Állítsuk be a táptalaj rétegvastagságát és a töltés sebességét, majd indítsuk el a töltést.
7. A Petri-csészéket a tápagar megszilárdulásáig tartsuk vízszintes helyzetben és ne mozgassuk. A kész lemezeket feliratozzuk a táptalaj típusa és a készítés dátuma szerint, és végezzünk sterilitási próbát (24 órára helyezzük 28 °C-os termosztátba).

6.3 Tenyésztési eljárások

6.3.1 Dúsítás

A **dúsító táptalajok** összetételük alapján alkalmasak arra, hogy bizonyos mikroorganizmusokat a többi mikrobával szemben speciális tápanyag-hasznosítási

képességük, vagy más egyedi tulajdonságuk alapján (pl. antibiotikum-rezisztencia, nehézfém-rezisztencia) a tenyésztés során felszaporítsunk. Az ilyen szelektív tápközegbe juttatott mikrobák közül azok fognak érvényre jutni, amelyek a táptalaj komponenseit hasznosítani, vagy tolerálni és hasznosítani képesek (lásd 42. GYAKORLAT).

42. GYAKORLAT

Dúsító tenyészetek létrehozása, majd tenyésztés szelektív táptalajon

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

gázolaj bontó baktériumok
cellulóz bontó baktériumok
HgCl₂-rezisztens baktériumok

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

kerti talaj
gázolaj-tartalmú dúsító tápleves
cellulózos dúsító tápleves
HgCl₂-tartalmú dúsító tápleves
steril vegyszerkanál
mérleg
rázótermosztát
szélesztőbot (sterilizéshez alkohol)
Bunsen-égő
termosztát

A vizsgálat menete

1. Helyezzük a kerti talaj 1-1 g-ját vegyszerkanál segítségével a dúsító tápleveseket tartalmazó lombikokba.
2. A beoltott lombikokat a jobb levegőzés érdekében tegyük 28 °C-os rázótermosztátba.
3. A tenyészeteket inkubáljuk 1 hétig.
4. Az inkubációs idő elteltével a dúsító tenyészetekből, illetve az eredeti mintából készítsünk 5 tagú 10-es léptékű hígítási sorozatot (lásd 25. GYAKORLAT).
5. A hígítási sorozat egyes tagjaiból szélesszünk (lásd 25. GYAKORLAT) a dúsító táplevessel megegyező összetételű tápagar lemezekre.
6. A tenyészeteket inkubáljuk 1 hétig 28 °C-on.
7. Az inkubációs idő elteltével végezzünk csíraszám becslést és telepmorfológiai vizsgálatokat.

A **Winogradsky-oszlopban** (29. ábra) a bentikus környezetben előforduló és elsősorban a kénformák átalakításában résztvevő anaerob anyagkörforgalmi rendszert (az ún. szulfurétumot) modellezhetjük. Az oszlopban végbemenő természetes szelekciós folyamatok a fotoszintetizáló baktériumok oxigén érzékenysége alapján különböző mélységekben eltérő faji összetételű baktériumközösségeket alakítanak ki. A gyakorlat célja anoxikus fotoszintetizáló és anaerob szulfátredukáló baktériumok dúsítása és mikroszkópos vizsgálata (lásd 43. GYAKORLAT).

43. GYAKORLAT

Winogradsky-oszlop készítése fototróf baktériumok dúsítására

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

anoxikus fotoszintetizáló baktériumok
szulfátredukáló baktériumok

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

kerti vagy erdőtalaj
tavi iszap
CaCO₃
CaSO₄
szűrőpapír
üvegoszlop
parafilm vagy PVC fólia

A vizsgálat menete

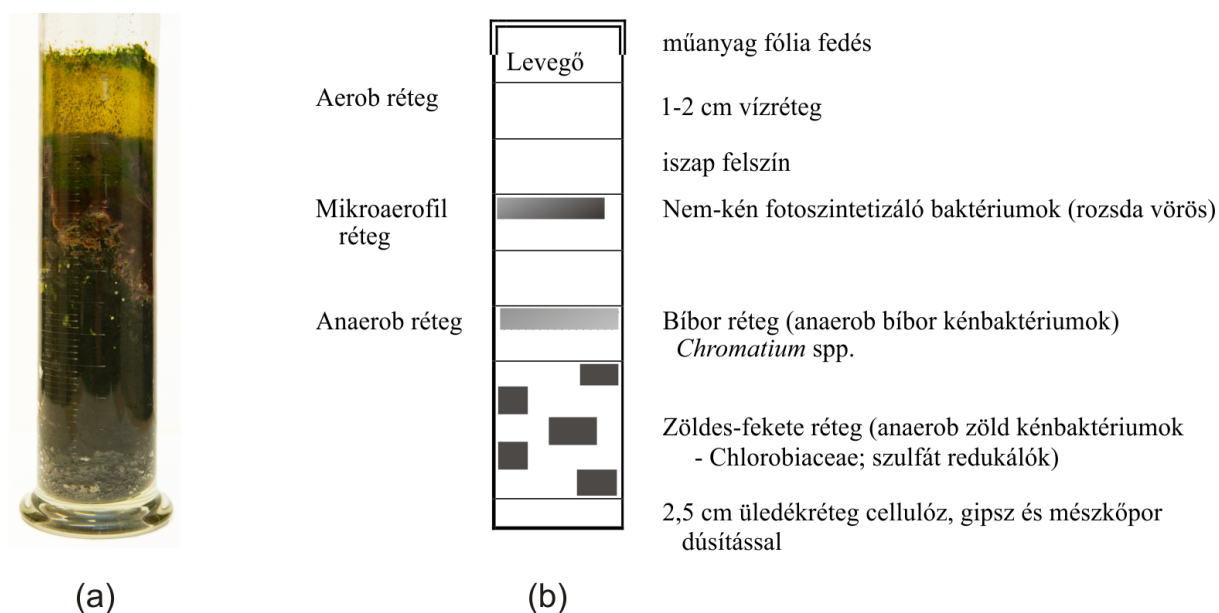
1. Egy tálban keverjük össze 100-200 g mennyiségű szitált talajt 3-5 g kalcium-karbonáttal és 3-5 g kalcium szulfáttal.

2. A szűrőpapírt tépjük apró darabokra és keverjük hozzá a talajhoz, majd adjunk hozzá csapvizet a krémszerű konzisztencia eléréséig.

3. Ezt a dúsított talajt kb. 2-5 cm vastagságban rétegezzük az üvegoszlop aljára, majd az oszlopot körülbelül 15-25 cm magasságban egyenletesen töltjük fel a tavi iszappal. Az oszlop akkor lesz megfelelő, ha nincs benne gázbuborék, és 24 órás állás után mintegy 0,5 cm vízréteg fedí az iszapot (a felesleget öntsük le). Az üvegoszlop tetejét a kiszáradás elkerülése érdekében zárjuk le (pl. parafilmmel, vagy PVC fóliával).

4. Helyezzük az oszlopot legalább 4-6 hétig szobahőmérsékleten világos helyre (pl. ablakba, de kerüljük a közvetlen napsugárzást, a túlmelegítést).

5. Az inkubációs idő alatt az oszlopban megfigyelhető színváltozás alapján kövessük nyomon az anoxikus fotoszintetizáló és az anaerob szulfátredukáló baktériumok dúsulását, majd az inkubációs elteltével óvatosan bontsuk szét az oszlopot, és végezzünk mikroszkópos vizsgálatokat az anoxikus fototróf mikroorganizmusokkal (29. ábra).



29. ábra Winogradsky-oszlop

Egy három hónapja inkubált oszlop (a). A Winogradsky-oszlop baktériumközösség szerkezetének vázlata (b).

6.3.2 Szélesztés, lemezöntés

A **szélesztés**en alapuló módszer (lásd 44. GYAKORLAT) lényege, hogy a vizsgálandó mikroorganizmusokat tartalmazó mintából készített hígítási sorozat egyes tagjaiból meghatározott mennyiséget egyenletesen szétoszlatunk a vizsgálat céljának megfelelő összetételű, steril táptalaj felületén. Lemezöntés során a mintából készített hígítási sorozat egyes tagjaiból meghatározott mennyiséget juttatunk a körülbelül 50-55 °C hőmérsékletű,

még folyékony állapotú steril táptalajba, és az így beoltott táptalajból steril Petri-csészékbe lemezeket öntünk. A szélesztést vagy lemezöntést követő inkubációs idő elteltével a táptalaj felületén vagy a táptalaj felületén és belsejében fejlődött telepek megszámlálásával csíraszám becslést végezhetünk, vagy a telepeket további vizsgálatok céljából friss steril táptalajra izolálhatjuk.

44. GYAKORLAT

Környezetünkben lévő mikroorganizmusok kimutatása szélesztéssel

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

talajmintában lévő baktériumok

vízmintában lévő baktériumok

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

húspepton vagy keményítő-kazein tápagar lemez

pipetta, steril pipettahegyek

99 ml-es steril víz lombikban

9 ml-es steril víz kémcsőben

kémcsőkeverő (vortex)

szélesztőbot (sterilizéshez alkohol)

Bunsen-égő

termosztát

A vizsgálat menete

1. A steril vizet tartalmazó lombikokra és kémcsövekre még a hígítási sorozat elkészítése előtt írjuk fel a minta jelzését és a hígítás fokát. A talajminta 1 g-ját mérjük 99 ml steril vizet tartalmazó lombikba, és kémcsőkeverővel alaposan keverjük össze. A vízmintából felkeverés után 1 ml-nyi mennyiséget pipettázzunk egy 9 ml steril vizet tartalmazó kémcsőbe.

2. Az így kapott szuszpenzió(k)ból 1 ml-nyi mennyiséget steril pipettával vigyünk át egy újabb 9 ml steril vizet tartalmazó kémcsőbe, és a kémcső tartalmát alaposan keverjük össze. Ezt a műveletet ismételjük meg a kívánt hígítási fok eléréséig.

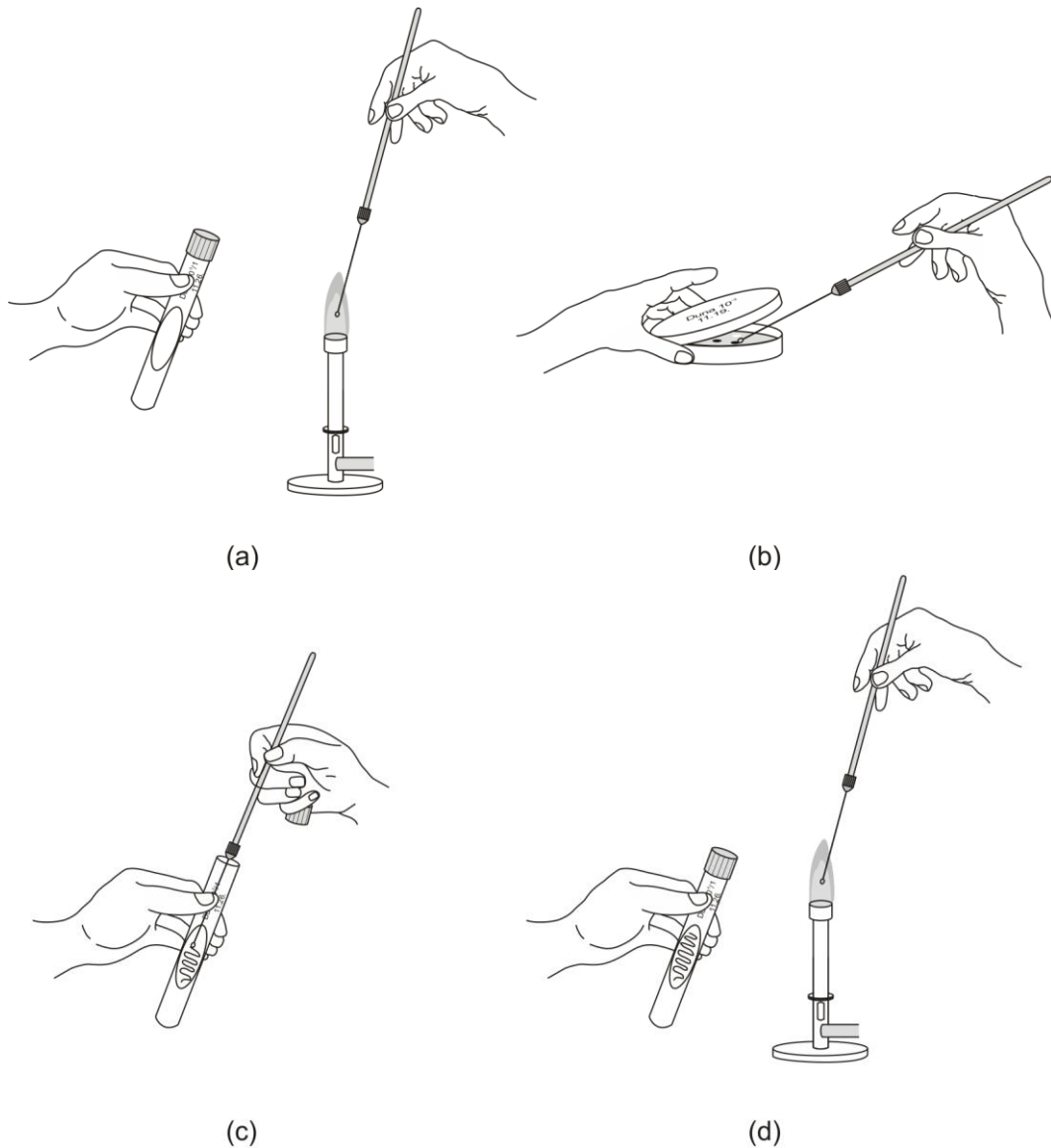
3. Minden Petri-csészén feliratozással jelöljük a vizsgált minta típusát, a hígítás fokát és a szélesztés időpontját. A megfelelő hígítási fokokból cseppentsünk 0,1 ml-nyi mennyiséget steril pipettával a megfelelő táptalaj felületére. A szélesztőbotot csírátlanítsuk leégetéssel (mártjuk alkoholba és gyújtjuk meg), majd hűtsük le a Petri-csésze fedelének belső (steril) oldalán. A szélesztőbot segítségével kenjük szét egyenletesen a szuszpenziót a táptalaj felszínén, úgy, hogy közben a Petri-csészét forgassuk. Ügyeljünk arra, hogy szélesztés alatt a Petri-csészéket csak résnyire nyissuk ki.

4. A szélesztéssel fertőzött tápagar lemezeket fordított helyzetben (fedelükkel lefelé) helyezük 28 °C-os termosztátba, és inkubáljuk 1 hétig.

5. Az inkubációs idő elteltével végezzünk csíraszám becslést (lásd 25. GYAKORLAT). Ehhez a tápagar lemezeken kifejlődött telepeket számoljuk meg, párhuzamos minták esetén átlagoljuk a kapott értékeket, majd szorozzuk meg a hígítás fokával. A különböző hígítási fokoknál kapott eredmények ismételt átlagolásával kapjuk meg a kiindulási minta egységnyi mennyiségére becsült csíraszám értéket.

6.3.3 Baktériumok izolálása, tisztítása

Izolálás (30. ábra) során egy tenyészetben különálló telepként fejlődött sejtömeget oltókacs segítségével a szélesztő táptalajjal azonos táptalajra oltunk (lásd 45. GYAKORLAT). A művelet eredményeként nyert tenyészetet izolátumnak nevezzük. Megjegyezzük, hogy izolálás határhígítás (lásd 28. GYAKORLAT) segítségével is végezhető.



30. ábra Izolálás

Megfelelő számozással látunk el ferde táptalajokat, majd leégetjük az oltókacsot (a). Az iróntartással fogott kacsot vörös izzásig hevítjük és a befogórészt is áthúzzuk a lángon. A réstre nyitott Petri-csészében egy baktériummentes területen lehűtjük az oltókacsot, majd a kiválasztott különálló baktériumtelepből kacsnyit felvesszünk és a tenyészet fedelét visszazárjuk (b). A feliratozott ferde táptalajos kémcső kupakját levesszük és a száját leégetjük. Ezt követően a kaccsal beoltjuk a táptalajt (c). A kémcső száját újfent leégetve a kupakját visszazárjuk, a kacsot pedig leégetéssel sterilizáljuk (d).

45. GYAKORLAT

Izolátum létrehozása ferde tápagon

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

talajmintában lévő baktériumok

vízmintában lévő baktériumok

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

szélesztéssel fertőzött tápagar lemezek

ferde húspepton tápagar

ferde keményítő-kazein tápagar

oltókacs

Bunsen-égő

termosztát

A vizsgálat menete

1. Az izolátumot tartalmazó kémcsövet lássuk el a mintára és az izolátumra utaló egyedi jelzéssel, és tüntessük fel az izolálás időpontját.

2. Vegyük a kezünkbe az oltókacsot és tartsuk "irónfogással", majd az oltókacsot hevítjük fel izzásig a Bunsen-égő lángjában. Hűtjük le az oltókacsot a Petri-csészében lévő táptalajba szúrva úgy, hogy közben ne érintsünk vele kifejlődött telepeket. A lehűtött oltókaccsal emeljük ki egy kacsnyi sejttömeget a kiválasztott telepből, majd zárjuk vissza a Petri-csésze fedelét.

3. Az oltókacsot mindvégig az egyik kezünkben tartva vegyük a másik kezünkbe a steril táptalajt tartalmazó kémcsövet. Az oltókacsot tartó kezünkkel (óvatos forgatással) lazítsuk meg a kémcsövet lezáró dugót vagy kupakot, majd vegyük le és rögzítsük azt az ujjaink között.

4. A kémcső száját égessük le a Bunsen-égő lángjában, és a kacsnyi sejttömeget oltjuk cikk-cakk vonalban a ferde táptalaj felszínére. Ügyeljünk arra, hogy a fertőzött oltókaccsal ne érintsük a kémcsövek száját és belső falát!

5. Égessük le ezután ismét a kémcső száját, és helyezzük vissza a dugót vagy a kupakot. Az átoltás szabályainak figyelembe vételével sterilizáljuk izzítással az oltókacsot. (lásd 3. ábra)

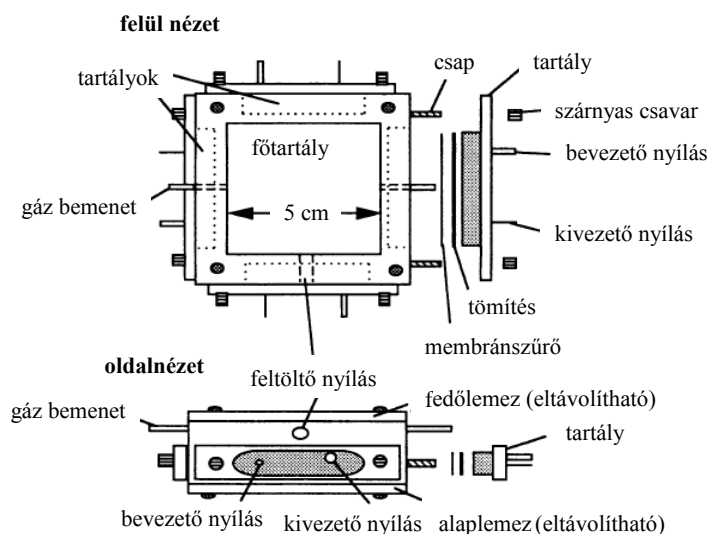
6. Helyezzük vissza a kémcsöveket és az oltókacsot az állványba.

7. Helyezzük a tenyészetet 28 °C-os hőmérsékletű termosztátba.

8. Az inkubációs idő elteltével ellenőrizzük az izolátum növekedését.

A természetes élőhelyek térbeli és időbeli heterogenitásának modellezésére **gél-stabilizált kamrák alkalmazása** nyújt lehetőséget. Ilyen kamrákon belül kémiai gradienst lehet létrehozni: analitikai diffúziós gradiens kamra (Emerson és mtsai, 1994). A kamrában kisméretű, vízdékony molekulák vagy gázok hosszantartó, folyamatos gradienseinek felállítására van lehetőség. A gradiensalkotó oldott anyagok folyamatosan pótolhatók, emellett a környezeti paraméterek is gradiens mentén változtathatók, ezáltal a természetes körülmények jól modellezhetők.

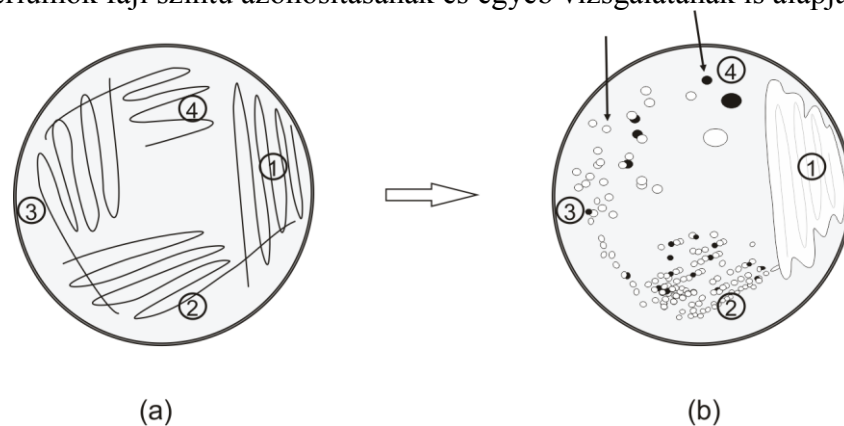
Maga a kamra egy polikarbonát „doboz” (31. ábra), amelyben egy elkülönült főtartály található, ebbe önthető a félszilárd táptalaj. A főtartály mellett féligáteresztő hártával elválasztva, tápanyagot tartalmazó melléktartályok vannak elhelyezve. A membrán engedélyezi a kis molekulák szabad diffúzióját a melléktartályokból a gél tartalmazó főtartályba, de megakadályozza a szervezetek mozgását a gélből a kisebb tartályok felé.



31. ábra A gradiens kamra felépítése

A diffúziós grádiens kamra előnyei közé tartozik, hogy könnyű kezelni, a főtér gázösszetétele folyamatosan nyomon követhető, változtatható, így egyaránt lehetséges a kamrát oxikus vagy anoxikus körülmények között működtetni. A kamra különösen érdekes felhasználási területe az új tulajdonságokkal rendelkező szervezetek izolálása.

Kevert tenyészetek kialakulása, vagyis két vagy több mikroba együttes szaporodása esetén több lehetőséggel számolhatunk: 1/ mindegyik mikroba képes a másiktól függetlenül is növekedni; 2/ az egyik mikroba termel valamilyen anyagot, ami lehetővé teszi a másik mikroba növekedését is az adott táptalajon (szinergizmus); 3/ az egyik mikroba által termelt anyag gátolja a másik növekedését (antagonizmus); 4/ az egyik mikroba a másikinál gyorsabb növekedésre képes, ezáltal az utóbbi növekedése korlátozott lesz a létfontosságú tápanyagok felhasználása miatt. A kevert tenyészetek mikrobiológiai vizsgálata a különböző mikrobák eltérő anyagcsere tulajdonságai miatt általában nem ad kielégítő eredményt, ezért szükséges a tiszta tenyészetek létrehozása (lásd 46. GYAKORLAT). A **tiszta tenyészet** más mikroorganizmusoktól mentes, egyetlen sejtből, vagy telepkepző egységből fejlődő sejtömeg, amely a baktériumok faji szintű azonosításának és egyéb vizsgálatának is alapjául szolgál.



32. ábra Tiszta tenyészet létrehozása oltókacs segítségével

A kevert tenyészetből készített szuszpenzió kacsnyi mennyiségével csokolatot készítve fertőzzük egy Petri-csészés tápagarlemez egyik negyedét (1.). Leégetjük az oltókacst és a steril kaccsal a lemez második negyedét is csokolatot készítve fertőzzük úgy, hogy az első csokolatból indítjuk ezt (2.). Megismételjük ezt a műveletet a lemez harmadik (3.) és negyedik (4.) negyede esetében is (a). A megfelelő ideig tartó inkubálást követően kinőtt kolóniák között megkeressük az eltérő morfológiájú különálló telepeket (nyilak) és izoláljuk (b). A harmadik és negyedik negyedben várható a megfelelő hígulás bekövetkezése.

46. GYAKORLAT

Tiszta tenyészetek létrehozása kevert tenyészetből

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Serratia marcescens és *Micrococcus luteus* törzsek kevert szuszpenziója

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

húspepton tápagar lemez

oltókacs

Bunsen-égő

termosztát

A vizsgálat menete

1. A Petri-csészét lássuk el a mintára és a tisztítási művelet időpontjára utaló jelzéssel.

2. Vegyük a kezünkbe az oltókacst és sterilizáljuk az oltókacsott Bunsen-égő lángjában történő izzítással (lásd 3. ábra), majd hűtsük le a Petri-csészében lévő steril táptalajba szűrva (30. ábra).

3. Az oltókacst mindvégig az egyik kezünkben tartva vegyük a másik kezünkbe a baktériumtenyészetek kevert szuszpenzióját tartalmazó kémcsövet. Az oltókacst tartó

kezünkkel (óvatos forgatással) lazítsuk meg a kémcsövet lezáró dugót vagy kupakot, majd vegyük le és rögzítsük azt az ujjaink között.

4. A kémcső száját égessük le a Bunsen-égő lángjában, és emeljük ki egy cseppnyi sejtömeget a szuszpenzióból. Égessük le ezután ismét a kémcső száját, és helyezzük vissza a dugót vagy a kupakot, majd tegyük vissza a kémcsövet az állványba.

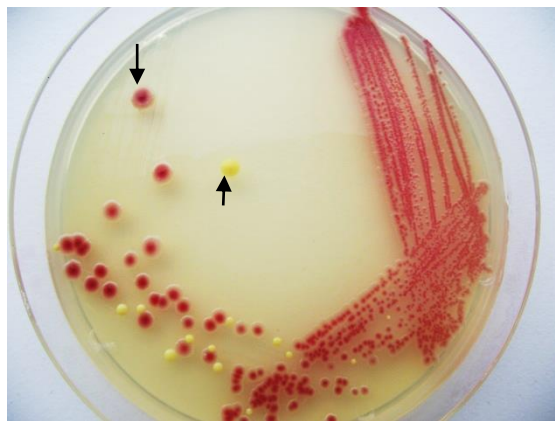
5. A fertőzött oltókaccsal végezzünk sűrű cikk-cakk vonalban leoltást a Petri-csészében lévő táptalaj felületének kb. egyharmadán. Ezt követően égessük le újra az oltókacsot, majd hűtsük le a Petri-csészében lévő táptalaj steril részében (32. ábra).

6. Újabb inokulálás nélkül végezzünk továbboltást a Petri-csészében lévő táptalaj felszínének második harmadán úgy, hogy az új oltási vonallal részben keresztezzük az előző oltási vonalakat, ezáltal hígítjuk a táptalaj felületére felkent kevert szuszpenziót.

7. Ismételjük meg a sterilizálást és a továbboltási műveletet a Petri-csészében lévő táptalaj felületének harmadik harmadán is. Sterilizáljuk az oltókacsot és helyezzük vissza az állványba.

8. Helyezzük a Petri-csészét 1 hétre 28 °C-os hőmérsékletű termosztátba.

9. Az inkubációs idő elteltét követően megfigyelhetjük, hogy a folyamatos hígítás és továbboltás eredményeképpen a táptalaj lemeznek lesznek olyan részei, ahol a különálló telepek már csak egyetlen sejtől fejlődnek (33. ábra). Ezeknek a telepeknek az újraizolálásával (lásd 45. GYAKORLAT) tiszta tenyészeteket hozhatunk létre (34. ábra).



33. ábra Kevert tenyészet tisztítása táptalajon történő leoltással (Fotó: Vajna B.)

Nyílak jelölik a külön álló, különböző morfológiájú telepeket, melyekből a tiszta tenyészetek létrehozhatók.



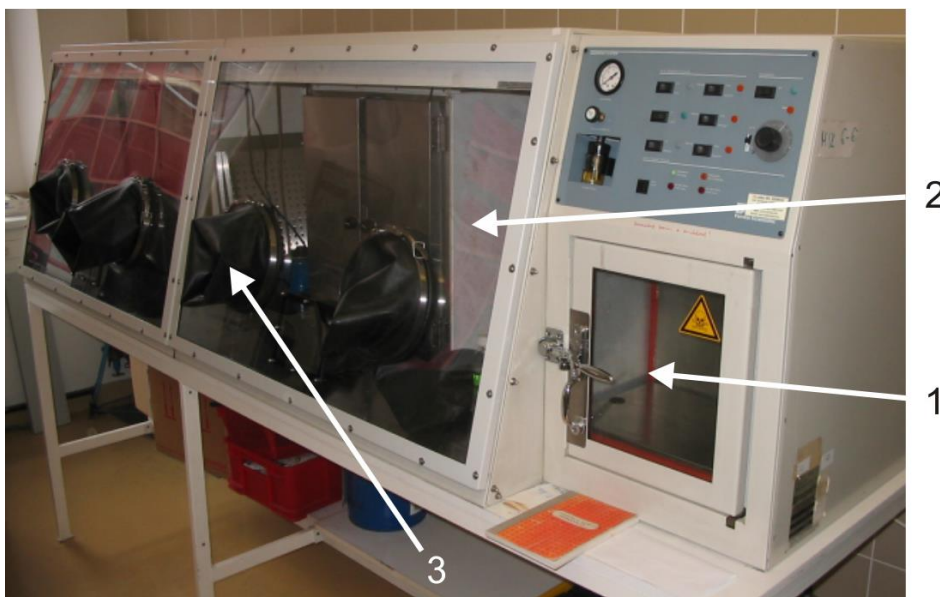
34. ábra Izolálás Petri csészében szélesztett tenyészetből, a táptalaj felületéről (Fotó: Vajna B.)

Egy vízminta izolátumai.

6.3.4 Anaerob tenyésztési technikák alkalmazása

A mikrobiológiai laboratóriumi gyakorlatok során vizsgált legtöbb baktérium jól növekszik és szaporodik normál (21%-os) légköri oxigénkoncentrációnál. A szigorúan aerob (más néven obligát aerob) szervezetek (pl. *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*) respiratórikus anyagcseréjük során kizárólag a molekuláris oxigént tudják végső elektronfelvevőként használni. A fakultatív aerob (vagy fakultatív anaerob) szervezetek (pl. *Escherichia coli*) legjobban szintén normál légköri oxigénkoncentrációnál növekednek, de alternatív anyagcsere folyamatok (pl. fermentáció) működtetésére való képességük miatt az oxigén hiánya sem korlátozza növekedésüket és szaporodásukat. Bizonyos mikroorganizmusok azonban csak csökkent oxigénkoncentráció értékek mellett, vagy a légköri oxigén teljes hiányában képesek növekedni és szaporodni. A mikroaerofil szervezetek (pl. *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*) általában 5-15%-os oxigén koncentrációt igényelnek. Az aerotoleráns anaerob szervezetek (pl. *Streptococcus pyogenes*) anyagcseréjük során ugyan nem hasznosítják az oxigént, de elviselik annak jelenlétét. A szigorúan anaerob (más néven obligát anaerob) szervezetek (pl. *Methanobacterium palustre*, *Clostridium sporogenes*) anaerob respiratórikus vagy fermentatív anyagcserét folytatnak és légköri oxigén jelenlétében általában gyorsan elpusztulnak.

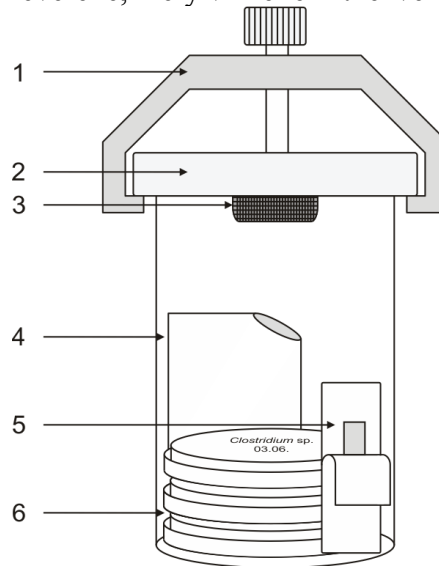
Az anaerob baktériumok tenyésztésére számos módszer létezik és a használni kívánt eljárást érdemes annak alapján megválasztani, hogy a kitenyészteni kívánt szervezet mennyire érzékeny a tápközeg és az azt körülvevő atmoszféra maradék oxigén koncentrációjára. Az oxigénre még nyomokban is érzékeny baktériumok (pl. metanogének, szulfátredukálók) tenyésztésére a legalkalmasabb a külvilággal zsilipkamrán keresztül érintkező **anaerob rendszer** (35. ábra) alkalmazása, amelyben az anoxikus környezet folyamatosan fenntartható, miközben benne kesztyűk segítségével mikrobiológiai műveletek (pl. mikroszkopizálás, törzsek izolálása, átoltása) végezhetők. A rendszerből az oxigént nyomáscsökkentéssel kombinált anaerob gáz átöblítéssel (pl. N₂) távolítjuk el, majd gyengén pozitív nyomás mellett anaerob gázkeveréket (pl. 10% H₂, 10% CO₂, 80% N₂) vezetünk bele. A nyomokban jelenlévő oxigén kimutatása metilénkék, vagy rezaurin redoxindikátorokkal történik, míg eltávolítására palládium katalizátort használunk. A rendszerbe helyezett aktív szén a kénhidrogén, illetve más katalizátor-, illetve sejtmérgek megkötését szolgálja.



35. ábra Kesztyűs benyúlású anaerob rendszer

A mintát anaerobizálható zsilipkamrán (1) keresztül juttatjuk be a munkatérbe (2). A munkatérben a mikrobiológiai műveleteket (hígítás, szélesztés, izolálás, átoltás stb.) kesztyűk (3) segítségével kívülről benyúlva végezzük.

Olyan mikrobákat, amelyek a nyomokban jelenlévő oxigénre kevésbé érzékenyek és az átmeneti (pl. a mintafeldolgozás során jelenlévő) magas oxigén szintet endospóra alakjában túlélni képesek, sikeresen tenyésztjük **anaerob tenyésztőedényekben** (lásd 47. GYAKORLAT). Az anaerob tenyésztőedények (36. ábra) kb. 3-10 l űrtartalmú, palládium katalizátorral, illetve egyszer használatos H₂+CO₂ generátorral és redoxindikátorral működő, általában átlátszó polikarbonátból készült, zárható berendezések. Működésük lényege, hogy a légköri oxigént a készülékben fejlesztett hidrogénnel palládium katalizátor segítségével egyesítjük. A reakció lassú égés, végterméke víz. H₂+CO₂ forrásként fólia tasakba zárva két tablettát találunk, melyek közül az egyik nátrium-borohidridet (NaBH₄) tartalmaz, amely vízzel reagálva hidrogént termel, a másik tabletta pedig citromsav és nátrium-hidrogénkarbonát (NaHCO₃) keveréke, mely vízzel érintkezve CO₂ fejlődése mellett oldódik.



36. ábra Anaerob tenyésztő edény rajza

1. záró rendszer, 2. fedő, 3. palládium katalizátor, 4. H₂ és CO₂ fejlesztő tasak, 5. redox indikátor, 6. tápagar lemezek

47. GYAKORLAT

*Clostridium*ok tenyésztése anaerob tenyésztőedényben

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Clostridium sp.

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

talajminta, vagy tavi iszap
 9 ml-es steril víz
 kémcsőkeverő (vortex)
 Wilson-Blair-féle bizmut-szulfít tápagar lemez
 pipetta, steril pipettahegyek
 szélesztőbot (sterilizéshez alkohol)
 Bunsen-égő
 termosztát

A vizsgálat menete

1. A Petri-csészéket lássuk el a mintára és a hígítás fokára utaló jelzéssel.
2. A mintából steril víz felhasználásával készítsünk 10-es léptékű hígítási sorozatot, majd a hígítási sorozat egyes tagjaiból szélesszünk (lásd 25. GYAKORLAT) a bizmut-szulfít tápagar lemezekre.
3. A szélesztéssel fertőzött lemezeket helyezzük fordított helyzetben (leoltott felszínükkel lefelé) az anaerob tenyésztőedénybe. A redoxindikátort tartalmazó csíkot tegyük

a lemezek mellé úgy, hogy kívülről lehessen látni az indikátorcsíkot (ami néhány másodpercen belül megkékül). A gázfejlesztő tasak sarkát vágjuk le, és a szabaddá váló résen keresztül pipettázzunk a tasakba 10 ml vizet. A tenyésztőedényre tegyük rá a fedelét és kézzel könnyen húzzuk meg a kengyel szorítócsavarját, majd helyezzük az anaerob tenyésztőedényt 28 °C-os termosztátba 1 hétre.

4. Az inkubációs idő elteltével vegyük ki a Petri-csészéket az anaerob tenyésztőedényből és a bizmut-szulfid tartalmú táptalajon kifejlődött telepek megszámlálásával végezzünk csíraszám becslést (lásd 25. GYAKORLAT).

Az anaerob baktériumok tenyésztésének legrégebben használt és legegyszerűbb módszere a **redukált félfolyékony**, vagy szilárd **táptalajok mélyén történő tenyésztés** (lásd 48. GYAKORLAT). A tápközeg legfontosabb tulajdonsága a megfelelően kis redoxpotenciál ($E_h < -60$ mV). Ennek ellenőrzését a táptalajhoz adott redoxindikátor teszi lehetővé. Redoxindikátorként rezazurint vagy metilénkékét szoktak használni. Redukált állapotban mindkettő színtelen, oxidált állapotban a rezazurin pirosas-kék, a metilénkék pedig kék színű. A beoltott táptalaj lezárásával (felolvasztott és hevítéssel sterilizált vazelin, vagy vazelin-paraffin 1:1 arányú keverékének a táptalaj tetejére rétegzésével) biztosíthatjuk, hogy a táptalajba oxigén az inkubálás alatt se kerüljön. Mivel a félfolyékony táptalajok kis mennyiségű agarral készülnek, ezért ezek a tápközeg lezárás nélkül is alkalmasak lehetnek anaerob tenyésztésre, mert az agar a konvekciós áramlásokat, így a reoxidációt is csökkentheti, és az agarkolloid kis töménységben alkalmazva redukáló hatású. A redoxpotenciál további csökkentése céljából félfolyékony táptalajokban redukzív tulajdonságú vegyületeket (nátrium-tioglikolátot és ciszteint) is alkalmazhatunk.

48. GYAKORLAT

Anaerob tenyésztés nátrium-tioglikolát tartalmú „magasagarban”

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

anaerob baktériumok

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

talajminta, vagy tavi iszap

9 ml-es steril víz

kémcsőkeverő (vortex)

nátrium-tioglikolát tartalmú olvasztott magasagar

pipetta, steril pipettahegyek

Bunsen-égő

termosztát

A vizsgálat menete

1. A kémcsöveket lássuk el a mintára és a hígítás fokára utaló jelzéssel.

2. A mintából steril víz felhasználásával készítsünk 10-es léptékű hígítási sorozatot (lásd 25. GYAKORLAT), majd a hígítási sorozat egyes tagjaiból pipettázzunk 1-1 ml-nyi mennyiséget a nátrium-tioglikolátos olvasztott „magasagart” tartalmazó kémcsövekbe.

3. A beoltott kémcsöveket tegyük 1 hétre 28 °C-os termosztátba.

4. Az inkubációs idő elteltével a tápközeg belsejében fejlődött telepek megszámlálásával végezzünk csíraszám becslést (lásd 25. GYAKORLAT).

Az ún. „anaerob” magasagarban történő tenyésztés hátránya, hogy a kémcső belsejébe zárt kolóniák nehezen vizsgálhatók és izolálhatók. Erre a problémára kínál megoldást a Petri-csésze és az „anaerob” agar egy sajátos kombinációja a **Marino-lemez** (más néven Brewer-plate), ahol nagyobb lemezben tanulmányozhatjuk az anaerob baktériumok telepeit (lásd 49. GYAKORLAT) és az izolálásuk is jóval könnyebb.

49. GYAKORLAT

Anaerob baktériumok tenyésztése Marino-lemezen

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Clostridium sp.

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

talajminta, vagy tavi iszap
9 ml-es steril víz
kémcsőkeverő (vortex)
80 °C-os vízfürdő
olvasztott állapotú RMAC tápagar
pipetta, steril pipettahegyek
alufóliába burkolt steril üveg Petri-csésze
Bunsen-égő
termosztát

A vizsgálat menete

1. A mintából steril víz felhasználásával készítsünk 10-es léptékű hígítási sorozatot (lásd 25. GYAKORLAT), a kémcsöveket lássuk el a mintára és a hígítás fokára utaló jelzéssel.

2. A *Clostridium*ok kitenyésztése céljából, a minta hígításait tartalmazó kémcsöveket 10 percre helyezzük a 80 °C-os vízfürdőbe. Ezáltal az endospóra képzésére képes szervezetekre szelektálunk.

3. Az üveg Petri-csészéket steril fülke alatt csomagoljuk ki, és a fedőrészüket belső oldalára pipettázunk 100 µl-nyi mennyiséget egy-egy adott hígítási fokból. Ezt követően öntsük rá a körülbelül 45 °C-ra hűlt tápagart, és óvatosan keverjük össze azt az előzőleg odapipettázott hígított mintával.

4. Még mielőtt a táptalaj megdermedne, helyezzük rá a Petri-csésze kisebb átmérőjű alját, így egy vékony táptalajréteget képezünk a Petri-csésze fedőrése és alja között.

5. Ha a beoltott táptalaj megdermedt, a Marino-lemezeket csomagoljuk vissza az alufóliába, és 1 hétig inkubáljuk 28 °C-os hőmérsékletű termosztátban.

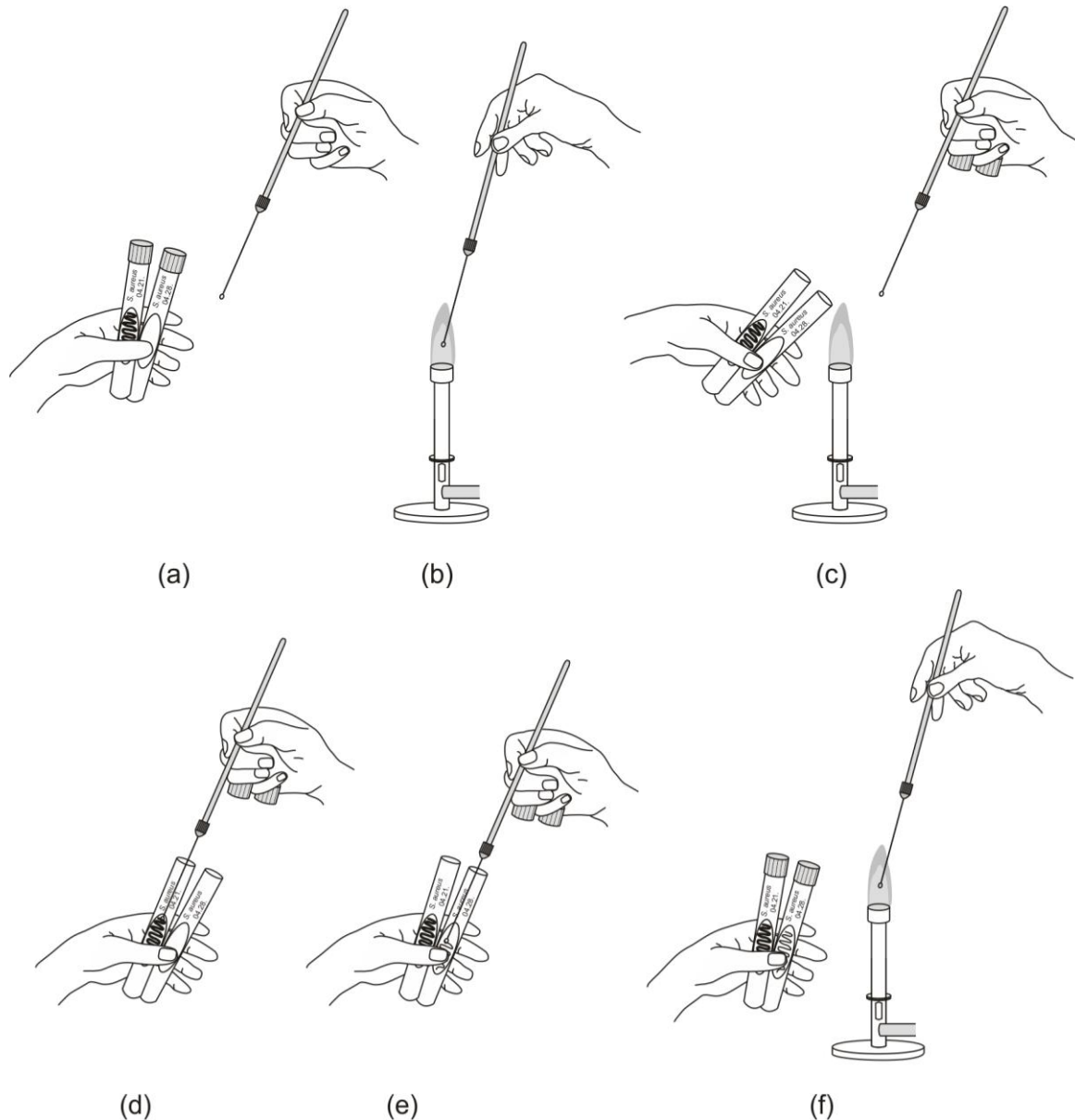
6. Az inkubációs idő elteltével a tápközeg belsejében fejlődött telepek megszámlálásával végezzünk csíraszám becslést (lásd 25. GYAKORLAT) és vizsgáljuk meg az egyes telepeket sztereomikroszkóp alatt (készítsünk telepmorfológiai feljegyzést), majd kíséreljük meg a kolóniák izolálását félfolyékony magasagarba átszúrással.

6.3.5 Tenyészetek átoltása, törzsfenntartás, törzstárolás

A törzsfenntartás célja az, hogy a mikroorganizmusokat úgy tartsuk életben, hogy tulajdonságuk az eredeti izolátuméhoz képest ne változzon. A törzsfenntartási módszerek mindegyike esetében lényeges követelmény, hogy a tárolás során a mikrobacejtek ne fertőzödjének be, minél nagyobb mértékben megőrizték életképességüket és genetikai állományuk ne változzon. A természetből újonnan izolált mikrobák, valamint a már leírt, meghatározott törzsek laboratóriumi fenntartása különböző módszerekkel (pl. átoltás, liofilizálás, fagyasztás) történhet. A megfelelő technika kiválasztása számos tényező figyelembevételével történik (pl. a fenntartás célja, tervezett ideje, a mikroorganizmus generációs ideje).

Az **átoltáson alapuló törzsfenntartás** (lásd 50. GYAKORLAT) lényege, hogy a baktériumtenyészeteket megfelelő időközönként friss steril tápközegre visszük át, "oltjuk" (37. ábra), majd inkubálást követően a megfelelően kifejlődött tenyészeteket 4-6 °C-on (hűtőszekrényben vagy hűtőszobában) tároljuk. Ezt a műveletet rendszeresen, elsősorban a törzs sajátosságaitól függő időközönként (néhány hét vagy hónap elteltével) meg kell

megismételni. A módszer hátránya, hogy gyakori átoltás során fennállhat a fertőződés veszélye, tárolás közben a tápközeg és a tenyészetek kiszáradhatnak, illetve a fellépő mutációk és a szelekció miatt megnövekszik az esélye annak, hogy a törzs az eredetihez képest egy idő után eltérő tulajdonságokkal rendelkezik. Ha azonban alacsony tárolási hőmérsékletet (5 °C) és minimál táptalajt alkalmazunk, a mikrobacejtek anyagcsereje alacsony szinten marad, így a tenyészet hosszabb ideig lesz életképes, és ezért ritkábban kell átoltani, tehát csökken az átoltással járó veszélyek lehetősége. Továbbá a tenyészetek felületére rétegzett steril ásványi olaj segítségével is csökkenthető a kiszáradás és az oxidatív stresszhatás. A mikrobák így akár évekig is életképesek maradhatnak. Átoltáskor célszerű a törzseket legalább két példányban fenntartani, arra az esetre, ha az egyik véletlenül befertőződné.



37. ábra Baktériumtenyészetek fenntartása átoltással

A megfelelő jelölésekkel ellátott kémcsöveket V alakban kézbe fogjuk (a szájak, kupakok ne érjenek össze) és kézügyibe helyezzük a leégetett oltókacsot (a). A kémcsövek kupakját egymás után levesszük másik kezünk kisujja és gyűrűs ujjja közé fogva, miközben a kémcsövek száját leégetjük (b). Leégetjük az oltókacsot (c) és az átoltásra váró tenyészetből egy kacsnyit kivéve (d) átvisszük a steril ferde táptalajra és azt ciccakkban beoltjuk (e). Figyeljünk arra, hogy az oltókacsot ne érintsük a kémcső tenyészetek üvegfalát! A kémcsövek száját újra leégetjük, majd a kémcsöveket visszazárjuk (f). A művelet befejezéseként sterilizáljuk az oltókacsot is.

50. GYAKORLAT

Baktériumtenyészetek fenntartása átolással

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Micrococcus luteus tenyészet ferde agaron
ismeretlen baktériumtörzs tenyészet ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

ferde húspepton tápagar
oltókacs
Bunsen-égő
termosztát

A vizsgálat menete

1. A steril táptalajt tartalmazó kémcsőre írjuk rá az átoltandó tenyészet azonosító jelzését és az átoltás időpontját.

2. A steril táptalajt és a tenyészetet tartalmazó kémcsövet egyszerre, közel vízszintes helyzetben fogjuk az egyik kezünkbe vagy rögzítjük az ujjaink között úgy, hogy a kémcsövekben a táptalajok legyenek az oltási felülettel felfelé, valamint a kémcsövek szája ne érjen össze.

3. A kezünkkel (óvatos forgatással) lazítsuk meg a kémcsövet lezáró dugót vagy kupakot, hogy azt ezután könnyebben el tudjuk távolítani. Vegyük a másik kezünkbe az oltókacst és tartsuk „irónfogással”.

4. Az oltókacst hevítjük fel izzásig a Bunsen-égő lángjában.

5. A csövekből ezután húzzuk ki a dugót vagy vegyük le róluk a kupakot, és azokat szorítsuk a kis-, gyűrűs- és középső ujjaink közé. Ügyeljünk arra, hogy a dugóknak vagy a kupakoknak a kémcsővel érintkező részei se egymáshoz, se máshoz ne érjenek! A dugók vagy a kupakok az átoltás alatt végig maradjanak a kezünkben.

6. A kémcsövek száját égessük le a Bunsen-égő lángjában, és a már égetéssel sterilizált oltókacst hűtsük le a steril táptalajt tartalmazó kémcsőben úgy, hogy az oltókacst hozzáérintjük a steril táptalaj széléhez.

7. Az oltókacs segítségével emeljük át a tenyészetből egy kacsnyi sejtömeget a steril táptalajt tartalmazó kémcsőbe, majd oltjuk azt cikk-cakk vonalban a ferde táptalaj felszínére. Ügyeljünk arra, hogy a fertőzött oltókaccsal ne érintsük a kémcsövek száját és belső falát!

8. Égessük le ezután ismét a kémcsövek száját, és helyezzük vissza a dugókat vagy a kupakokat.

9. Sterilizáljuk izzítással az oltókacst. Ennek során a baktériummal fertőzött oltókacst először mindig a gázláng hideg magjába helyezzük és megszáritjuk, majd a tűt a lángban egyre feljebb emelve átizzítjuk.

10. Helyezzük vissza a kémcsöveket és az oltókacst az állványba.

11. Az újonnan leoltott baktériumtörzset tartalmazó kémcsöveket rakjuk 28 °C hőmérsékletű termosztátba.

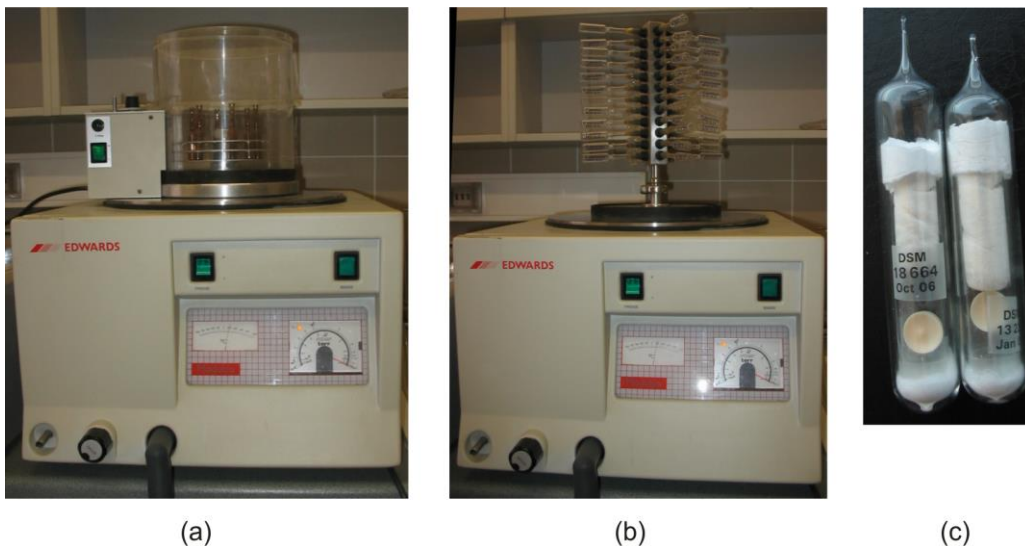
12. Az inkubációs idő elteltével ellenőrizzük a tenyészet növekedését és fertőzés mentességét, majd tárolás céljából tegyük a kifejlődött tenyészetet 4-6 °C-os hűtött helyre.

Számos módszer létezik a mikroorganizmusok, elsősorban gombák szárítva történő fenntartására. Ebben az esetben a tenyészetet steril táptalajhoz keverjük, majd szilikagélén, papírcsíkokon vagy zselatin korongokon kiszáritjuk. Ily módon a mikrobák évekig megőrzik életképességüket. A technikák közös vonása, hogy a vizet a tenyészetből elvonjuk, és a tárolási körülmények során sem engedjük meg a vízfelvételt.

Fagyasztási folyamat során a mikrobasejtek dehidratálódnak, ezáltal a víz hozzáférhetetlenné válik számukra. Nem megfelelő módon végezve a műveletet a hűtés és a felengedés is károsíthatja a mikrobasejteket. Ennek oka a vízelvonás miatt megnövekedett

koncentrációjú elektrolit oldat és a képződő jégkristályok. E hatás csökkenthető a fagyasztás és a felmelegítés szabályozásával, valamint krioprotektív anyagok hozzáadásával. Krioprotektív hatású vegyület pl. a dimetil-szulfoxid (DMSO) és a glicerin. A különböző fagyasztási technikákat az alkalmazott hőmérséklet szerint osztályozhatjuk. Általánosságban elmondható, hogy a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ feletti tárolás kevésbé hatásos. A $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő mélyfagyasztással már a legkülönbözőbb szervezetek (pl. baktériumok, gombák, vírusok) is évekig eltarthatók. Folyékony nitrogénben $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on vagy nitrogén gőzben $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on (ultrafagyasztás) még olyan szervezetek életképességét is évtizedekig sikeresen lehet megőrizni, amelyek esetében más módszer nem vezetett eredményre.

A **liofilizálás** vagy fagyasztva szárítás az egyik legrégebben alkalmazott eljárás a mikroorganizmusok tartós (akár évtizedekig tartó) életképességének megőrzésére (38. ábra). Liofilizálás során a tenyészetekből először krioprotektív anyagok (pl. tejpor, lószérum, inozitol, szacharóz, rafinóz) hozzáadásával szuszpenziót készítünk, majd ezt fagyasztjuk, és a jeget vákuumban szublimáltatjuk úgy, hogy szárítás során a szuszpenzió ne olvadjon fel. A szárítás után a tenyészeteket lezárt ampullákban tároljuk (lásd 51. GYAKORLAT).



38. ábra Laboratóriumi liofilizáló (fagyasztva szárító) berendezés és liofilizátumok

A liofilizáló berendezés ampullák előszárítására alkalmas centrifugával felszerelve (a). Utószárító feltét ampullákkal (b).
Betécsöves baktérium liofilizátumok (c).

A liofilizáló berendezések alapvető része a vákuum pumpa és a vízgőz megkötésére szolgáló rendszer (esetünkben egy hűtött falú kamra, ahová a gőz lecsapódik). A sejtszuszpenzió leggyakrabban a vákuumban bekövetkezett párolgás miatti hővesztéségtől fagy meg. Hogy a párolgáshoz minél nagyobb legyen a felület, illetve, hogy a szuszpenzió ne legyen habos a gőz távozása miatt, a mintákat előszárítás közben centrifugáljuk. A kezdeti szárítást egy második lépésben még alaposabb szárítás követi, szintén vákuumban. A másik lehetőség az, hogy a mintákat üvegcsövecskékbe tesszük, először megfagyasztjuk, és csak azután szárítjuk ki vákuum segítségével (ekkor a kezdeti centrifugálás elmarad). A minták mellé CoCl_2 kristályokat helyezünk, melyek a víz jelenlétét indikálják (pl. az üveg törése vagy repedése esetén bekövetkező vízfelvétel miatt a kék színű CoCl_2 rózsaszínűvé változik).

51. GYAKORLAT

Baktériumtenyészetek fenntartása liofilizálással

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Micrococcus luteus tenyészet ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

5%-os inozitol tápleves
oltókacs
Bunsen-égő
steril Pasteur pipetta
steril ampulla
steril vattadugó
fémcsipesz
steril géz

A vizsgálat menete

1. A baktériumot tenyészük a számára legmegfelelőbb táptalajon és hőmérsékleten a stationer fázis eléréséig, általában 18-24 óráig.

2. Feliratozzuk az ampullákat.

3. Steril Pasteur pipettával pipetázunk a ferde tenyészet tetejére 1 ml inozitol táplevest, és szuszpendáljuk a sejteket, majd csepegtessünk bele az ampullákba 0,3–0,3 ml szuszpenziót. Égessük le az ampullák száját, és helyezzünk bele lazán egy gézdugót.

4. Kapcsoljuk be a liofilizáló készülék hűtését, s ha a hőmérséklete már legalább 10 perce $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$, tegyük föl az ampullákat centrifugálni. Állítsunk be 30 perc centrifugálási időt, és indítsuk el a pörgetést. Csak ezután kapcsoljuk be a vákuumpumpát (a gázballaszt legyen teljesen nyitva), és zárjuk el a szelepet.

5. A száradási idő kb. 1 óra, utána az ampullákat tegyük föl az utószárító feltételre. A száradás végét a nyomásban bekövetkezett hirtelen csökkenés mutatja.

6. A szárítás után az ampullák nyakát vákuum alatt forrasszuk le. A gép leállításakor nyissuk ki a szelepet, majd kapcsoljuk ki a vákuumpumpát és utána a hűtést.

6.3.6 Mikrokozmosz rendszerek

A **mikrokozmosz** görög eredetű neve fordításának (kis, kicsinyített világ) megfelelően egy a természeti környezetből kiszakított jellemző minta, amelyet laboratóriumi körülmények között, a természeteshez hasonló feltételek mellett vizsgálati célra fenntartunk. A mikrobiológiai vizsgálatok során használt mikrokozmoszok általában kis kisméretű, anyagforgalmi tekintetben zárt vizsgálati rendszerek (lásd 52. GYAKORLAT). Döntőrészt bioremediációs vizsgálatok során szennyezőanyagok (xenobiotikumok) biodegradálhatóságának tanulmányozására, veszélyes vegyi anyagok lebontásának tesztelésére, valamint ökotoxikológiai tesztek kivitelezésére stb. alkalmazott a természethez képest általában egyszerűsített, mégis komplex modellrendszerek. Bennük viszonylag jól modellezhető a kérdéses környezeti állapot, megfelelően vizsgálhatók a biológiai, fizikai, valamint (bio)kémiai kölcsönhatások. Megfelelő mikrokozmoszokban tanulmányozhatók a mikrobaközösségeken belül kialakuló kölcsönhatások, a közösség szerkezet változása, valamint a közösség környezetére gyakorolt hatása. A mikrokozmosz rendszerek rendkívül változatosak térfogatukat, méretüket vagy felépítésüket (pl.: aerob, anaerob) nézve. Nem ritkák a 100 ml-es térfogatú zárt vizsgálati rendszerek, az 5-10 literes megoldások pedig már mezokozmosznak is nevezhetők. Megjegyezzük, hogy léteznek több 10 m^3 -es nyitott rendszerek is. A mikrokozmoszokban általában nem sikerül a vizsgált környezet hibátlan másolása. Azonban az elektron donorok/akceptorok, szubsztrátok eloszlása és a környezeti paraméterek megközelíthetik a természetes állapotot. Egy mikrokozmosz modellrendszer összeállítás lényegében akkor megfelelő, ha általa sikerül feltett kérdéseinket megválaszolni, koncepciókat megerősíteni, vagy akár elvetni. A mikrokozmosz vizsgálatokat minimum a rendszerre jellemző egyensúlyi állapot kialakulásáig folytatjuk. A mikrokozmoszok egyi fontos tulajdonsága, hogy evolúció folyik bennük. Erre jó példa az olyan mikrokozmosz melynek célja új anyagcsereutak kialakítása szelekciós nyomás alkalmazásával, például

pesticidok, klórozott szénhidrogének, vagy más hasonló, nehezen bontható szerves szennyező anyagok biodegradációjának megoldására.

52. GYAKORLAT

Klórozott szénhidrogénekkel szennyezett talajvíz biodegradációjának tesztelése 100 ml-es anaerob mikrokozmoszban

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

szennyezett talajvíz

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

steril 130 ml-es szorítófogóval zárható üvegek

szorítható alumínium zárókupak

steril teflon betétes gumidugók (szeptumok)

kézi szorítófogó

mérőhenger

N₂ palack

fecskendőszűrű

Hamilton-fecskendők

fecskendőtű

steril szilikoncső

1 % rezaurin indikátor

vegyifülke

szennyezőanyag pl.: TCE

gázkromatográf

alkohol

mintázó vegyszerkanál

gyufa

A vizsgálat menete

1. Az előkészített szennyezett talajvízmintából vegyifülkében mérjük 75 ml-t a 130 ml-es steril üvegekbe.

2. Vegyifülke alatt purgáljuk ki a bemért 75 ml talajvízből a szennyezőanyagot sterilre szűrt N₂ gáz 20 percen keresztül történő buborékolatásával.

3. Zárjuk le kézi szorítófogóval az üvegeket steril teflonbetétes szeptum és szorítható alumínium zárókupak felhasználásával.

4. Vegyifülke alatt, steril Hamilton-fecskendő segítségével a szeptum átszúrásával aseptikusan mérjük be a szükséges mennyiségű szennyezőanyagot a lezárt üvegekbe.

5. Körrázógépben 100 RPM-en kevertessük a mikrokozmoszokat 1 napig 18 °C-os hőmérsékleten.

6. A rázatás után 24 órát pihentessük az üvegeket 18 °C-os hőmérsékleten, majd Hamilton-fecskendő segítségével aseptikus módon vegyünk 100 µl mintát és gázkromatográf segítségével határozzuk meg a mikrokozmosz kiindulási szennyezőanyag tartalmát (Függelék 13.6.3 fejezet).

7. Ezt követően inkubáljuk a mikrokozmoszokat 30 napig 18 °C-os hőmérsékleten.

8. Az inkubáció után Hamilton-fecskendő segítségével aseptikus módon vegyünk 100 µl mintát és gázkromatográf segítségével határozzuk meg a szennyezőanyagot és bomlástermékeit (Függelék 13.6.3 fejezet).

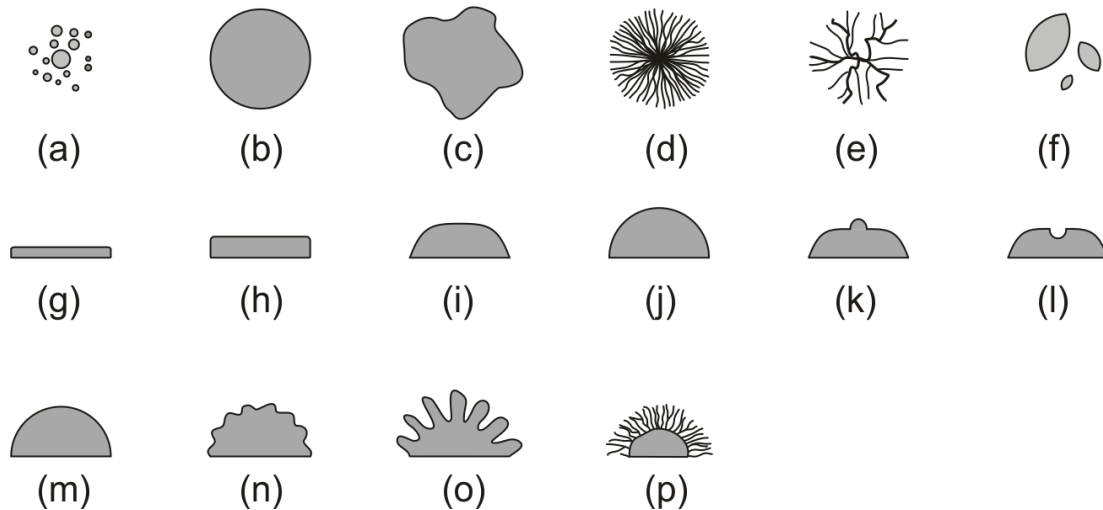
9. A kapott mérési adatokból becsüljük meg a szennyezőanyag biodegradációjának mértékét.

A mikrokozmosz rendszerekhez kapcsolódó többi gyakorlat a Xenobiotikumok lebontásának vizsgálata c. 9.5 fejezetben kerül bemutatásra.

6.4 Törzsek feno- és genotípusos jellemzése

6.4.1 Telep és sejtmorfológiai vizsgálatok, festési eljárások, morfortípus ismeret

A telep (kolónia) szilárd táptalaj felületén, vagy belsejében rendszerint egyetlen sejtől, vagy telepképző egységből fejlődő különálló sejttömeg, amelyben a sejtek száma több milliárd is lehet. A sejttömeg általában egymással kapcsolatban álló egyedi sejtekből áll, de bizonyos baktériumok, pl. *Streptomyces* spp. fonalképzők, így micéliális telepeket fejlesztenek. A baktériumtelepek meghatározott körülmények között fajra jellemző, jól leírható küllemmel bírnak (39. ábra), ezért a **telepmorfológiai megfigyeléseknek** a baktériumok meghatározásakor is jelentőségük van (lásd 53. GYAKORLAT).



39. ábra Baktérium telepmorfológiai alapok

Telepalak: (a) pontszerű, (b) nagy kör alakú, (c) szabálytalan, (d) fonálszerű, (e) rizoid, (f) orsó alakú. Telep kiemelkedés: (g) lapos, (k) lapos kiemelkedő, (i) domború, (j) párnaszerűen feldomborodó, (k) csúcsos, (l) bemélyedő. Telep szegélye: (m) ép, (n) hullámos, (o) karélyos, (p) fonalas.

53. GYAKORLAT

Telepmorfológiai megfigyelések

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

környezeti mintából származó szélesztéssel fertőzött táptagar lemez

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

nagyító
vonalzó
oltókacs
Bunsen-égő

A vizsgálat menete

1. Válasszunk ki a táptagar lemezen 5 egymástól különböző és különálló telepet. A táptalajok felszínén kifejlődött telepeket lehetőség szerint sötét háttér előtt, áteső fényben vizsgáljuk és jellemezzük azokat külön-külön az alábbi szempontok szerint (39. ábra):

telep mérete (átmérő mm-ben)
telep alakja
telep elevációja
telep szegélye
telep színe (nem vízdékony pigment)
diffúzibilis pigment jelenléte vagy hiánya a telep körül

telep felülete (fénylő, matt)
 telep denzitása (átlátszatlan, áttetsző, átlátszó)
 telep konzisztenciája (kacccsal átoltáskor kenhető, nyúlós, hártyszerű, darabokra törő)

A **baktériumok** hagyományos taxonómiai módszerekkel történő rendszerezésében a sejtalaktani jellegzetességek megfigyelése kiemelkedő fontosságú. A laboratóriumi törzsek vizsgálatakor e szervezetek azonban mindössze néhány **morfológiai** típus valamelyikébe sorolhatók (3. táblázat). A természetes élőhelyeken előforduló baktériumok behatóbb tanulmányozása során azonban kiderült, hogy ezeknek a szervezeteknek a morfológiája változatosabb, közöttük különböző alakú, méretű, csoportosulású sejtformák sokasága figyelhető meg, ami pl. a környezethez való alkalmazkodás, vagy az életciklus változásának a következménye. De tenyészetek esetén a tenyésztési körülmények, a tenyészet kora, a baktériumok élettani állapota a sejtek nagyságát és megjelenési formáját jelentősen megváltoztathatja.

A baktériumok mikrométeres (μm) nagyságrendű szervezetek. Egy átlagos pálcá alakú baktériumsejt 2-5 μm hosszú és 0,5-0,8 μm átmérőjű. A gömb alakú baktériumok átlagos sejtátmérője 0,8 μm . Néhány baktériumcsoport mérete azonban eltér az átlagostól, pl. a spirochéták között vannak nagyon vékony (0,2 μm), bár hosszú baktériumok, míg léteznek az átlagos baktérium sejtmérethez képest óriási baktériumok is, mint a *Thiomargarita namibiensis* (0,1-0,3 x 0,75 mm) és az *Epulopiscium fishelsoni* (50 μm x 600 μm).

3. táblázat A baktériumok leggyakoribb sejtmorfológiai típusai

Sejtmorfológiai típus		Mikroorganizmus
<i>Szabályos alakú baktériumok</i>		
gömb (kokkusz)		
mikrokokkusz	a sejtek osztódás után egyesével szétválnak	<i>Micrococcus luteus</i>
diplokokkusz	osztódás után a sejtek párosával együtt maradnak	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
sztreptokokkusz	a sejtek egy síkban osztódva láncszerű szerkezetet hoznak létre	<i>Streptococcus lactis</i>
sztafilokokkusz	a sejtek szabálytalan irányokban osztódva nagyobb sejtaggregátumok formájában, szőlőfürtszerűen maradnak együtt	<i>Staphylococcus aureus</i>
tetragenusz	a sejtek a tér két irányában osztódnak és négyesével kapcsolódnak össze	<i>Planococcus</i> sp.
szarcina	a sejtek a tér három irányában osztódva nyolcasával képeznek aggregátumokat	<i>Sarcina lutea</i>
pálcika (bacillusz)		
méretük és alakjuk is rendkívül változatos		
	hosszú és széles	<i>Bacillus megaterium</i>
	rövid és vékony	<i>Pseudomonas</i> sp.
	kokkoidális	<i>Haemophilus influenzae</i>
görbült pálcika		
vibrio	a sejt negyed vagy fél csavarulatot képez	<i>Vibrio cholerae</i>
spirillum	merev sejtfallal rendelkező, 1 vagy több csavarulatot képező szabályos sejtalak	<i>Spirillum volutans</i>
fonalas		
	elágazó sejteket, átmérőjüket tekintve bakteriális hifafonalakat, illetve ezek szövedékét, micéliumot létrehozó szervezetek	<i>Streptomyces</i> sp. <i>Nocardia</i> sp.

<i>Szabálytalan alakú baktériumok</i>		
	bunkós végű, szabálytalan sejtalak nyeles pálcika alak	<i>Corynebacterium</i> sp. <i>Caulobacter</i> sp.
spirohéta	a sejteknek nincs merev sejtfaluk, belső flagellum körül mozgó, 1 vagy több csavarulatos sejtalak	<i>Treponema pallidum</i>

Mikroorganizmusok sejtmorfológiájának vizsgálatára, a sejten belüli alkotórészek, illetve bizonyos szerkezeti sajátosságok tanulmányozására leggyakrabban rögzített, festett preparátumokat használunk (lásd 54. GYAKORLAT).

A baktériumok festéséhez kémiai jellegük alapján bázikus, savas, vagy neutrális festékeket használunk. A bázikusak színes részükben pozitív töltésűek, s mivel általában válogatás nélkül kötődnek a sejtek (neutrálisához közeli pH értékeken negatív töltésfelesleggel rendelkező) fehérjéihez és nukleinsavaihoz, a baktériumsejtek egyenletes festődését eredményezik (pozitív festékek). Ilyenek pl. a vörös színű safranin, a lilás színű kristályibolya, a kék színű metilénkék és a zöld színű malachitzöld. A savasak színes részükben (kromofór csoport) negatív töltésűek, ezért ezeket a sejt (mivel az is negatív) nagyrészt elutasítja. Ennek következtében a sejt vagy festetlen marad, vagy csak igen gyengén festődik, a háttér azonban színes maradhat (negatív festékek). Ilyen pl. az Eozin Y. De negatív festődést ad a kolloidális mérete miatt a sejtbe nem diffundáló fekete színű India tus, illetve a nigrozin. A neutrális festékek, mivel töltésfelesleggel nem rendelkeznek vízben nem, csak zsíroldószerekben oldódnak, és elsősorban a sejten belüli hidrofób zsírzárványok specifikus kimutatására alkalmasak. Ilyen pl. a szudán-III.

A pozitív festést készíthetjük egyféle festékkel (**egyszerű festés**), vagy használhatunk többféle festéket (összetett festés). Összetett festés esetén az elsőt alapfestésnek, a másodikat kiegészítő (kontraszt) festésnek nevezzük.

A festési folyamatokra épülő mikroszkópos vizsgálatok a következő lépésekből állnak: tárgylemez zsírtalanítása, feliratozása, kenetkészítés, rögzítés (esetenként elmaradhat), festés (összetett festési eljárás során kiegészítő festés is), csapvízes öblítés, szárítás, mikroszkopizálás.

54. GYAKORLAT

Egyszerű festés

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Staphylococcus aureus 24-48 órás tenyésztete ferde agaron

Pseudomonas aeruginosa 24-48 órás tenyésztete ferde agaron

Bacillus cereus 24-48 órás tenyésztete ferde agaron

ismeretlen baktériumtörzs 24-48 órás tenyésztete ferde agaron

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

tárgylemez

96%-os etilalkohol

szemcseppentő

oltókacs

Bunsen-égő

kémcsőfogó facsipesz

kristályibolya festékoldat

safranin festékoldat

metilénkék festékoldat

fénymikroszkóp

immerziós olaj

benzin
papírvatta

A vizsgálat menete

1. Kémcsőfogó facsipesz segítségével rögzített tárgylemezt a Bunsen-égő lángjának forró részén néhányszori áthúzással zsírtalanítjuk (tárgylemez zsírtalanítása).

2. A megfelelő hőmérsékletre lehűlt zsírtalanított tárgylemez egyik végére írjuk rá a vizsgált mikroorganizmus jelzését (feliratozás).

3. Szemcseppentővel cseppentsünk egy csepp vizet a zsírtalanított tárgylemez felületére. Sterilizált oltókaccsal (lásd 3. ábra) emeljük ki a kémcsőből kevés baktériumtenyészetet (az oltás valamennyi szabályát figyelembe véve), és készítünk a tárgylemez felületén levő vízcseppben híg szuszpenziót. A szuszpenziót az oltókacs segítségével húzzuk szét filmmé a tárgylemez kb. 2/3-án, és hagyjuk megszáradni (kenetkészítés).

4. Hővel történő rögzítés során a beszárított preparátumot tartalmazó tárgylemezt 4-5-ször húzzuk át a Bunsen-égő lángjában. A rögzítés a sejtek helyhez kötését és lemosódás elleni védelmét szolgálja, de egyben a baktériumsejtek egy részét el is elpusztítja.

5. A rögzített kenetre cseppentsünk annyi bázikus festékoldatot, hogy azt teljesen elfedje, és hagyjuk így állni kb. 1-2 percig (festés).

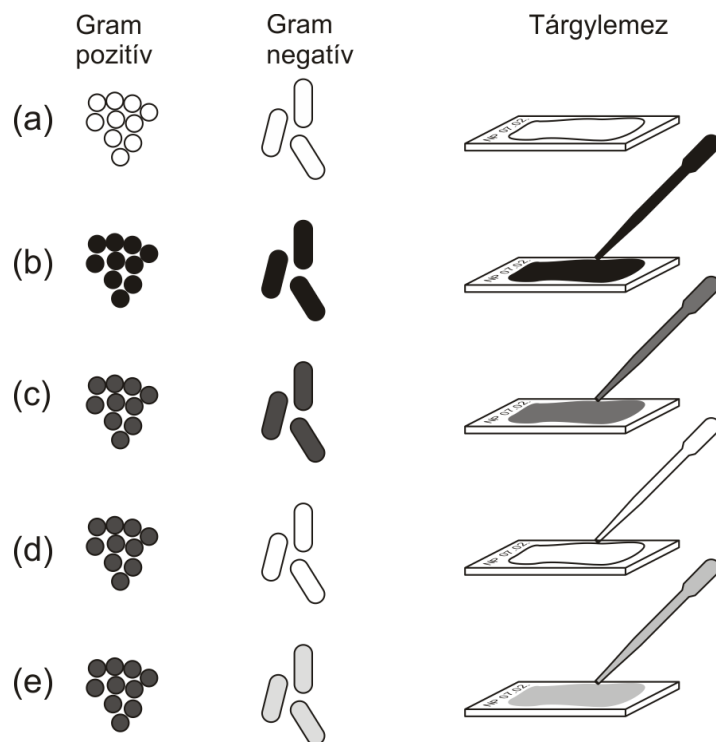
6. A festést követően végezzünk csapvizetes öblítést, ami a felesleges és a vizsgálódást zavaró festék eltávolítására szolgál. Ezt a műveletet addig folytassuk, amíg a preparátumról lecsepegő folyadék szintelen nem lesz.

7. A festett preparátumot tartalmazó tárgylemezt ezután hagyjuk szabad levegőn megszáradni.

8. A festett preparátum mikroszkópos vizsgálata során a kenetet először 40 x-es nagyítású objektívvel ellenőrizzük, majd vizsgáljuk meg a mintát 100 x-os nagyítású immerziós lencsével immerziós olaj alkalmazásával. Megfigyeléseinkről készítsünk rajzot és rögzítsük jegyzőkönyvben.

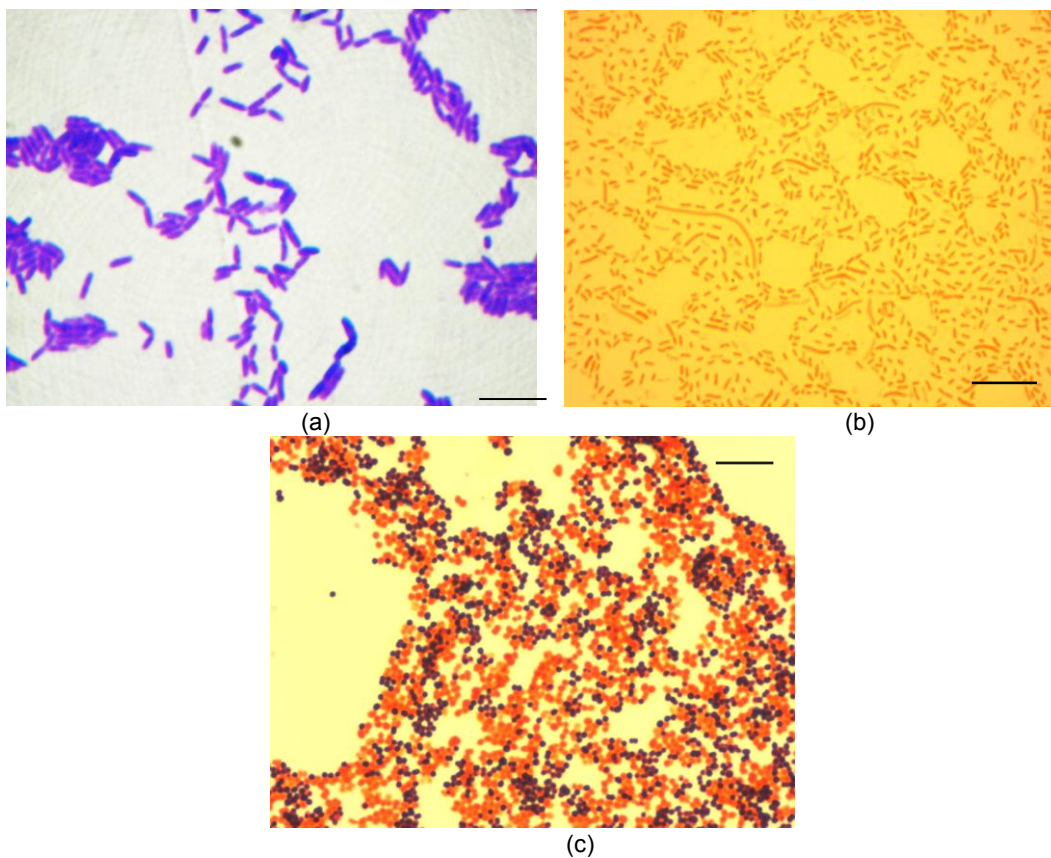
9. A mikroszkópos megfigyelések befejezése után tisztítsuk meg az objektív frontlencséjét benzines papírvattával. Alkoholot ne használjunk erre a célra, mert a lencsék ragasztását az alkohol károsíthatja.

A baktériumok faji szintű azonosításában ma is alapvető összetett differenciáló festést Christian Gram dán tudós dolgozta ki 1884-ben. A festési eljárás a baktériumok sejtfal szerkezetének durva tipizálására alkalmas (lásd 55. GYAKORLAT). A **Gram-festés** lényege, hogy bizonyos baktériumfajok sejtje, illetve sejtfala a jód-pararozanilin festéket (kristályibolya-jód komplex) erősen megköti, más fajok sejtjeiből, sejtfalából viszont a festék 96%-os alkohollal kimosható. Az előbbi csoportot (sötétlila színű) Gram-pozitív, az utóbbiakat (szintelen, illetve a kontrasztfestést mutató) Gram-negatív baktériumoknak nevezzük. A festést mindig exponenciális fázisban szaporodó (16-24 órás) tenyészetekkel végezzük, mert az idősödő Gram-pozitív sejtekből a festék komplex a tömény alkoholos kezelés hatására könnyebben eltávolítható, így ezek tévesen Gram-negatív elszíneződést mutathatnak (40. ábra és 41. ábra).



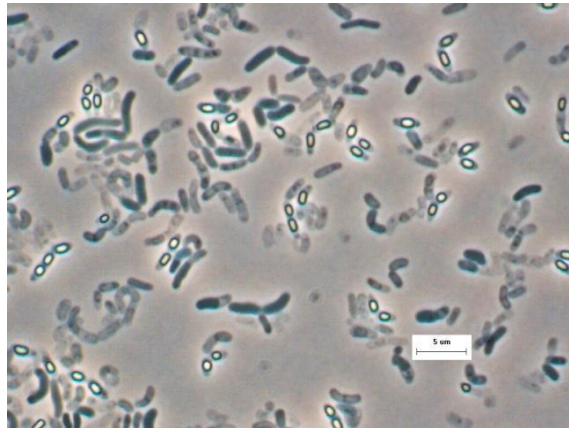
40. ábra A Gram festés lépései

Rögzített kenetet készítünk zsírtalanított tárgylemezen (a). Kristályibolya oldattal festjük (b), majd Gram-féle jód oldattal kezeljük (c). Etanollal víztelenítünk (d). Szafranin festékoldattal kontrasztfestést végzünk (e).



41. ábra Gram festett baktériumtenyészetek mikroszkópos képe (Fotó: Tóth E.)

Bacillus sp. Gram-pozitív sejtjei (a). *Sphingobacterium* sp. Gram-negatív sejtjei (b).
Salinococcus sp. Gram variábilis sejtjei (c). Méretvonal: 10 µm.



42. ábra *Bacillus aurantiacus* sejtek Gram festett fénymikroszkópos képe (Fotó: Borsodi A.)

A fénytörő ovális képletek érett endospórák. Méretvonal: 5 μm .

55. GYAKORLAT

Gram-festés

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Bacillus cereus var. *mycoides* 16-24 órás tenyésztete ferde agaron

Escherichia coli 16-24 órás tenyésztete ferde agaron

Pseudomonas aeruginosa 16-24 órás tenyésztete ferde agaron

Staphylococcus aureus 16-24 órás tenyésztete ferde agaron

ismeretlen baktériumtörzs 16-24 órás tenyésztete ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

tárgylemez

96%-os etanol

szemcseppentő

oltókacs

Bunsen-égő

kémcsőfogó facsipesz

kristályibolya festékoldat

Gram-féle jóddoldat

szafranin festékoldat

fénymikroszkóp

immerziós olaj

benzin

papírvatta

A vizsgálat menete

1. Tárgylemez zsírtalanítása (lásd 54. GYAKORLAT).
2. Feliratozás.
3. Kenetkészítés.
4. Rögzítés.
5. Festés kristályibolya festékoldattal (1 perc).
6. Öblítés csapvízzel.
7. Kezelés Gram-féle jóddoldattal (1 perc).
8. Öblítés csapvízzel.
9. Színtelenítés 96%-os etanollal. (A kenetet szemcseppentő segítségével mindaddig kezeljük alkohollal, amíg a tárgylemezről lecseppenő alkohol szintelen nem lesz.)
10. Öblítés csapvízzel.

11. Kontrasztfestés szafranin festékoldattal (0,5-1 perc).
12. Öblítés csapvízzel.
13. Szárítás.
14. Mikroszkópos értékelés. A Gram-pozitív sejtek kékes-lila, a Gram-negatív sejtek rózsaszínes-piros színűek. Rajzoljuk le a mikroszkópos képet méretarányosan és a festődésnek megfelelő színnel.

A **Ziehl-Neelsen-féle saválló festés** diagnosztikai jelentőségű, összetett, differenciáló festési eljárás, ami az ún. "saválló" mikroorganizmusok elkülönítését teszi lehetővé (lásd 56. GYAKORLAT). Savállóak pl. a *Mycobacteriaceae* és a *Nocardiaceae* családba sorolt baktériumfajok, amelyek között számos emberre és állatra patogén szervezetet találhatunk. A lipidekben és viaszanyagokban gazdag sejtfalszerkezettel rendelkező saválló baktériumok a szokásos festési módszerekkel csak nehezen festődnek, azonban karbolsav (fenol) és melegítés hatására a fukszin erősen megkötik, és megfestődésük után belőlük a festék még sósavas alkohollal sem mosható ki.

56. GYAKORLAT

Ziehl-Neelsen-féle saválló festés

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Rhodococcus rhodochrous 24-48 órás tenyésztete ferde agaron

Mycobacterium phlei 24-48 órás tenyésztete ferde agaron

ismeretlen baktériumtörzs 24-48 órás tenyésztete ferde agaron

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

tárgylemez
 96%-os etanol
 szemcseppentő
 oltókacs
 Bunsen-égő
 kémcsőfogó facsipesz
 karbolsav fukszin festékoldat
 savas etanol
 metilénkék festékoldat
 szűrőpapírdarab (2 x 4 cm)
 fénymikroszkóp
 immerziós olaj
 benzin
 papírvatta

A vizsgálat menete

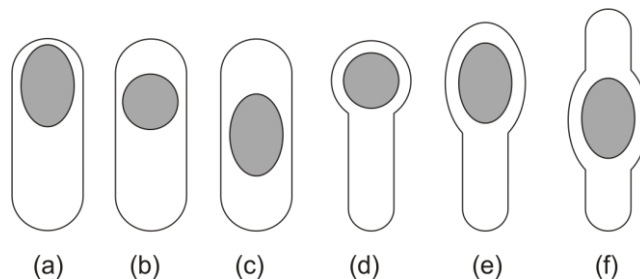
1. Tárgylemez zsírtalanítása (lásd 54. GYAKORLAT).
2. Feliratozás.
3. Kenetkészítés.
4. Rögzítés.
5. Az agresszív festés során helyezünk a hővel fixált készítményre a kenetet lefedő szűrőpapír-darabkát, és fedjük be karbolsav fukszin festékoldattal úgy, hogy az a preparátumot teljesen elborítsa. A facsipeszbe fogott tárgylemezt a Bunsen-égő segítségével melegítjük annyira, hogy a preparátumot lefedő festékoldat éppen csak gőzölgjön. Az elpárolgott festéket pótoljuk folyamatosan. Ezt a műveletet folytassuk 10 percig.
6. Öblítés csapvízzel.
7. Mosás savas etanollal. (A kenetet szemcseppentő segítségével mindaddig kezeljük, amíg a tárgylemezről lecseppenő alkohol szintelen nem lesz.)

8. Öblítés csapvízzel.
9. Kontrasztfestés metilénkék festékoldattal (1 perc).
10. Öblítés csapvízzel.
11. Szárítás.

12. Mikroszkópos értékelés. A saválló baktériumok lilás-vörösre, a nem saválló sejtek kékre festődnek. Rajzoljuk le a mikroszkópos képet méretarányosan és a festődésnek megfelelő színnel.

A *Clostridium* és a *Bacillus* nemzetségbe tartozó baktériumfajok sejtjei kedvezőtlen környezeti feltételek mellett igen ellenálló intracelluláris képletet, endospórát képeznek (42. ábra). Az endospóra környezeti hatásokkal (pl. hővel, kémiai szerekkel, UV-sugárzással) szembeni rezisztenciája bonyolult, réteges szerkezetének és speciális alkotóelemek jelenlétének (pl. Ca-dipikolinát tartalom) a következménye. De más bakteriális spórák (pl. artrospóra), vagy gombaspórák (pl. askospóra) is ellenállást mutatnak környezeti hatásoknak.

Az endospórások más spórafestési módszerekkel nem festődik meg, ezért a festékoldat (malachitzöld) bejuttatását erőteljes hőhatás segítségével (agresszív festési eljárással) végezzük. A **Schaeffer-Fulton-féle spórafestés** (lásd 57. GYAKORLAT) összetett szerkezeti festés, melynek során az endospórák zöldre, a vegetatív sejtek pirosra színeződnek. Az endospóra alakja (kerek, ovális), sejten belüli elhelyezkedése (centrális, szubterminális, terminális) és a sejthez viszonyított mérete (deformáló, nem deformáló) az adott baktériumfajra jellemző sajátosság (43. ábra és 44. ábra).



43. ábra Endospóra morfológiai típusok

Az endospóra elhelyezkedése az anyasejtben: terminális (a, d, e), szubterminális (b) és centrális (c, f). Spóრაalak: kerek (b, d), ellipszoid (a, c, e, f). Az endospóra átmérőjének az anyasejthez viszonyított mérete: nem deformáló (a, b, c), deformáló (d, e, f).



44. ábra Egy centrális, ellipszoid alakú endospórát tartalmazó *Bacillus alkalisediminis* sejt elektronmikroszkópos képe (Fotó: Kovács A.)

Méretvonal: 1 μm .

57. GYAKORLAT

Schaeffer-Fulton-féle spórafestés

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Bacillus cereus var. *mycoides* 72 órás tenyésze ferde agaron

Saccharomyces cerevisiae 1 hetes tenyésze ferde agaron

ismeretlen baktériumtörzs 72 órás tenyésze ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

tárgylemez

96%-os etanol

szemcseppentő

oltókacs

Bunsen-égő

kémcsőfogó facsipesz

malachitzöld festékoldat

szafranin festékoldat

szűrőpapídarab (2 x 4 cm)

fénymikroszkóp

immerziós olaj

benzin

papírvatta

A vizsgálat menete

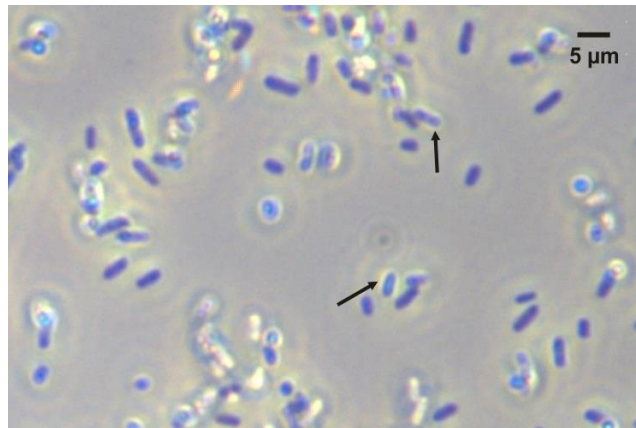
1. Tárgylemez zsírtalanítása (lásd 54. GYAKORLAT).
2. Kenetkészítés.
3. Rögzítés.
4. Agresszív festés malachitzöld festékoldattal (10 perc) (lásd 56. GYAKORLAT).
5. Öblítés csapvízzel.
6. Kontrasztfestés szafranin festékoldattal (1 perc).
7. Öblítés csapvízzel.
8. Szárítás.
9. Mikroszkópos megfigyelés. A festett preparátumokban a spórák zöldre, a vegetatív sejtek pirosra színeződnek. Rajzoljuk le a mikroszkópos képet méretarányosan és a festődésnek megfelelő színnel (45. ábra).



45. ábra Schaeffer-Fulton spóra festett élesztősejtek mikroszkópos képe (Fotó: Vajna B.)

A *Saccharomyces cerevisiae* spórák zöld, ovális képletek, míg a sejtek vörösén festődnek. Méretvonal: 10 μm .

Számos baktérium a sejtfalon kívül jól kimutatható nyálkás, viszkózus anyagot, **tokot (glikokalix, kapszula)** képez (46. ábra). A tok az általa körülvevett baktériumsejtnak számos külső behatás (pl. kiszáradás, protozoonok, baktriofágok) ellen képes védelmet nyújtani. Esetenként tartalék tápanyagraktárnak is tekinthető, továbbá hozzájárul a baktérium által kiválasztott "emésztőenzimek" koncentráálásához, és lehetővé teszi a sejtek specifikus és nem specifikus rögzülését különböző felületekhez. A patogén baktériumok számára a tok kiváló védelmet biztosít a gazdaszervezet ellenanyagai és a fagociták támadásával szemben.



46. ábra *Azotobacter* sp. tok kimutatása Leifson-féle festéssel (Fotó: Vajna B.)

Nyilak mutatnak a festődött sejtek körül látható világos „tok udvarra”.

A tok felépítésében többnyire poliszacharidok, uronsavak, ritkábban fehérjék vesznek részt. A tok mérete és állaga (kompakt vagy nyálkás) fajok, sőt törzsek szerint változhat. A tok képződésére a baktérium tenyésztési körülményei (pl. táptalaj összetétele) is jelentős befolyást gyakorolnak. Mivel a tok rendszerint a szokásos festési eljárásokkal nem festhető, kimutatására leggyakrabban negatív festési technikát (háttérfestést) alkalmaznak (lásd 58. GYAKORLAT). A kolloid tusfesték szemcséi nem hatolnak be a tokba, így az a sötét háttérben az erősebben fénytörő sejttel együtt látszik (46. ábra).

58. GYAKORLAT

Leifson-féle tokfestés

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Rhizobium sp. 48 órás tenyésztete ferde agaron
Azotobacter vinelandii 48 órás tenyésztete ferde agaron
Enterobacter aerogenes 48 órás tenyésztete ferde agaron
 ismeretlen baktériumtörzs 48 órás tenyésztete ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

tárgylemez
 96%-os etanol
 szemcseppentő
 oltókacs
 Bunsen-égő
 kémcsőfogó facsipesz
 Indiai tus
 fénymikroszkóp
 immerziós olaj
 benzin
 papírvatta

A vizsgálat menete

1. Tárgylemez zsírtalanítása (lásd 54. GYAKORLAT).
2. Feliratozás.
3. Kenetkészítés. Szemcseppentővel vigyünk egy cseppnyi vizet a zsírtalanított tárgylemez felületére. Sterilizált oltókaccsal (lásd 3. ábra) az oltás valamennyi szabályát figyelembe véve emeljük ki a kémcsőből kevés baktériumtenyészetet, és készítünk a tárgylemez felületén levő vízcseppben híg szuszpenziót, majd keverjük hozzá Indiai tust. A tussal összekevert szuszpenziót az oltókacs segítségével húzzuk szét filmmé a tárgylemez kb. 2/3-án.
4. Szárítás.
5. Mikroszkópos kiértékelés. A baktériumsejtek körüli tok világos udvarként látszik a sötét hátérben. Rajzoljuk le a mikroszkópos képet méretarányosan és a festődésnek megfelelő színnel.

A Szudán-fekete festékoldat (neutrális festék) a sejtekben lévő hidrofób komponensek (pl. **lipidek**) kimutatására alkalmas (lásd 59. GYAKORLAT). A poli- β -hidroxivajsav (PHB) szemcsék számos baktérium sejtjében megtalálható, sejten belüli tartaléktápanyagok. Fénymikroszkópos vizsgálat során Szudán-fekete festéssel a **poli- β -hidroxivajsav szemcsék** feketére festődve kimutathatóvá válnak.

59. GYAKORLAT

Poli- β -hidroxivajsav szemcsék kimutatása

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Bacillus megaterium 48 órás tenyésze ferde agaron

Pseudomonas sp. 48 órás tenyésze ferde agaron

ismeretlen baktériumtörzs 48 órás tenyésze ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

tárgylemez

96%-os etanol

szemcseppentő

oltókacs

Bunsen-égő

kémcsőfogó facsipesz

éter

Szudán-fekete-B festékoldat

szafranin festékoldat

xilol

fénymikroszkóp

immerziós olaj

benzin

papírvatta

A vizsgálat menete

1. Tárgylemez zsírtalanítása (lásd 54. GYAKORLAT).
2. Kenetkészítés.
3. Feliratozás.
4. Rögzítés.
5. Fessük a preparátumot Szudán-fekete-B festékoldattal 5 percig.
6. Itassuk le a felesleges festéket, és hagyjuk beszáradni a kenetet.
7. Csepegtessünk xilolt a preparátumra, hogy a felesleges festék eltávozzon.
8. Szárítás.

9. Kontrasztfestés szafranin oldattal 10 másodpercig.

10. Öblítés csapvízzel.

11. Szárítás.

12. Mikroszkópos értékelés. A baktériumsejtekben fekete szemcsék jelzik a felhalmozódott poli- β -hidroxi-vajsavat. Rajzoljuk le a mikroszkópos képet méretarányosan és a festődésnek megfelelő színnel.

A **Neisser-féle festés** a baktériumok polifoszfát szemcséinek kimutatására szolgáló összetett, szerkezeti festés (lásd 60. GYAKORLAT). A polifoszfát (vagy volutin) szemcsék, mint tartaléktápanyagok elsősorban foszfát tartalékot jelentenek a baktériumok számára a nukleinsavak és foszfolipidek szintéziséhez. De néhány mikroorganizmus képes a polifoszfát szemcsékből ATP (vagyis energia) előállításra is.

A polifoszfátok savanyú jellegűek, ezért bázikus festékekkel erősen festődnek. Fénymikroszkópos vizsgálatkor a Neisser-féle festés révén a sejtek sárgásbarna, a polifoszfát szemcsék élénkpiros színnel jelennek meg.

60. GYAKORLAT

Neisser-féle festés polifoszfát szemcsék kimutatására

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Corynebacterium sp. 48 órás tenyésze ferde agaron

ismeretlen baktériumtörzs 48 órás tenyésze ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

tárgylemez

96%-os etanol

szemcseppentő

oltókacs

Bunsen-égő

kémcsőfogó facsipesz

Neisser-festékelegy

kriozidin festékoldat

fénymikroszkóp

immerziós olaj

benzin

papírvatta

A vizsgálat menete

1. Tárgylemez zsírtalanítása (lásd 54. GYAKORLAT).

2. Feliratozás.

3. Kenetkészítés.

4. Rögzítés.

5. Fessük a kenetet 30 másodpercig frissen készített Neisser-festékeleggyel.

6. Öblítés csapvízzel.

7. Fessük a preparátumot 1 percig kriozidin oldattal.

8. Öblítés csapvízzel.

9. Szárítás.

10. Mikroszkópos értékelés. Rajzoljuk le a mikroszkópos képet méretarányosan és a festődésnek megfelelő színnel.

Az aktív mozgásra képes baktériumfajok legtöbbje finom (12-18 nm átmérőjű), a sejt hosszát többszörösen meghaladó képletekkel, csillókkal (flagellum) rendelkeznek. Számos pálcika alakú baktériumfajnak vannak csillói, a kokkus alakú fajokon azonban flagellum

csak ritkán fordul elő. A csillók elhelyezkedési módja és száma (mono-, lofo-, amfi-, lofoamfi-, peritrich) az adott mikroorganizmusra jellemző.

Natív állapotban a csilló közvetlen fénymikroszkópos megfigyelésére nincs lehetőségünk, mivel a flagellum átmérője a fénymikroszkóp optikai feloldóképességének határa alá esik, csak csillókötegbe rendeződött csillókat pillanthatunk meg fáziskontraszt mikroszkópos vizsgálatok során. A **baktériumok csillói** (pl. Ryu-festékkoldattal történő) speciális festési eljárást követően fénymikroszkópban, vagy (pl. negatív festéssel) elektronmikroszkóppal figyelhetők meg (lásd 61. GYAKORLAT).

61. GYAKORLAT

Csillófestés Ryu-festékkoldattal

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Pseudomonas aeruginosa 16-24 órás tenyészet ferde agaron

Proteus vulgaris 16-24 órás tenyészet ferde agaron

ismeretlen baktériumtörzs 16-24 órás tenyészet ferde agaron

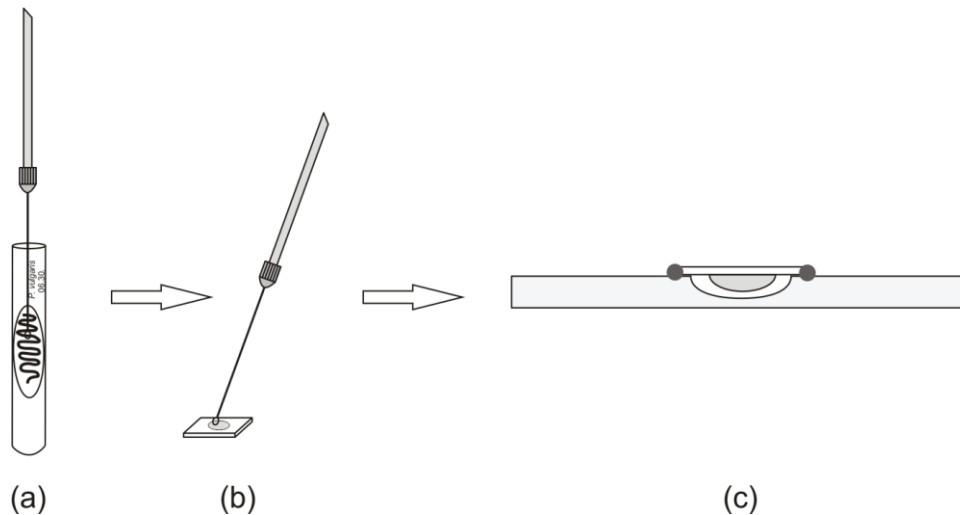
A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

tárgylemez
96%-os etanol
szemcseppentő
oltókacs
Bunsen-égő
kémcsőfogó facsipesz
Ryu-festékkoldat
pipetta, steril pipettahegyek
fedőlemez
fénymikroszkóp
immerziós olaj
benzin
papírvatta

A vizsgálat menete

1. Tárgylemez zsírtalanítása (lásd 54. GYAKORLAT).
2. Feliratozás.
3. Steril oltókacs segítségével óvatosan mossuk bele a baktériumtenyészet széléről származó sejteket a zsírtalanított tárgylemezre cseppentett steril desztillált vízbe.
4. Fedőlemezrel óvatosan fedjük le a baktérium szuszpenziót.
5. 5-10 perc elteltével, pipetta segítségével juttassunk 1-2 cseppnyi Ryu festékkoldatot a fedőlemez alatti folyadékba, a kapillaritást kihasználva.
6. Újabb 5-10 perc várakozás után végezzünk mikroszkópos megfigyelést. Ennek során keressünk olyan látóteret, ahol a baktériumsejtek és csillóik lilás színnel festődve láthatók. Rajzoljuk le a mikroszkópos képet méretarányosan és a festődésnek megfelelő színnel.

Élő baktériumsejtek **mozásképességének** közvetlen fénymikroszkópos megfigyelésére **függőcsepp preparátumot** (47. ábra) készíthetünk (lásd 62. GYAKORLAT). A csillóval nem rendelkező baktériumok csak Brown-féle mozgást mutatnak, a peritrich csillójúak rendszerint lassabban haladnak, míg a poláris csillójúak sebes, cikázó mozgást végeznek.



47. ábra Függőcsepp preparátum készítése

Baktériumtenyészetből híg szuszpenziót készítünk egy cseppnyi vízben egy fedőlemezen (a). A fedőlemezt vájt tárgylemezre fordítjuk (b) és vazelines paraffinnal rögzítjük a tárgylemezre (c) a mikroszkópizálás előtt.

62. GYAKORLAT

Mozgásképeség vizsgálata függőcsepp preparátum segítségével

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Pseudomonas aeruginosa 16-24 órás tenyésze ferde agaron

Proteus vulgaris 16-24 órás tenyésze ferde agaron

Staphylococcus aureus 16-24 órás tenyésze ferde agaron

ismeretlen baktériumtörzs 16-24 órás tenyésze ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

vájt tárgylemez
 fedőlemez
 oltókacs
 Bunsen-égő
 pipetta, steril pipettahegyek
 fénymikroszkóp
 immerziós olaj
 benzin
 papírvatta
 vazpar

A vizsgálat menete

1. Készítsünk híg szuszpenziót a vizsgálandó baktériumtenyészetből egy fedőlemez közepén kis csepp vízben, vigyázva arra, hogy a csepp ne folyjon szét.
2. A cseppet fedjük le egy vájt tárgylemezzel úgy, hogy az ne érintse a cseppet.
3. Egyszerre hirtelen mozdulattal fordítsuk meg a két lemezt, ekkor a folyadékcsepp a fedőlemezen függ a tárgylemez vájata felett (47. ábra).
4. A preparátum beszáradását megakadályozhatjuk, ha a fedőlemezt a szélén vazparral a tárgylemezhez rögzítjük.
5. Végezzünk fénymikroszkópos megfigyelést, és következtessünk a csillózat típusára.

A csillóval rendelkező baktériumok **mozgásképeségének** közvetett megfigyelésére rutin vizsgálatokban félszilárd vagy lágy agart (0,3 % agartartalom) használhatunk, melyben **szűrt tenyészetet** hozunk létre (lásd 63. GYAKORLAT). Ilyen tápközegben a baktériumok passzív mozgása gátolt, így a csillóval nem rendelkezők csak az oltási vonal mentén nőnek,

míg az aktív mozgásra képes mikroorganizmusok a táptalajban szénforrás igényük kielégítésére szétterjednek és a táptalaj zavarosodását idézik elő.

63. GYAKORLAT

Mozgásképeség vizsgálata szűrt tenyészet segítségével

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Proteus vulgaris 24 órás tenyésze tápagaron

Staphylococcus aureus 24 órás tenyésze tápagaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

félszilárd magas húspepton agar

oltókacs

Bunsen-égő

A vizsgálat menete

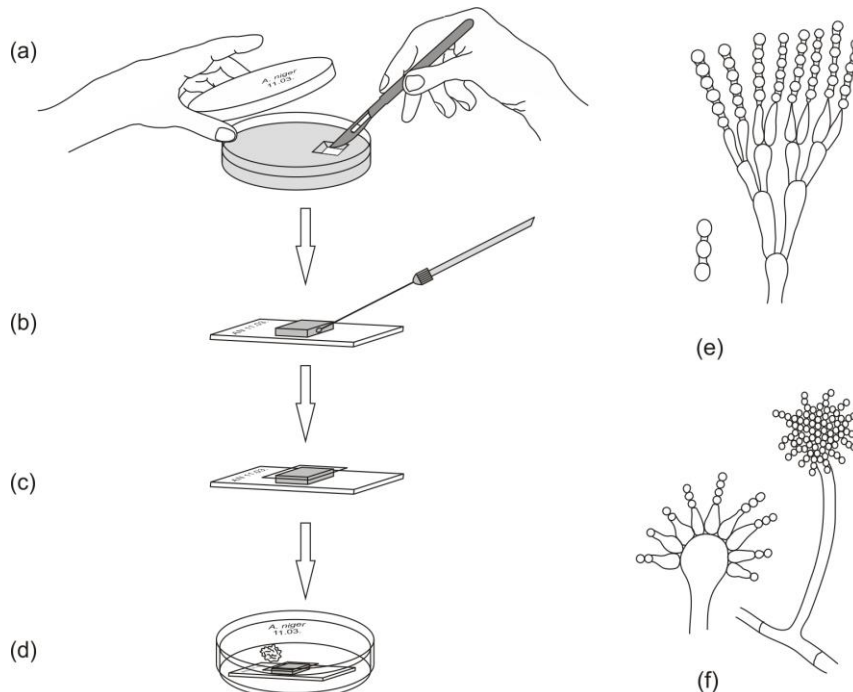
1. A steril táptalajt tartalmazó kémcsövekre írjuk rá a vizsgálatba vont tenyészet azonosító jelzését és az átoltás időpontját.

2. A baktériumtenyészet kacsnyi mennyiségét szűrővel (kb. 4 cm mélyen) oltjuk a kémcsőben lévő tápközeg belsejébe.

3. A beoltott kémcsöveket helyezük 28 °C-os termosztátba és inkubáljuk 1 hétig.

4. Az inkubációs idő elteltével a szaporodás diffúz vagy lokalizált jellegét értékeljük. A csillóval mozgó baktériumok diffúz növekedési zónát hoznak létre a szűrő mentén, a csillóval nem rendelkezők csak a szűrő vonala mentén növekednek.

A mikroszkópikus gombák és aktinobaktériumok mikromorfológiájának tanulmányozására **paránytenyészetek** (tárgylemez-tenyészetek) **készítésével** és közvetlen mikroszkópos vizsgálatával nyílik lehetőségünk (lásd 64. GYAKORLAT).



48. ábra Paránytenyészet készítése

Megfelelő összetételű lemeztápagarból steril szikével táptalaj tömböt vágunk ki és steril tárgylemezre helyezük (a). A tápagartömböt szegélyén oltjuk a vizsgálni kívánt mikroba tenyészetével (b). A beoltott tápagartömböt steril fedőlemezzel fedjük, majd a paránytenyészetet steril Petri-csészébe helyezük (c). A tenyésztéshez a megfelelő páratartalmat steril megnedvesített vattagombóccal biztosítjuk (d). *Penicillium* sp. (e), ill. *Aspergillus* sp. (f) konidiumtartójának és konidiumainak vázlatos képe.

A penészek néven összefoglalt, fonalas gombák közös jellemzője, hogy tenyészetük fonalakkból (hifák) álló szövedék (micélium), amely részben a tápoldatba, vagy táptalajba merül, részben annak felületét borítja (szubsztrát- és légmicélium). Az *Ascomycota* (Tömlősgombák) tagozatba az élesztőgombákon kívül számos, az élelmiszeriparban nagy jelentőségű penészgomba tartozik. Ezeknél a penészeknél a hifafonalak tagoltak. A Tömlőspenészek micéliumai fejlettek, soksejtűek, haploidok. Ivartalan szaporodásuk konídiumokkal történik. Ivaros szaporítószervük az aszkusz, amelynek belsejében aszkospórák képződnek. Az *Aspergillus* (kannapenész) nemzetségnél a konídiumtartók vége fejszerűen megduzzad, ezen sugárirányban megnyúlt nyélsejtek (sterigma) találhatóak. Minden nyélsejtből az ivartalan konídiumok láncszerűen fűződnek le (48. ábra). A *Penicillium* (ecsetpenész) nemzetség konídiumtartója már elágazik, ennek végein a nyélsejtekről konídiumláncok fűződnek le (48. ábra).

64. GYAKORLAT

Paránytenyészetek készítése

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Aspergillus niger 72 órás tenyésze Petri-csészében

Penicillium chrysogenum 72 órás tenyésze Petri-csészében

Streptomyces sp. 72 órás tenyésze Petri-csészében

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

maláta tápagar lemez (kb. 2 mm magas)

Czapek tápagar lemez (kb. 2 mm magas)

keményítő-kazein tápagar lemez (kb. 2 mm magas)

steril tárgylemez és steril fedőlemez Petri-csészében

szike

steril nedves vattagombóc

Bunsen-égő

mikroszkóp

immerziós olaj

termosztát

A vizsgálat menete

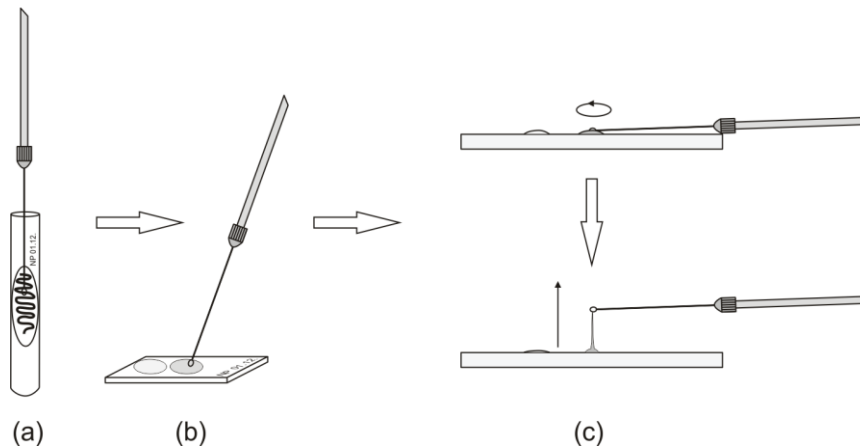
1. Az előzetesen sterilizált Petri-csészékben lévő tárgylemez felületére helyezünk a tenyésztetni kívánt mikroorganizmusnak kedvező tápagarlemezről szike segítségével (az aseptikus munka szabályainak figyelembevételével) kivágott kb. 1,5 x 1,5 cm-es lemezkét (48. ábra).

2. Az agarlemezek szélét oltuk be, majd fedjük le a Petri-csészében lévő steril fedőlemezzel.

3. A beoltott lemezeket ezután nedves vattagombócok jelenlétében Petri-csészében inkubáljuk 28 °C-on, 1 hétig.

4. Az inkubációs idő elteltével a tárgylemezek mikroszkóppal közvetlenül vizsgálhatók. Mikroszkópos megfigyeléseinkről készítsünk rajzot.

A **japán Gram-próba** a Gram-pozitív és Gram-negatív sejtfalszerkezettel rendelkező baktériumok elkülönítésére szolgáló, gyorsan és egyszerűen kivitelezhető eljárás (lásd 65. GYAKORLAT). A reakció alapja, hogy erős lúg hatására a Gram-negatív sejtek felszakadnak és a kiszabaduló DNS-ből szál húzható, ellentétben a Gram-pozitív sejtekkel, ahol ez nem következik be (49. ábra).



49. ábra A japán Gram-próba

Kacsnyi baktériumtömeget veszünk ki a tenyészetből (a) és tárgylemezre kenjük cseppnyi KOH oldat mellé (b). Kevés KOH oldatot a baktériumtömegbe keverünk és közben próbáljuk a kaccsal szálát húzni(c).

65. GYAKORLAT

Japán Gram-próba

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Bacillus cereus var. *mycoides* 16-24 órás tenyésze ferde agaron

Escherichia coli 16-24 órás tenyésze ferde agaron

Pseudomonas aeruginosa 16-24 órás tenyésze ferde agaron

Staphylococcus aureus 16-24 órás tenyésze ferde agaron

ismeretlen baktériumtörzs 16-24 órás tenyésze ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

tárgylemez

40% (m/V) KOH oldat

szemcseppentő

oltókacs

Bunsen-égő

A vizsgálat menete

1. Tárgylemez zsírtalanítása (lásd 54. GYAKORLAT).

2. Feliratozás.

3. Cseppentsünk a zsírtalanított tárgylemezre egy csepp KOH oldatot (49. ábra).

Oltókacs segítségével emeljük ki a tenyészetből kacsnyi mennyiséget, és helyezzük a tárgylemezen lévő csepp mellé. Keverjük a baktériumtömegbe kis mennyiségű reagenst oltókacs segítségével, és ezt a műveletet többször ismételjük meg. Közben próbáljuk szálát húzni a baktérium szuszpenzióból. A Gram-negatív baktériumok "nyálkássá" válnak, belőlük szálát lehet húzni, a Gram-pozitív sejt-tömeg azonban továbbra is könnyen keverhető, és a szálképződés elmarad.

6.4.2 A mikroorganizmusok tenyészfeltételeinek elemzése

A klasszikus mikrobiológiai telep- és sejt-morfológiai vizsgálatok során, ahogyan azt az előző fejezetek gyakorlatainak elvégzése során tapasztalhattuk, viszonylag kevés értékelhető és főképpen megkülönböztető erejű bélyeget nyertünk. A baktériumok és a fonalas gombák egyes csoportjai esetében ezért a kutatók a tenyésztéshez változatos összetételű táptalajokat alkalmazva kerestek ilyen bélyegeket. Ezek a vizsgálatok vetették meg az alapját a későbbi biokémiai elemzéseknek, valamint az élettani és ökológiai vizsgálatoknak.

A *Streptomyces* nemzetség fajtái, vagy a *Pseudomonas* fajok esetében például a pigmentképzést (vízoldható és vízben nem oldódó pigmentek) akár 5-6 különböző tápközegen is elemezték (International Streptomyces Project [ISP] tápközégek, *Pseudomonas* agarok) (lásd 67. GYAKORLAT), vagy tesztelték a növekedést szintetikus agar (glükóz-ammóniumsó közeg) felületén (lásd 67. GYAKORLAT), esetleg anaerob viszonyok között stb. Megjegyezzük, hogy az így nyert bélyegek jó részéről utóbb kiderült, hogy akár technikai (pl. az anaerob szaporítás), akár pedig genetikai okokból (pl. horizontális géntranszfer lehetősége) nem teljesen megbízhatók az identifikáció során. Mégis néhány jellegzetes tesztet mind a mai napig egyes nemzetségek fajainak leírása során alkalmaznak.

66. GYAKORLAT

Növekedés és pigmentképzés ISP tápagar lemezekon

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Streptomyces spp. ferde tápagaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

zabpehely tápagar lemez

élesztőkivonat-malátakivonat tápagar lemez

pepton-élesztőkivonat-vas tápagar lemez

oltókacs

Bunsen-égő

termosztát

A vizsgálat menete

1. Feliratozzuk a tápagar lemezeket, majd keresztoltással oltjuk a *Sptreptomyces* törzseket az agar lemezekre.

2. Egyheti 28 °C-os inkubálást követően figyeljük meg és hasonlítsuk össze a növekedés mértékét, ill. a telepek jellemzőit a különböző tápközégekben. Írjuk le a pigmentképzést (a tápagarba diffundált pigmenteket, valamint a telepek színanyagait) és elemezzük, hogy a vízoldható pigmentek indikátor tulajdonságúak-e. Cseppentsünk 0,05 HCl és 0,05 NaOH oldatot a táptalaj megfelelő pontjaira és vizsgáljuk a pigment színváltozását.

3. Észleléseinket rögzítsük jegyzőkönyvben.

67. GYAKORLAT

Növekedés képessége szintetikus tápközegen

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

glükóz és ammónium ion, mint egyedüli C és N forrás értékesítése ismeretlen baktériumtörzs tenyészet ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

ferde húspepton tápagar

ferde glükóz-ammónium ion szintetikus tápagar

fiziológiás sóoldat kémcsőben

oltókacs

Bunsen-égő

termosztát

A vizsgálat menete

1. Készítsünk kaccsal baktériumszuspenziót az ismeretlen baktérium törzstenyészetből. Ne feledjük a kémcsövek gondos feliratozását!

2. Kaccsal oltjuk a szuszpenzióból a húspepton, ill. a szintetikus ferde táptalajt.

3. Egyheti 28 °C-os inkubálást követően figyeljük meg a növekedés mértékét, a kolóniák típusát a két táptalajon.

4. A tenyészetekből készítsünk natív mikroszkópi preparátumot és figyeljük meg a sejtmorfológiai bélyegeket (lásd 3. táblázat). Észleléseinket jegyzőkönyvezzük.

6.4.3 Biokémiai vizsgálatok törzstenyészeteken

Számos baktérium tartalmaz flavoproteineket és más ún. "két-elektron" és "egy-elektron" átvivő elektronszállítókat, amelyek a molekuláris oxigént hidrogén-peroxiddá (H_2O_2), vagy szuperoxiddá (O_2) redukálják (lásd 68. GYAKORLAT). A mikroorganizmusok egy része rendelkezik a keletkező toxikus oxigén-intermedierekkel szemben védelmet biztosító enzimkészlettel. Az obligát aerob és a fakultatív anaerob (pl. Enterobacteriaceae) baktériumok rendszerint szuperoxid-diszmutázt és **katalázt**, míg az aerotoleráns anaerob baktériumok (pl. *Streptococcus* fajok) szuperoxid-diszmutázt és peroxidázt tartalmaznak. Ezek a szervezetek a szuperoxid-diszmutáz enzim segítségével a szuperoxid-iont (O_2^-) protonok segítségével molekuláris oxigénné és hidrogén-peroxiddá (H_2O_2) alakítják. A hidrogén-peroxidból kataláz enzim segítségével vizet és oxigént, peroxidáz enzim és NADH segítségével vizet állítanak elő. A legtöbb szigorúan anaerob baktériumból mindhárom enzim hiányzik, ezért ezek képtelenek tolerálni a molekuláris oxigén jelenétét.

68. GYAKORLAT

Kataláz teszt

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismeretlen baktériumtörzs 24 órás tenyésze ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

3%-os H_2O_2 -oldat

A vizsgálat menete

1. A kataláz aktivitás vizsgálatához cseppentsünk a tesztorganizm 24 órás ferdeagar tenyészetére 3%-os hidrogén-peroxid oldatot.

2. A pozitív reakciót a felszabaduló oxigénnek köszönhetően buborékképződés jelzi, melynek elmaradása negatív reakcióra utal.

Az aerob mikrobák légzési elektrontranszportláncá gyakran tartalmaz aa_3 típusú citokróom végoxidázt, ami az oxigén vízzé történő redukcióját segíti. A aa_3 típusú citokróom oxidáz jelenlétét vizsgáló, ún. **oxidáz teszt** (lásd 69. GYAKORLAT) a baktérium identifikálás klasszikus tesztjei közé tartozik (pl. pszeudomonaszok és enterobaktériumok elkülönítése).

69. GYAKORLAT

Oxidáz teszt

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismeretlen baktériumtörzs 24 órás tenyésze ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

steril Petri-csésze szűrőpapírral

oxidáz reagens (kereskedelmi forgalomban kapható)

üvegbot vagy platina oltókacs

Bunsen-égő

A vizsgálat menete

1. Cseppentsünk a Petri-csészében lévő szűrőpapír-szeletre egy csepp oxidáz reagenst.

2. A vizsgált mikroorganizmus tenyészetéből platina oltókacs segítségével (közönséges oltókacs alkalmazásánál a Fe^{2+} -ionok jelenléte téves pozitívítást eredményezhet) vagy üvegbottal kenjük kis mennyiségű baktériumtömeget az előzőleg reagenssel átitatott

szűrőpapír felületre.

3. A pozitív reakciót a 30-60 másodperc alatt bekövetkező liláskék elszíneződés jelzi, amely a tetrametil-p-feniléndiamin redukciójából eredő "Wurster-kék" keletkezésének köszönhető. Az egy percen túl bekövetkező elszíneződést negatívnak kell tekinteni.

Néhány mikroba légzése során több, ún. alternatív elektronakceptort, így a metilénkéket is képes elfogadni, aminek redukciójával szintelen, ún. leuko-metilénkék keletkeznek. A folyamat a színváltozás miatt könnyen detektálható. A **metilénkék-redukció** (lásd 70. GYAKORLAT) végbemenetelének kinetikája arányos az anyagcsere-aktivitással és a mikrobaszámmal is, így a múltban gyakran használták, pl. a tej tájékoztató jellegű higiénias minősítésére is.

70. GYAKORLAT

Metilénkék redukció vizsgálata

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismeretlen baktériumtörzs tenyésztete ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

metilénkék tápleves

oltókacs

Bunsen-égő

termosztát

A vizsgálat menete

1. A steril táplevest tartalmazó kémcsőre írjuk rá a vizsgálatba vont tenyészet azonosító jelzését és az átoltás időpontját.

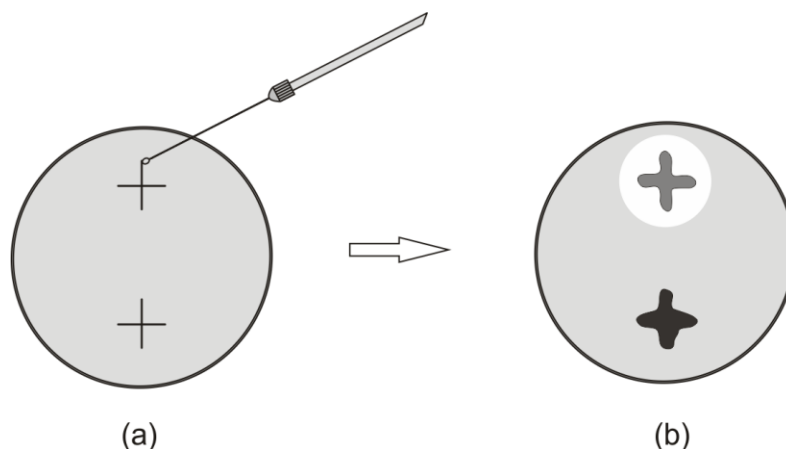
2. Egy kacsnyi baktériumtenyészettel oltuk be a metilénkék-táplevest.

3. A beoltott táplevest helyezük 28 °C-os termosztátba és inkubáljuk 1 hétig.

4. A pozitív reakciót a kék színű tápleves alulról meginduló elszíntelenedése jelzi.

Negatív reakció esetén a tápleves kék színe nem változik. A pozitív csövek erőteljes aerobizálásával (összerázással) a leukometilénkék – legalább részlegesen – visszaoxidálható.

A baktériumok számára a különböző biopolimerek (pl. fehérjék, poliszacharidok, nukleinsavak) és a nagyobb molekulaméretű komplex szerves molekulák (pl. lipidek) felvétele csak mono-, vagy oligomerjeikre, illetve komponenseikre hasítása után lehetséges. Így az egyes baktériumok számára a hasznosítható tápanyagok hozzáférhetősége nagyban függ a **biopolimer bontó exoenzimek** (pl. proteázok, nukleázok, lipázok) szintézisének képességétől.



50. ábra Biopolimerek lebontásának kimutatása

Kacsnyi baktériumtömeeggel keresztoltást végzünk (a) megfelelő tápagon (pl. tejagar). Az inkubációs idő elteltével a kifejlődött telepek körül kialakuló, vagy kimutatható tisztulási udvar utal a bontás képességére (b).

A kazein nagyméretű tejfehérje, felvétele csak a mikroba által termelt kazeáz enzim segítségével végbemenő extracelluláris hidrolízis után lehetséges. A **kazeáz aktivitás** a tápközegben lévő kazein bontásával detektálható (lásd 71. GYAKORLAT).

71. GYAKORLAT

Kazeáz aktivitás kimutatása

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismeretlen baktériumtörzs tenyésztete ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

tejagar lemez
oltókacs
Bunsen-égő
termosztát
sósavas HgCl_2 -oldat

A vizsgálat menete

1. A steril táptalajt tartalmazó Petri-csészére írjuk rá a vizsgálatba vont tenyészet azonosító jelzését és az átoltás időpontját.
2. Egy kacsnyi baktériumtenyészettel végezzünk ún. keresztoltást (egy X-alakot rajzolva) a tejagar lemez felületén (50. ábra).
3. A beoltott tájagar lemezt helyezzük $28\text{ }^\circ\text{C}$ -os termosztátba és inkubáljuk 1 hétig.
4. Az értékelés 1 hét elteltével a kifejlődött telepek körüli terület vizsgálatával történik. Pozitív esetben a baktériumtelep körül feltisztult, átlátszó udvar látható, ami a kazein lebomlásának következtében áll elő (a tej kolloid szerkezetének megváltozása miatt turbiditása csökken). Néhány esetben téves pozitív eredményt adhat, hogy a kazein limitált proteolízissel csupán parakazeinné bomlik, ami szintén feltisztult zónát eredményezhet. A téves pozitív reakció kizárására a tejagart vékony rétegben öntsük le sósavas HgCl_2 -dal. Ez a kezelés denaturálja a fehérjéket, ezért az esetlegesen jelenlévő parakazein kicsapódik, és a telepek körüli feltisztulási zóna megszűnik (negatív a reakció).

A zselatin kötőszöveti kollagénből forralással nyerhető, vízdoldható polipeptid láncok keveréke, amelynek gélképző tulajdonsága van. A **zselatin hidrolízisét** katalizáló proteáz (zselatináz) enzim termelésére képes baktériumok a zselatint tápanyagként hasznosítható aminosavakra bontják (lásd 72. GYAKORLAT).

72. GYAKORLAT

Zselatináz aktivitás kimutatása

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismeretlen baktériumtörzs tenyésztete ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

zselatin tartalmú tájagar lemez
oltókacs
Bunsen-égő
termosztát
sósavas HgCl_2 -oldat

A vizsgálat menete

1. A steril táptalajt tartalmazó Petri-csészére írjuk rá a vizsgálatba vont tenyészet azonosító jelzését és az átoltás időpontját.
2. Egy kacsnyi baktériumtenyészettel végezzünk ún. keresztoltást (egy X-alakot rajzolva) a zselatin tartalmú tájagar lemez felületén (50. ábra).
3. A beoltott tájagar lemezt helyezzük $28\text{ }^\circ\text{C}$ -os termosztátba és inkubáljuk 1 hétig.

Az inkubációs időt követően a tápagar lemezen kifejlődött telep köré öntsünk sósavas HgCl₂ oldatot, és várjunk néhány perct. A HgCl₂ az el nem bontott zselatinnal (negatív reakció) opálos csapadékot képez (a fehérjét denaturálja). Pozitív reakció esetén a telep körül az elbontott zselatin helyén átlátszó feltisztulási zóna látható.

A keményítő a természetben az egyik leggyakrabban előforduló poliszacharid, ami számos szervezetben, mint tartalék tápanyag fordul elő. A két komponensből (amilózból és amilopektinből) felépülő **keményítő hidrolízise** a természetben gyorsan végbemegy a mikrobák által termelt α -amiláz enzim segítségével (lásd 73. GYAKORLAT).

73. GYAKORLAT

Keményítő hidrolízis vizsgálata

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismeretlen baktériumtörzs tenyésztete ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

keményítő tápagar lemez

oltókacs

Bunsen-égő

termosztát

Lugol-oldat

A vizsgálat menete

1. A steril táptalajt tartalmazó Petri-csészére írjuk rá a vizsgálatba vont tenyészet azonosító jelzését és az átoltás időpontját.

2. Egy kacsnyi baktériumtenyészettel végezzünk ún. keresztoltást (egy X-alakot rajzolva) a keményítő tartalmú tápagar lemez felületén (50. ábra).

3. A beoltott tápagar lemezt helyezzük 28 °C-os termosztátba és inkubáljuk 1 hétig.

4. Az inkubációs időt követően a tápagar lemezen kifejlődött telep köré öntsünk Lugol-oldatot, és várjunk néhány perct. A Lugol-oldat az el nem bontott keményítővel (negatív reakció) sötétkék színreakciót ad. Pozitív reakció esetén a telep körül az elbontott keményítő helyén átlátszó feltisztulási zóna látható.

A mikrobák által termelt észterázok egyik fő csoportját a lipázok alkotják. A **lipolitikus aktivitás** vizsgálatára a különböző szubsztrátumok szerint számos módszert dolgoztak ki, amelyek közül a Tween-származékok (pl. Tween80, vagy más néven polioxietilén-szorbitán-monooleát) hidrolízisének kimutatása a legelterjedtebb (lásd 74. GYAKORLAT).

74. GYAKORLAT

Lipolitikus aktivitás vizsgálata

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismeretlen baktériumtörzs tenyésztete ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

Tween80 tartalmú tápagar lemez

oltókacs

Bunsen-égő

termosztát

A vizsgálat menete

1. A steril táptalajt tartalmazó Petri-csészére írjuk rá a vizsgálatba vont tenyészet azonosító jelzését és az átoltás időpontját.

2. Egy kacsnyi baktériumtenyészettel végezzünk ún. keresztoltást (egy X-alakot

rajzolva) a Tween80 tartalmú tápagar lemez felületén (50. ábra).

3. A beoltott tápagar lemezt helyezük 28 °C-os termosztátba és inkubáljuk 1 hétig.

4. Az inkubációs időt követően a tápagar lemezen kifejlődött telep körül pozitív reakció esetén a polioxietilén-szorbitán-oleát hidrolízisével olajsav válik szabaddá. Ez a tápközegben lévő Ca^{2+} -ionokkal vízdíszíthatatlan Ca-oleát kristályok formájában a telepek körül rozettaszerű precipitációs zónát eredményez.

A mikrobák **nukleáz aktivitásuk** révén képesek lehetnek a nagy molekulaméretű nukleinsavak tápanyagként történő felhasználására (lásd 75. GYAKORLAT).

75. GYAKORLAT

Nukleáz aktivitás kimutatása

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismeretlen baktériumtörzs tenyésztete ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

DNS tartalmú tápagar lemez

oltókacs

Bunsen-égő

termosztát

1 M HCl oldat

A vizsgálat menete

1. A steril táptalajt tartalmazó Petri-csészére írjuk rá a vizsgálatba vont tenyésztet azonosító jelzését és az átoltás időpontját.

2. Egy kacsnyi baktériumtenyésztettel végezzünk ún. keresztoltást (egy X-alakot rajzolva) a DNS tartalmú tápagar lemez felületén (50. ábra).

3. A beoltott tápagar lemezt helyezük 28 °C-os termosztátba és inkubáljuk 1 hétig.

4. Az inkubációs időt követően a tápagar lemezen kifejlődött telep köré öntsünk 1 N-os sósav oldatot, és várjunk néhány percet. A sósav-oldat az el nem bontott DNS-t kicsapja (negatív reakció). Pozitív reakció esetén a telep körül az elbontott DNS helyén átlátszó feltisztulási zóna látható.

A szénhidrát-anyagcsere a mikrobák alapvető sajátossága, ezért a cukrok bontásának vizsgálata gyakran elengedhetetlen a baktériumok ökológiai kapacitásának megismerése és taxonómiai helyzetének tisztázása során.

A **Hugh-Leifson teszt**, melynek segítségével a cukrok oxidatív és/vagy fermentatív lebontási képessége tanulmányozható, a baktériumok szénhidrát anyagcseréjének alapvető fontosságú vizsgálatai közé tartozik, és nélkülözhetetlen az aerob baktériumok klasszikus biokémiai alapon történő identifikálása során (lásd 76. GYAKORLAT).

Az alaptáptalaj különféle monoszacharidokkal vagy oligoszacharidokkal kiegészítve számos szénhidrát bontásának vizsgálatára ad lehetőséget.

76. GYAKORLAT

Hugh-Leifson teszt

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismeretlen baktériumtörzs tenyésztete ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

glükóz tartalmú Hugh-Leifson félszilárd magasagar

oltókacs

Bunsen-égő

termosztát

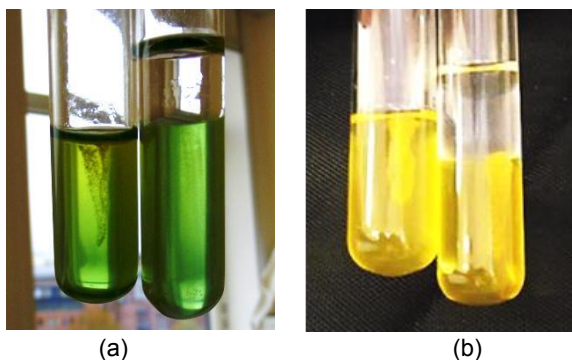
A vizsgálat menete

1. A steril táptalajt tartalmazó kémcsövekre írjuk rá a vizsgálatba vont tenyészet azonosító jelzését és az átoltás időpontját.

2. A baktériumtenyészet kacsnyi mennyiségét szűrővel oltuk a kémcsőben lévő aerob és anaerob tápközeg belsejébe. Az anaerob kémcsőbe oltáskor át kell szűrni a táptalaj tetején lévő paraffinolaj rétegen, ami az oxigén bediffundálásának megakadályozására szolgál. A kacs leégetése során az arra tapadt paraffinolaj meggyulladhat és szétfröccsenhet, ezért ilyenkor az oltókacsot lehetőleg magunktól távol tartva égessük le (vagy használjunk oltóharangot).

3. A beoltott kémcsöveket helyezzük 28 °C-os termosztátba és inkubáljuk 1 hétig.

4. Az inkubációs időt követően a kémcsőben lévő táptalaj színváltozása alapján (a brómtimolkék indikátor neutrális környezetben zöld, savas körülmények között sárga) értékeljük a baktériumok cukor hasznosítását (51. ábra). Fermentatív savképzés: mindkét cső teljesen sárga színű (az anaerob csőben gázképződés is lehet). Erős oxidatív savképzés: az aerob cső sárga színű, az anaerob csőben nincs, vagy csak nagyon gyenge a színváltozás. Gyenge oxidatív savképzés: az aerob cső felső harmada sárga színű, az anaerob csőben nincs színváltozás.



51. ábra A Hugh-Leifson teszt eredményei (Fotó: Felföldi T.)

A mindkét csőben negatív reakció (zöld szín) azt jelzi, hogy a vizsgált törzs nem képez savat a glükózból (a). A vizsgált törzs a glükóz anaerob (fermentatív) és aerob bontására egyaránt képes (sárga szín) (b).

A **metilvörös (MR) és Voges-Proskauer (VP) reakció** során a glükózt fermentáló baktériumok közül a vegyes savas és a 2,3-butándiolos fermentációra képes mikroorganizmusokat különíthetjük el egymástól (lásd 77. GYAKORLAT). A VP teszt során a 2,3-butándiol prekursorát, az acetyl-methyl-carbinolt (acetoin) mutatjuk ki α -naftol és KOH segítségével. A metilvörös (MR) indikátor savas végterméket (pH 4-5) jelez.

77. GYAKORLAT

Metilvörös és Voges-Proskauer reakció

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismeretlen baktériumtörzs tenyésztete ferde agaron

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

MR-VP tápleves
oltókacs
Bunsen-égő
termosztát
üres kémcső
pipetta, steril pipettahegyek
 α -naftol oldat (Barritt reagens)

40%-os KOH oldat
metilvörös oldat

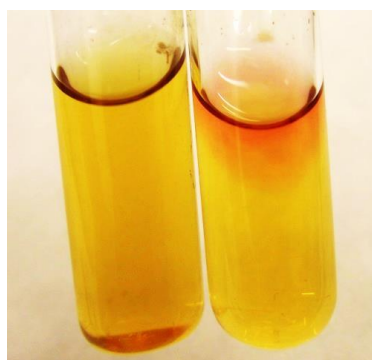
A vizsgálat menete

1. A steril táplevest tartalmazó kémcsőre írjuk rá a vizsgálatba vont tenyészet azonosító jelzését és az átoltás időpontját.

2. A baktériumtenyészet kacsnyi mennyiségével oltuk be az MR-VP táplevest.

3. A beoltott kémcsövet helyezük 28 °C-os termosztátba és inkubáljuk 1 hétig.

Az inkubációs időt követően a beoltott táplevesből pipetázzunk 1 ml-nyi mennyiséget egy üres kémcsőbe, majd adjunk hozzá 0,6 ml 5%-os α -naftol oldatot és 0,2 ml 40%-os KOH oldatot, és a nyitott kémcsövet helyezük ferdítőállványra. A tápleves kb. 5 perc alatt bekövetkező rózsaszínes-piros színváltozása acetoin képződésére (butándiolos fermentációra) utal (52. ábra). A beoltott tápleves másik feléhez adjunk 5-6 csepp metilvörös indikátort, és óvatos keverjük össze. Pozitív reakció (vegyes savas fermentáció) esetén a tápleves tartósan megmaradó piros színt mutat, míg a tápleves sárgás színe negatív reakciót jelez.



52. ábra A Voges-Proskauer teszt eredményei (Fotó: Felföldi T.)

A pozitív reakciót a tápleves vörös elszíneződése jelzi.

Az **eszkulin** (6,7 dihidroxi-kumarin-6- β -glükózid) **hidrolízisének** kimutatása fontos diagnosztikai bélyeg a coccusok azonosításában (lásd 78. GYAKORLAT).

78. GYAKORLAT

Eszkulin hidrolízis vizsgálata

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismeretlen baktériumtörzs tenyészet a ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

eszkulin tápleves

oltókacs

Bunsen-égő

termosztát

A vizsgálat menete

1. A steril táplevest tartalmazó kémcsőre írjuk rá a vizsgálatba vont tenyészet azonosító jelzését és az átoltás időpontját.

2. A baktériumtenyészet kacsnyi mennyiségével oltuk be az eszkulin táplevest.

3. A beoltott kémcsövet helyezük 28 °C-os termosztátba és inkubáljuk 1 hétig.

4. Az inkubációs időt követően pozitív reakció (eszkulin hidrolízis) esetén a képződő 6,7 dihidroxi-kumarin (eszkuletin) a táplevesben lévő vas(FeIII) sókkal sötétbarna-fekete színű kolloidális csapadékot képez. A tápleves színváltozásának elmaradása negatív reakciót jelez.

A fehérjék lebontása során keletkező **aminosavak hasznosítása** által a mikroorganizmusok szintén fontos energiaforrásokat nyerhetnek.

Az aminosavakból történő **kénhidrogén termelés** képessége a baktériumok között általánosan elterjedt tulajdonság, ezért az ezt vizsgáló teszt viszonylag csekély taxonómiai jelentőséggel bír, bár alkalmas bizonyos szervezetek (pl. *Salmonella* és *Escherichia* fajok) elkülönítésére (lásd 79. GYAKORLAT).

79. GYAKORLAT

Kénhidrogén termelés vizsgálata

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismeretlen baktériumtörzs tenyésztete ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

peptonvíz tápleves

oltókacs

Bunsen-égő

termosztát

indikátor papír (ólom-acetát oldattal átitatott szűrőpapírcsik)

A vizsgálat menete

1. A steril táplevest tartalmazó kémcsőre írjuk rá a vizsgálatba vont tenyészet azonosító jelzését és az átoltás időpontját.

2. A baktériumtenyészet kacsnyi mennyiségével oltuk be a cisztein tartalmú peptonvíz táplevest. A reagenssel átitatott papírcsikot úgy helyezük a kémcsőbe, hogy a tápleves felszíne felett kb. 1-2 cm-rel legyen (de ne érjen bele, mert az ólom-acetát mérgező a mikrobákra), majd rögzítjük a kémcsövet lezáró dugó vagy kupak segítségével.

3. A beoltott kémcsövet helyezük 28 °C-os termosztátba és inkubáljuk 1 hétig.

4. Az inkubációs időt követően pozitív reakció (kénhidrogén képződés) esetén a papírcsik feketére színeződik (PbS keletkezése során). Az indikátor színváltozásának elmaradása negatív reakciót jelez.

Bizonyos baktériumok triptofánból a táplevesben felhalmozódó indolt képeznek. Az **indol képződése** Kovács reagens (p-dimetilamino-benzaldehid) segítségével kimutatható (lásd 80. GYAKORLAT).

80. GYAKORLAT

Indol képzés kimutatása

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismeretlen baktériumtörzs tenyésztete ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

peptonvíz tápleves

oltókacs

Bunsen-égő

termosztát

Kovács reagens

A vizsgálat menete

1. A steril táplevest tartalmazó kémcsőre írjuk rá a vizsgálatba vont tenyészet azonosító jelzését és az átoltás időpontját.

2. A baktériumtenyészet kacsnyi mennyiségével oltuk be a cisztein tartalmú peptonvíz táplevest.

3. A beoltott kémcsövet helyezük 28 °C-os termosztátba és inkubáljuk 1 hétig.

4. Az inkubációs időt követően adjunk a tesztcsőhöz néhány csepp Kovács reagenst, és

hagyjuk, hogy az a tápleves tetején koncentrálódjon. Pozitív reakció esetén a felülúszó amilalkohol piros gyűrűt képez. Az indikátor színváltozásának elmaradása negatív reakciót jelez.

A mikroorganizmusok jelentős része rendelkezik **foszfátáz aktivitással** (lásd 81. GYAKORLAT).

81. GYAKORLAT

Foszfátáz aktivitás vizsgálata

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismeretlen baktériumtörzs tenyészet ferde agaron

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

Na-fenolftalein-foszfát tartalmú tápagar lemez

oltókacs

Bunsen-égő

termosztát

tömény ammóniaoldat

A vizsgálat menete

1. A steril táptalajt tartalmazó Petri-csészére írjuk rá a vizsgálatba vont tenyészet azonosító jelzését és az átoltás időpontját.

2. Egy kacsnyi baktériumtenyészettel végezzünk ún. keresztoltást (egy X-alakot rajzolva) a Na-fenolftalein-foszfát tartalmú tápagar lemez felületén.

3. A beoltott tápagar lemezt helyezzük 28 °C-os termosztátba és inkubáljuk 1 hétig.

4. Az inkubációs időt követően az értékelés ammóniagőzzel történik. Néhány csepp tömény ammóniaoldatot cseppentsünk a felfordított Petri-csésze tenyészetek fedelébe. Pozitív reakció (foszfátáz aktivitás) esetén a baktériumtelepek a felszabaduló szabad fenolftalein következtében pirosra színeződnek. Negatív a próba, ha nincs elszíneződés.

A kórokozó baktériumok jelentős része **hemolízist** kiváltó enzimeket (hemolizineket) is termel (lásd 82. GYAKORLAT). A hemolitikus zónák típusa alapján α , β és γ hemolízist különíthetünk el egymástól. α hemolízis esetén a véres agaron a baktériumtelepek körül zöldes-barnás zóna alakul ki a vörös vértetek különböző okokra visszavezethető részleges bomlása miatt. β hemolízis során a vörös vértetek teljesen elbomlanak, ezért a véres agaron a baktériumtelepek körül átlátszó udvar alakul ki. A nem hemolizáló szervezeteket (negatív reakció) nevezik γ hemolizálóknak.

A sztreptokokkuszok által különböző körülmények között termelt hemolizinek oxigén jelenlétében lehetnek labilisak (streptolizin O) vagy stabilak (streptolizin S). Az O típusú streptolizin antigén tulajdonságú extracelluláris fehérje, az S típusú streptolizin azonban nem-antigén tulajdonságú, és felszabadulásához keményítőre vagy egy a szérumban lévő anyagra van szükség. Ettől függetlenül véres agaron mindkettő hasonló típusú hemolízist mutat.

82. GYAKORLAT

Hemolízis kimutatása

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Bacillus cereus var. *mycoides* tenyészet ferde agaron

Bacillus subtilis tenyészet ferde agaron

Enterococcus faecalis tenyészet ferde agaron

Escherichia coli tenyészet ferde agaron

Staphylococcus aureus tenyészet ferde agaron

Streptococcus pyogenes tenyészet ferde agaron

ismeretlen baktériumtörzs tenyésztete ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

véres tápagar lemez
oltókacs
Bunsen-égő
termosztát

A vizsgálat menete

1. A steril táptalajt tartalmazó Petri-csészére írjuk rá a vizsgálatba vont tenyészet azonosító jelzését és az átoltás időpontját.
2. Egy kacsnyi baktériumtenyészettel végezzünk ún. keresztoltást (egy X-alakot rajzolva) a véres tápagar lemez felületén (50. ábra).
3. A beoltott tápagar lemezt helyezzük 28 °C-os termosztátba és inkubáljuk 24 óráig.
4. Az inkubációs időt követően a tápagar lemezen kifejlődött telepek körüli zóna alapján határozzuk meg a hemolízis típusát.

Az ún. **politróp táptalajok** összetételük miatt többféle enzimátikus tulajdonság egyidejű vizsgálatára alkalmasak (lásd 83. GYAKORLAT). A **TSI (Triple Sugar Iron) agar tesztet** általában a Gram-negatív enterális bacillusok (enterobaktériumok) elkülönítésére használják (4. táblázat). A kombinált ferde és magasagar háromféle cukrot (glükózt, laktózt és szacharózt) és a szénhidrát bontás detektálására fenolvörös indikátort, továbbá a kénhidrogén képződés kimutatására vas-ammónium-szulfátot tartalmaz (a cső mélyén a táptalaj megfeketedik). A szénhidrát fermentációt a táptalaj belsejében megfigyelhető gázképződés és a pH indikátor pirosról sárgára történő színváltozása jelzi. A kizárólag glükóz fermentációra képes szervezetek kimutatásának elősegítésére a táptalajban a glükóz koncentrációja csak 1/10-e a laktóz és a szacharóz koncentrációjának. Ily módon a glükóz fermentációja során keletkező kis mennyiségű sav a ferde táptalajban gyorsan oxidálódik, és a táptalaj piros színű marad vagy visszapirosodik. Ezzel szemben a táptalaj mélyén, anoxikus körülmények között a savas reakció (sárga szín) fennmarad. A kémcsőben lévő alkalikus környezetet (jobb átlevégőzést) fenntarthatjuk azáltal, hogy a kémcsövet lezáró kupakot a táptalaj beoltását követően lazán helyezzük vissza. Azok a szervezetek, amelyek képesek a szacharóz vagy a laktóz fermentációjára, a korlátozott mennyiségben jelenlévő glükóz felhasználása után tovább fermentálnak.

4. táblázat Néhány enterobaktérium tipikus TSI reakciója

Baktérium	TSI reakció			
	Szúrt tenyészet	Ferde tenyészet	Gáz képződés	H ₂ S termelés
<i>Enterobacter</i>	sárga	sárga	–	–
<i>Escherichia</i>	sárga	sárga	–	±
<i>Klebsiella</i>	sárga	sárga	–	–
<i>Proteus</i>	sárga	sárga vagy piros	+	–
<i>Serratia</i>	sárga	piros vagy sárga	–	±
<i>Shigella</i>	sárga	piros	–	–
<i>Salmonella</i>	sárga	piros	+	–

83. GYAKORLAT

Politróp táptalaj alkalmazása a baktérium diagnosztikában

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismeretlen baktériumtörzs tenyésztete ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

TSI ferde tápagar
oltókacs
Bunsen-égő
termosztát

A vizsgálat menete

1. A steril táptalajt tartalmazó káámcsőre írjuk rá a vizsgálatba vont tenyészet azonosító jelzését és az átoltás időpontját.

2. Egy kacsnyi baktériumtenyészettel végezzük el a kombinált ferde és magasagar beoltását úgy, hogy először szűrással oltsunk a táptalaj mélyére, majd a baktériumtenyészetet tartalmazó oltókacsot cikk-cakk vonalban húzzuk végig a ferde tápagar felületén (lásd 30. ábra).

3. A beoltott tápagart helyezük 35-37 °C-os termosztátba és inkubáljuk 18-24 óráig.

4. Az inkubációs időt követően a tápagarban megfigyelhető reakciók alapján a 4. táblázat segítségével azonosítsuk a vizsgált baktériumtörzset. Kizárólag a glükóz fermentációja esetén a táptalaj mélye sárga színű, a táptalaj ferde része piros. Glükóz, laktóz és/vagy szacharóz fermentációja esetén a táptalaj ferde része és a mélye is sárga színű. Fermentációs gáz képződés során a táptalaj belsejében buborékok láthatók. A táptalaj egészének piros színe arra utal, hogy a szervezet nem fermentáló. Kénhidrogén képződésekor a táptalaj mélyén fekete csapadék képződik.

6.4.4 Élettani és ökológiai vizsgálatok törzstenyészeteken

A mikroorganizmusok általában jól alkalmazkodnak élőhelyük sajátosságaihoz. A környezet fizikai és kémiai tulajdonságainak (hőmérséklet, pH, fényviszonyok, oxigén koncentráció, vízáktívítás stb.) változása nagymértékben befolyásolhatja életfunkcióikat (pl. szaporodási sebesség, pigmentképzés, endospóráképzés). Az exponenciális szaporodási fázisában levő sejtek általában érzékenyebbek, míg a stacionárius szakaszban levők ellenállóbbak a környezeti hatásokra.

6.4.4.1 Környezeti hatások elemzése

A hőmérséklet nagy hatást gyakorol a mikrobák anyagcsere-folyamataira és szaporodására (lásd 84. GYAKORLAT). Az egyes szervezetekre vonatkozóan a hőmérsékletnek három jellegzetes értékét – minimum, optimum és maximum – különíthetjük el (53. ábra). A hőmérsékleti optimum értékénél a baktériumok szaporodási sebessége maximális, míg a minimum és maximum értékek, adott környezeti feltételek mellett, a mikroorganizmusok sejtosztódásának alsó és felső határát jelzik. Aszerint, hogy ez a három érték milyen hőmérsékleti tartományba esik, a mikroorganizmusokat pszichrofil (pl. *Micrococcus cryophilus*, *Bacillus psychrophilus*), mezofil (pl. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*), termofil (pl. *Geobacillus stearothermophilus*, *Thermus aquaticus*) és hipertermofil (pl. *Pyrodictium occultum*, *Pyrolobus fumarii*) szervezetek közé sorolhatjuk.

A mikrobák szaporodási és pusztulási dinamikáját különféle táptalajokon és laboratóriumi körülmények között tanulmányozhatjuk.

84. GYAKORLAT

Baktériumok szaporodása eltérő hőmérsékleti feltételek között

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismeretlen baktériumtörzs tenyészet ferde agaron

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

ferde húspepton tápagar
oltókacs

Bunsen-égő
termosztát

A vizsgálat menete

1. Feliratozással jelöljük a kémcsöveken a vizsgálandó mikroorganizmusokat.
2. A vizsgálandó baktériumtörzs tenyészetének kacsnyi mennyiségét oltjuk ferde húspepton tápagarra (lásd 32. ábra).
3. A beoltott kémcsöveket inkubáljuk 4, 28 és 37 °C-os termosztátban 7 napig.
4. Az inkubációs idő elteltével vizsgáljuk meg a növekedés és a pigment képzés egymáshoz viszonyított mértékét.



53. ábra A hőmérséklet hatása a mikrobiális növekedésre (Fotó: Felföldi T.)

Micrococcus luteus tenyészetek egy hetes inkubációt követően 4, 28 és 37°C-on (balról jobbra).

A mikroorganizmusok hőtűrése fajonként, de akár törzsenként is nagyon különböző lehet (lásd 85. GYAKORLAT). Általánosságban elmondható, hogy a Gram-negatív szervezetek érzékenyebbek, mint a Gram-pozitívak, illetve, hogy az endospórák ellenállóbbak, mint a vegetatív sejtek (54. ábra).

A mikrobák hőtűrése – ami a logaritmusos szaporodási fázisban a legkisebb – függ az alkalmazott hőmérséklettől, annak időtartamától, és a többi környezeti tényezőtől (pl. a vízáktivitástól, a pH-tól, az egyéb ionok koncentrációjától).

85. GYAKORLAT

A baktériumok hőtűrésének vizsgálata

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Escherichia coli 24-48 órás tenyészetének szuszpenziója

Bacillus subtilis 48-72 órás tenyészetének szuszpenziója

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

20 ml olvasztott húspepton tápagar kémcsőben

60 °C-os és 95 °C-os vízfürdő

pipetta, steril pipettahegyek

steril üres Petri-csésze

Bunsen-égő

termosztát

kémcsőkeverő (vortex)

A vizsgálat menete

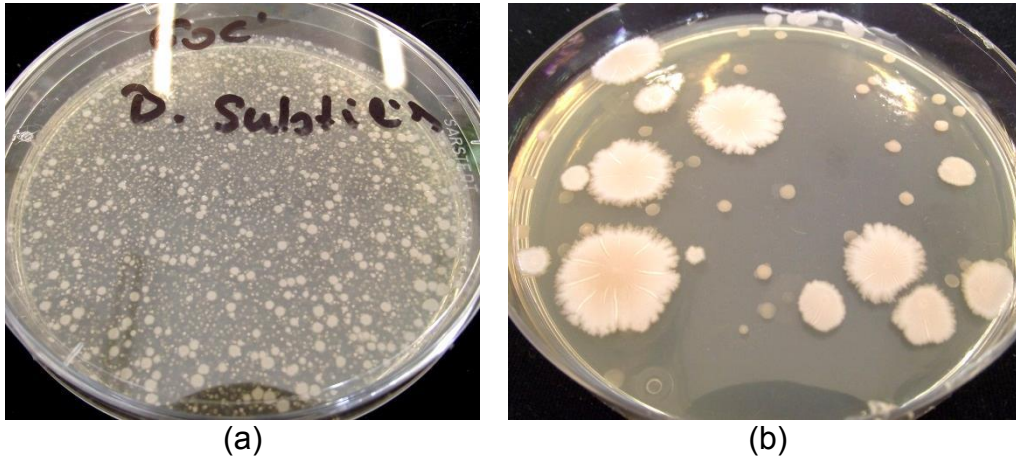
1. Az előzetesen megolvasztott táptalajokat tartalmazó kémcsövekre írjuk rá a vizsgálandó mikroorganizmus nevét és a kezelési hőmérsékletet, majd helyezük azokat kb. 10-20 percre 60 °C-os és 95 °C-os vízfürdőbe. Ezt követően pipetázzunk a kémcsövekbe aseptikus körülmények között 0,1-0,1 ml baktérium-suszpenziót, és keverjük össze.

2. 10 perces hőkezelés céljából tegyük vissza a beoltott kémcsöveket a megfelelő hőmérsékletű (60 °C-os vagy 95 °C-os) vízfürdőbe.

3. A hőkezelést követően a kémcsövek tartalmát öntsük olyan steril üres Petri-csészékbe (lásd 39. GYAKORLAT), melyekre előzőleg már felírtuk a vizsgált mikroorganizmus nevét és a hőkezelés paramétereit.

4. A beoltott tápagar lemezeket helyezzük 28 °C-os termosztátba és inkubáljuk 1 hétig.

5. Az inkubációs idő elteltével a baktériumok hőtűrésére a tápatalaj felületén és belsejében megjelenő kolóniák számából következtethetünk (54. ábra).



54. ábra Baktériumok hőtűrésének vizsgálata (Fotó: Felföldi T.)

Bacillus subtilis telepek növekedése azt követően, hogy a baktérium szuszpenziót a tápagarban 10 percig 60°C-os hőkezelésnek vetették alá (a). *Bacillus subtilis* telepek növekedése 90°C-os, 10 perces hőkezelést követően (b). Megfigyelhető a telepszámban bekövetkezett drasztikus változás, annak ellenére, hogy a beoltás azonos csíraszámmal történt.

A hidrogénionok környezeti koncentrációja (pH) az egyik legfontosabb növekedést és szaporodást szabályozó tényező, hiszen befolyásolja a mikroorganizmusok membrántranszport folyamatait, az enzimek szintézisét és aktivitását (lásd 86. GYAKORLAT). Minden mikrobának megvan a saját pH optimuma (az a pH érték, ahol adott körülmények között maximális a szaporodási rátája), minimuma és maximuma (az a minimális, illetve a maximális pH érték, ahol még egyáltalán szaporodást mutat). Az eltérő pH optimumok alapján a mikroorganizmusok lehetnek acidofil (pl. *Sulfolobus acidocaldarius*, *Thiobacillus thiooxidans*), neutrofil (pl. *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*) és alkalofil (pl. *Bacillus alcalophilus*) szervezetek.

86. GYAKORLAT

A pH hatása a mikroorganizmusok szaporodására

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Escherichia coli 24-48 órás tenyészetének szuszpenziója

Staphylococcus aureus 24-48 órás tenyészetének szuszpenziója

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

pH 5, 7 és 9 értékű húspepton táplevesek

pipetta, steril pipettahegyek

Bunsen-égő

termosztát

kémcsőkeverő (vortex)

A vizsgálat menete

1. Feliratozással jelöljük a kémcsöveken a vizsgálandó mikroorganizmusokat.

2. A baktériumtörzsek szuszpenziójából aseptikus körülmények között pipettázunk

0,1-0,1 ml-nyi mennyiséget pH 5, 7 és 9-es értékű húspepton táplevesekbe, majd kémcsőkeverő segítségével keverjük össze.

3. A beoltott kémcsőveket helyezzük 28 °C-os termosztátba és inkubáljuk 1 hétig.

4. Az inkubációs idő elteltével a pH-toleranciára a táplevesek kontrollhoz (steril tápleves) viszonyított zavarosodásának mértékéből (optikai denzitás változásából) következtethetünk.

A mikroorganizmusok számára jórészt a szabad, fizikailag, kémiailag nem kötött víz hozzáférhető (lásd 87. GYAKORLAT). E szabad víztartalom kifejezésére szolgál a **vízaktivitás (a_v)**, aminek az értéke 0-1 között lehet. A vízaktivitás egy viszonyszám, amely az oldatok parciális gőznyomása (p), valamint a tiszta oldószer gőznyomásának (p_o) aránya egy adott hőmérsékleten. Az a_v szemléletes összefüggésbe hozható az oldatok töménységével is: $a_v = p / p_o = n_o / (n_o + n)$, ahol p = az oldat gőznyomása, p_o = az oldószer gőznyomása (ugyanazon a hőmérsékleten), n = az oldott anyag mól száma, n_o = oldószer mól száma. Ha az oldott anyag koncentrációja nő, akkor a vízaktivitás (a_v) csökken. A vízaktivitás értéke kémiailag tiszta víz esetén 1,0.

A vízaktivitás értéke szorosan összefügg az oldatok fiziko-kémiai tulajdonságaival. Az oldatok – elsősorban a tömény oldatok – az oldott anyag kémiai tulajdonságai és/vagy vízaktivitás változtató szerepe révén hatnak a mikrobákra. (Az a_v tolerancia néhány esetben független lehet az oldott anyagtól.)

Mivel a mikrobák szaporodása csak bizonyos vízaktivitás-határok között megy végbe, a vízaktivitással jól jellemezhető a mikroorganizmusok szaporodásának vízigénye (5. táblázat). Többségük szaporodásához nagy vízaktivitás szükséges. A legkisebb vízaktivitást a mikrobák szaporodásuk egyébként optimális körülményei között viselik el. Más környezeti tényezők (pl. hőmérséklet, pH) szuboptimális mértéke a csökkent vízaktivitás szaporodás gátló hatását erősen fokozza.

5. táblázat A mikroorganizmusok szaporodásához szükséges minimális vízaktivitás értékek

Mikroba csoport	a_v
Baktériumok általában	0,91
Halofil baktériumok	0,75
Élesztők általában	0,88
Xerotróf élesztők	<0,80
Penészek általában	0,80
Xerotróf penészek	0,70

A vízaktivitás csökkentésének pl. az élelmiszeriparban nagy jelentősége van. Az élelmiszerek tartósítása, a mikroorganizmusok számára hozzáférhető víz, tehát a vízaktivitás csökkentésével (pl. szárítás, cukrozás, sózás, fagyasztás) érhető el.

A mikrobák vízaktivitás igénye vagy toleranciája jól jellemezhető cukor-, illetve sótűrésükkel. A gyakorlaton a sótolerancia meghatározásához a tápközeg vízaktivitás csökkenését NaCl hozzáadásával érjük el.

87. GYAKORLAT

Vízaktivitás hatása a mikrobák szaporodására

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

E. coli 24-48 órás tenyészetének szuszpenziója

Staphylococcus aureus 24-48 órás tenyészetének szuszpenziója

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

0, 5, 10% (m/v) NaCl koncentrációjú húspepton tápleves

pipetta, steril pipettahegyek
Bunsen-égő
termosztát
kémcsőkeverő (vortex)

A vizsgálat menete

1. A baktériumtörzsek szuszpenziójából aseptikus körülmények között pipetázunk 0,1-0,1 ml-nyi mennyiséget 0, 5 és 10% (m/v) NaCl koncentrációjú húspepton táplevesekbe, majd kémcsőkeverő segítségével keverjük össze. Feliratozással jelöljük a kémcsöveken a vizsgált mikroorganizmusokat.

2. A beoltott kémcsöveket helyezük 28 °C-os termosztátba és inkubáljuk 1 hétig.

3. Az inkubációs idő elteltével a NaCl-toleranciára a táplevesek kontrollhoz (steril tápleves) viszonyított zavarosodásának mértékéből (optikai denzitás változásából) következtethetünk.

Pontos összehasonlításhoz – a steril tápleves kontrollhoz viszonyítva – spektrofotométer segítségével is mérhetjük az optikai denzitást.

A legtöbb mikroorganizmus igen érzékeny az **ultraibolya sugárzásra** (lásd 88. GYAKORLAT). Az UV tartomány a napfény spektrum viszonylag széles sávját lefedi (4 nm-400 nm), de ennek csupán szűk része felelős az ún. germicid hatásért. A legerőteljesebb „csíraölő” hatás, a DNS replikáció zavarai miatt, 265 nm környékén érhető el. A pigmenttel rendelkező baktériumok viszonylagos védettséget élvezhetnek.

88. GYAKORLAT

Az UV sugárzás hatása baktériumok szaporodására

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismeretlen baktériumtörzs tenyészet ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

húspepton tápagar lemez
9 ml steril dH₂O kémcsőben
pipetta, steril pipettahegyek
oltókacs
szélesztőbot (sterilizéshez alkohol)
kémcsőkeverő
Bunsen-égő
UV lámpa
takaró lap vagy fólia
termosztát

A vizsgálat menete

1. A vizsgálandó baktériumtörzs tenyészetéből kacsnyi mennyiséget szuszpendáljunk steril vízben, és alaposan keverjük össze kémcsőkeverő segítségével.

2. Az így nyert szuszpenzióból szélesszünk 0,1 ml-nyi mennyiséget steril tápagarlemez felületére (lásd 25. GYAKORLAT). A fertőzött lemezek egy részét takarjuk le (pl. alufóliával), majd ezt követően adott ideig exponáljuk UV lámpa alatt. A behatási idő elteltével távolítsuk el a fóliát. A Petri-csészén jelöljük feliratozással a vizsgált mikroorganizmust és az UV sugárzás behatási idejét.

3. Kapcsoljuk ki az UV lámpát.

4. A beoltott tápagar lemezt helyezük 28 °C-os termosztátba és inkubáljuk 1 hétig.

5. Az inkubációs idő elteltével a germicid hatás mértékét a baktériumoknak a tápagarlemez letakart és az UV hatásnak közvetlenül kitett felületén való növekedési intenzitása közti különbség jelzi.

6.4.4.2 Antimikrobiális vegyületek és antibiotikumok hatásának vizsgálata

A mikroorganizmusokra ható biotikus és abiotikus gátló hatások sokféle mechanizmus alapján működhetnek.

Az antimikrobiális vegyületek olyan gátló anyagok, melyek a mikrobákat elpusztítják (pl. baktericid, fungicid anyagok), vagy szaporodásukban reverzibilisen gátolják (pl. bakteriosztatikus, fungisztatikus anyagok). Hatásmechanizmusuk nagyon különböző lehet: denaturálhatják a fehérjéket, károsíthatják a sejtfalat, a sejtmembránt, vagy mint kémiai antagonisták gátolhatják az energiatermelő és a bioszintetikus folyamatokat.

Ilyen például a baktériumok sejtfalának mureinjére ható **lizozim**, ami a természetben széles körben elterjedt. Megtalálható különböző állati szervekben, növényekben, valamint bakteriofágokban, és a tojásfehérje albuminjában is számottevő mennyiségben. Az enzim aktivitását a *Micrococcus luteus* baktérium szuszpenzió optikai denzitásának csökkenésével tesztelhetjük (lásd 89. GYAKORLAT).

89. GYAKORLAT

Tojás lizozim tartalmának meghatározása

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Micrococcus luteus tenyészet Petri-csészében

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

tojás
zselatinos foszfát puffer
lizozim
lombik
félkémcső
pipetta, steril pipettahegyek
oltókacs
kémcsőkeverő (vortex)
Bunsen-égő
termosztát
spektrofotométer

A vizsgálat menete

1. Feliratozással jelöljük a kémcsöveket.
1. Petri-csészére szélesztett 24 órás *Micrococcus luteus* tenyészetből készítsünk sűrű szuszpenziót 5 ml zselatin tartalmú foszfát-pufferben.
2. Törjük fel a tojást, és válasszuk szét a sárgáját és a fehérjét.
3. A tojásfehérjét foszfát puffer segítségével hígítsuk 1000-szeresére.
4. Standardnak készítsünk 4 µg ml⁻¹ koncentrációjú lizozim oldatot kereskedelmi forgalomban kapható kristályos lizozimból.
5. Ezt követően a táblázatban látható protokoll szerint készítsünk a mintából hígítási sorozatot (lásd 25. GYAKORLAT).

Félkémcső	1	2	3	4	5	6	7
Puffer (ml)	0	2	3	3,5	3,75	3,88	3,94
Minta (ml) ^a	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06
<i>M. luteus</i> szuszpenzió (ml)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Tojásfehérje OD (30 min.)							
Standard OD (30 min.)							

^a Tojásfehérje minta vagy lizozim oldat

6. Az egyes hígítási tagokba egy perces időközönként mérjük 0,3-0,3 ml *Micrococcus*

luteus szuszpenziót.

7. Alapos összekeverés után inkubáljunk minden csövet szobahőmérsékleten 30 percig.

8. Az inkubációs idő elteltével – a pufferhez viszonyítva – spektrofotométer segítségével 520 nm-en mérjük meg az egyes szuszpenziók az optikai denzitást.

9. A mért OD értékeket a lizozim minta térfogatok függvényében ábrázoljuk szemilogaritmikus papíron, és a görbe középső részének interpolálásával határozzuk meg a tojásfehérje lizozim tartalmát (mg).

Az **antibiotikumok** baktériumok, illetve gombák anyagcseréje során termelődött olyan vegyületek, amelyek kis koncentrációban is hatásos és specifikus anyagcseregátló szerek, s melyek ezáltal más mikrobákat elpusztítanak, vagy szaporodásukban korlátoznak. A legismertebb antibiotikum-termelő szervezetek a baktériumok *Streptomyces* és *Bacillus* nemzetségébe, valamint a gombák a *Penicillium* és *Cephalosporium* nemzetségébe tartoznak. Az antibiotikumoknak csupán kis hányada alkalmas gyógyászati (terápiás) célokra.

Más antimikrobiális szereket (pl. szulfonamidokat) célzott kémiai fejlesztésekkel állítanak elő. A gyógyászatban alkalmazható ilyen anyagcseregátló szereket kemoterápiás anyagoknak nevezzük.

A gyakorlaton a különböző antimikrobiális vegyületek hatását antimikrobiális anyag tartalmú korongok (6. táblázat) segítségével vizsgáljuk (lásd 90. GYAKORLAT 55. ábra).

6. táblázat Néhány antimikrobiális anyag típusa és hatásmechanizmusa

Antibiotikum	Hatás	Típus (spektrum)
Penicillin G	sejtfal-szintézis gátlás	szűk, Gram ⁺
Ampicillin/ Sulbactam	sejtfal-szintézis gátlás	széles, Gram ⁺ , néhány Gram ⁻
Vancomycin	sejtfal-szintézis gátlás	szűk, Gram ⁺
Streptomycin	fehérjészintézis gátlás, 30S riboszóma alegység gátlás	széles, Gram ⁺ , Gram ⁻
Tetraciklin	fehérjészintézis gátlás, 30S riboszóma alegység gátlás	széles, Gram ⁺ , Gram ⁻ <i>Rickettsia</i> , <i>Chlamydia</i>
Kloramfenikol	fehérjészintézis gátlás, 50S riboszóma alegység gátlás	széles, Gram ⁺ , Gram ⁻ <i>Rickettsia</i> , <i>Chlamydia</i>
Erythromycin	fehérjészintézis gátlás, 50S riboszóma alegység gátlás	szűk, Gram ⁺ , <i>Mycoplasma</i>
Ciprofloxacin	DNS szintézis gátlás	széles, Gram ⁺ , Gram ⁻
Rifampicin	DNS szintézis gátlás	széles, Gram ⁺ , <i>Mycoplasma</i>
Polymyxin B	membrán transzport gátlás	szűk, Gram ⁻
Kemoterápiás szer		
Sulphamethoxazol/ Trimetoprim	tetrahydrofolsav szintézis gátlás	széles, Gram ⁺ , Gram ⁻

90. GYAKORLAT

Antibiotikumok hatásának vizsgálata korong teszttel

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

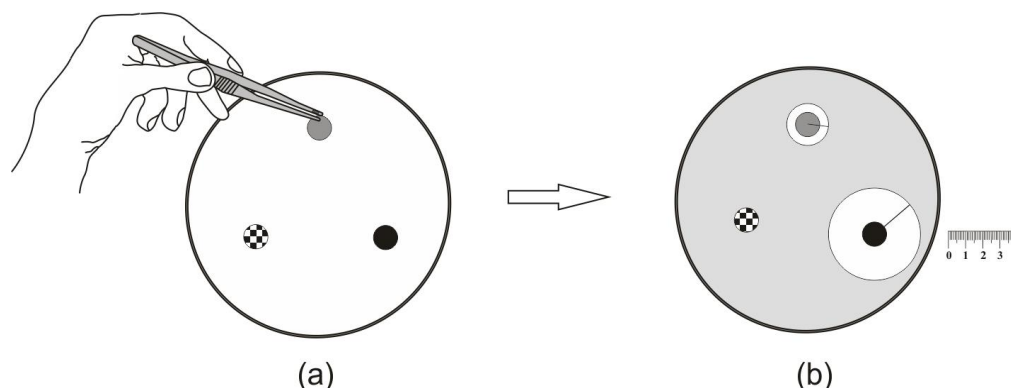
ismeretlen baktériumtörzs tenyészet ferde agaron

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

steril dH₂O kémcsőben
 oltókacs
 kémcsőkeverő (vortex)
 húspepton tápagar lemez
 pipetta, steril pipettahegyek
 szélesztőbot (sterilizéshez alkohol)
 fémcsipesz
 „antibiotikum” korongok
 Bunsen-égő
 termosztát
 vonalzó

A vizsgálat menete

1. Az ismeretlen baktériumtörzs tenyészetéből készítsünk steril vízben szuszpenziót.
2. Szélesszük a szuszpenzió 0,1-0,1 ml-nyi mennyiségét az előzőleg felíratott húspepton tápagarlemezek felületére (lásd 25. GYAKORLAT).
3. A fertőzött tápagar lemezekre steril csipesz segítségével helyezzünk antibiotikum tartalmú korongokat (lemezenként 4-5 korongot) (55. ábra).
4. A tápagar lemezt helyezzük 28 °C-os termosztátba és inkubáljuk 1 hétig.
5. Az inkubációs idő elteltével értékeljük ki a teszt eredményét. A korongra felvitt antimikrobiális anyagok az inkubációs idő alatt a táptalajba diffundáltak, és a diffúzió gyorsaságától, a hatóanyag mennyiségétől, valamint a mikroba érzékenységétől függően kisebb-nagyobb gátlási zónát hoztak létre (55. ábra). Értékeléskor a gátlási zónák átmérőjének meghatározásával (mm-ben kifejezett érték) következtethetünk a mikroba tesztelt antimikrobiális anyaggal szembeni érzékenységére vagy rezisztenciájára.



55. ábra Antibiotikumok hatásának kimutatása korongdiffúziós teszttel

A vizsgálatba vont baktérium szuszpenziójával tápagarlemez fertőzünk, majd az antibiotikum tartalmú tesztkorongokat a fertőzött tápagra helyezük (a). Kellő inkubációs idő elteltével a korongok körül kialakult gátlási zóna átmérőjének (vagy sugarának) lemérésevel (b) következtethetünk a baktériumtörzs antibiotikum érzékenységére.

Két antimikrobiális szer együttes alkalmazásával eldönthető, hogy a szerkombinációk egymás hatását gyengítik (**antagonizmus**) vagy erősítik (**szinergizmus**) (lásd 91. GYAKORLAT).

91. GYAKORLAT

Szinergizmus vagy antagonizmus kimutatása antimikrobiális szerkombinációk esetén

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismeretlen baktériumtörzs tenyészet ferde agaron

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

steril dH₂O kémcsőben

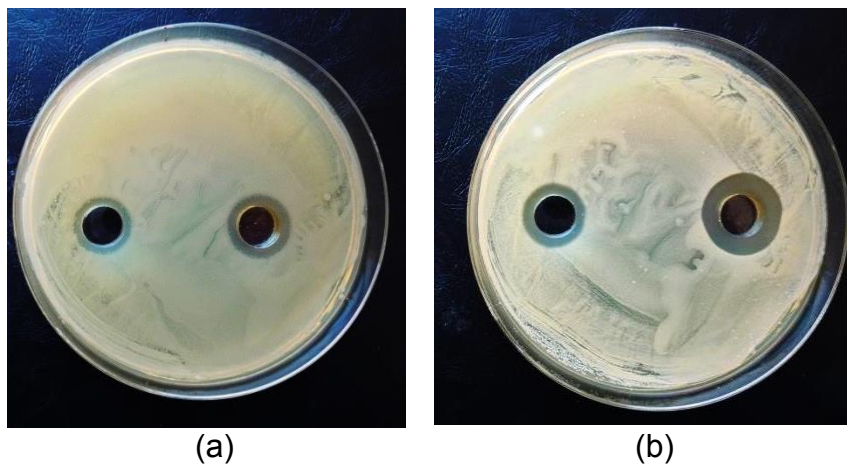
oltókacs
kémcsőkeverő (vortex)
húspepton tápagar lemez
pipetta, steril pipettahegyek
szélesztőbot (sterilizéshez alkohol)
fémcsipesz
„antibiotikum” korongok
Bunsen-égő
termosztát
vonalzó

A vizsgálat menete

1. Az ismeretlen baktériumtörzs tenyészetéből steril vízben készítsünk szuszpenziót.
2. A szuszpenzió 0,1-0,1 ml-nyi mennyiségét szélesszük - az előzőleg már feliratozott - húspepton tápagarlemezek felületére (lásd 25. GYAKORLAT).
3. A fertőzött tápagarlemezek felületére az antimikrobiális anyag tartalmú korongokat – steril csipesz segítségével – nem csupán egyesével, hanem párban, egymásra helyezve is rakjuk fel.
4. A tápagar lemezt helyezzük 28 °C-os termosztátba és inkubáljuk 1 hétig.
5. Az inkubációs idő elteltével értékeljük ki a teszt eredményét. Értékeléskor mérjük meg a gátlási zónák átmérőjét (mm-ben). Az antimikrobiális anyag külön-külön mért gátlási zónáit az együttesen mért értékkel összehasonlítva következtethetünk a szinergizmus vagy az antagonizmus meglétére.

A mikroorganizmusokból nyerhető elsődleges vagy másodlagos anyagcseretermékek száma határtalan. Az új és hasznos (érdekes) metabolitok megtalálása a tesztelési módszereken és a vizsgált mikrobák anyagcsere folyamatainak múlik.

Antimikrobiális hatású anyagok keresése legegyszerűbben **agardiffúziós módszerrel** végezhető (lásd 92. GYAKORLAT).



56. ábra A nanoezüst antagonistája hatása baktérium törzsek szaporodására (különböző koncentrációkban alkalmazva) (Fotó: Makk J.)

Escherichia coli ATCC 8739 (a) *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (b) (x. gyakorlat).

92. GYAKORLAT

***Streptomyces* törzsek rázatott tenyészet szűrletének "screenelése"**

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Staphylococcus aureus tenyészet ferde agaron

Streptomyces spp. tenyészet ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

maláta tápleves lombikban
húspepton tápleves
oltókacs
rázótermosztát (37 °C-os)
spektrofotométer
húspepton tápagar Petri-csészében
steril Petri-csésze
steril fémcsipesz
steril szűrőpapír korongok
steril dugófűrő
pipetta, steril pipettahegyek
steril fecskendőszűrő
termosztát

A vizsgálat menete

1. A vizsgálat előkészítéseként oltjuk a *Streptomyces* törzseket lombikban lévő steril maláta táplevesbe.
2. A beoltott lombikokat tegyük 37 °C-os rázótermosztátba, és rázassuk 7 napig.
3. A *Streptomyces* törzsek maláta táplevesbe való oltását követő 6. napon oltjuk a tesztmikrobaként használt *Staphylococcus aureus* törzset húspepton táplevesbe.
4. A táplevesbe oltott *Staphylococcus aureus* törzset tenyészük rázatással egy éjen át 37 °C-on.
5. A tenyésztést követően a *Staphylococcus aureus* tesztmikroba szuszpenzió sűrűségét optikai úton állítsuk be úgy, hogy az OD₆₆₀ értéke 0,3 legyen.
6. A hígított szuszpenzió 1 ml-nyi mennyiségével fertőzzük 100 ml felolvasztott és 50 °C-ra visszahűtött húspepton tápagart.
7. Az így fertőzött tápagarból öntsünk lemezeket (lásd 39. GYAKORLAT) steril Petri-csészékbe. Hagyjuk a lemezeket megszilárdulni.
8. Ezt követően a *Streptomyces* törzsek 37 °C-on, 1 hétig rázatott szűrletét vigyük át a *Staphylococcus aureus*-szal fertőzött tesztagarra. Erre két eljárás alkalmazását javasoljuk. Az egyik esetben steril csipesszel a szűrletbe mártott (kb. 1 cm átmérőjű) steril szűrőpapír korongot a tesztagar felszínére helyezük. A másik lehetőség, hogy steril dugófűrővel lyukakat készítsünk a tesztagarba, és ezekbe a lyukakba pipettázunk a *Streptomyces* tenyészet szűrletéből.
9. A tápagar lemezt helyezük 37 °C-os termosztátba és inkubáljuk 1 napig.
10. Az inkubációs idő elteltével az antimikrobiális anyag jelenlétét a gátlási zónák megjelenése jelzi (56. ábra).

A mikrobák által termelt **antimikrobiális anyagokkal szembeni érzékenységet keresztcsikolatos módszerrel** is vizsgálhatjuk (lásd 93. GYAKORLAT). A vizsgálat azon alapul, hogy a szilárd táptalaj felületére oltott gátlóanyagot termelő mikroorganizmusból a keletkező antibiotikum a táptalajba diffundál, és gátolja a termelő törzs mellé oltott érzékeny mikrobák szaporodását (57. ábra).

93. GYAKORLAT

Mikrobák antagonizmusának vizsgálata keresztcsikolatos módszerrel

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

antibiotikum-termelő mikroba: *Penicillium chrysogenum* tenyészet
E. coli tenyészet ferde agaron

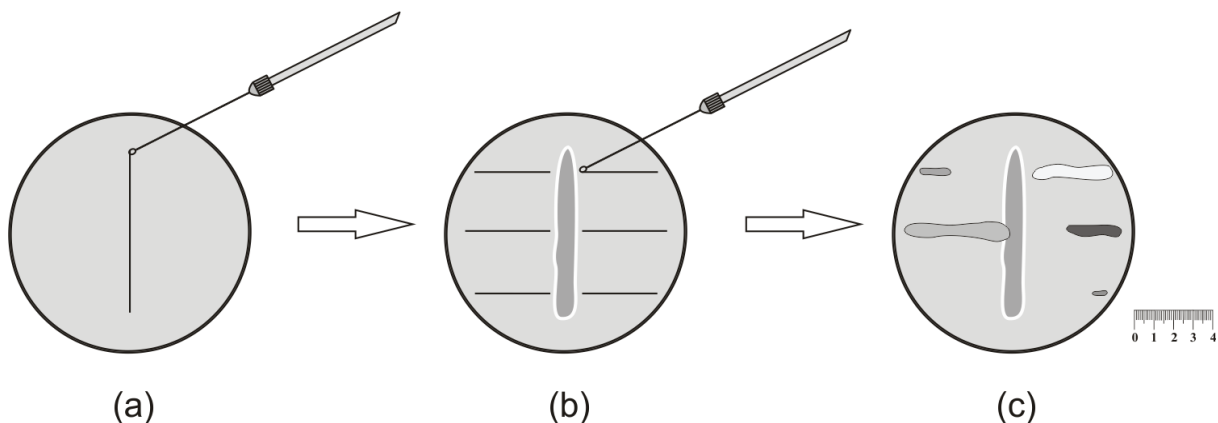
Bacillus cereus var. *mycoides* tenyészet ferde agaron
Micrococcus luteus tenyészet ferde agaron
Serratia marcescens tenyészet ferde agaron
Staphylococcus aureus tenyészet ferde agaron
ismeretlen baktériumtörzs tenyészet ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

húspepton tápagar lemezek
oltókacs
Bunsen-égő
termosztát

A vizsgálat menete

1. A feliratozott Petri-csészében lévő tápagarlemez közepére egy – a lemez átmérőjén végighúzott – vonaloltással vigyük fel az antibiotikum termelő mikrobát (57. ábra).
2. A tápagar lemezt helyezük 28 °C-os termosztátba és inkubáljuk 1 hétig.
3. Ezt követően a feliratozott Petri-csészében lévő antibiotikum termelő mikroba mellé, keresztcsíkozással oltjuk le a tesztmikrobákat (57. ábra) úgy, hogy az oltási vonalak ne érintsék egymást.
4. A tápagar lemezt ismét helyezük 28 °C-os termosztátba és inkubáljuk 1 hétig.
5. Az inkubációs idő elteltével a gátlási távolság meghatározásával értékeljük az antibiotikum termelő mikroba és a tesztorganizmusok közötti kölcsönhatásokat (57. ábra).



57. ábra Mikrobák antagonizmusának, illetve szinergizmusának kimutatása keresztcsíkolatos módszerrel

A „termelő mikroba” tenyészetét vonaloltással hozzuk létre (a). Megfelelő időtartalmú inkubációt követően a termelő mikroba telepre merőlegesen a tesztmikrobák tenyészeivel oltunk (b). A tesztmikrobák kinövését követően lemérhetjük a gátlási zónát (c), vagy észleljük a tesztmikroba erőteljesebb növekedését a termelő törzs tenyészetének közelében.

Az antimikrobiális vegyületekkel szemben gyakran tapasztalhatjuk a rezisztencia kialakulását vagy meglétét. A rezisztencia lehet természetes vagy szerzett. Természetes rezisztencia esetén a mikroba felépítése (pl. sejtfal típusa, átjárhatósága, a receptorok vagy a transzportrendszer hiánya) gátolja az antibiotikum hatásának kifejtését. A szerzett rezisztencia spontán mutációk, vagy horizontális géntranszfer (konjugáció, transzdukción, transzformáció) révén alakul ki.

A gyakorlaton a **replika technikát** alkalmazzuk a **különböző antibiotikumokkal szemben rezisztens mikrobák izolálására** (lásd 94. GYAKORLAT). Ezzel a módszerrel a Petri-csészékben kialakult, különálló telepek alkotta lemeztenyészetéről "kópiát-kópiákat" készítünk (58. ábra). Egy műanyag vagy fém tuskóra feszített steril bársonyszövetet óvatosan a tenyészetre nyomva, a bársony finom szálai oltókacsoként szolgálnak, és így egyszerre valamennyi telepet átolthatjuk antibiotikum tartalmú tápagar lemezekre (az alaptáptalajon

növekedést mutató, telepkepző szervezet nem növekszik a szelektív táptalajon). A replika technika segítségével más jellegzetes képességeket mutató mikrobatorzseket, pl. különböző anyagcsere-mutánsokat is nyerhetünk megfelelően szelektív táptalajok alkalmazásával.

94. GYAKORLAT

Replika-technika alkalmazása antibiotikum rezisztens mikrobák izolálására

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

fertőzött húspepton tápagar lemezekben fejlődött mikroba telepek
(pl. talajmikrobák tenyészet)

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

műanyag, vagy fém tuskóra feszített steril bársonyszövet (replika tuskó)
különböző antibiotikumokat tartalmazó tápagarlemezek
termosztát

A vizsgálat menete

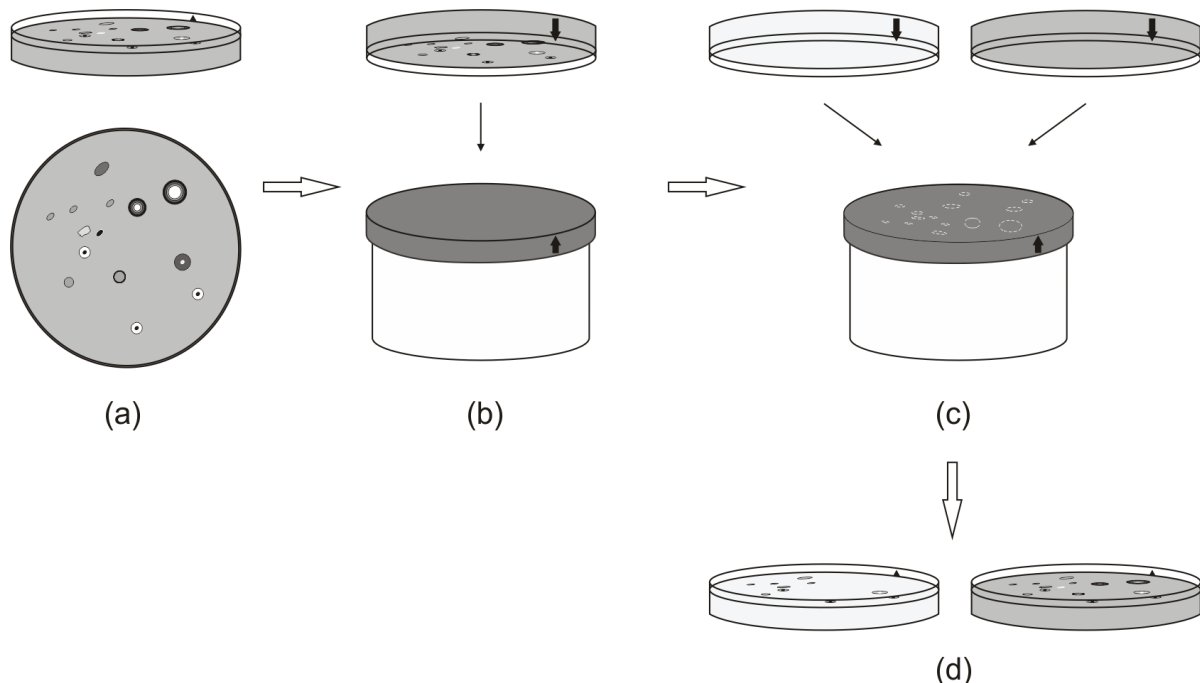
1. A vizsgálatához használjunk környezeti mintából származó, szélesztéses technikával fertőzött húspepton tápagar lemezeket (lásd 25. GYAKORLAT).

2. Az így előkészített tápagar lemezekről replika tuskó segítségével – annak óvatosan a tenyészetre nyomásával – készítsünk másolatot (58. ábra).

3. Ezt követően a replika tuskó segítségével készítsünk lenyomatokat - az előzőleg feliratozott -, különböző antibiotikum tartalmú tápagar lemezekre. Ügyeljünk arra, hogy az egyes lemezeket az eredetivel azonos pozícióban, gondosan megjelölve másoljuk át 58. ábra.

4. A tápagar lemezeket helyezzük 28 °C-os termosztátba és inkubáljuk 1 hétig.

5. Az inkubációs idő elteltével végzett értékelés során – az eredeti szélesztéssel fertőzött lemezen fejlődött telepekkel összehasonlítva – vizsgáljuk meg a kifejlődött/nem fejlődött telepek alapján az antibiotikum rezisztenciát/érzékenységet.



58. ábra Replika eljárás használata

Környezeti mintából származó szélesztett agar tenyészetet replika tuskóra feszített steril bársony szövettel „mintázunk” (a). Óvatosan rányomjuk a bársonyt a tenyészetre (b), majd a bársonnyal antibiotikum tartalmú új táplemezeket oltunk (c). Összehasonlítva a kifejlődött új tenyészetet az eredetivel (d) fény derül a rezisztens mikrobák telepeire.

Az edényes növények által termelt, mikroorganizmusokra kis koncentrációban is toxikus, szelektív hatású vegyületeket nevezük **fitoncidoknak** (lásd 95. GYAKORLAT). Kémiai szerkezetüket tekintve nagyon sokfélék lehetnek. Közéjük tartozik pl. a fokhagymából kimutatott allicin, (ami az enzimek szulfhidril csoportjait köti le), a paprika kapszaicinja, a komlóban levő humulon, a fahéj eugenol aldehidje, vagy a szegfűszegben található benzooesav.

95. GYAKORLAT

Növényi antimikrobiális vegyületek hatásának vizsgálata

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismeretlen baktériumtörzs tenyészet ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

lombik

Bunsen-égő

steril dH₂O kémcsőben

pipetta, steril pipettahegyek

kémcsőkeverő (vortex)

húspepton tápagar lemez

szélesztőbot (sterilizéshez alkohol)

dugófúró eszköz

fémcsipesz, kés

növények (pl. hagyma, fokhagyma, gyömbér, kakukkfű, kamilla)

növényi kivonatok (pl. kakukkfű kivonat, paprika kivonat)

termosztát

A vizsgálat menete

1. A növényi anyagokat forrásban lévő vízfürdőben extraháljuk 10 percig, majd hagyjuk kihűlni, illetve használhatunk kereskedelemben kapható kivonatokot.

2. Az ismeretlen baktériumtörzs tenyészetéből steril vízben készítsünk szuszpenziót.

3. A szuszpenzió 0,1-0,1 ml-nyi mennyiségét szélesszük húspepton tápagarlemezek felületére (lásd 25. GYAKORLAT). A szélesztést követően a lemezeket kis ideig hagyjuk szikkadni, majd vágjunk a fertőzött táptalajba – égetéssel csíramentesített dugófúróval – lemezenként 3 lyukat. Pipettával töltünk a lyukakba különböző növényi kivonatokot.

4. A fokhagymát, gyömbért szeletekben (frissen vágott felszínükkel a táptalaj felé fordítva) helyezük a szélesztéssel fertőzött tápagar lemezekre.

5. A tápagar lemezeket helyezük 28 °C-os termosztátba és inkubáljuk 1 hétig.

6. Az inkubációs idő elteltével a vizsgálatba vont növényi anyagok a táptalajba diffundálnak és a mikroorganizmusok érzékenységétől függően kisebb-nagyobb gátlási zónát hoznak létre. Kiértékeléskor a gátlási zónák átmérőjét mérjük meg mm-ben.

A **nehézfémek** pl. ezüst, réz, nikkell ionjai már igen kis koncentrációban toxikusak (fehérjék denaturálása) a mikrobákra. Jelen gyakorlatunkban azt vizsgáljuk, hogy az ionok a szilárd táptalajba diffundálva és a vizsgált mikroorganizmus érzékenységétől függően különböző méretű gátlási zónát alakítanak ki (lásd 96. GYAKORLAT).

96. GYAKORLAT

Nhézfémionok gátló hatásának vizsgálata

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismeretlen baktériumtörzs tenyészet ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

steril dH₂O kémcsőben

pipetta, steril pipettahegyek
 Bunsen-égő
 kémcsőkeverő (vortex)
 húspepton tápagar lemezek
 szélesztőbot (sterilizéshez alkohol)
 dugófúró eszköz
 különböző töménységű CuSO₄-oldatok (egy telített, valamint ennek egy 10-szeres és egy 100-szoros hígítású oldata)
 fémcspesz
 rézlemezke
 termosztát

A vizsgálat menete

1. Feliratozással jelöljük a kémcsöveket.

2. Az ismeretlen baktériumtörzs tenyészetéből steril vízben készítsünk szuszpenziót.

3. Iratozzuk fel a tápagar lemezeket tartalmazó Petri-csészéket, majd szuszpenzió 0,1-0,1 ml-nyi mennyiségét szélesszük a húspepton tápagarlemez felületére (lásd 25. GYAKORLAT). A szélesztést követően a lemezeket kis ideig hagyjuk szikkadni, majd vágjunk a fertőzött táptalajba – égetéssel csíramentesített dugófúróval – lemezenként 3 lyukat. Pipettával töltünk a lyukakba különböző töménységű CuSO₄-oldatot.

4. A leégetett rézlemezeket és pénzérméket helyezük a szélesztéssel fertőzött tápagar lemezekre.

5. A tápagar lemezeket helyezük 28 °C-os termosztátba és inkubáljuk 1 hétig.

6. Az inkubációs idő elteltével a táptalajba diffundáló nehézfémionok a hatóanyag mennyiségétől és a vizsgált baktériumtörzs érzékenységétől függően kisebb-nagyobb gátlási zónát hoznak létre. Kiértékeléskor a gátlási zónák átmérőjét mérjük meg mm-ben.

6.4.1 Baktériumtörzsek kemotaxonómiai vizsgálata

A kemotaxonómia az élőlények kémiai alkotóinak változatosságával foglalkozik. Módszereinek robbanásszerű elterjedése a kromatográfias eljárások fejlődésével vált lehetővé. Kemotaxonómiai módszerek segítségével vizsgálható a mikroorganizmusok nukleinsavainak és fehérjéinek szerkezete, minősége és mennyisége, karakterisztikus szénhidrátjaik, anyagcsere végtermékeik, lipid komponenseik összetétele (7. táblázat).

7. táblázat A baktériumok sejtfalában és citoplazma membránjában előforduló kemotaxonómiai markerek

Struktúra	Kemotaxonómiai marker
plazmamembrán (Gram-pozitív és negatív Bacteria)	izoprenoid kinonok lipidoldékony pigmentek lipoteikosavak poláris lipidek fehérjék
sejtfal (Gram-pozitív és negatív Bacteria)	peptidoglikán és analógjai sejtfal-cukor összetétel teikosavak és származékai
Gram negatív Bacteria külső membránja	lipopoliszacharidok (K és O antigének) poláris lipidek
Gram pozitív Bacteria	kötött lipidek: mikolsavak szabad lipidek: glikolipidek, szulfoglikolipidek, viaszok

A nukleinsav alapú technikák elterjedésével a kemotaxonómiai módszerek ugyan kisebb jelentőséggel bírnak, de pl. fajleírásoknál a kemotaxonómiai markerek ismerete elengedhetetlen. Ezen kívül munkaigényessége ellenére a kemotaxonómiai technikákat széles körben alkalmazzák mikrobiális biodiverzitás vizsgálatokra, hiszen ellentétben a nukleinsav alapú technikákkal itt a környezetből amplifikálás nélkül történik a kémiai komponensek kinyerése, így a kapott eredmények pontosabb mennyiségi információt hordoznak.

6.5 Sejtfal összetétel vizsgálata

A sejtfalalkotók közül taxonómiai szempontból a peptidoglikán típusa döntő fontosságú. A glikánrész relatíve egységes, bár ismert néhány atipikus forma (pl. bizonyos mikolsav tartalmú aktinobaktériumoknál az N-acetil-muraminsavat N-glikolil muraminsav helyettesíti). Legnagyobb jelentőséggel a muraminsavról lelógó oligopeptid lánc összetétele, valamint az interpeptid hidak kapcsolódási módja bír, legnagyobb a variabilitás a diaminosav összetételében jelentkezik (pl. lizin, ornitin, DAP).

Ha a sejtfal **diamino-pimelinsavat (DAP)** tartalmaz (mivel ez a diaminosav, csak a sejtfalból származhat) elegendő a teljes sejt lizátumát vizsgálni kimutásához (lásd 97. GYAKORLAT). Ehhez 121 °C-on a baktériumsejteket roncsoljuk, majd a tisztított lizátumot vékonyréteg kromatográfia (VRK) segítségével megfuttatjuk. A teljes sejt lizátumából a **sejtfal karakterisztikus cukormolekulái** is meghatározhatók (lásd 98. GYAKORLAT).

97. GYAKORLAT

Baktériumtörzsek sejtfal diamino pimelinsav (DAP) tartalmának meghatározása

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Escherichia coli tenyészet ferde agaron
Brevibacterium linens tenyészet ferde agaron
Nocardioides hungaricus tenyészet ferde agaron
ismeretlen baktériumtörzs tenyészet ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

jól zárható, teflonkupakos üvegcsövek
blokktermosztát
6M HCl, piridin (alt), metanol (alt)
desztillált víz
szárítószekrény
aktív szén (por)
pipettahegy
szűrőpapír
ninhidrin előhívó reagens (0,2 V/V %-os butanolban oldva)
cellulóz vékonyréteg (pl. TLC Cellulose (Merck))
futtató kád

A vizsgálat menete

1. A mikroorganizmusok fiatal tenyészeteiből néhány kacsnyit szuszpendáljunk 300 µl 6 M sósav oldatban, majd helyezzük teflonkupakos zárócsövekbe, ezeket megfelelően feliratozzuk.

2. A sejtek (így a murein) teljes roncsolását 121 °C-on, 20 percig blokktermosztátban végezzük (4 M sósavval a murein részleges darabolása érhető el).

3. Az így kapott sötétbarna, illetve fekete oldatból a sósavat és vizet szárítószekrényben 70 °C-on párologtatjuk el, majd 100-150 µl desztillált vizet adunk hozzá.

4. Mivel az így kapott lizátum sejttörmelékét is tartalmaz, végezzünk további tisztítást

1 ml-es pipettahegy és aktív szénpor segítségével. Ehhez tegyük a pipettahegybe szűrőpapírt, és erre rétegezzük rá az aktív szenet, majd szűrjük át rajta a lizátumot.

5. Az így nyert (tiszt) mintát értékeljük ki vékonyréteg kromatográfia segítségével. A mintákat, valamint a standard oldatot (DAP elegy, amely a 1:1 arányban tartalmazza az LL és DL formát) vigyük fel cellulóz vékonyrétegre (SigmaCell Type 100 Cellulose) (a mintákból 8 µl, szakaszosan felvive, közben a foltokat hajszárítóval megszáritva, a standard oldatból 1 µl), majd futtassuk meg a megfelelő futtatóelegyben 4-10 °C-on (2-2,5 óra).

6. A foltok előhívását ninhidrin reagenssel végezzük 100 °C-on. A foltok jellemzésére használjuk retenciófaktorukat: R_f (DAP LL izomer) = 0,29; R_f (DAP DL izomer) = 0,24

7. Értékeljük ki és hasonlítsuk össze a különböző baktériumtörzsek vizsgálatának eredményeit.

Megjegyzés: Az oldószerek és egyéb vegyszerek jelentős része jelentősen mérgező (esetenként karcinogén, mutagén hatású). Ezért a gyakorlat során vegyifülke alkalmazása és gumikesztyű viselése kötelező!

98. GYAKORLAT

Baktériumsejtek karakterisztikus cukormolekuláinak meghatározása

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Brevibacterium linens tenyészet ferde agaron

Nocardioides hungaricus tenyészet ferde agaron

ismeretlen baktériumtörzs tenyészet ferde agaron

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

jól zárható, teflonkupakos üvegcsövek

blokktermosztát

0,25 M sósav

szárítószekrény

futtató kád

cellulóz vékonyréteg (pl. SigmaCell Type 100 Cellulose)

standard cukoroldatok

savas anilin ftalát reagens oldat (kereskedelmi forgalomban kapható)

A vizsgálat menete

1. Hasonlóan járunk el, mint a DAP kimutatásakor (lásd 97. GYAKORLAT), de itt a sejtek roncsolását 0,25 M sósavban végezzük el 121 °C-on blokk termosztátban.

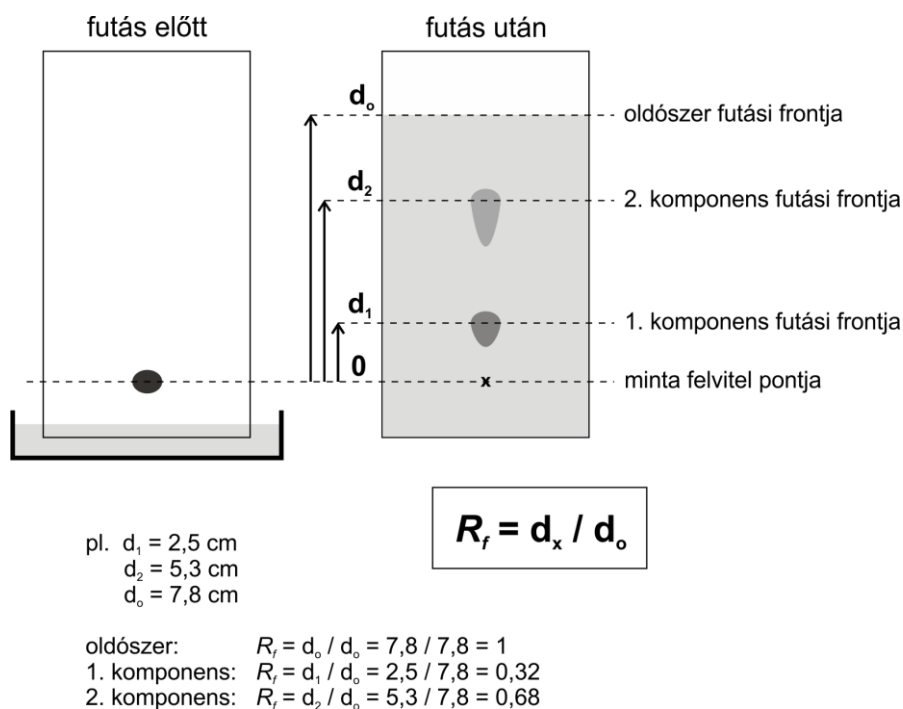
2. Az így kapott sötétbarna, illetve fekete oldatból szárítószekrényben 70 °C-on párologtassuk el a sósavat és maradék vizet, majd adjunk hozzá 100-150 µl desztillált vizet.

3. Mivel az így kapott lizátum sejtörmelékét is tartalmaz, végezzünk további tisztítást 1 ml-es pipettahegy és aktív szénpor segítségével. Ehhez tegyük a pipettahegybe szűrőpapírt, és erre rétegezzük rá az aktív szenet, majd szűrjük át rajta a lizátumot.

4. A tisztított lizátumot vékonyréteg kromatográfiásan elemezzük (futtató elegy ld. függelék). Standard oldatok: (a) galaktóz, arabinóz, xilóz (mind 1 m/V% végkoncentrációban), (b) ramnóz, mannóz, glükóz, ribóz (mind 1 m/V% végkoncentrációban), ugyanazon rétegen, külön oldatban felvive.

5. Az előhívást végezzük savas anilin ftaláttal, 100 °C-on, 4 percig.

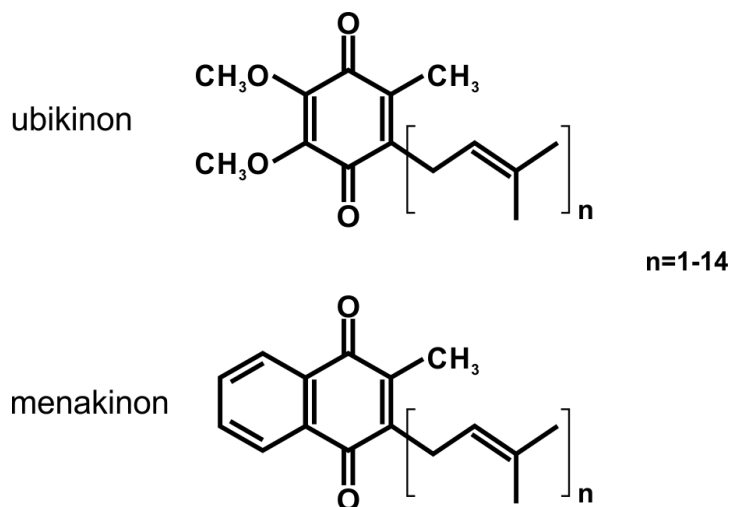
6. Értékeljük ki és hasonlítsuk össze a különböző baktériumtörzsek vizsgálatának eredményeit (59. ábra).



59. ábra A retenciós faktor (R_f) meghatározása vékonyréteg kromatográfia esetében

6.5.1.1 Membrán markerek elemzése

Az **izoprenoid kinonok** elsődleges szerepe a légzési elektrontranszportban van, mint mobilis elektron- és protonszállító molekulák (60. ábra). Kimutatták azonban, hogy a baktériumok az elektrontranszportlánc többi tagjához képest többszörös mennyiségben tartalmaznak kinonokat, így ezen molekuláknak más szerepet is tulajdonítanak (valószínűsíthető, hogy pl. aktív transzport folyamatokban, spóráképzésben is részt vesznek). Kémiai szerkezetük alapján megkülönböztetjük a naftokinon és a benzokinon típusú vegyületeket. Naftokinonokhoz a fillokinonokat és a menakinonokat soroljuk, míg a benzokinonok két osztályát a plasztokinonok, illetve az ubikinonok alkotják. Ezen vegyületek közül kemotaxonomiai szempontból a menakinonok és az ubikinonok bírnak nagy jelentőséggel, mivel ezek a baktériumok között széles körben és nagy variabilitással fordulnak elő (lásd 99. GYAKORLAT).



60. ábra A menakinonok és ubikinonok általános szerkezete

A kinonanalíziselelsősorban nagyobb taxonok (család, rend, nemzetség) közötti hasonlóságot vagy különbséget lehet demonstrálni. Az élővilágban való gyakori előfordulásuk miatt az ubi- és menakinonok vizsgálata terjedt el: az ubikinonok általánosan előforduló vegyületek az állatok, növények és a mikroorganizmusok körében, baktériumok közül a Gram-negatív szervezetek termelik. Az ubikinonok variabilitása kisebb mértékű, leginkább az izoprén oldallánc hosszában találunk különbséget. Menakinonok csak a baktériumokban (Gram negatív szervezetek egy része, Gram pozitív baktériumok) és az Archaeakban fordulnak elő. A menakinonok variabilitása megnyilvánulhat a gyűrűs molekularész és az izoprén oldallánc változatosságában is. Az oldallánc 1-től 14 izoprén egységből épülhet fel, a kettőskötések telítődhetnek is, ami további változatosságot eredményez. Ritkábban az izoprén egységek gyűrűvé záródása, valamint különböző szubsztituensek is megfigyelhetők az oldalláncon és a gyűrűs molekularészen is.

99. GYAKORLAT

Kinonok kimutatása baktériumtörzs tenyészetből

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Arthrobacter variabilis 24 órás tenyésze
Escherichia coli 24 órás tenyésze
Pseudomonas fragi 24 órás tenyésze
Brevibacterium linens 24 órás tenyésze
Nocardioides hungaricus 24 órás tenyésze
ismeretlen baktériumtörzs 24 órás tenyésze

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

oldószerek (metanol, kloroform, hexán, dietil éter, acetonitril, izopropanol)
mágneses keverő
futtató kád
Kieselgel 60 F₂₅₄vékonyréteg kromatográfiás lap
vákuumbepárló készülék
K₂ vitamin és Q10 standardok
HPLC készülék
asztali centrifuga
szűrővel ellátott Eppendorf csövek
pipettahegyek

A vizsgálat menete

1. A baktériumok kinonmolekuláinak meghatározásához az adott törzsek standard körülmények között (lehetőség szerint 25 °C-on, maximális aeráció mellett) tenyésztett (a tenyészet késői log fázisában lévő), legalább 300 mg liofilizált biomásszája szükséges. (A bakteriális kinonok a sejtekben hőre még kevésbé érzékenyek, mint izolált állapotban, ezért a baktériumokat autoklavozással előljük. A centrifugált (3000 g, 15 perc) biomásszát 2 x 10 ml desztillált vízzel mossuk, majd a tiszta baktériumtömeget liofilizálással teljesen vízmentesítjük.) A liofilizált biomásszát feliratozzuk a baktériumtörzsek jelzésével. Ezt a jelzést a preparálás során mindvégig minden újab csőbe történő átvitelkor megőrizzzük.

2. A lipid komponenseket a következő lépésben zsíroldőszerrerl nyerjük ki. A mintákat kloroform : metanol 2 : 1 térfogat arányú elegyében kevertetjük (4 °C-on, sötétben, 16 óráig).

3. Az így kapott szuszpenziót a sejtörmelék eltávolítása céljából szűrjük át szűrőpapíron (Whatman), majd töményítés céljából pároljuk szárazra vákuumbepárló készülékkel. A párlási maradékot nyerjük vissza 1 ml kloroform : metanol (2 : 1 térfogat arányú) elegyben.

4. Ezután a mintákat tisztítsuk vékonyréteg kromatográfiával (Kieselgel 60 F₂₅₄, futtató elegy ld. függelék), standard oldat: K₂-vitamin, elúciós idő: kb. 1 óra). A vékonyrétegen a

menakinonok és az ubikinonok egymástól is és a többi lipid vegyülettől is elválnak. Azonosításuk retenciós faktoruk alapján történik UV fényvel való megvilágítás segítségével: a kinonok ugyanis ilyen körülmények között a szilikagél rétegben található fluoreszcens indikátor miatt szürke színnel tűnnek elő. Átlagos retenciós faktoruk az alkalmazott oldószerben: $R_{f(MK)} : 0.8$, $R_{f(Q)} : 0.3$.

5. A vékonyréteg kromatográfiával azonban a kinonmolekulák összetételének pontos meghatározása nem lehetséges, ezért a megfelelő foltokat a kromatogramról kaparjuk le, majd az így kapott mintákat oldjuk vissza 1 ml acetonitril : izopropanol 65 : 35 térfogat arányú elegyében (4 °C-on, sötétben, 8 órán át).

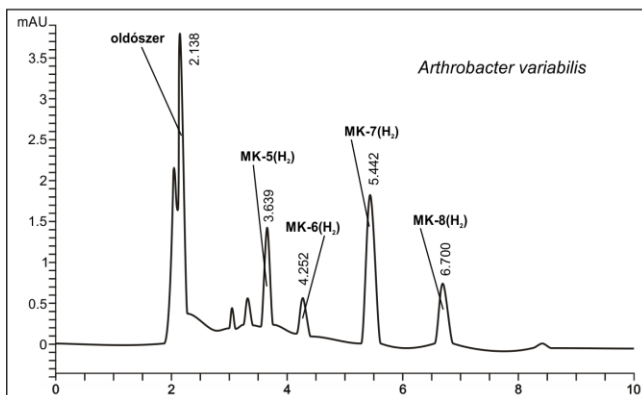
6. Szűrővel ellátott Eppendorf csövekben 3000 g-n 3 perc centrifugálás után (szilikagél eltávolítása) az oldatot analizáljuk HPLC-vel (HP 9001 készülék, oszlop: ODS Spherisorb, 250 mm x 4.6 mm id., eluens: acetonitril-izopropanol 65-35 térfogat arányú elegye, áramlási sebesség: 1300 ml/perc, oszlop nyomása 88 bar, hőmérséklete: 30 °C). A kinon molekulák és az oszlop apoláros, C-18 (oktadecil) láncai, illetve az oldószer szintén apoláros molekulái között (direkt fázis) megosztásos egyensúlyi folyamatok alakulnak ki. A retenciós időt elsősorban a vizsgált molekula apolaritása határozza meg, azonos apolaritású molekulák esetében pedig a funkciós csoport polaritása dönt, így a hosszabb, telítettebb izoprén láncú kinonok retenciós ideje lesz a nagyobb. A detektáláshoz használjunk diódasor detektort 270 nm-en, ezen a hullámhosszon mind a két típusú molekula erős abszorpciót mutat.

7. A kapott kromatogramok kiértékeléséhez autentikus baktériumtörzsek ismert kinonösszetétele jelent segítséget, valamint az a tény, hogy a baktériumok általában a kinonmolekulák homológ sorait termelik (ugyanazon izoprénegység számú, de eltérő telítettségű, illetve azonos telítettségű, de eltérő izoprén egység számú vegyületek). A retenciós idők logaritmusai és az izoprén oldallánc egységeinek száma között lineáris összefüggés áll fenn (61. ábra), így tehát egy homológ sorhoz tartozó csúcsok retenciós idejének logaritmusát ábrázolva egyenest kapunk, ami szintén segíti a csúcsok azonosítását, mivel kereskedelmi forgalomban standard kinonoldatok nem, vagy csak korlátozottan hozzáférhetők. Értékeljük ki és hasonlítsuk össze a különböző baktériumtörzsek vizsgálatának eredményeit.

A **poláris lipidek** amfipatikus molekulák – a hidrofób lipid (zsírsav-glicerin-észter) kovalensen egy hidrofil csoporthoz kapcsolódik, a glicerin harmadik hidroxil-csoportját ez észteresíti. Heterogén molekulacsoport, hiszen a glicerinhez sokféle molekula kapcsolódhat. Legközönségesebb molekulák a glicerofosfolipidek PG (foszfátidil-glicerol) és DPG (difoszfátidil-glicerol, pl. kardiolipin). A foszfáthoz azonban további csoportok is kötődhetnek: aminosav, poliál, inozitol-származékok pl. PE (foszfátidil-etanolamin), PC (foszfátidil-kolin), PS (foszfátidil-szerin).

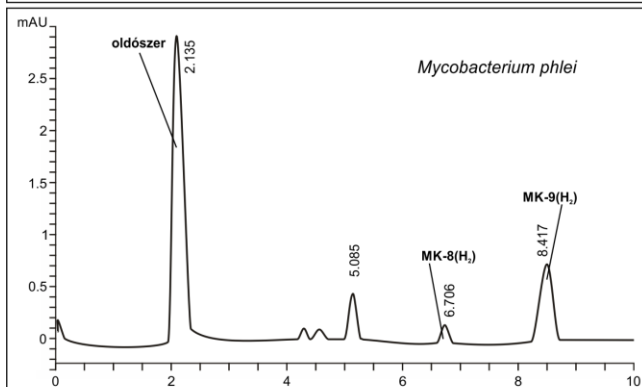
Kimutatásuk és meghatározásuk a sejtől történő izolálást követően kétdimenziós vékonyréteg kromatográfiával történik (lásd 100. GYAKORLAT).

KÜLÖNBÖZŐ BAKTÉRIUM FAJOK
STANDARDKÉNT HASZNÁLHATÓ, AZONOSÍTOTT CSÚCSOKAT TARTALMAZÓ KROMATOGRAMJAI



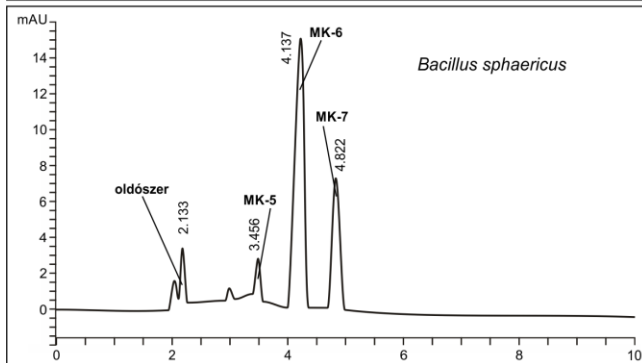
$t_0 = 2,138$

ismert csúcsok	teljes retenciósi idő (t_R)	nettó retenciósi idő ($t_R' = t_R - t_0$)
MK-5(H ₂)	3,639	1,501
MK-6(H ₂)	4,252	2,114
MK-7(H ₂)	5,442	3,284
MK-8(H ₂)	6,700	4,562



$t_0 = 2,135$

ismert csúcsok	teljes retenciósi idő (t_R)	nettó retenciósi idő ($t_R' = t_R - t_0$)
MK-8(H ₂)	6,706	4,571
MK-9(H ₂)	8,417	6,282

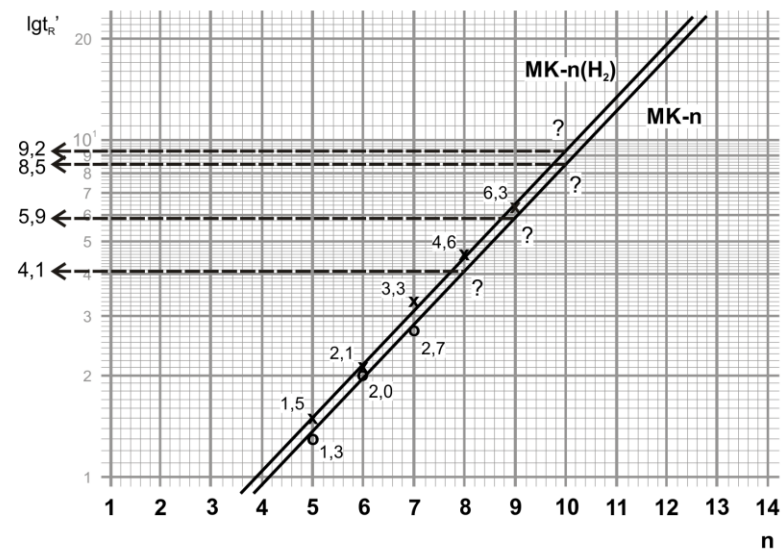


$t_0 = 2,133$

ismert csúcsok	teljes retenciósi idő (t_R)	nettó retenciósi idő ($t_R' = t_R - t_0$)
MK-5	3,456	1,323
MK-6	4,137	2,004
MK-7	4,822	2,689

STANDARDOKBAN NEM SZEREPLŐ CSÚCSOK
VÁRHATÓ t_R' -ÉRTÉKÉNEK MEGHATÁROZÁSA

azonos telítettségi fokú menakinonok: közel **lineáris** kapcsolat
nettó retenciósi idők logaritmusai és izoprén egységek száma között →
szemilogaritmikus papíron ábrázolva →
menakinon homológ sorok: párhuzamos egyenesek

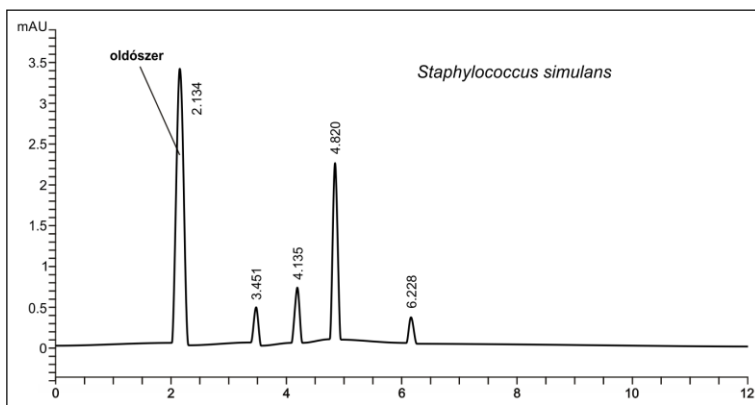


standard csúcsok között nem szereplő tag várható t_R' -értékének meghatározása **extra- vagy interpolációval***

MK-n(H ₂) homológ sor	várható t_R'	MK-n homológ sor	várható t_R'
MK-5	1,3	MK-5(H ₂)	1,5
MK-6	2,0	MK-6(H ₂)	2,1
MK-7	2,7	MK-7(H ₂)	3,3
MK-8	4,1*	MK-8(H ₂)	4,6
MK-9	5,9*	MK-9(H ₂)	6,3
MK-10	8,5*	MK-10(H ₂)	9,2*

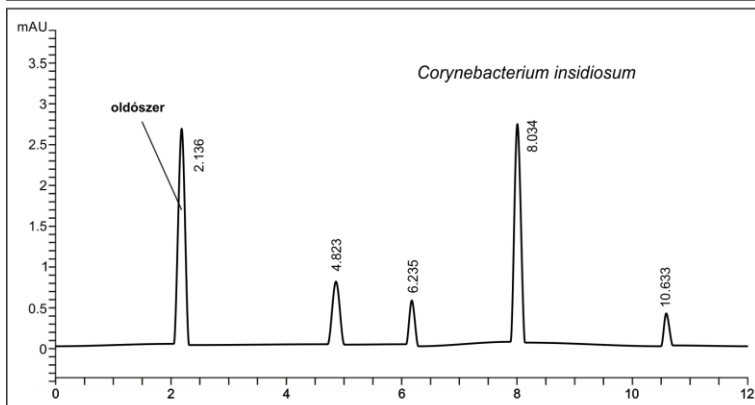
KÜLÖNBÖZŐ BAKTÉRIUM FAJOK
ISMERETLEN CSÚCSOKAT TARTALMAZÓ KROMATOGRAMJAI

CSÚCSOK AZONOSÍTÁSA A HOMOLÓG SOROK
VÁRHATÓ t_R ÉRTÉKEI ALAPJÁN



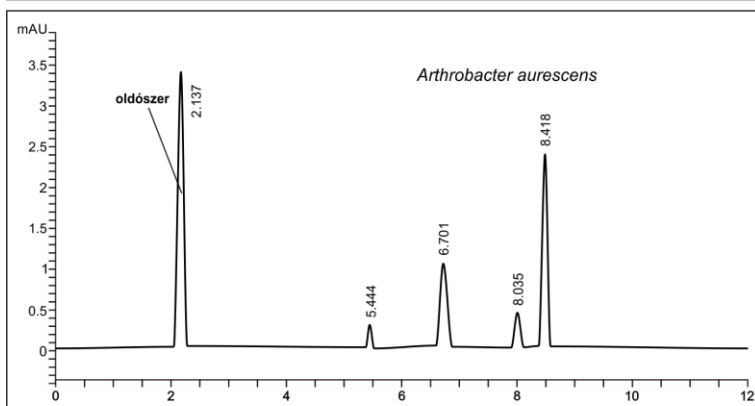
$t_0=2,134$

teljes retenciósi idő (t_R)	nettó retenciósi idő ($t_R' = t_R - t_0$)	azonosított csúcsok
3,451	1,317	MK-5
4,135	2,001	MK-6
4,820	2,686	MK-7
6,228	4,094	MK-8



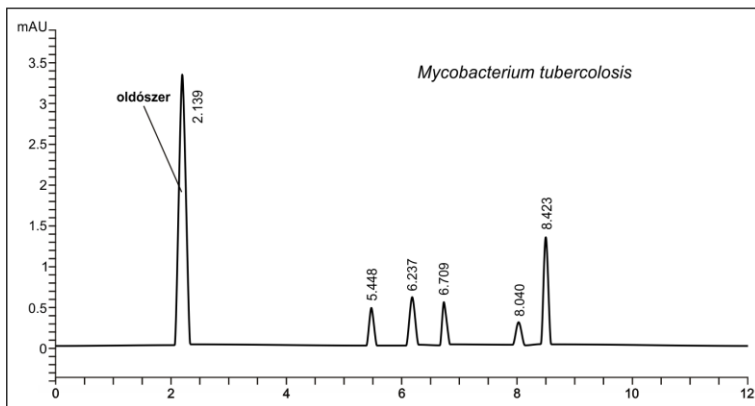
$t_0=2,136$

teljes retenciósi idő (t_R)	nettó retenciósi idő ($t_R' = t_R - t_0$)	azonosított csúcsok
4,823	2,687	MK-7
6,235	4,099	MK-8
8,034	5,898	MK-9
10,633	8,497	MK-10



$t_0=2,137$

teljes retenciósi idő (t_R)	nettó retenciósi idő ($t_R' = t_R - t_0$)	azonosított csúcsok
5,444	3,307	MK-7(H₂)
6,701	4,564	MK-8(H₂)
8,035	5,898	MK-9
8,418	6,281	MK-9(H₂)



$t_0=2,139$

teljes retenciósi idő (t_R)	nettó retenciósi idő ($t_R' = t_R - t_0$)	azonosított csúcsok
5,448	1,317	MK-5(H₂)
6,237	2,001	MK-6(H₂)
6,709	2,686	MK-7(H₂)
8,040	4,094	MK-8(H₂)
8,432	6,293	MK-9(H₂)

61. ábra Kínómolekulák meghatározása autentikus baktériumok kinonprofilja alapján

100. GYAKORLAT

Poláris lipidek kimutatása baktériumtörzs tenyészetből

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Escherichia coli tenyészet
Brevibacterium linens
Nocardioides hungaricus Rich tápagaron
ismeretlen baktériumtörzs tenyészet

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

Rich tápleves
átfordulós kémcsőkeverő
asztali centrifuga
csavarkupakos kémcsövek
oldószerek (kloroform, metanol, ecetsav, alt.)
Pasteur pipetta
vákuumbepárló készülék
vékonyréteg kromatográfiás lemez (HPTLC szilikagél 10x10)
ninhidrin reagens (0,2 m/V %-os 1M butanolban készült oldat)
hevítő lap

A vizsgálat menete

1. A baktériumok Rich táplevesben 24-48 órán át tenyésztett kultúráit liofilizáljuk a kinonok vizsgálatánál leírt módon (lásd 99. GYAKORLAT), a liofilizátumokat tartalmazó csöveket feliratozzuk. 50 mg liofilizált biomasszát 4 órán át kevertessünk átfordulós kémcsőkeverővel 6,75 ml reakcióelegyben (ld. függelék) feliratozott csavarkupakos kémcsövekben.

2. Ezt követően centrifugáljuk a mintát, majd a felülúszót elegyítsük 1,75 ml kloroformmal és 1,75 ml 0,3 m/V %-os NaCl oldattal, és kézi rázással képezzünk belőle emulziót. A fázisok szétválásáig a csöveket helyezük hűtőszekrénybe.

3. Az alsó fázist szívjuk le Pasteur pipettával egy tiszta csavarkupakos kémcsőbe, majd szárítsuk meg rotációs bepárlóval. Az anyagot ezután oldjuk 100 µl kloroform : metanol 2:1 arányú elegyében, amelyből 10 µl-t vigyünk fel vékony réteg kromatográfiás lemezzel alsó sarkába, majd a foltot szárítsuk meg.

4. A vékonyréteg kromatográfiát két dimenzióban végezzük el: 1. dimenzió: kloroform : metanol : desztillált víz 65 : 25 : 4 térfogat arányban; 2. dimenzió: kloroform : metanol : ecetsav : desztillált víz 80 : 12 : 15 : 4 arányú elegyében, közben a réteget hajszárítóval szárítsuk meg.

5. A foltok előhívása 3 lépésben történik, először ninhidrin reagenssel (lásd 97. GYAKORLAT, DAP kimutatása) az amino csoportot tartalmazó poláris lipidek hívhatók elő, molibdén kék oldatos kezelés után a foszfolipidek jelennek meg, végül 180-300 °C-os, hevítő lapon történő kezelés hatására a korábban már előtűnt foltok mellett a glikolipidek is kimutathatók. Pontos azonosításuk standard oldatok és az irodalmi adatokkal történő összehasonlítással válik lehetségessé (59. ábra).

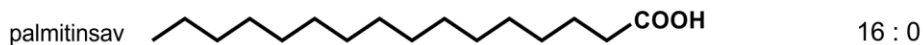
6. Értékeljük ki és hasonlítsuk össze a különböző baktériumtörzsek vizsgálatának eredményeit.

A mikrobiológiában a **zsírsavak**nak két fontos frakcióját kell elkülönítenünk. A rövid szénláncú (C1-6) zsírsavak főleg anyagcsere-folyamatok közti- és végtermékeként jelennek meg, legjellemzőbben a fermentációs folyamatokban (pl. vegyes savas fermentáció). Így ezek vizsgálatával a mintában lezajló/lezajlott anyagcsere-folyamatokra, fermentáció típusokra következtethetünk (lásd 101. GYAKORLAT és 102. GYAKORLAT).

A hosszú szénláncú zsírsavak (C12-20) strukturális elemek (62. ábra): a zsírsavak a poláris lipidekben a sejtmembránok fontos lipid-alkotói (foszfolipidek) mind pro-, mind eukarióta sejtekben, a Gram-negatív baktériumok lipopoliszacharid-rétegében is előfordulnak (pl. lipid-A) valamint megtalálhatók a Gram-pozitív baktériumok sejtfalában, mint lipoteichosavak. A baktériumok foszfolipid-zsírsavai (PLFA) rendszertani információt hordoznak. Általánosságban elmondható, hogy azonos fajba tartozó baktériumok azonos táptalajon, és megegyező környezeti feltételek (pl. pH, hőmérséklet, oxigénviszonyok) között ugyanazokat a zsírsavakat termelik, hasonló arányban. Eltérő tenyészfeltételek mellett viszont a termelt zsírsavak aránya megváltozik, ez a környezeti feltételekhez való alkalmazkodás egyik formája (membrán fluiditás változik). Rokon fajok azonos nemzetségen belül gyakran ugyanazon zsírsavakat eltérő arányban termelik. A zsírsavak változatosságát a szénlánc hossza, ill. telítettsége, az azon lévő metil- (pl. iso, anteiso) vagy oxigén-gyökök szubsztitúciója (pl. epoxi, hidroxil), esetleg gyűrűvé záródások (pl. ciklopropán-zsírsavak) adják (63. ábra és 64. ábra).

Egyenes szénláncú zsírsavak

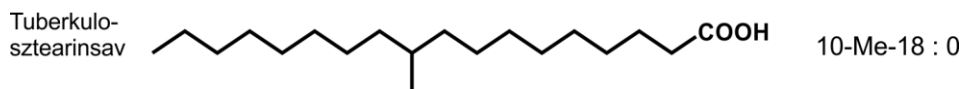
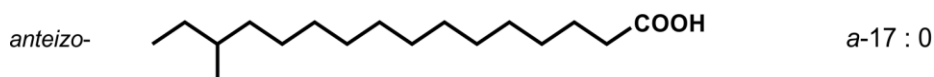
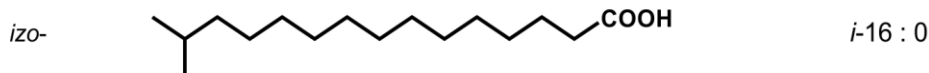
telített



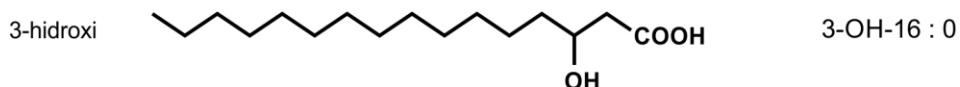
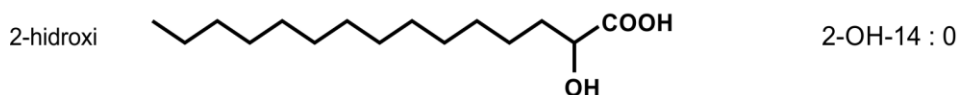
telítetlen



Elágazó szénláncú zsírsavak



Hidroxi zsírsavak

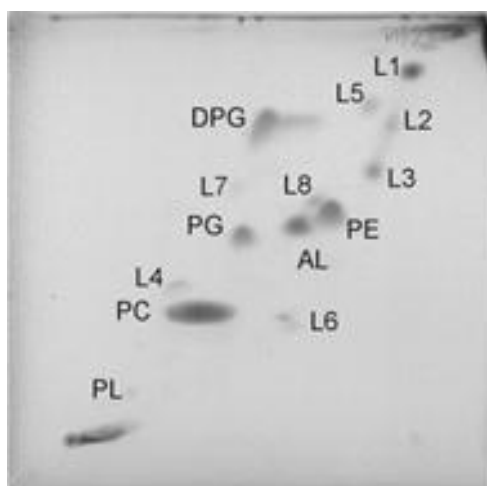


62. ábra A baktériumok leggyakoribb zsírsavtípusai

A membránzsírsavak összetétel elemzése és mennyiségi mérése gázkromatográfiával történik, metilált, azaz zsírsav-metilészter (FAME) formában. A volatilis zsírsavak kimutatásához szintén gázkromatográfot használhatunk.

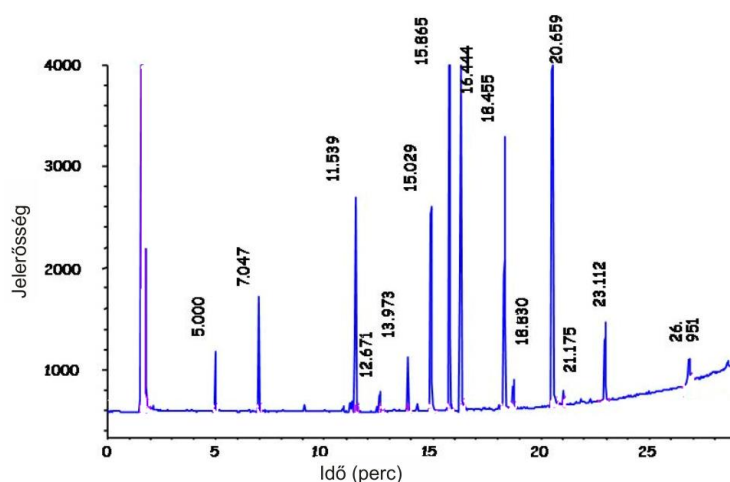
Gázkromatográf felhasználásakor a volatilizált mintát hordozó gázhoz (mobil fázis) adva, a minta komponensei a kromatográfiás oszlopra kerülnek, amely az álló fázist tartalmazza. Az oszlopon a komponensek az álló fázissal való interakciók következtében visszatartódnak. A szeparált komponensek a detektorba jutnak) és kromatográfiás csúcsokként jelennek meg, ahol, a görbe alatti terület az anyag koncentrációjával arányos.

A minta megoszlása a stacioner és mobil fázis között: $K = C_s/C_m$, ahol K = megoszlási állandó; C_s = anyag koncentrációja az álló fázison; C_m = anyag koncentrációja a mobil fázison. Két komponens egymástól csak akkor választható el, ha azok különböző K értékkel rendelkeznek. Minél jobban kötődik az oldott anyag a stacioner fázishoz, annál később jön le az oszlopról. A retenciós időt (R_t) befolyásolja az alkalmazott oszlop típusa, a vivő gáz áramlási sebessége és a hőmérséklet.



63. ábra *Phreatobacter oligotrophus* baktérium PI_31 törzsének poláris lipid profilja kétdimenziós vékonyréteg kromatográfiát követően (Fotó: Tóth E.)

PG: foszfátidil glicerol, DPG: difoszfátidil glicerol, PE: foszfátidil etanolamin, PC: foszfátidil kolin, L1-9: ismeretlen lipidek, AL: ismeretlen aminolipid, PL: ismeretlen foszfolipid



64. ábra Egy baktériumtörzs zsírsav metilészter mintázata

A gázkromatográfiával készült profilban az egyes zsírsavakhoz tartozó csúcsokat „bakteriális metilészter külső standard” párhuzamos vizsgálatával azonosíthatjuk.

A baktériumok citoplazma membránjának zsírsavai relatíve egyszerű szerkezetűek. A leggyakoribbak az egyenes láncok telített, egyszeresen telítetlen, illetve egy metilcsoportot tartalmazó változatai. A szénlánc hossza, telítettségének mértéke, és a kettős kötés pozíciója

taxonómiai, valamint a metilcsoport elhelyezkedése (ha van) jelentőséggel bír (lásd 101. GYAKORLAT). A zsírsavak kimutatásának folyamata összesen négy lépésből áll: zsírok elszappanosítása (sejtek lízise, zsírsavak felaszabodítása az egyéb sejtből található zsírokból), zsírsavak észteresítése (zsírsavak metil-észterének kialakítása), extrahálás (a zsírsav-metil-észterek vizes fázisból szerves fázisba történő átvitele), végül az extraktum tisztítása (a szerves fázis lúgos mosása).

101. GYAKORLAT

Membrán zsírsavak kimutatása baktériumtörzs tenyészetből

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Arthrobacter variabilis logaritmusos szaporodási fázisú tenyészet TSA tápagon

Escherichia coli logaritmusos szaporodási fázisú tenyészet TSA tápagon

Pseudomonas fragi logaritmusos szaporodási fázisú tenyészet TSA tápagon

Brevibacterium linens logaritmusos szaporodási fázisú tenyészet TSA tápagon

Nocardioideus hungaricus logaritmusos szaporodási fázisú tenyészet TSA tápagon

ismeretlen baktériumtörzs logaritmusos szaporodási fázisú tenyészet TSA tápagon

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

TSA tápaga

előre elkészített reagensek (1-4)

kémcsőkeverő (vortex)

zsírtalanított, csavarkupakos kémcsövek

vízfürdő

jégháza

Pasteur pipetták

1 ml-es zsírtalanított tárolócsövek

Hamilton fecskendő

gázkromatográf

BAME standard oldat (kereskedelmi forgalomban kapható)

A vizsgálat menete

1. A vizsgálathoz TSA agaron, 28 °C-on növesztett logaritmusos szaporodási fázisú tenyészeteket (legstabilabb zsírsav összetétel a szaporodás log fázisában) alkalmazzunk (az analízishez az ily módon tenyésztett sejtek nedves, illetve liofilizált kultúrái is használhatók). Az alkalmazott csöveket minden esetben a törzs jelzésének megfelelően feliratozzuk.

2. A liofilizált tenyészet 0,1 mg-jához vagy a nedves tenyészet néhány kacsnyi mennyiségéhez (teflonkupakos csövekben) adjunk 1 ml-nyi mennyiséget az 1. reagensből, vortexeljük össze, majd a tesztcsövet helyezük 5 percre 100 °C-os vízfürdőbe.

3. Újabb vortexelés után még egyszer tegyük 25 percre a vízfürdőbe, majd hirtelen hűtsük le.

4. Ezután adjunk hozzá 2 ml-nyi mennyiséget a 2. reagensből, vortexeljünk, majd tartsuk 10 percig 80 °C fokos vízfürdőben, és ismét hirtelen hűtsük le.

5. A metilációs folyamat után adjunk hozzá 1,25 ml-nyi mennyiséget a 3. reagensből (fázis szeparáció) és átfordulós kémcsőkeverővel kevertessük 10 percen át.

6. Ezután az alsó fázist távolítsuk el Pasteur pipettával (későbbiekben már nincs rá szükség). A felső (szerves) fázishoz adjunk 3 ml-nyi mennyiséget a 4. reagensből és kevertessük 5 percig. A felső fázis 1 µl-ét analizáljuk közvetlenül gázkromatográffal (közvetlen injektálás Hamilton fecskendő segítségével). Standardként BAME (bakteriális

metil észter) oldatot használunk, az ismeretlen csúcsok azonosítása retenciós idejük alapján történik a standard csúcsok alapján. (A kromatográfiás körülményeket a függelékben tüntettük fel).

7. A zsírsav metil észterek tárolása 1ml-es üvegcsövekben, -20 °C-on néhány hétig megoldható).

8. Értékeljük ki és hasonlítuk össze a különböző baktriumtörzsek vizsgálatának eredményeit.

6.5.1.2 Illékony fermentációs anyagcsere végtermékek vizsgálata

A **rövid szénláncú (C1-6) zsírsavak** a fermentációs folyamatok közti- és végtermékei, így kimutatásukkal a lejátszódó(tt) fermentációs lépések vizsgálhatók (lásd 102. GYAKORLAT). Ennek segítségével az egyes szervezetek által fermentációs útvonalai térképezhetőek fel, gyakorlati alkalmazása pedig az élelmiszeripar több ágazatában is rutinszerű.

A fermentációs végtermékek vizsgálata elsősorban az anaerob baktériumok klasszifikációjánál nyújt jelentős segítséget. Különböző fermentációs típusok ismertek és ezek jellemzőek az adott taxonómiai csoportokra. A gyakorlat során baktériumok tenyészteteinek, valamint élelmiszer minták (pl. sajtok) volatilis fermentációs végtermékeinek meghatározására kerül sor.

102. GYAKORLAT

Baktérium tenyészetek és élelmiszerek illó zsírsavtartalmának meghatározása

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

anaerob baktériumtörzsek tenyésztete tioglikolát táplevesben
különböző érlelésű sajtok

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

tioglikolát tápleves
Eppendorf csövek
kémcsőveverő (vortex)
50 %-os kénsav oldat
t-butil-metil-éter oldat
CaCl₂
Hamilton fecskendő, gázkromatográf

A vizsgálat menete

1. A csöveket a mintáknak megfelelően feliratozzuk. 0,5 ml-nyi táplevest vagy 3 g sajt-mintát (Pálpusztai, Ementáli stb.) tegyünk Eppendorf csőbe és adjunk hozzá 0,05 ml 50%-os H₂SO₄ oldatot, majd 0,5 ml t-butil-metil-étert.

2. Kb. 20-szor rázzuk össze (vagy 5-10 másodpercig vortexeljük), majd az emulzió megtörésére röviden centrifugáljuk.

3. A felső (éteres) fázist töltsük egy tiszta Eppendorf csőbe, majd fagyasszuk ki mélyhűtőben -20 °C-on az éteres fázist szennyező vizet.

4. A folyadékfázist töltsük át egy tiszta Eppendorf csőbe és a teljes víztelenés érdekében adjunk hozzá néhány szem vízmentes CaCl₂ szemcsét.

5. Az éteres fázisból injektáljunk 1 µl-nyi mennyiséget töltött GC oszlopra.

6. Végezzük el a gázkromatográfiás mérést.

7. Értékeljük ki és hasonlítuk össze a különböző baktriumtörzsek illetve élelmiszer minták vizsgálatának eredményeit.

6.5.2 16S rDNS bázissorrend homológián alapuló mikrobiális fajmeghatározás

Ismeretlen baktériumtörzsek faji szintű meghatározásának egyik legkevésbé ellentmondásos módszere a 16S rRNS gén bázissorrendjének elemzése. Ennek lépései: DNS izolálás (lásd 103. GYAKORLAT), a 16S rRNS gén szaporítása univerzális kezdőszekvenciák (primerek) segítségével (PCR) (lásd 104. GYAKORLAT), az ampikon bázissorrendjének meghatározása (szekvenálása) (lásd 106. GYAKORLAT), a szekvencia összehasonlítása adatbázissal (lásd 157. GYAKORLAT).

6.5.2.1 DNS kivonása

A **DNS izolálás** két részre bontható. Első lépésben fel kell tárnunk a sejteket és oldatba vinni a DNS-t, az így kapott terméket nevezzük nyers lizátumnak. Míg a második, tisztítási lépésben el kell választanunk a DNS-t a többi molekulától, sejttörmeléktől.

A sejtfeltárást kémiai, biológiai és fizikai módszerekkel, illetve ezek kombinációjával végezhetjük. Biológiai módszer az enzimatis emésztés (proteáz, Gram pozitív baktériumok esetén lizozim, élesztők esetén litikáz). Kémiai feltárást a tömény lúggal (NaOH, KOH – segít felnyitni a sejtfalet), detergenssel (SDS – szétbontja a sejtmembránt) való kezelés. A fizikai feltárások közé tartozik a késes homogenizátor, a sejtmalom, a dörzsoszárban való folyékony nitrogénes homogenizálás, a sejtek kisméretű résen, adott nyomáson történő átpréselése („French press”) és a magas hőmérsékleten történő sejtroncsolás (pl. 98 °C, 5 perc) alkalmazása.

A DNS szennyeződésektől való megtisztításának számos módszere létezik. Az egyik legegyszerűbb a kisózás, amikor nagy koncentrációjú sókkal csapjuk ki a DNS-t, fehérjéket és egyéb szennyező anyagokat, majd a DNS-t etanolos precipitációval nyerjük vissza. Az eljárás hatékonysága változó.

Szerves extrakció esetén a sejtlyizátumhoz 1:1 arányban fenol, kloroform vagy izoamilalkohol, vagy ezek különböző arányú keverékét adjuk hozzá, majd centrifugálás után a DNS-t a vizes fázisból etanolos precipitációval nyerjük vissza. A módszer nagy hatékonysággal távolítja el a szerves sejtkeletkezőket, szennyeződések, hátránya azonban, hogy időigényes, nem automatizálható és veszélyes hulladékok keletkeznek.

Régebben elterjedt volt a CsCl gradiens centrifugálás, elsősorban a különböző méretű genomok (eukarióták esetén organellumok genomjai is), plazmidok elválasztására. A nyers lizátumot először etanol segítségével csapadékba vitték, majd azt etidium-bromidos festés mellett egy CsCl oldatban centrifugálták, ahol a különböző méretű nukleinsavak a kialakuló sűrűség-gradiensnek megfelelően méret szerint elváltak. A megfelelő zónából a nukleinsavakat vissza lehetett nyerni. Az etidium-bromidtól izopropanollal tisztították meg a nukleinsavakat, végül az utolsó lépésben itt is etanolos precipitációt alkalmaztak. A módszer megóvja a nukleinsavakat az apró darabokra való töredezésétől, alkalmazása során nagyon nagy tisztaságú nukleinsav keletkezik, viszont az eljárás hosszadalmas, megfelelő szaktudást és speciális felszerelést igényel, emellett veszélyes hulladék keletkezik.

A „szilikát alapú” módszerek a DNS szilikát gélhez való szelektív kötődésén alapulnak, ami kaotrópikus sók (pl. nátrium-perszulfát, lítium-klorid) nagy koncentrációja („kötő puffer”) mellett valósul meg. Ezt követi az RNS, a kis fragmentumok és a sók lemosása, majd a DNS eluálása valamilyen kis só koncentrációjú pufferrel. A módszer gyors, etanol precipitációt nem igényel, sőt etanol precipitáció helyett is használható. Ily módon tiszta, kis fragmentumoktól mentes DNS-t állíthatunk elő, de nagyon nagyméretű DNS tisztítására nem alkalmas. Utóbbi módszert gyakran alkalmazzák az ún. DNS-izoláló kitekben, melyekben a gyártó egy dobozba rakja össze a folyamathoz szükséges összes anyagot.

A DNS kivonása során a legfontosabb követelmény a megfelelő minőségű DNS előállítás. A gyenge minőségű DNS ugyanis tartalmaz egyéb sejtalkotókat (pl. fehérjéket,

membrándarabokat), a DNS kivonás során a mintába kerülő szennyeződések (pl. sókat, fenolos vegyületeket, etanolt, detergenset), amelyek gátolhatják a további alkalmazásokat.

A DNS tisztaságát spektrofotométerrel ellenőrizhetjük, a 260 és a 280 nm-en mért fény abszorpciójának hányadosával, ami nagy tisztaság esetén 1,6-1,8 körüli értéket ad.

Figyelni kell a kiindulási minta mennyiségére, amely érték függ a sejtek DNS tartalmától is. Az ajánlott sejtszámok baktériumoknál 10^9 , élesztőknél 10^7 , míg állati sejtenyészetnél 10^6 darab sejt.

A DNS-kivonás eredményességét agaróz gélelektroforézissel ellenőrizhetjük. A DNS-t mélyhűtőben (-20°C) kell tárolni, hogy minél lassabban degradálódjon.

103. GYAKORLAT

DNS izolálása és tisztítása baktériumtenyészetekből

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismeretlen baktériumtörzs tenyészet ferde agaron

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

oltókacs

pipetták, steril pipettahegyek

Eppendorf csövek, csőtartók

0,5 M-os NaOH oldat

1 M-os TRIS (tris-hidroximetil-aminometán) puffer

kémcsőkeverő (vortex)

sejtmalom

Eppendorf centrifuga

PCR készülék

vízfürdő

depcH₂O

steril üveggyöngy

mikrospatula

DNS izoláló kit (kereskedelmi forgalomban kapható)

laboratóriumi mérleg

gélöntő forma

gélfuttató kád

agaróz

1 x TBE-oldat

mikrohullámú sütő

DNS-festék

töltőpuffer

parafilm

DNS molekulásúly Marker 3 (65. ábra, kereskedelmi forgalomban kapható)

A vizsgálat menete

1. A NaOH-os sejtfeltáráshoz (1-3. pont) 1,5 ml-es steril, a baktériumtörzs nevével feliratozott Eppendorf csőbe mérjük 25 μl 0,5 M-os NaOH oldatot.

2. Szuszpendáljuk bele egy kacsnyi baktériumot, alaposan keverjük össze, majd inkubáljuk 15 percig szobahőmérsékleten.

3. Az inkubációs idő lejártá után mérjük hozzá 25 μl 1 M-os TRIS (tris-hidroximetil-aminometán) puffert (pH 8), majd 300 μl depcH₂O-t. Az izolált DNS-t ellenőrizzük agaróz gélelektroforézis segítségével (9-12. pont).

4. A sejtmalmos sejtfeltáráshoz (4-7. pont) 600 μl -es steril, a baktériumtörzsek nevével feliratozott Eppendorf csőbe mérjük 2 mikrospatulányi steril üveggyöngyöt, 8 μl 1 M-os TRIS puffert (pH 8) és 100 μl depcH₂O-t.

5. Szuszpendáljunk bele egy kacsnyi baktériumot, majd sejtmalomban rázassuk 1 percig 30 Hz-en.

6. Ezt követően a csöveket centrifugában „pörgessük le” (vagyis az Eppendorf cső tartalmát gyűjtjük össze az aljára centrifugálással), majd vízfürdőben vagy PCR-készülékben denaturáljuk a nyers lizátumot 5 percig 98 °C-on.

7. Rövid vortexelés után 5 percig 10.000 g-vel centrifugáljuk a csöveket, majd a DNS-t tartalmazó felüliszót (nagyjából 70 µl) mérjük át steril, üres, a baktériumtörzsek nevével feliratozott Eppendorf csőbe. Az izolált DNS-t ellenőrizzük agaróz gélelektroforézis segítségével (9-12. pont).

8. A DNS-izoláló kit használatának lépéseit a gyakorlatvezető ismerteti. Az izolált DNS-t ellenőrizzük agaróz gélelektroforézis segítségével (9-12. pont).

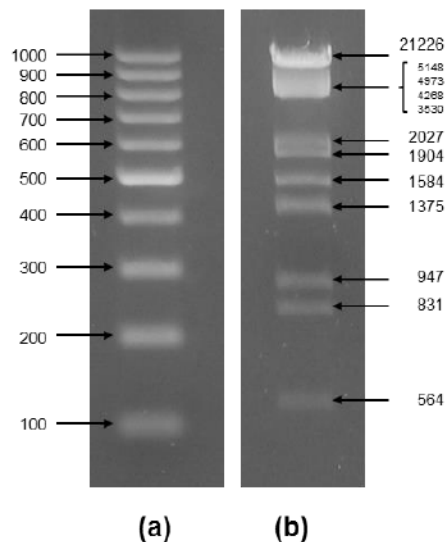
9. Az agaróz gélelektroforézis első lépéseként készítsünk 20 cm széles 25 cm hosszú 1%-os agaróz gél. Ehhez 0,8 g agarózhoz mérjük 80 ml 1x TBE oldatot. Az oldatot forraljuk fél mikrohullámú sütőben, hogy az agaróz feloldódjon, majd hűtsük le kézmelegre, és adjunk hozzá 1,5 µl DNS-festéket. Helyezzük be a fésűket a gélöntő formába, és öntsük bele az oldatot. Amíg a gél megszilárdul, töltsük fel a futtatókádát 1 x TBE oldattal.

10. A gélből annak megszilárdulása után (30-40 perc) vegyük ki a fésűket, és a gél helyezzük át a futtatókádba.

11. A DNS-mintákból 5-5 µl-t keverjünk össze 3-3 µl töltőpufferrel egy darab parafilmen, és töltsük a gél zsebeibe. A DNS méretének félkvantitatív meghatározása érdekében a minták mellé töltsünk 3 µl molekulasúly markert.

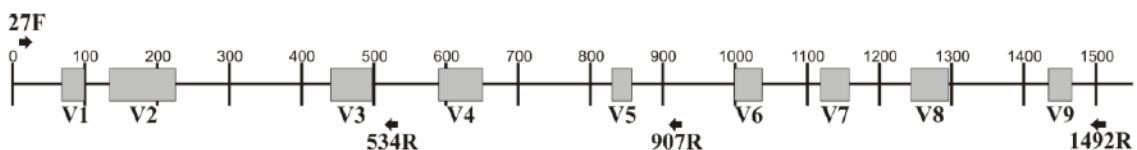
12. Az elektroforézist 100 V-on 20 percig végezzük 20 cm széles 25 cm hosszú gélben, majd a DNS jelenlétét és mennyiségét detektáljuk UV fényben.

13. Az izolált DNS-t a további felhasználásig tároljuk -20 °C-on.



65. ábra DNS méret létrák

„Marker 100” DNS létra (a) és „Marker 3” DNS létra (b) 2 %-os agaróz gélben végzett futtatásának képe.



66. ábra A 16S rRNS-t kódoló gén variábilis szakaszai és a gyakorlatokon alkalmazott PCR primerek kötődési helyei

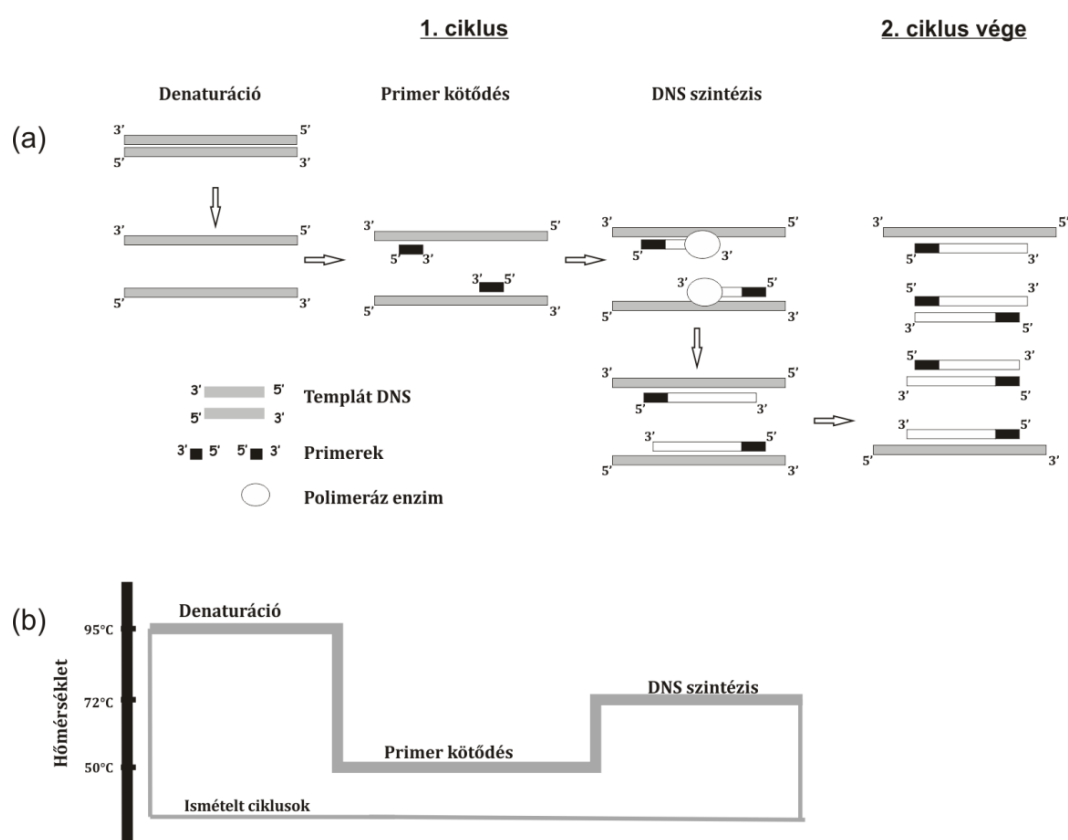
A számozás az *E. coli* referenciatörzsét követi.

A V1-V9 variábilis szakaszokat szürke mezők, a primerek kötőhelyét nyilak jelölik.

6.5.2.2 16S rRNS gén specifikus PCR

A polimeráz lánreakció (Polymerase Chain Reaction – **PCR**) révén a genomiális DNS kisebb részeit sokszorosíthatjuk (67. ábra). A folyamat három részes ciklusokból áll. A denaturáció során a magas hőmérsékletre (94-98 °C) felmelegített DNS-szálak kettéválnak. Az annealáció ideje alatt az egyszálú DNS-ek megfelelő részeihez kapcsolódik a forward és a reverz primer. Az extenzió során a *Taq* DNS-polimeráz a primer folytatásaként a reakcióelegyben jelen lévő dNTP-k beépítésével szintetizálja a kiegészítő szálát. A reakció során a két primer közt elhelyezkedő DNS szakasz exponenciálisan sokszorozódik (66. ábra).

A további lépésekhez (pl. szekvenáló reakcióhoz) esetenként a PCR terméknek a polimeráz enzimtől, be nem épült nukleotidoktól, a kiindulási genomi DNS-től és a keletkező primer-dimerektől való megtisztítása szükséges. A tisztítás elve megegyezik a DNS tisztításánál említett szilikát alapú módszerrel, annyi kiegészítéssel, hogy ebben az esetben egy adott mérettartományon (pl. 40 bp – 40 kbp) kívül eső DNS (primer dimerek és genomi DNS) elveszik a tisztítás során.



67. ábra DNS fragmentum szaporítása polimeráz lánreakcióval (PCR)

A polimeráz lánreakció folyamatának vázlatos bemutatása (a) és a hőmérséklet változása (b) a PCR ciklusok során.

104. GYAKORLAT

16S rDNS sokszorozása PCR segítségével és a PCR termék tisztítása

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismeretlen baktériumtörzsből izolált DNS

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

pipetták és steril pipettahegyek

Eppendorf csövek, csőtartók

10 x-es PCR puffer (kereskedelmi forgalomban kapható)

25 mM-os koncentrációjú MgCl₂ oldat (kereskedelmi forgalomban kapható)
 1 mM-os koncentrációjú dNTP mix (kereskedelmi forgalomban kapható)
 forward és reverz primer
 27f primer: 5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3'
 1492r primer: 5' TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3'
 1 U/μl *Taq* polimeráz (kereskedelmi forgalomban kapható)
 depcH₂O
 kémcsőkeverő (vortex)
 Eppendorf centrifuga
 PCR készülék
 PCR termék tisztító kit

A vizsgálat menete

1. A DNS mintákat és a PCR-hez szükséges reagenseket vegyük ki a mélyhűtőből.
2. Feliratozzunk 1 nagy (1,5 ml) Eppendorf csövet a PCR premixhez, valamint a DNS mintáink számánál kettővel több PCR csövet a reakciók számára. A mintaszám feletti két cső a negatív és a pozitív kontroll miatt szükséges.
3. Mérjük össze az alábbi PCR premixet a mintaszámnak megfelelő és még három (kontrollok és mérési ráhagyás) egységnyi mennyiségben. A DNS mintát ne mérjük még bele a premixbe!

A bemért reagensek neve és mennyisége (μl)	X minta esetén
10x-es PCR puffer	2,5
MgCl ₂ oldat	2,0
dNTP mix	5,0
27f primer	0,25
1492r primer	0,25
<i>Taq</i> polimeráz enzim	1,0
depcH ₂ O	kiegészítve 24-re

4. Mérjük szét a premixet 24 μl-enként a feliratozott PCR csövekbe, majd mérjük hozzá mindegyikhez 1-1 μl DNS-mintát. A negatív kontrollba ne mérjük be semmit, a pozitív kontrollba egy olyan DNS-mintából mérjük be, amellyel már korábban végeztünk sikeres PCR-t. A PCR csöveket ezután vortexeljük és röviden centrifugáljuk.
5. A PCR csöveket rakjuk be a PCR készülékbe, és az alábbi hőprofil beállítása után indítsuk el a reakciót.

PCR reakció	Hőmérséklet	Idő
Kezdeti denaturáció	98 °C	5 perc
32 ciklus	Denaturáció	94 °C
	Anneláció	52 °C
	Extenzió	72 °C
Végső extenzió	72 °C	10 perc
Tárolás	4 °C	

6. Készítsük el az agaróz gélt, és futtassuk meg a mintákat (lásd 103. GYAKORLAT, 9-12. pont).
7. A PCR termék tisztító kit használatának lépéseit a gyakorlatvezető ismerteti. A megtisztított PCR terméket szintén futtassuk agaróz gélben.
8. A normál és a tisztított PCR terméket pár napig 4°C-on, hosszabb ideig -20 °C-on tárolhatjuk.

6.5.2.3 PCR termék restrikciós emésztése

Nagyszámú baktériumtörzs vizsgálata esetén az azonos fajba tartozó törzsekből származó PCR termékek csoportosításával elkerülhetjük a felesleges bázissorrend elemzést. Erre a célra alkalmazhatjuk az Amplifikált Riboszómális DNS Restrikciós Analízise (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis - ARDRA) módszert, amely gyors, olcsó és hatékony tipizálási módszer (lásd 105. GYAKORLAT). Az **ARDRA** során a szaporított 16S rRNS gént restrikciós enzimekkel hasítjuk. Különböző baktériumfajoknál a régió belül található restrikciós hasítási helyek száma és elhelyezkedése eltér egymástól. Az enzimátikus emésztést követő gélelektroforézis során kialakuló mintázat alapján a törzsek egymástól megkülönböztethetők, illetve csoportosíthatók (68. ábra). (A módszer metodikájából adódóan azonban egy csoportba elvileg több különböző szekvencia is kerülhet, illetve hasonló szekvenciák kerülhetnek különböző csoportokba is. Ezért ahogy a DNS bázissorrendjének elemzése (lásd 106. GYAKORLAT) egyre olcsóbbá válik, egyre kevésbé lesz szükség a törzsek ARDRA módszerrel történő előzetes csoportosítására.)

Az emésztési reakció során kisebb DNS-fragmentumok keletkeznek a PCR termékből, ezért elválasztásukhoz nagyobb felbontás szükséges, amit az agaróz gél töménységének és az elektroforézis idejének növelésével, valamint az elektroforézis során alkalmazott feszültség csökkentésével érhetünk el.

105. GYAKORLAT

PCR termékek restrikciós emésztése

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

a 104. GYAKORLAT során előállított PCR termék

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

pipetták, steril pipettahegyek

Eppendorf csövek, csőtartók

restrikciós enzimekhez tartozó 10 x-es puffer

(kereskedelmi forgalomban kapható)

restrikciós enzimek (kereskedelmi forgalomban kapható)

depch₂O

kémcsőkeverő (vortex)

Eppendorf centrifuga

vízfürdő

DNS molekulasúly Marker 100 (65. ábra; kereskedelmi forgalomban kapható)

A vizsgálat menete

1. A PCR termékeket, a restrikciós enzimeket és a hozzájuk tartozó puffereket vegyük ki a hűtőből.

2. Feliratozzunk 1 nagy Eppendorf csövet a premixhez, és a vizsgált PCR termékek számának megfelelő közepes (0,6 ml) Eppendorf csövet a reakció számára.

3. Mérjük össze az alábbi premixet a mintaszámnak megfelelő mennyiségben egy ráhagyással.

A bemért reagensek neve és mennyisége (μl)	X minta esetén
enzim (10 U/μl)	0,15
10 x-es puffer	2,00
depch ₂ O	9,80

4. A premixet 12 μl-enként mérjük szét a feliratozott közepes Eppendorf csövekbe, majd mérjük hozzá mindegyikhez 8-8 μl PCR terméket. A csöveket ezután vortexeljük,

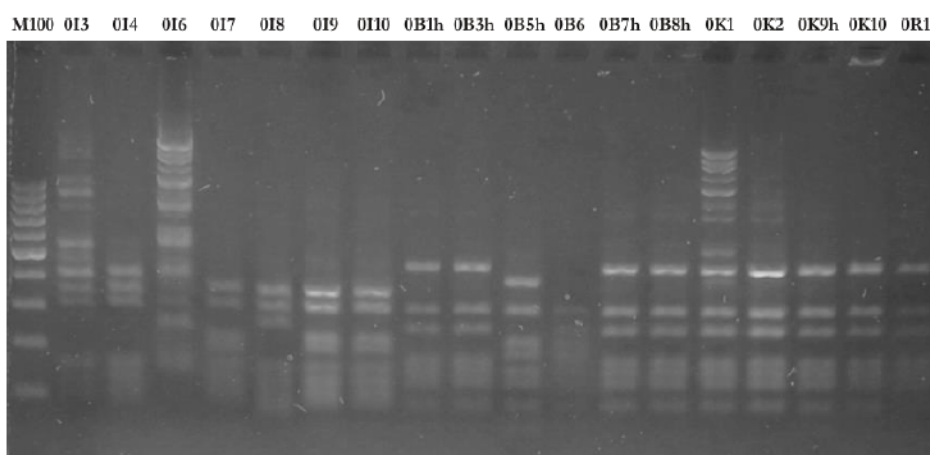
röviden centrifugáljuk, és 3 órára helyezzük be a megfelelő hőmérsékletű vízfürdőbe.

Enzim	Puffer	Hasítási hely	Optimális hőfok
<i>AluI</i>	Y+/Tango	5' AG↓CT	37 °C
<i>BsuRI</i>	R+ (red)	5' GG↓CC	37 °C
<i>Hin6I</i>	Y+/Tango	5' G↓CGC	37 °C
<i>TaqI</i>	Taq	5' T↓CGA	65 °C

5. Készítsünk 2%-os agaróz gélt (lásd 103. GYAKORLAT, 9. pont, kivéve, hogy 2 g agarózhoz mérjük 100 ml 1x TBE oldatot).

6. Az emésztési termékeket (20 µl) keverjük össze 5-5 µl töltőpufferrel, és töltsük a gél zsebeibe. A DNS méretének félkvantitatív meghatározása érdekében töltsünk a minták mellé 5 µl Marker 100 molekulasúly markert.

7. Az elektroforézist 80 V-on 90 percig végezzük 20 cm széles és 25 cm hosszú gélben, majd a DNS jelenlétét és mennyiségét detektáljuk UV fényben, és a kapott gélképet rögzítjük digitálisan is.

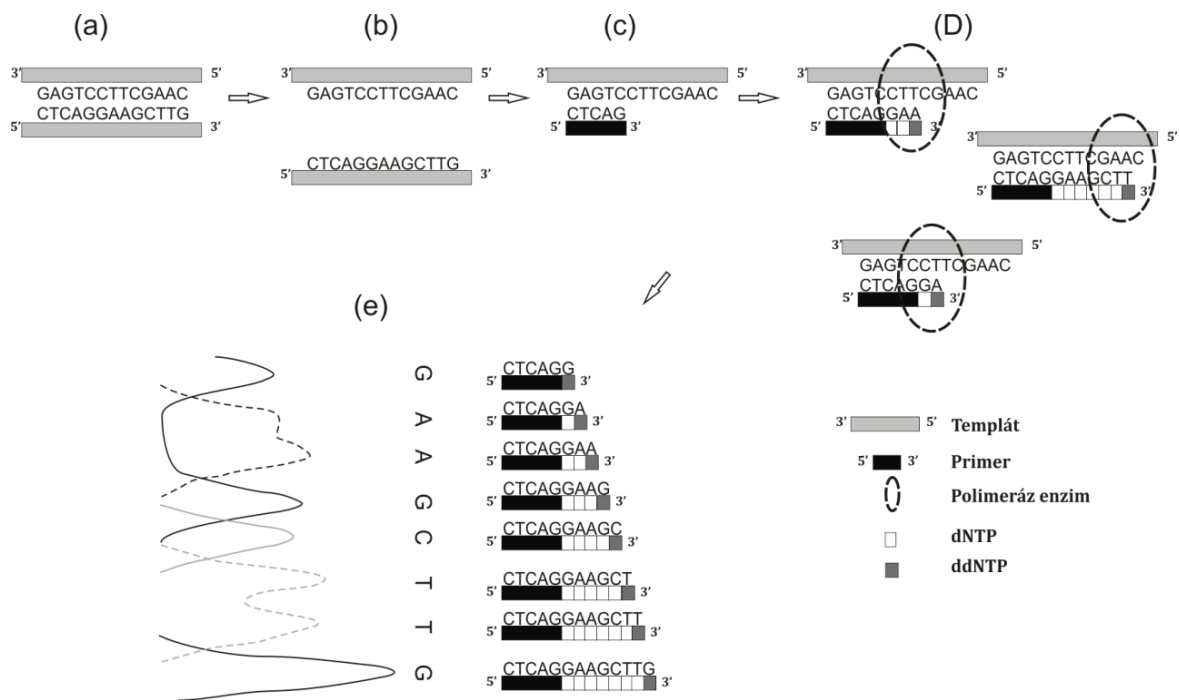


68. ábra 16S rRNS gén szaporításával nyert PCR termék restriktions emésztési mintázata (ARDRA) (Fotó: Vajna B.)

A gélképen a *MspI* enzim segítségével emésztett PCR termékeket láthatjuk (0I3-0R1). Az első sávban (M) a Marker 100 DNS létrát futtattuk.

6.5.2.4 DNS bázissorrend elemzés

A **DNS bázissorrendjének meghatározására** a Sanger-féle láncterminációs eljárás egy változatát a jelölt terminátorú ciklikus szekvenáló reakciót használjuk (lásd 106. GYAKORLAT). Ez hasonló a PCR-hez, de csak 1 primert tartalmaz, és a dNTP-k mellett, a négy bázisnak megfelelően négy különböző fluoreszcens festékkel jelölt ddNTP is részt vesz a reakcióban. Ha ez utóbbiak épülnek be a lánchosszabbítás során, akkor a reakció leáll, mert egy ddNTP után már nem tud újabb nukleotid beépülni. Így különböző hosszúságú, az utolsó bázisnak megfelelően terminálisan jelölt DNS-fragmentumok keletkeznek. A reakcióelegyet továbblépés előtt az enzimtől és a be nem épült nukleotidoktól etanolos precipitációval tisztíthatjuk meg. Tisztítás után az akár egy bázisnyival különböző fragmentumokat kapilláris elektroforézissel választhatjuk el, melynek során a különböző fluoreszcens jelek detektálása lézer segítségével történik, és a számítógép egy ennek megfelelő elektroforetogramot rajzol ki (69. ábra).



69. ábra A Sanger féle stopnukleotida eljárás használatával történő DNS bázissorrend elemzés vázlatja

A polimeráz láncreakció terméke (a). A denaturált termék (b). Primerkötés (c). A DNS dependens DNS polimeráz mindaddig folytatja a kiegészítő szál (lánc) szintézisét (extenzió), míg nem egy dideoxi-nukleotid-trifoszfat (ddNTP) épül be (d). Ez láncterminációt okoz. (e) A bázissorrend-elemzési termék kapilláris gélelektroforézise során a négy bázist a dideoxi-nukleotidok fluoreszcens jelölésével különböztetjük meg.

A pontos identifikáció alapja a jó minőségű szekvenencia. A szekvenálásban hibák mind a reakció, mind a kapilláris-elektroforézis során felléphetnek. Ezek egy része precíz munkavégzéssel megelőzhető, de a „futás” minőségét és az analizáló szoftver hibás leolvasását mindig ellenőriznünk és esetlegesen „manuálisan” javítanunk kell.

106. GYAKORLAT

DNS bázissorrendjének elemzése

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

a 104. GYAKORLAT során előállított és tisztított PCR termék

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

pipetták, steril pipettahegyek, Eppendorf csövek, csőtartók
ABI BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (kereskedelmi forgalomban kapható)

Ready Reaction Mix, 5x-ös puffer

primerek:

534r: 5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3'

907r: 5' CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT 3'

1492r: 5' TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3'

depH₂O

kémcsőkeverő (vortex)

Eppendorf centrifuga

PCR készülék

3 M nátrium-acetát (NaAc; pH 4,6)

95%-os és 70%-os etanol

hűthető centrifuga

vákuumcentrifuga
számítógép telepített MEGA programmal

A vizsgálat menete

1. A tisztított PCR termékeket és a szekvenáló reakcióhoz szükséges reagenseket vegyük ki a mélyhűtőből.

2. Feliratozzunk 3 nagy Eppendorf csövet a szekvenáló reakció premixek számára, és a minták számának háromszoros mennyiségében PCR csöveket a reakciók számára.

3. Mérjük össze az alábbi premixet annyszoros mennyiségben, ahány mintánk van és még egy (ráhagyás). (A három primerhez három külön premixet kell összemérni!)

A bemért reagensek neve és mennyisége (µl)	X minta esetén
5 x-ös puffer	1,5
Ready Reaction Mix	1,0
primer	0,5
depcH ₂ O	4,0

4. Mérjük szét a premixet 7 µl-enként a feliratozott PCR-csővekbe, majd mérjük hozzá mindegyikhez 3-3 µl tisztított PCR terméket. A PCR csöveket ezután vortexeljük, és röviden centrifugáljuk.

5. A PCR csöveket rakjuk be a PCR készülékbe, és az alábbi hőprofil beállítása után indítsuk el a reakciót.

PCR reakció	Hőmérséklet	Idő
28 ciklus	Denaturáció	96 °C
	Anneláció	50 °C
	Extenzió	60 °C
Tárolás	4 °C	

6. Miközben a szekvenáló reakció zajlik, készítsük elő az etanolos precipitációt. A minták számának megfelelő számú közepes méretű Eppendorf csőbe mérjük össze az alábbi elegyet:

A bemért reagensek neve és mennyisége (µl)	
95%-os etanol	62,5
depcH ₂ O	14,5
3 M NaAc	3

7. A szekvenáló reakció lejárta után mérjük be a 10 µl terméket a fenti elegybe, vortexeljük alaposan, és hagyjuk állni szobahőmérsékleten 15 percig.

8. Hűthető centrifugában 20 percig, 18.000 g-vel centrifugáljuk a csöveket 4 °C-on, majd pipettával óvatosan szívjuk le a felülúszót.

9. A csapadékra mérjük 250 µl 70%-os etanolt, és alapos vortexelés után újra centrifugáljuk a csöveket 10 percig, 18.000 g-vel. Utána ismét pipetázzuk le a felülúszót.

10. Végül szárítsuk ki a terméket vákuum-centrifugában.

11. A kiszáritott termékre mérjük rá 20 µl formamidot, majd vortexelés és „lepörgetés” után denaturáljuk a mintákat PCR készülékben 98 °C-on 5 percig. A gyakorlatvezető által ismertett módon hajtsuk végre a kapilláris elektroforézist az ABI Prism™ 310 genetikai analizátorral, ahol a szoftver automatikusan elvégzi a szekvenciák kiértékelését is.

12. Indítsuk el a MEGA programot, és nyissuk meg az illesztési felületet (Align>Edit/Build Alignment>Create a new alignment), majd nyissuk meg az első szekvencia kromatogramját (Sequencer>Edit Sequencer file). Állapítsuk meg, honnan kezdődik az értelmes leolvasás, és az elejéről töröljük az értelmezhetetlen részt. Reverz szekvencia esetén a szekvencia reverz komplementjét kell a továbbiakban használnunk

(Edit>Reverse complement). Keressük meg az első N-t (Ctrl+N), ha lehetséges javítsuk ki egyben ezeket a fel nem ismert helyeket. Keressük meg az értékelhető szekvencia végét, és a többit töröljük. Mentsük el a fájlt ab1 formátumban (Data>Save file), és töltsük be a szekvenciát az illesztési felületre (Data>Add to Alignment Explorer). Ezután a többi szekvencia kromatogramját is nyissuk meg, és hasonlóan járjunk el.

13. Keressük meg az egy törzshöz tartozó, különböző primerek felhasználásával készült szekvenciák közös szakaszát (Search>Find motif). Copy – Paste parancsokkal illesszük össze a szekvenciákat, majd mentjük el a fájlt.

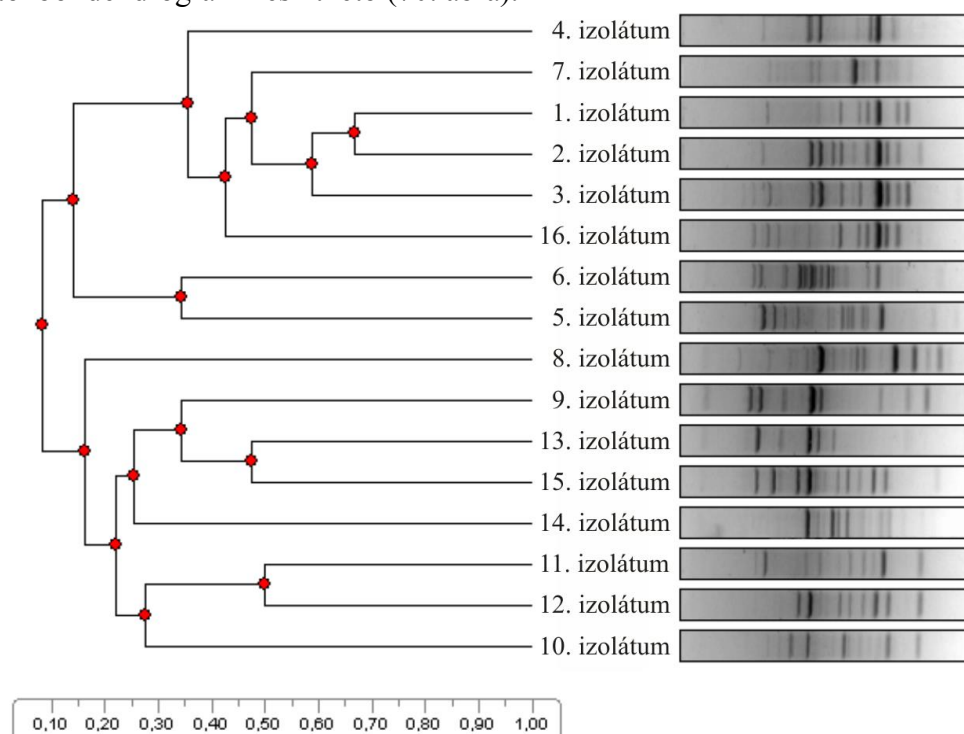
6.5.3 Egyéb faj- és törzs specifikus genotipizálási eljárások

A PCR reakciót eddig egy köztes lépésként alkalmaztuk az ARDRA módszer vagy a bázissorrend elemzés során. Azonban speciális PCR reakciók alkalmasak közvetlenül is baktériumtörzsek tipizálására, közvetlen ujjlenyomat mintázat létrehozásával.

Ilyen módszer a rep-PCR (repetitive extragenic palindromic; repetitív, gének között elhelyezkedő palindrom szekvenciák), amelynek során a genomban elszórva található változó számú ismétlődő elemeket, mint a REP, ERIC és BOX szakaszokat, szaporítjuk fel. Ezt úgy érhetjük el, hogy a PCR primereket ezen szakaszok határán elhelyezkedő bázissorrendekre tervezzük.

Egy másik ilyen módszer a **RAPD** (Random Amplification of Polymorphic DNA; random szaporított polimorf DNS), melynek során egy vagy több rövid primert használunk (lásd 107. GYAKORLAT). A PCR során kis annealációs hőmérsékleten a primerek random módon kötődnek a genom különböző részeihez, és így különböző hosszúságú PCR termékek jönnek létre. A gyakorlat során alkalmazott M13 primer mikroszatellit DNS régiókhöz kötődik. A reakcióhoz minél inkább ép genomra van szükségünk, így olyan DNS izolálási eljárást kell előtte alkalmaznunk, ami a DNS-t nem töri apró darabokra.

Ezen PCR termékeket ezután agaróz gélen futtatjuk meg, és a kapott ujjlenyomat mintázatokból dendrogram készíthető (70. ábra).



70. ábra Polimorf DNS szakaszokra tervezett primerekkel szaporított random PCR termék gélképek (RAPD ujjlenyomat) csoportelemzése (Fotó: Felföldi T.)

Synechococcus izolátumok RAPD ujjlenyomatának dendrogramja és a RAPD termék agaróz gélképe.

107. GYAKORLAT

Törzsek elválasztása RAPD ujjlenyomat módszer segítségével

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismeretlen baktériumtörzs tenyészetek ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

DNS-izoláláshoz szükséges anyagok és eszközök (lásd 103. GYAKORLAT)

pipetták, steril hegyek, Eppendorf csövek, csőtartók

10 x-es PCR puffer (kereskedelmi forgalomban kapható)

25 mM-os koncentrációjú MgCl₂ (kereskedelmi forgalomban kapható)

1 mM-os koncentrációjú dNTP mix (kereskedelmi forgalomban kapható)

M13 primer: 5' GAG GGT GGC GGT TCT 3'

1 U/μl *Taq* polimeráz (kereskedelmi forgalomban kapható)

depcH₂O

kémcsőkeverő (vortex)

Eppendorf centrifuga

PCR készülék

DNS molekulásúly Marker 100 (65. ábra, kereskedelmi forgalomban kapható)

számítógép telepített TotalLab programmal

A vizsgálat menete

1. A törzsekből végezzük el a NaOH-os DNS izolálást (lásd 103. GYAKORLAT).
2. A PCR-hez szükséges reagenseket vegyük ki a mélyhűtőből.
3. Feliratozzunk 1 nagy Eppendorf csövet a PCR premixhez, és a DNS mintáink számánál kettővel több PCR csövet a reakció számára. A plusz két cső a negatív és a pozitív kontroll miatt szükséges.
4. Mérjük össze az alábbi PCR premixet a mintaszámnak megfelelő és még három (kontrollok és mérési ráhagyás) egységnyi mennyiségben. A DNS mintát ne mérjük bele a premixbe!

A bemért reagensek neve és mennyisége (μl)	X minta esetén
10 x-es PCR puffer	2,5
MgCl ₂ oldat	3,0
dNTP mix	6,0
M13 primer	2,0
<i>Taq</i> polimeráz enzim	1,0
depcH ₂ O	kiegészítve 25-re

4. Mérjük szét a premixet 24 μl-enként a feliratozott PCR-csövekbe, majd mérjük hozzá mindegyikhez 1-1 μl DNS-mintát. A negatív kontrollba ne mérjük be semmit, a pozitív kontrollba egy olyan DNS-mintából mérjük be, amellyel már korábban végeztünk sikeres PCR-t. A PCR csöveket ezután vortexeljük, és röviden centrifugáljuk.

5. A PCR-csöveket rakjuk be a PCR készülékbe, és az alábbi hőprofil beállítása után indítsuk el a reakciót.

PCR reakció	Hőmérséklet	Idő
Kezdeti denaturáció	98 °C	5 perc
35 ciklus	Denaturáció	94 °C
	Anneláció	56 °C
	Extenzió	72 °C
Végső extenzió	72 °C	10 perc
Tárolás	4 °C	

6. Érdekes a PCR-reakciót (3-5. pont) legalább háromszor megismételni, mert a primerek random kötődése miatt az eredmény kis mértékben eltérhet az egyes esetekben.

7. Készítsünk 20 cm széles és 25 cm hosszú agaróz gélt (lásd 103. GYAKORLAT, 9. pont) a következő eltérésekkel: 2%-os gélt készítsünk (2 g agarózhoz mérjünk 100 ml 1x TBE oldatot), és az öntőformába középre ne rakjunk fésűt, hogy a minták majd végigfuthassanak a teljes gélen.

8. A teljes PCR terméket (25 µl) keverjük össze 8-8 µl töltőpufferrel, és töltsük a gél zsebeibe. A DNS méretének félkvantitatív meghatározása érdekében töltsünk a minták mellé 5 µl Marker 100 molekulasúly markert.

9. Az elektroforézist 80 V-on 140 percig végezzük a 20 cm széles és 25 cm hosszú gélen, majd a DNS jelenlétét és mennyiségét detektáljuk UV fényben, és a kapott képet rögzítsük digitálisan is.

10. Végezzük el a kép kiértékelését TotalLab programmal a gyakorlatvezető útmutatása szerint.

6.5.4 Egyéb faj- és törzs specifikus genotipizálási eljárások

A 2000-es közepétől egyre több ún. újgenerációs DNS-szekvenálási módszer (NGS, Next-Generation DNA Sequencing) látott napvilágot, és ezek a technikák nagyon gyorsan elérhetővé váltak a legtöbb mikrobiológiai laboratórium számára. A Sanger módszerrel összehasonlítva az NGS módszerek esetében az egy nukleotid meghatározására vonatkozó költség nagyságrendekkel alacsonyabb, viszont nagyobb pontatlansággal rendelkeznek (8. táblázat/11. táblázat). Az NGS technikákra elmúlt években jellemző módszertani sokszínűség az utóbbi években „letisztulni” látszik, és az Illumina cég kezd egyeduralgódóvá válni. Bár az általuk alkalmazott technika esetében a leolvasási hossz viszonylag rövid, mindezt felülírja a relatív nagy leolvasási pontossággal párosuló alacsony fajlagos működési költség.

8. táblázat. A legáltalánosabban használt NGS módszerek jellemzőinek összehasonlítása

	Illumina	Roche 454	Ion Torrent	PacBio
Leolvasási hossz (nt)	200-300	500-1000	400-500	50 000
Amplifikáció szükséges	igen	igen	igen	nem
Hibás leolvasások (%)	~0,1	~1-2	~2-3	~10-15
Szekvenálási idő	2-6 nap	10-20 óra	4-8 óra	2 óra
Prokarióta genom/futás	15-200	1-20	10-100	~5
Költség/nukleotid	alacsony	nagy	közepes	közepes

Az NGS módszerekre jellemző nagy átteresztőképesség és alacsony fajlagos költség alapvetően meghatározta a mikrobiális ökológia és bakteriális taxonómia tudományterületek kutatásait az utóbbi évtizedben. A DNS-alapú vizsgálatok három részre oszthatók ebben a körben: baktériumtörzsek teljes genomjának meghatározása, mikrobaközösségek taxonómiai összetételének feltárása (amplikon szekvenálás; 7.1.2.4 fejezet) és közösségei alapú metagenomikai elemzések ('shotgun' DNS szekvenálás; 7.3.1 fejezet).

A törzsek teljes genom szekvenálását, amennyiben ismeretlen genom meghatározásáról szól, akkor *de novo* genom szekvenálásnak nevezzük. Az annotáció során az egyes gének azonosítása történik meg a szekvenált genomon belül. Új baktériumfajok leírásakor a teljes genom szekvenálás ma már alapkövetelmény a típus-törzsek esetében, hiszen több munka- és anyagigényes vizsgálat kiváltható vele (genomi GC-tartalom és genom méret meghatározása, DNS-DNS hibridizáció, egyedi gének Sanger szekvenálása).

7 TENYÉSZTÉSTŐL FÜGGETLEN TECHNIKÁK ALKALMAZÁSA A KÖRNYEZETI MIKROBIOLÓGIÁBAN

7.1 Taxonómiai diverzitást vizsgáló eljárások

7.1.1 Kemotaxonómiai markereken alapuló eljárások

A környezeti mikrobiológiában is alkalmazhatunk kemotaxonómiai módszereket, hiszen bizonyos biomarkerek nem csak különálló mikroba törzsekből izolálhatók, hanem egy környezeti mintából is és felhasználhatóak közösségi elemzések céljából. A módszer hátránya, hogy a kemotaxonómiai markerek gyakran kevésbé specifikusak, így taxonómiai célokra csak erős megkötésekkel alkalmazhatók. A módszerek előnye ugyanakkor, hogy ezek a vegyületek egy mintából közvetlenül izolálhatók, majd vizsgálhatók, ezáltal a nukleinsav alapú módszerekkel összehasonlítva pontosabb mennyiségi információt hordoznak, a nukleinsav szaporítása során keletkező mennyiségi torzításokat nem hordozzák).

Kemotaxonómiai módszerek alkalmazása esetén először oldószerekkel kivonjuk az adott mintából a célmolekulákat, majd fracionáljuk és azonosítjuk azokat. Esetünkben szerves oldószerekkel zsírolékony molekulákat vonunk ki (lásd 108. GYAKORLAT).

108. GYAKORLAT

Kemotaxonómiai markerek (zsírsavak és kinonok) kinyerése és fracionálása környezeti mintából

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

talajminta
üledék minta
szennyvíziszap minta

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

Pasteur pipetták (zsírtalanítva)
üvegtölcsérek (zsírtalanítva)
csavarkupakos kémcsövek (zsírtalanítva, teflonbetéttel ellátva)
vákuum bepárló készülék
bepárlólombikok
oldószerek (diklórmetán, metanol, kloroform, foszfátpuffer, aceton)
SPE oszlop (szilárd fázisú extrakcióhoz)
Whatman-papír (2 Chr)
asztali centrifuga
zsírtalanított üveg centrifugacsövek
30 °C-os vízfürdő

A vizsgálat menete

FONTOS! Szerves oldószerekkel dolgozzunk elszívófülke alatt!

1. A csöveket a mintáknak megfelelően feliratozzuk. Ezután a mintát (10 g) egy éjen át kevertessük diklórmetán-metanol-foszfátpuffer (10g talajminta esetén 7,5 ml diklórmetán, 15 ml metanol és 5 ml foszfátpuffer hozzáadása javasolt) elegyben 4 °C-on. (Ha fázisszeparáció figyelhető meg, akkor ez kb. 1-5 ml metanol hozzáadásával megszüntethető.)

2. Másnap adjunk hozzá még 7,5 ml diklórmetánt és 7,5 ml desztillált vizet, rázzuk össze és még egy éjen át hagyjuk állni. A fázisszeparáció során a lipidek az alsó fázisba (diklórmetán) kerülnek.

3. A mintát a következő napon centrifugáljuk 2 percig 2000 g-n, majd pipettával szívjuk ki a diklórmetános fázist az alsó szilárd és a felső vizes fázis közül.

4. A leszívott diklórmetános fázist szűrjük át tölcserbe helyezett szűrőpapíron, majd a

szűrőpapírt még 3 x 0,75 ml diklórmetánnal mossuk át a kémcsőbe vagy zsírtalanított gömblombikba.

5. Vákuumbepárlóval 37 °C-on párologtassuk el az oldószert.

6. Az SPE oszlopot nedvesítsük meg 3 ml metanollal, majd tömörítsük a töltetet 6 ml kloroform nagy nyomású levegővel történő átnyomásával.

7. Tiszta, zsírtalanított Pasteur pipettával rétegezzük rá a mintát, amelyet előzőleg felvettünk 200 µl kloroformban.

8. Ezután lassan rétegezzünk az oszlopra 5 ml kloroformot, és engedjük át rajta. A lecsöpögő kloroformos fázist fogjuk fel tiszta csőben, ez tartalmazza (sok egyéb mellett) a kinonmolekulákat.

9. A következő lépésben az oszlopra rétegezzünk 5 ml acetont. Ezt a fázist fogjuk fel egy külön tiszta csőben. Ez a glikolipideket tartalmazza, a későbbiekben ezzel a fázissal nem foglalkozunk, taxonómiai jelentősége csekély: elöntjük.

10. Legvégül az oszlopon engedjük lassan átfolyni 4 ml metanolt, ez mossa ki a foszfolipideket, ezt egy újabb tiszta, zsírtalanított csavarkupakos kémcsőben gyűjtjük össze.

11. Bármely fázissal dolgozunk is tovább ezután, szobahőmérsékleten pároljuk szárazra rotációs vákuumbepárlóval és vegyük fel 300 µl tiszta oldószerben. Az így nyert preparátumok -20 °C-on néhány hétig eltarthatók.

A **biológiai membránok** fontos alkotó elemei a különböző szénlánc hosszúságú és eltérő telítettségű, esetleg elágazó **zsírsavmolekulák**. Taxonómiai információt közösségi mintákból számos zsírsavtípus nem hordoz, hiszen az univerzálisan megtalálható molekulák (pl. C_{14:0}, C_{16:0}), mind pro-, mind eukariótákban előfordulhatnak. Néhány vegyületcsoport azonban kiemelt jelentőségű (pl. elágazó zsírsavakat elsősorban a Gram pozitív prokarióták termelnek) (lásd 109. GYAKORLAT).

109. GYAKORLAT

Membránzsírsavak vizsgálata környezeti mintából

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

környezeti mintából preparált metanolos fázis (lásd 31. GYAKORLAT)

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

oldószerek (alt. metanol, alt. kloroform, alt. toluol)

37 °C-os vízfürdő

csavarkupakos kémcsövek

kémcsőkeverő (vortex)

zsírtalanított Pasteur pipetták

asztali centrifuga

A vizsgálat menete

1. A gyakorlat során a csöveket mindig precízen feliratozzuk. A metanolos fázisban lévő foszfolipideket rotációs vákuumbepárlóval megszáritjuk, majd a száraz foszfolipideket oldjuk vissza 0,5 ml metanol:toluol (1:1) elegyben.

2. Adjunk hozzá 0,5 ml 0,2 N metanolos KOH oldatot, majd zárjuk le a csöveket légmentesen, vortexeljük és inkubáljuk 15 percig 37 °C-on.

3. Ezután hűtsük le 5 perc alatt szobahőmérsékletűre és adjunk hozzá 0,5 ml 0,2 N ecetsavat, vortexeljük 5 másodpercig, majd adjunk hozzá 2 ml kloroformot és 2 ml desztillált vizet. Ismét vortexeljük 30 másodpercig. (Fontos, hogy a sav és a kloroform hozzáadása között ne teljen el sok idő, mert a metilészterek könnyen lebomlanak víz és sav jelenlétében.)

4. Az elegyet centrifugáljuk 5 percig 2000 g-n, ez fázisszétválást eredményez.

5. Az alsó, kloroformos fázist vigyük át tiszta kémcsőbe, majd újabb 1 ml kloroform hozzáadásával a 3-4. lépést ismételjük meg. Fontos, hogy vizet nem szabad átvinni!

6. Ezt követően párologtassuk el az oldószert 37 °C-on, majd oldjuk vissza a maradékot 0,5 ml hexánban (HPLC minőség). Ez a minta szükség esetén 2 hónapig -20 °C-on eltartható, esetleg töményíthető.

7. A hexános fázis 1 µl-ét injektáljuk gázkromatográf kapilláris oszlopára. Standardként az alábbi vegyületkeverékeket használjuk: Supelco 37 component FAME mix, PUFA No1, Marine Source, FAME mix Rapseed Oil, BAME metil észter mix.

8. A kapott kromatogram alapján a standardok segítségével határozzuk meg az egyes csúcsokat, mennyiségi arányaikat és ebből következtessünk a közösség összetételére.

110. GYAKORLAT

Bakteriális kinonok vizsgálata környezeti mintából

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

környezeti mintából preparált kloroformos fázis (lásd 31. GYAKORLAT)

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

Sep-Pak[®] Plus Silica oszlop, állvány
hexán, dietil-éter, acetonitril (HPLC-tisztaságú)
izopropanol (HPLC-tisztaságú)
Pasteur-pipetták (zsírtalanítva)
csavarkupakos kémcsövek

A vizsgálat menete

1. A felhasznált csöveket mindig precízen feliratozzuk. A kloroformos fázist szobahőn rotációs vákuumbepárlóval szárítsuk be, majd a beszárított zsíroldékony anyagokat oldjuk vissza 1 ml tiszta hexánban.

2. Az állványba helyezett Sep-Pak[®] Plus Silica oszlopokat nedvesítsük tiszta hexánnal.

3. A szintén hexánban oldott mintákat zsírtalanított Pasteur pipettával vigyük fel az oszlopokra. Hagyjuk, hogy a folyadék átfolyjon, s a lipidek teljes mennyisége belépjen a mátrixba.

4. Ezután mossuk át az oszlopokat 8 ml tiszta hexánnal, ami által a minta egyéb zsíroldékony anyagainak nagy része lemosódik, míg a kinonok a mátrixban maradnak.

5. A menakinonokat 98:2 arányú hexán:dietil-éter elegy 8 ml-ével mossuk mintaszedő kémcsőbe.

6. Az ubikinonokat 90:10 arányú hexán:dietil-éter elegy 8 ml-ével mossuk új mintaszedő kémcsőbe.

7. Rotációs vákuumbepárlóval pároljuk szobahőn szárazra, majd vegyük fel újra a kinonfrakciókat 300 µl 65:35 arányú acetonitril:izopropanol elegyben.

8. A kinonokat tartalmazó elegy 20 µl-ét injektáljuk reverz fázisú HPLC oszlopra. Eluens: acetonitril:izopropanol 65:35 elegy.

9. Határozzuk meg mintáink kinonjait úgy, hogy vessük össze a kapott kromatogramokat autentikus baktériumtörzsekből preparált referencia kinonok csúcsaival, majd a mennyiségi arányokból következtessünk a közösség összetételére (leírást lásd a baktériumtörzseknél leírt módon – 99. GYAKORLAT).

7.1.2 Nukleinsav kivonáson alapuló eljárások

A mikrobiális közösségek tenyésztéstől független vizsgálatának egyik legelterjedtebb megközelítése napjainkban a **nukleinsav kivonáson és elemzésen alapuló módszerek** alkalmazása. Ezek során a vizsgálatok céljától függően a közösségi DNS vagy RNS tartalom elemzését végezzük el (lásd 111. GYAKORLAT). A közösségi DNS tartalom vizsgálata könnyebben kivitelezhető, információt adhat a közösségalkotó fajokról, illetve a közösségalkotók genetikai potenciáljáról. Egy mikrobaközösség RNS tartalmának vizsgálata

viszont közvetlenebb információt nyújt az aktív (RNS-sé átíródó) génekről, s így a közösség aktív anyagcseréjű tagjairól. Mindkét megközelítés első lépése a közösségi nukleinsav tartalom kivonása és tisztítása, majd az RNS vizsgálatok esetében reverz transzkripció segítségével cDNS előállítás.

A jelenleg széleskörben elterjedt nukleinsav-alapú közösségvizsgálati módszerek szinte mindegyike a polimeráz láncreakció (PCR, lásd 6.5.2.2 fejezet) valamelyik típusán alapszik. PCR segítségével szaporítjuk a közösségalkotók genetikai állományából a vizsgálni kívánt génszakaszt, ami filogenetikai kutatások esetében leggyakrabban a 16S rRNS-t (ritkábban a 23S rRNS-t) kódoló gén, illetve eukarióta mikroorganizmusok esetében a két riboszomális alegység génje közötti „spacer” (ITS) szakasz. Ezek a génszakaszok evolúciósan relatíve konzervatívok, ezért faji azonosításra, illetve taxonómiai besorolásra alkalmasak. Amennyiben a közösség anyagcsere aktivitására vagyunk kíváncsiak, PCR segítségével szaporíthatunk ún. anyagcsere géneket is, amik egy adott anyagcsereút enzimjét (vagy ennek valamelyik alegységét) kódolják (lásd 6.5.2.2 fejezet).

A PCR-alapú közösségvizsgálati módszerek legnagyobb kihívása a közösségi PCR termék vizsgálata, az egyes közösségalkotókból származó PCR amplikonok szétválogatása, azonosítása, mennyiségi viszonyaik megállapítása. A módszerek egy csoportja a közösség összességére nézve ad információt, mintegy a közösség azonosítására alkalmas mintázatot. Ezeket a módszerek hívjuk ujjenyomat módszereknek (lásd 7.1.2.2 fejezet), előnyük a gyorsaság, mely sok minta közösségének összehasonlítását teszi lehetővé (pl. időbeli változások vagy térbeli változatosság széleskörű felmérése), de nem, vagy csak korlátozott mértékben szolgáltatnak információt a közösség tagjairól. Amennyiben az egyes közösségalkotókból felszaporított DNS szakaszok bázissorrendjét is meg szeretnénk határozni, akkor a közösségi PCR termék klóntár elemzését elvégezzük (lásd 7.1.2.3 fejezet), illetve az egyre jobban elterjedő újgenerációs bázissorrend meghatározást (next-generation sequencing – NGS) alkalmazzuk (lásd 7.1.2.4 fejezet).

7.1.2.1 Közösségi nukleinsav kivonása környezeti mintákból

111. GYAKORLAT

Közösségi DNS kivonása környezeti mintából

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

környezeti minta

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

talaj, üledék vagy vízminta

laboratóriumi mérleg

steril mikrospatula

talaj DNS izoláló kit (pl. MoBio UltraClean Soil DNA Kit;

Epicentre Biotech SoilMaster DNA extraction kit)

pipetták, steril pipettahegyek

Eppendorf csövek, csőtartók

sejtmalom, vagy Eppendorf csövek rögzítésére alkalmas feltétű vortex mikrocentrifuga

A vizsgálat menete

1. Amennyiben az üledék vagy talajminta jelentős mennyiségű vizet tartalmaz, a mintát 1,6 ml-es Eppendorf csövekbe töltve centrifugáljuk 5 percig 12.000 g-n, majd öntsük el a felülúszót.

2. Vízmintában lévő sejteket először szűréssel koncentrálnak. Ehhez 0,1-10 l vízmintát (a minta sűrűségétől függően) 0,22 µm pórusátmérőjű cellulóz-nitrát szűrőpapírra szűrünk.

3. A tömörített minta megfelelő mennyiségét (ez a DNS izoláló kit típusától függ)

töltsük vagy a feldarabolt szűrőpapírt adjuk steril mikroszpatulával vagy csipesszel steril mikroszpatulával a DNS izoláló kit megfelelő csövébe.

4. A DNS-izoláló kit használatának lépéseit a gyakorlatvezető (illetve a kit használati útmutatója) ismerteti.

5. Az izolált DNS-t detektáljuk agaróz gélelektroforézis segítségével (lásd 103. GYAKORLAT).

6. Az izolált DNS-t a további felhasználásig tároljuk -20 °C-on.

7.1.2.2 PCR alapú ujjlenyomat technikák

A **Denaturáló Gradiens Gélelektroforézis (DGGE)** azonos hosszúságú DNS szakaszok elválasztására alkalmas azok bázissorrendjének különbsége alapján (lásd 112. GYAKORLAT). Az elektroforézist vertikális poliakrilamid gélben végezzük, melyben denaturáló vegyületek (urea és formamid) lineárisan növekvő koncentrációja található. A mintákat a gél tetejénél töltjük be, itt található a legenyhébben denaturáló gélrész is. A duplaszálú DNS-ek a pozitív pólusú elektróda felé vándorolva egyre erősebben denaturáló közeggel találkoznak, amely a duplaszálú DNS-ek széttekeredését, denaturálódását eredményezi, a GC-tartalomtól függő futási távolság megtétele után (ezt a jelenséget, vagyis a G és C nukleotidok közötti három H-híd kötést, kihasználva a DNS szálak teljes széttekeredését megakadályozandó a PCR primerek egyike szinte csak G és C nukleotidokat tartalmazó 5'-végű toldalékkal, ún. „GC-clamp”-pel rendelkezik). A denaturálódott DNS szakaszok mobilitása a gélben jelentősen lecsökken, így a különböző bázissorrendű PCR termékek a gélben különböző távolságokra fognak eljutni az elektroforézis végére. A különböző közösségekből származó minták DGGE csíkmintázatuk alapján összehasonlíthatók. Az egyes csíkokat kivágva, PCR-rel újraamplifikálva és bázissorrend elemzésnek alávétve az egyes közösségalkotókra nézve filogenetikai információt is nyerhetünk. Ám az elemezhető szakasz relatív rövidege (legfeljebb körülbelül 500 bp) és a bázissorrend elemzés sikerének bizonytalansága (gyakori kevert szekvenciák) miatt, ez a módszer csak nagyon korlátozottan alkalmas a közösségalkotók filogenetikai jellemzésére.

112. GYAKORLAT

Baktériumközösségek vizsgálata Denaturáló Gradiens Gélelektroforézissel (DGGE)

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

környezeti minták mikrobaközösségeinek szerkezete

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

közösségi DNS izolátumok

pipetták, steril hegyek

Eppendorf csövek, csőtartók

10 x-es PCR puffer (kereskedelmi forgalomban kapható)

25 mM-os koncentrációjú MgCl₂ oldat (kereskedelmi forgalomban kapható)

1 mM-os koncentrációjú dNTP mix

Primerek:

GC-27f primer: „GC-clamp”-5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3'

534r primer: 5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3'

1 U/μl *Taq* polimeráz

depH₂O

kémcsőkeverő (vortex)

mikrocentrifuga

PCR-készülék

laboratóriumi mérleg

gélfuttató kád

agaróz
 1 x TBE-oldat
 DNS-festék (etidium-bromid oldat, ~5 µg/ml végkoncentrációban)
 töltőpuffer
 DNS molekulasúly Marker 100
 DGGE készülék (Ingeny PhorU2x2)
 ultrahangos szonikátor
 mágneses keverő
 perisztaltikus pumpa
 Falcon csövek
 40%-os akrilamid oldat (kereskedelmi forgalomban kapható)
 50 x TAE puffer (kereskedelmi forgalomban kapható)
 tetrametil-etilén-diamin (TEMED)
 ammónium perszulfát (APS)
 formamid
 töltőpuffer (6x Loading Dye, kereskedelmi forgalomban kapható)
 urea
 számítógép telepített TotalLab programmal

A vizsgálat menete

1. A közösségi DNS izolátumokból a 16S rRNS génszakaszt szaporítsuk a 104. GYAKORLAT 1-6. pontjainak útmutatásai szerint, annyi változtatással, hogy használjunk GC-kapcsos 27f és 534r primert.

2. Készítsük el a 7%-os akrilamid tartalmú denaturáló gradiens gélhez szükséges két különböző összetételű akrilamid keveréket (40% és 60% denaturáló ágens tartalommal), az alábbi táblázat szerint.

Anyag	40%	60%
PAA (40%)	4,2 ml	4,2 ml
50 x TAE	480 µl	480 µl
Urea	4 g	6 g
Formamid	3,84 ml	5,76 ml

3. Gáztalanítsuk a keverékeket ultrahangos szonikálással 15 percig.

4. Készítsük elő a gélöntő kazettát az Ingeny PhorU készülék leírása szerint, a gyakorlatvezető útmutatásával.

5. Készítsünk 1 ml 20%-os (m/V) APS oldatot.

6. Öntsük meg a denaturáló gradiens gélét az Ingeny PhorU készülék leírása szerint, a gyakorlatvezető útmutatásával.

7. A gél 1 óras szilárdulási ideje alatt cseréljük le az Ingeny PhorU készülékben levő puffermennyiségből 5 litert friss 1x TAE pufferre.

8. Mérjük össze az ún. koncentráció gélét („stacking gel”), az alábbi összetétellel:

PAA (40%)	1,05 ml
50 x TAE	120 µl
dH ₂ O	4,95 ml

9. A denaturáló gélről öntsük le a polimerizáció során keletkezett vizet, majd öntsük meg a koncentráció gélét az Ingeny PhorU készülék leírása szerint, a gyakorlatvezető útmutatásával.

10. A PCR termékek 45 µl-nyi mennyiségeihez mérjük hozzá 9-9 µl 6 x töltőpuffert.

11. A befuttató gél megszilárdulása után a gélfuttató kazettát helyezzük be az Ingeny PhorU készülékbe, és mossuk ki a gél zsebeit a gyakorlatvezető útmutatása szerint.

12. Töltsük be a mintákat a zsebekbe, lehetőleg a gél középső régiójába, miközben ügyeljünk arra, hogy a készülék felső pufferkeringetése legyen kikapcsolva, és a 12 V-os

alapfeszültség legyen ráadva az elektródákra.

13. A mintákat 5 percig futtassuk be 200 V-on, a felső pufferkeringetést továbbra is kikapcsolt állapotban tartva, majd az elektroforézis feszültséget 120 V-ra mérsékelve és a felső keringetést visszakapcsolva futtassuk a mintákat 14 órán át.

14. A gyakorlatvezető útmutatásai szerint végezzük el a gél festését és dokumentálását (fényképezését). A gél festését etidium-bromiddal végezzük, a mosási lépésekhez pedig használjunk (a DGGE készülék tankjából lefejtett) 1 x TBE puffert. *(Vigyázat! Az etidium-bromid toxikus! Használjuk a megfelelő egyéni védőfelszerelést! Tájékozódjunk a vegyszer biztonsági adatlapján található információk alapján.)*

15. A gékép kiértékelését végezzük el a TotalLab programmal.

A **Terminális Restriktív Fragmenshossz Polimorfizmus (T-RFLP)** hasonlóan az ARDRA-hoz, a restriktív enzimekkel emésztett PCR terméket méret szerint választja szét, viszont a templát szaporítása a PCR reakció során speciális, 5' végén fluoreszcensen jelölt (pl.: HEX: Hexachlorofluorescein) primerrel történik (lásd 113. GYAKORLAT). A restriktív hasító helyek és a fluoreszcensen jelölt primer közti távolság az adott amplicon bázissorrendjétől függ, így a PCR termékek emésztése az egyes taxonokra jellemző hosszúságú terminálisan jelölt fragmentumot eredményez. Az emésztett ampliconok elválasztása nagy hatékonyságú kapilláris elektroforézissel történik, a fluoreszcensen jelölt terminális fragmentumokat (kizárólag azokat) lézeres gerjesztés segítségével detektáljuk. A kromatogramon egy amplicon így csak egyetlen csúcsként jelenik meg. A mintával együtt futtatott, eltérő színű fluoreszcens jelöléssel ellátott belső molekulású standard, a relatív rövid szakaszok és hasonló bázisösszetétel miatt nagyon pontos fragmenshossz meghatározást tesz lehetővé (kb. +/- 1 bázispár az első 500 bázison). A kromatogramon az egyes csúcsokhoz tartozó görbe alatti területek a PCR-termékben megtalálható mennyiségi arányokat tükrözik. A módszer jó reprodukálhatósága, és szemikvantitatív jellege miatt különösen alkalmas közösségszerkezeti vizsgálatok lebonyolítására. Az „in vitro” elemzés mellett a primerek kötési, illetve a restriktív enzimek hasítási helyeinek ismeretében adott fajokhoz, törzsekhez számítógépes adatbázisok alapján terminális fragmenshosszok adhatóak meg. Az „in silico” kalkulált adatok birtokában a különböző minták terminális fragmenshosszaihoz filogenetikai információ rendelhető. Azonban a valós és az „in silico” fragmenshosszok közötti kisebb eltérések korlátozzák a módszer ilyen alkalmazását.

113. GYAKORLAT

Baktériumközösségek vizsgálata T-RFLP módszerrel

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

környezeti minták mikrobaközösségeinek szerkezete

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

közösségi DNS izolátumok

pipetták, steril hegyek

Eppendorf csövek, csőtartók

10 x-es PCR puffer (kereskedelmi forgalomban kapható)

25 mM-os koncentrációjú MgCl₂ oldat (kereskedelmi forgalomban kapható)

1 mM-os koncentrációjú dNTP mix

Primerek

HEX-27f primer: HEX-5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3'

534r primer: 5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3'

1 U/μl Taq polimeráz

depcH₂O

kémcsőkeverő (vortex)

mikrocentrifuga
PCR-készülék
laboratóriumi mérleg
gélfutató kád
agaróz
1 x TBE-oldat
DNS-festék
töltőpuffer
DNS molekulásúly Marker 100
restrikciós endonukleázok és puffereik
3 M Na-acetát (pH 4,6)
95%-os és 70%-os etanol
hűthető centrifuga
vákuumcentrifuga
formamid (molekuláris biológiai célra alkalmas tisztaságú)
fluoreszcensen jelölt molekulásúly standard (pl. GeneScanTM-500 Tamra)
ABI PrismTM 310 genetikai analizátor (Applied Biosystems)
GeneMapper szoftver
T-REX alkalmazás (interneten elérhető szerveren futó online alkalmazás)
PAST 3 szoftver

A vizsgálat menete

1. A közösségi DNS izolátumokból a 16S rRNS génszakaszt szaporítsuk a 106. GYAKORLAT 1-6. pontjainak útmutatásai szerint, annyi változtatással, hogy használjunk fluoreszcensen jelölt primert.

2. Végezzük el a PCR termékek restrikciós hasítását kétféle enzimmal, a 105. GYAKORLAT 1-4. pontjai szerint. (Az ott leírt agaróz gélelektroforézist már nem kell elvégezni.)

3. A hasítási termékeket tisztítsuk meg etanol precipitációval a 104. GYAKORLAT 6-10. pontjai szerint.

4. A beszárított terméket vegyük fel 20 µl depcH₂O-ban.

5. Feliratozást követően 600 µl-es ABI mintatartó csövekben 12 µl formamidhoz mérjük hozzá a mintákból 0,5 µl-t, a molekulásúly standardból pedig 0,3 µl-t. Vortexelés és lepörgetés után denaturáljuk a mintákat PCR-készülékben 98 °C-on 5 percig. Ezután 2 percre helyezük jégre.

6. A gyakorlatvezető által ismertetett módon hajtsuk végre a kapilláris elektroforézist az ABI PrismTM 310 genetikai analizátorral.

7. A GeneMapper szoftverrel a gyakorlatvezető útmutatásai szerint elemezzük a nyers futási adatokat, majd a kromatogramok csúcsainak adatait exportáljuk Excel táblázatba.

8. A T-REX (trex.biohpc.org/index.aspx) online program segítségével végezzük a kromatogramok zajsűrését és egymáshoz történő illesztését.

9. A kapott adatmátrixból készítsünk hasonlósági fát a PAST 3 program segítségével, a gyakorlatvezető útmutatásai szerint.

A Hosszheterogenitás-PCR (LH-PCR) az egyes génszakaszok illetve spacer régiók természetes hosszvariabilitása alapján választja el az egyes közösségalkotókat (lásd 114. GYAKORLAT). Ehhez a T-RFLP-hez hasonlóan fluoreszcensen jelölt primerrel amplifikáljuk a céltartományt, majd kapilláris elektroforézissel elválasztva, lézeres gerjesztés segítségével detektáljuk az egyes ampliconokat. A T-RFLP-hez hasonlóan a kromatogram egyes csúcsai itt is megfeleltethetőek az egyes közösségalkotó taxonokkal, s mennyiségi arányaik elvileg jellemzik a közösségen belüli részarányokat. A módszer jól reprodukálható, szemikvantitatív ujjlenyomatot ad a közösségekről. Az „in vitro” elemzés mellett a primerek

kötési helyek ismeretében adott fajokhoz, törzsekhez számítógépes adatbázisok alapján megadhatóak az elméleti amplikonhosszok, de meg kell jegyezzük, hogy ennek a módszernek a filogenetikai felbontása elmarad a T-RFLP-től.

114. GYAKORLAT

Baktérium- és gombaközösségek vizsgálata LH-PCR-rel

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

környezeti minták mikrobaközösségeinek szerkezete

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

közösségi DNS izolátumok

pipetták, steril hegyek

Eppendorf csövek, csőtartók

10 x-es PCR puffer (kereskedelmi forgalomban kapható)

25 mM-os koncentrációjú MgCl₂ oldat (kereskedelmi forgalomban kapható)

1 mM-os koncentrációjú dNTP mix

Primerek

16S rRNS gén első szakaszára

HEX-27f primer: HEX-5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3'

534r primer: 5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3'

Bakteriális 16S és 23S rRNS-ek között elhelyezkedő ITS régióra

HEX-926f primer: 5' GGT TAA AAC TYA AAK GAA TTG ACG G3'

115r/23S primer: 5' CCG GGT TBC CCC ATT CGG 3'

Gomba 18S és 5,8S rRNS-ek között elhelyezkedő ITS1 régióra

HEX-ITS1F primer: HEX-5' CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A 3'

ITS2 primer: 5' GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC 3'

1 U/μl *Taq* polimeráz

depcH₂O

kémcsőkeverő (vortex)

mikrocentrifuga

PCR-készülék

laboratóriumi mérleg

gélfutató kád

agaróz

1 x TBE-oldat

DNS-festék

töltőpuffer

DNS molekulásúly Marker 100

formamid (molekuláris biológiai célra alkalmas tisztaságú)

fluoreszcensen jelölt molekulásúly standard (pl. GeneScanTM-500 Tamra)

ABI PrismTM 310 genetikai analizátor (Applied Biosystems)

GeneMapper szoftver

T-Align szoftver (interneten elérhető szerveren futó on-line alkalmazás)

PAST 3 szoftver

A vizsgálat menete

1. A közösségi DNS izolátumokból a kívánt génszakaszt szaporítsuk a 104. GYAKORLAT 1-6. pontjainak útmutatásai szerint a fentebb megadott primerekkel. A reakciók hőprofiljai a következők:

HEX-27f – 534r primer pár esetén:

PCR reakció		Hőmérséklet	Idő
Kezdeti denaturáció		98 °C	5 perc
32 ciklus	Denaturáció	94 °C	30 mp
	Anneláció	52 °C	30 mp
	Extenzió	72 °C	30 mp
Végső extenzió		72 °C	10 perc
Tárolás		4 °C	

HEX-926f – 115r/23S primer pár esetén:

PCR reakció		Hőmérséklet	Idő
Kezdeti denaturáció		98 °C	5 perc
32 ciklus	Denaturáció	94 °C	30 mp
	Anneláció	56 °C	1 perc
	Extenzió	72 °C	1,5 perc
Végső extenzió		72 °C	10 perc
Tárolás		4 °C	

HEX-ITS1F – ITS2 primer pár esetén:

PCR reakció		Hőmérséklet	Idő
Kezdeti denaturáció		98 °C	5 perc
32 ciklus	Denaturáció	94 °C	30 mp
	Anneláció	52 °C	30 mp
	Extenzió	72 °C	1 perc
Végső extenzió		72 °C	10 perc
Tárolás		4 °C	

2. A PCR termékeket tisztítsuk meg etanol precipitációval a 104. GYAKORLAT 6-10. pontjai szerint.

3. A beszárított terméket vegyük fel 20 µl DEPC kezelt vízben.

4. Feliratozást követően 600 µl-es ABI mintatartó csövekben 12 µl formamidhoz mérjük hozzá a mintákból 0,5 µl-t, a molekulásúly standardból pedig 0,3 µl-t. Vortexelés és lepörgetés után denaturáljuk a mintákat PCR-készülékben 98 °C-on 5 percig. Ezután 2 percre helyezzük jégre.

5. A gyakorlatvezető által ismertetett módon hajtsuk végre a kapilláris elektroforézist az ABI Prism™ 310 genetikai analizátorral.

6. A GeneMapper szoftverrel a gyakorlatvezető útmutatásai szerint elemezzük ki a nyers futási adatokat, majd a kromatogramok csúcsainak adatait exportáljuk Excel táblázatba.

7. A T-REX (trex.biohpc.org/index.aspx) online program segítségével végezzük a kromatogramok zajsűrűsítését és egymáshoz történő illesztését.

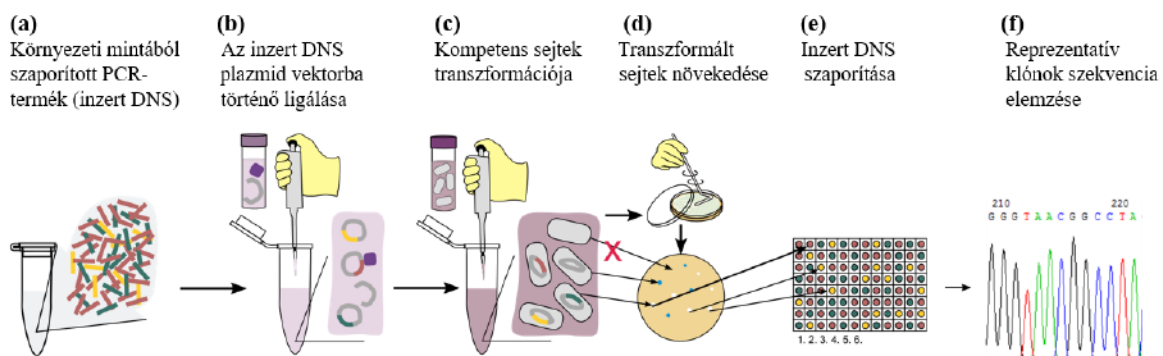
8. A kapott adatmátrixból készítsünk hasonlósági fát a PAST 3 program segítségével, a gyakorlatvezető útmutatásai szerint.

7.1.2.3 Molekuláris klónozás

A közösségi PCR termék – ahogy azt a korábbi gyakorlatok eredményei bizonyították is – vegyes, több, sok fajtól származó amplikont tartalmaz. A **klóntárak létrehozása**, a molekuláris klónozás lehetővé teszi egy közösségi PCR termék amplikonjainak egyesével történő szétválogatását és egyedi vizsgálatát (lásd 115. GYAKORLAT). A klónozott

szekvenciák bázissorrendjének elemzésével az egyes közösségalkotók genetikai állományára nézve nyerhetünk információt (a közösségi PCR által megcélzott genomi régióról). Természetesen a feldolgozás mélysége a klóntár méretétől függ (általában pár száz, esetleg ezer klón), ami nagyságrendekkel elmarad a PCR termékben levő ampliconok számától. A klóntár összetétele elvileg reprezentálja a PCR termékben levő ampliconok arányait, így közösségszerkezeti vizsgálatokra is alkalmas.

A környezeti mikrobiológiában leggyakrabban alkalmazott klóntár készítési eljárás (71. ábra) az úgynevezett TA-klónozás. Ennek során a *Taq* polimeráz terminális transzferáz aktivitása következtében a PCR termékek végeire szintetizált túlnyúló adenin nukleotid jelenlétét kihasználva a PCR ampliconokat túlnyúló timin nukleotiddal rendelkező linearizált vektorokba ligáljuk ligáz, vagy topoizomeráz enzim alkalmazásával. A gyakorlaton is alkalmazott pGEM-T klónozó rendszer (Promega) esetében a vektorok ampicillin rezisztencia gént hordoznak. Az inzerteket tartalmazó cirkularizált vektorokkal kompetens sejteket transzformálunk, majd ampicillin tartalmú szelektív táptalajra szélesztve kinövesztjük a vektorokat tartalmazó (ampicillin rezisztenciát hordozó) transzformált sejteket. A vektor az inzerciós helyet magába foglaló régióban egy β -galaktozidáz gént is tartalmaz, amely az inzert bekötésével inaktíválódik. A transzformált sejteket X-Gal (=BCIG: bromo-kloro-indolil-galaktopiranozid) és IPTG (izopropil- β -D-thio-galaktóz) tartalmú táptalajon növesztve így lehetővé válik azok kék-fehér szelekciója (az ép β -galaktozidáz gént tartalmazó telepek kék bomlásterméket eredményezve bontják az X-Gal-t).



71. ábra A molekuláris klónozás főbb lépései

Napjainkban az újgenerációs DNS-szekvenálási eljárások a klónozás és szekvenálás módszerének alternatíváját jelentik. Ezeknél a nagy áteresztőképességű technikáknál ugyanis lehetőség van a kevert PCR amplicon több ezer DNS molekulájának egyszerre történő bázissorrend meghatározására, így a vizsgált mikrobaközösség összetételének részletes feltérképezésére.

115. GYAKORLAT

Klóntár létrehozása Promega pGEM-T klónozó kit alkalmazásával

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

közösségi PCR termék ampliconjainak elválasztása

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

közösségi DNS izolátum

pipetták, steril hegyek

Eppendorf csövek, csőtartók

10 x-es PCR puffer (kereskedelmi forgalomban kapható)

25 mM-os koncentrációjú $MgCl_2$ oldat (kereskedelmi forgalomban kapható)

1 mM-os koncentrációjú dNTP mix

Primerek:

27f primer: 5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3'

1492r primer: 5' TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3'

1 U/ μ l *Taq* polimeráz

depcH₂O

kémcsőkeverő (vortex)

mikrocentrifuga

96 lyukú PCR lemez lepörgetésére alkalmas centrifuga

PCR-készülék

laboratóriumi mérleg

gélfuttató kád

agaróz

1 x TBE-oldat

DNS-festék

töltőpuffer

DNS molekulasúly Marker 3 (65. ábra)

PCR-termék tisztító kit

LB-Ampicillin agarlemezek

izopropil- β -D-thio-galaktóz (IPTG) oldat

X-Gal oldat

üvegbot

42 °C-os vízfürdő

37 °C-os rázótermosztát

37 °C-os termosztát

jég

SOC tápleves

pGEM-T klónozó kit (Promega)

steril fogpiszkáló (~200 db)

96 lyukú PCR lemez és fedőfólia

A vizsgálat menete

1. A közösségi DNS izolátumokból szaporítsuk a 16S rRNS génszakaszt a 104. GYAKORLAT útmutatásai szerint, annyi változtatással, hogy a PCR során alkalmazzunk 30 perces végső extenziót. (Ez a PCR amplikon végeken túlnyúló adeninek biztos megjelenéséhez szükséges.)

2. A PCR termék tisztaságát és erősségét a tisztítás után ismét ellenőrizzük agaróz gélelektroforézissel a 103. GYAKORLAT alapján. Csak erős és éles sávot mutató PCR termékkel dolgozzunk tovább.

3. Feliratozást követően mérjük össze egy 200 μ l-es PCR csőben a ligáló reakciót az alábbi összetétel szerint:

Ligáló puffer	5 μ l
Vektor	1 μ l
PCR termék	3 μ l
T4 ligáz	1 μ l

Keverés után inkubáljuk a reakciót 1 órán át szobahőmérsékleten.

4. Feliratozást követően egy jégben lehűtött 1,6 μ l-es Eppendorf csőbe mérjük be 2 μ l-t a ligáló reakcióból, majd adjunk hozzá 50 μ l kompetens sejt szuszpenziót (a kit tartozéka, tárolása -80 °C-on). Gyenge pöckölgetéssel keverjük össze, majd helyezzük 20 percre jégre a transzformáló keveréket.

5. Ezt követően a sejteket tartalmazó csövet 50 másodpercre helyezzük be 42 °C-os

vízfürdőbe, majd 2 percre helyezzük vissza a jégre.

6. Pipetázzunk a transzformált sejtekre 950 µl SOC táplevest, majd helyezzük másfél órára 37 °C-os rázótermosztátba (150 RPM-es keveréssel).

7. Szélesszünk 3 LB-Ampicillin tápagar lemez felületére üvegbottal 100 µl 100 mM-os IPTG-t és 20 µl 50 mg/ml X-Gal-t.

8. A másfél órás inkubáció után a transzformált sejtekből feliratozást követően 50, 100, illetve 150 µl-t szélesszünk az előkészített LB-Ampicillin tápagar lemezekre, majd helyezzük őket 24 órára 37 °C-os termosztátba.

9. Feliratozást követően a kinőtt telepek közül a jól elkülönülő fehéreket pontozzuk át friss LB-Ampicillin agarlemezekre steril fogpiszkálókcal. Körülbelül 1 cm-es távolságot tartunk az átpontozások között. Az átpontozott telepek száma fogja meghatározni a klóntárunk méretét. A gyakorlat során egy darab 96 lyukú PCR lemezen folyik majd a klóntár feldolgozása, ezért körülbelül 110 telepet érdemes átpontozni. Az átoltott telepeket tartalmazó agarlemezeket helyezzük 24 órára 37 °C-os termosztátba. Lényegében ezzel létrehoztuk a klóntárat, a további lépésekben (könnyebben eltartható) DNS-t izolálunk a klónokból.

10. Egy 96 lyukú PCR lemez lyukjaiba steril fogpiszkálóval egyenként kenjük bele az átpontozott telepeket. Miután mind a 96 lyukat megtöltöttük, mérjük rá mindegyikre 50 µl DEPC-kezelt steril vizet, és zárjuk le a lemezt fedőfóliával.

11. Vortexeljük a lemezt, majd röviden centrifugáljuk (1000 g, 30 másodperc).

12. A lemezt PCR készülékben inkubáljuk 5 percig 37 °C-on.

13. Vortexeljük a lemezt, majd centrifugáljuk (2500 g, 3 perc).

14. A klóntárból izolált DNS-t további felhasználásig tároljuk -20 °C-on.

Az elkészített **klóntárat** az adott kutatás kérdésfeltevésének függvényében többféleképpen is „rendezhetjük”. Az egyes klónokban megtalálható inzertszekvenciák csoportosítását és további vizsgálatát elvégezhetjük például ARDRA elemzéssel, T-RFLP analízissel, LH-PCR-rel, illetve bázissorrend elemzéssel. Amennyiben a klóntár elkészítése mellett az adott mintára (vagy kapcsolódó mintasorozatra) mondjuk közösségi T-RFLP vizsgálatot végeztünk, úgy az egyes klónokat is csoportosíthatjuk, illetve azonosíthatjuk T-RFLP-vel, közvetlen megfeleltetést nyerve ezzel a klónok és a közösségi T-RFLP mintázatok egyes csúcsai között. Az egyes klónok inzertjeinek bázissorrend elemzésével ekképpen az egyes T-RFLP csúcsokhoz pontos filogenetikai információt is rendelhetünk.

Mindegyik megközelítés első lépése a vektorokba ligált inzertszakaszok és az őket közrefogó vektorrégiók PCR amplifikációja vektorspecifikus primerekkel. Erre azért van szükség, hogy a további vizsgálatok során a vektorokat tartalmazó sejtek genomi DNS-e ne zavarja az elemzést. (Ha például bakteriális 16S rRNS génszakaszt ligáltunk be inzertként a vektorokba, akkor a további feldolgozás során alkalmazott inzertspecifikus – kvázi univerzális – primerek a transzformált *E. coli* kompetens sejtek 16S rRNS génszakaszait is amplifikálnák.) A vektorspecifikus primerekkel nyert PCR termékekre az eredeti inzertek előállításához alkalmazott primerpárral ezután nested PCR-t végezhetünk, így megkapjuk az egyes inzertek tiszta formában felszaporított kópiáit.

7.1.2.4 Amplikon szekvenálás NGS módszerrel

Az NGS módszerek (lásd 6.5.4 fejezet) alkalmasak a közösség tagjainak azonosítására (taxonösszetétel meghatározása) és a vizsgált élőhely fajszámának, diverzitásának becslésére is (lásd 12.3 fejezet). Baktériumok esetében az ilyen vizsgálatok során legáltalánosabban a 16S rRNS marker gént használják, a szekvenálások során legáltalánosabban alkalmazott eszközök pedig az Illumina cég különböző szekvenáló platformjai és reagensei. Ez estében a maximálisan elérhető szekvenálási hossz (~400 nt), nemzetség szintű taxonómiai azonosítást tesz lehetővé.

Az eljárás során alkalmazott főbb lépések a következők: DNS kivonása a vizsgált mintákból; PCR amplifikáció az adott taxonómiai marker gén(ek)re; tisztítás és kvantifikálás, valamint mintaspecifikus jelölés és a szekvenáláshoz szükséges adapter szekvenciák kapcsolása; a minták egyesítése; szekvenálás (előtte általában klonális amplifikáció szükséges emulziós PCR-rel); a rossz minőségű szekvencia leolvasások eltávolítása és egyéb minőségi szűrések; a mintaspecifikus jelölés alapján a különböző mintákhoz tartozó szekvenciák szétválogatása; primerek, adapter szekvenciák és mintaspecifikus azonosítók eltávolítása; bioinformatikai elemzések (taxonok azonosítása, fajsám becslése, diverzitás indexek számolása, a taxonelozslás összevetése környezeti változókkal, stb.).

7.1.2.5 *Filospecies homológia vizsgálat*

Filospeciesnek nevezzük a filogenetikai vizsgálat legkisebb, tovább nem osztható egységét. Ez a gyakorlatban egyedi DNS szekvencia leolvasást jelent, ami származhat törzsből (7.1.2 fejezet), vagy környezeti klónból (klóntár tagja, kivágott DGGE sáv stb., 7.1.2.2 fejezet). A legáltalánosabb cél a homológia vizsgálat során a taxonómiai azonosítás, és a legáltalánosabb ilyen céllal vizsgált gén a 16S rRNS gén. Az újonnan szekvenált génszakasz azonosítása referencia adatbázisok (pl. EzTaxon, <http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) segítségével történhet. Ennek során a típus törzsekkel történő összevetés százalékos hasonlósági értékeket eredményez. Baktériumoknál a teljes 16S rRNS génre vonatkozóan a különböző taxonszinteknél az alábbi értékek tekinthetők általánosnak: 97% faji határ, 95% nemzetség határ, 86% család-szintű határ, 75% phylum-szintű határ. Ezen értékek figyelembe vételével azonosíthatjuk a vizsgált törzset, illetve környezeti klónt.

Hasonlósági vizsgálatokat végezhetünk más gének, illetve nem kódoló régiók alapján is, továbbá részletesebb elemzésekkel is pontosíthatjuk egy adott filospecies/taxon leszármazási viszonyainak tisztázását (lásd 12.4 fejezet).

7.2 Anyagcsere diverzitást és aktivitást vizsgáló eljárások

7.2.1 Közösségi enzimprofil/szubsztrátbontási vizsgálatok

Környezeti mintákban jelenlévő mikrobaközösségek funkcionális diverzitásának becslésére – az egyes fajok tenyésztése nélkül közvetlenül, a **mikrobaközösségek szénforrás hasznosító képességének tesztelésével** – alkalmazhatók a baktériumok gyors identifikációja céljából kifejlesztett BIOLOG™ (Hayward, California, USA) mikrotiter lemezek (lásd 116. GYAKORLAT). A BIOLOG GN2, GP2 stb. mikrotiter lemezek 95 különféle szénforrást (polimereket, szénhidrátokat, karbonsavakat, aminosavakat, aminosavat, amidokat stb.) és oxidált állapotú, színtelen tetrazólium-ibolya redox-indikátort tartalmaznak (73. ábra). Az aerob mikrobiális szerves szubsztrát oxidációt követő elektrontranszport során a tetrazólium festék mesterséges elektron-akceptorként szolgál, és vízben oldhatatlan, bíbor színű formazánná redukálódik, a színváltozás pedig kolorimetriásan értékelhető (73. ábra). A GN2 mikrotiter lemezek szénforrás spektruma elsősorban a Gram-negatív, míg a GP2 lemezek a Gram-pozitív szervezetek azonosítását teszik lehetővé a mikroorganizmusok egyedüli szénforrás hasznosítási mintázatának az adatbázisban található mintázatokkal való egybevetésével (>1000 baktérium taxon). A 90-es évektől megjelent közlemények arról tanúskodnak, hogy a kutatók többsége a közösségi analízisekhez is GN2 mikrotiter lemezeket használ annak ellenére, hogy a BIOLOG Inc. a közösségi mintázat elemzés céljára kifejlesztett egy ún. EcoPlate™ lemezt, ami háromszoros ismétlésben tartalmaz 31, közöttük környezeti mintákban is előforduló szénforrásokat (pl. növényi gyökér exudátumokat).

A BIOLOG lemezek eredeti felhasználási területéből, vagyis a baktériumok gyors identifikációjából adódóan a felkínált szénforrások sem összetételükben, sem arányaikban nem tükrözik a természetes ökoszisztémákban általánosan előforduló és a mikrobák számára

szén és/vagy energiaforrásként szolgáló szerves anyagokat. A szénforrások ilyen spektrumának alkalmazásával tehát nem nyerhetünk betekintést az adott mikrobaközösség tényleges „*in situ*” funkcionális diverzitásába, de alkalmas különböző élőhelyek mikrobiális aktivitásainak kvantifikálására (pl. összaktivitás, átlagos színfejlődés mértéke), a mikrobaközösségekre jellemző „anyagcsere ujjlenyomat” meghatározására és statisztikai elemzésére (pl. főkomponens elemzés), az anyagcsere aktivitás változásainak időbeni nyomon követésére és az élőhely mikrobiális aktivitásában jelentkező térbeli eltérések feltérképezésére.

116. GYAKORLAT

Közösségi szénforrás értékesítés vizsgálata BIOLOG mikrotiter lemezekkel

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

környezeti minták mikrobaközösségei

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

BIOLOG GN2 mikrotiter lemez

steril műanyag edény („vályú”)

steril víz vagy fiziológiás sóoldat kémcsőben

pipetta, steril pipettahegyek

kémcsőkeverő (vortex)

termosztát

turbidiméter

optikai denzitás mérésére szolgáló készülék (ELISA reader)

A vizsgálat menete

1. A BIOLOG lemezen jelöljük feliratozással a minta típusát és a vizsgálat megkezdésének időpontját.

2. Ha szükséges készítsünk a környezeti mintából steril víz vagy fiziológiás sóoldat felhasználásával a GN-NENT standardnak megfelelő sűrűségű szuszpenziót. A szuszpenziók megfelelő denzitás értékét turbidiméter segítségével állítsuk be.

3. A kb. 20 ml térfogatú mintát vagy hígított szuszpenziót öntsük steril műanyag edénybe, majd pipetta segítségével mérjünk 150-150 µl-nyi mennyiséget a BIOLOG lemez mind a 96 csövecskéjébe. Ügyeljünk arra, hogy pipettázás során csak résnyire nyissuk ki a lemez tetejét.

4. A beoltott lemezt helyezzük a környezeti minta eredeti hőmérsékleti értékével megegyező hőmérsékletű termosztátba.

5. A szubsztrátum hasznosítást mutató abszorpció értékeket ELISA Reader (Labsystems Multiscan PLUS) segítségével OD₅₉₀ értéken olvassuk le 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 és 120 óra elteltével. A pozitív reakciót (az adott szénforrás értékesítését) a csövecskékben lévő indikátor bíbor színűvé válása jelzi. Ennek mértékét a kontrollhoz (A1) viszonyított számérték (abszorpció különbség) nagysága határozza meg.

6. Határozzuk meg és ábrázoljuk grafikusán a mikrobaközösségek szubsztrátum hasznosítására utaló átlagos színfejlődés mértékét [$AWCD = \sum_{(i = 1, 95)} (R_i - C)/95$; ahol C a kontroll csőben (A1) mért abszorpció érték; R_i az i-edik csőben (A2–H12) mért abszorpció érték] 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 és 120 órás inkubáció elteltével. Több minta egyidejű vizsgálata esetén a mintákat a mikrobiális összaktivitás (valamely mintában mért, a szubsztrátumok hasznosításából eredő abszorpciós értékek összege), az értékesített szubsztrátumok típusa, és a különböző minták közösségi-szintű mikrobiális szénforrás értékesítési mintázatának többváltozós adatelemzése [pl. főkomponens (PCA) vagy hierarchikus cluster analízis] alapján hasonlíthatjuk össze.

Környezeti mintákban megtalálható baktériumközösségek összetételének meghatározása (lásd 7.1.2 fejezet) mellett, fontos információt jelenthet a mintákban lezajló egyes enzimikus folyamatok nyomon követése is. Szalma komposztálása során erre lehetőségünk nyílik pl. a növényi sejtfal lebontásának vizsgálatával, vagyis a mikroorganizmusok által termelt hemicellulázok, vagy **xilanázok aktivitásának mérésével** (lásd 117. GYAKORLAT). A gyakorlat során a mintához xilán-oldatot adunk, és a mintákat a xilanázoknak megfelelő hőmérsékleten inkubáljuk. A xilán-oldat hozzáadására azért van szükség, mert a xilanáz enzimek számára az oldott xilán könnyebben hozzáférhető, mint a szalmában jelen levő polimer. A reakció során xilóz monomerek szabadulnak fel, amiket a narancssárga színű DNSA-reagens (3,5-dinitroszalicilsav) 100 °C-on oxidál, miközben bordó színű 3-amino-5-nitroszalicilsavvá redukálódik. Ez utóbbi koncentrációja abszorbancia-méréssel meghatározható, amiből a kiindulási minta mennyiségét ismerve kiszámolható az enzimaktivitás.

117. GYAKORLAT

Xilanáz aktivitás mérése környezeti mintából

A vizsgálat tárgya

szalma-komposzt

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

laboratóriumi mérleg

szárítószekrény

rázótermosztát

vízfürdő

spektrofotométer

pipetták, steril pipettahegyek

Eppendorf csövek, csőtartók

0,2 M Na-acetát puffer (pH: 5,0)

4 mg/ml xilán oldat

1%-os DNSA-reagens

xilóz hígítási sor

A vizsgálat menete

1. Mérjük ki a vizsgálni kívánt komposztált szalmamintából kb. 1 g-ot a mintanévvvel előre feliratozott Falcon-csőbe.

2. Mérjük rá 10 ml xilán-oldatot, és jól rázzuk össze a Falcon-csövet.

3. Pár perc várakozás és ismételt összerázás után mérjük ki 300 µl-t az oldatból Eppendorf csőbe. Az Eppendorf csövet tegyük 4 °C-os hűtőbe. Ez lesz a kiindulási kontroll minta.

4. A Falcon-csőben lévő mintát inkubáljuk 45 °C-on 2 órán keresztül rázótermosztátban, hogy a mintában lévő xilanázok bonthassák a xilánt.

5. Az inkubáció után ismét mérjük ki 300 µl-t az oldatból egy új Eppendorf csőbe.

6. Az inkubáció elején (kiindulási kontroll) és végén kimért 300 µl-nyi oldatokhoz mérjük hozzá 450 µl narancssárga színű DNSA-reagenst.

7. Tegyük az oldatokat 5 percig forró (100 °C-os) vízfürdőbe, majd hűtsük le.

8. Spektrofotométerben 480 nm-en mérjük meg a keletkezett 3-amino-5-nitroszalicilsav abszorbanciáját. Ehhez használjunk desztillált vízzel 10 x-esére hígított mintákat. A spektrofotométer nulla értékre való beállításához („vakolás”) desztillált vízzel 10 x-esére hígított DNSA-reagenst alkalmazzunk. A minták 2 óra után mért abszorbancia értékéből vonjuk le a kezdeti abszorbancia értéket.

9. Készítsünk kalibráló egyenest xilóz hígítási sorból. Ehhez végezzük el a 6-8. pontokat az előre elkészített xilóz hígítási sorokkal. Majd a kapott abszorbancia értékekre

illesszünk egyenest.

10. A 8. pontban kapott értékeket a kalibráló egyenes segítségével számoljuk át cukorkoncentrációra.

11. A mintákat szárítószekrényben 105 °C-on szárítsuk tömegállandóságig.

12. Végül a 10. pontban kiszámolt koncentráció és a minta szárazanyagtartalma alapján számoljuk ki az enzimaktivitást, melyet a következőképpen definiálunk: egy egységnyi enzimaktivitás az az enzim mennyiség, amely a xilánból 1 perc alatt 1 mol xilózt szabadít fel 1 g szárazanyag tartalmú szalma-komposztra vonatkoztatva.

7.2.2 Anyagcsere gének vizsgálata

Bizonyos anyagcsere képességeket vizsgálhatunk az adott anyagcsereútban szereplő fehérjéket kódoló gének célzott kimutatásával vagy általános sejtaktivitást jelző fehérjék vizsgálatával [pl. PCR alapú módszerekkel (lásd 7.1.2 fejezet), vagy hibridizációval]. Egy gén megléte a genomban természetesen még nem jelenti azt, hogy megfelelő fehérje is keletkezik a sejten belül, így kimutatásukkal csak közvetett információt nyerhetünk az adott funkcióról.

9. táblázat Anyagcsere aktivitás vizsgálatok és filogenetikai elemzések során használt néhány anyagcsere gén/genomi régió

Genomi régió	Kódolt fehérje/enzim	Főbb jellemzők
<i>cpeB(A)</i>	fikoeritrin	fikobiliszóma fehérjé(ke)t kódoló gén, csak cianobaktériumokban és vörösmoszatokban fordul elő
<i>cpcBA</i> -IGS	fikocianin (operon)	fikobiliszóma fehérjéket kódoló gén, csak cianobaktériumokban és vörösmoszatokban fordul elő
<i>psbA</i>	a II. fotorendszer D1 fehérjéje	néhány algában több, egymástól eltérő bázissorrendű változatban fordul elő
<i>rbcL</i>	a RuBisCO nagy alegysége	a CO ₂ -fixáció egyik kulcsenzimének alegységét kódoló gén, laterális géntranszfer az egyes csoportok között
<i>rpoCI</i>	DNS-függő RNS polimeráz	prokariótákban csak egy kópiában található meg
<i>amoA</i>	az ammónia-monooxigenáz A alegysége	az ammónia-oxidáció sebesség-meghatározó lépését kódoló fehérje egyik alegysége
<i>nirS</i>	citokróm <i>cd₁</i> típusú nitrit-reduktáz	a denitrifikáció egyik közti lépéséért felelős enzim, két típusa közül egy törzsen belül csak az egyik fordul elő, laterális géntranszfer az egyes csoportok között
<i>nirK</i>	réz tartalmú nitrit-reduktáz	a denitrifikáció egyik közti lépéséért felelős enzim, két típusa közül egy törzsen belül csak az egyik fordul elő, laterális géntranszfer az egyes csoportok között
<i>nosZ</i>	dinitrogén-oxid-reduktáz	a denitrifikáció utolsó lépéséért felelős enzim, nem minden denitrifikáló szervezetben található meg
<i>dsrAB</i>	disszimilatórikus szulfít-reduktáz	szulfát-redukáló baktériumokra jellemző
<i>nifH</i>	a nitrogenáz enzim II komponense (dinitrogenáz-reduktáz)	a gyorsan növény <i>Rhizobium</i> oknál plazmidon, a lassan növény <i>Rhizobium</i> oknál a kromoszómán helyezkednek el

<i>nodD</i>	a noduláció (gümőképződés) első lépésében szereplő fehérje
<i>catA</i>	katekol-1,2-dioxigenáz monoaromás szennyezők lebontásában részt vevő fehérjét kódoló gén egyik alegysége

Egy lépéssel közelebb kerülünk a valódi aktivitás kimutatásához, ha vizsgálatainkat RNS alapon végezzük, azaz a sejtben megtalálható mRNS-t vizsgáljuk, hiszen ebben az esetben a gén átíródása már jelez egyfajta lehetőséget. Sőt az mRNS mennyiségéből következtethetünk arra is, hogy a vizsgált aktivitás mennyire kifejezett (több mRNS kópiáról több fehérje íródhat át). Ehhez azonban fontos tudnunk azt, hogy az összehasonlítani kívánt csoportok esetében az adott gén azonos (vagy legalább hasonló) kópiaszámban fordul-e elő a genomban.

Szerencsés esetben ezek az anyagcsere gének (9. táblázat) filogenetikai információt is hordoznak, és az aktivitás összeköthető például egy adott környezet taxondiverzitásának (fajgazdagságának) felmérésével. Az anyagcsere gének esetében a fehérje kódszótár degeneráltsága miatt (egy aminosavat általában több triplet is kódol), ezek a gének a filogenetikai vizsgálatoknál általánosan használt 16S rRNS génjénél (lásd 6.5.2. fejezet) változatosabbak, ezért finomabb felbontású összehasonlításokra adnak lehetőséget (pl. közeli rokonok). Egyes esetekben azonban laterális géntranszfer fordul elő, vagyis a gének/génklaszterek távoli rokon taxonok között adodnak át. Ilyen esetekben az anyagcsere gének alapján végzett filogenetikai elemzéseknél különös körültekintéssel kell eljárunk.

7.3 Molekuláris eljárások a diagnosztikai és környezeti mikrobiológiában

7.3.1 'Shotgun' metagenomikai elemzések

Az NGS módszerek (lásd 6.5.4 fejezet) lehetőséget adnak egy közösség teljes génkészletének a meghatározására is. Ebben az esetben nem egy taxonómiai marker gén (legáltalánosabban a 16S rRNS gén) vizsgálata zajlik, amivel csupán a mintában előforduló taxonok azonosítása lehetséges, hanem a közösségi génkészlet alapján a gének által kódolt fehérjék (funkciók) révén a közösségre jellemző anyagcsere tulajdonságok, rezisztencia és adaptációs mechanizmusok stb. becsülhetők. Ez az ún. metagenomikai megközelítés, ami azt jelenti, hogy a vizsgált minta teljes genetikai állományát tanulmányozzuk. Megjegyezzük, hogy metagenomikai vizsgálatok kivitelezésére az NGS módszerek térhódítása előtt is volt lehetőség, azonban a Sanger szekvenálással végzett metagenomikai elemzések nagy költségvonzata nem tette lehetővé nagyszámú minta feldolgozását.

A metagenomikai elemzéseket általában 'shotgun' szekvenálással kombinálják. Ennek során a közösségi DNS-t olyan méretű darabokra törik (fragmentálják), ami a szekvenáló platform számára legmegfelelőbb bemeneti DNS méretet jelent. Ez a fragmentálás enzimatikus és fizikai módszerekkel is megvalósítható. A fragmentumok (DNS darabok) szekvenálását követően az átfedő szakaszok alapján hosszabb DNS szakaszokat állítanak elő bioinformatikai módszerekkel. A gének azonosítása során (annotáció) feltárul a közösségre jellemző funkcionális potenciál, vagyis az, hogy milyen fehérjék kifejeződésére van lehetőség, azok a fehérjék (enzimek) milyen vegyületek átalakítását végezhetik, milyen adaptációs folyamatokban játszhatnak szerepet stb.

Az NGS módszerek áteresztőképességének további növekedésével lehetővé vált ún. MAG-ok (metagenome-assembled genome; metagenom-alapján megszerkesztett genomok) létrehozása. Egy-egy mintából akár néhány tucat bakteriális genom is teljesen rekonstruálható, vagyis a tenyésztés megkerülésével lehetőség nyílik a baktériumok genom alapú jellemzésére. Ennek különösen az eddig nem tenyésztett csoportok élőhelyükön

betöltött szerepének felderítésében van jelentősége. Például egy csillós szulfát-redukáló baktérium genom-szinten jellemezhető MAG alapján, ha a *dsrA* (disszimilatórikus szulfid-reduktáz fehérje A alegységét) és *fliC* (flagellin fehérjét kódoló) géneket együttesen tartalmazza a genomja, anélkül, hogy mikroszkópban látnánk a csillókat vagy teszteltük volna a baktérium szulfát-redukáló képességét. Ne feledjük azonban, hogy genomikai alapokon csupán predikciók tehetők, hiszen nem lehetünk biztosak abban, hogy az adott enzim/fehérje tényleg funkcióképes-e, tényleg kifejeződik-e a vizsgált a környezetben (nem is beszélve arról, hogy akár olyan reakciót is katalizálhat, amit eddig még nem írtak le az enzim esetében).

7.4 Fluoreszcens *in situ* hibridizáció

Fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) során a sejtek RNS-éhez a sejten belül, a térszerkezetüket és általában a térbeli elhelyezkedésüket is megőrizve, fluoreszcens festékkel jelölt taxon-specifikus, 15-20 nukleotid hosszúságú oligonukleotidokat kapcsolnak. A célmolekula általában riboszómális RNS (prokarióták esetében a 16S, eukariótáknál pedig a 18S rRNS). A próba különböző specifitású lehet: faj, nemzetség, család, domén. Léteznek mRNS-ekre és ezáltal anyagcsere aktivitásra specifikus eljárások is.

A FISH nagy előnye az, hogy a sejtek morfológiájának és az adott mintán (pl. élőbevonaton) belüli térbeli helyzetük megőrzése mellett filogenetikai és mennyiségi információhoz is juthatunk. A mátrixban (pl. poliszaharidok, ásványi szemcsék) vagy a sejtekben található különböző anyagok (pl. pigmentek) autofluoreszcenciája azonban erőteljesen elfedheti a próba jelét. Ilyen esetekben különleges, pl. jelerősítési technikákat alkalmaznak. Ennek egyik formája, hogy a próbához enzimet (torma-peroxidázt) kapcsolnak, ami a célsejten belül szubsztrátjával reagálva fluoreszcensen aktív terméket hoz létre (egy enzim több szubsztrátum molekulával reagál).

8 GYORSDIAGNOSZTIKAI ELJÁRÁSOK

A mikrobiológiában használatos gyors identifikációs módszerek lehetővé teszik, hogy 24-48 óra alatt (esetenként ennél is gyorsabban) a baktériumok tiszta tenyészetének vizsgálatával elvégezzük bizonyos taxonómiai csoportokban az adott baktérium identifikációját (azonosítását). Ehhez előre gyártott tesztcsíkokat/tesztlemezeket használhatunk. A multitesztek inokulálását és termosztálását követően a leolvasott eredményeket általában számítógépes adatbázisokkal összehasonlítva történik a vizsgált szervezet faji szintű azonosítása. A gyorsdiagnosztikai eljárások hátránya, hogy adatbázisaik nem tartalmazzák az összes ismert baktérium taxont (gyakran elsősorban kórtani szempontból fontos csoportokkal foglalkoznak), ezért előfordulhat, hogy pl. a környezeti mintákból izolált baktériumtörzsek pontos azonosítása nem lehetséges. Ugyanakkor a gyorsdiagnosztikai eljárások előnye, hogy általuk számos teszt (pl. különböző szénforrások értékesítésének vizsgálata, biokémiai reakciók tesztelése) egyidejű, gyors elvégzésére nyílik mód.

Az **API gyorsesztnék** számos változata létezik, pl. API 50CH – 50 különböző szénforrás hasznosításának vizsgálatára, API 20NE – a nonenterális baktériumok meghatározására, API ZYM – enzimatis aktivitások tesztelésére (lásd 118. GYAKORLAT). A gyártó által forgalmazott műanyag csíkok száraz formában (liofilizálva) tartalmazzák a mikrobák enzimaktivitásának és cukorbontási képességének vizsgálatához szükséges szubsztrátumokat. A vizsgálatok során a tesztcsíkokat a baktériumok tiszta tenyészetéből készített szuszpenzióval inokuláljuk, ami egyúttal biztosítja a szubsztrátumok rehidratálását is. Az inkubációs idő elteltével a teszteredményeket az anyagcsere végtermékeket indikátorok színváltozása (szénhidrátok esetén pl. metilvörös indikátor), vagy megfelelő reagensek hozzáadása utáni színváltozás jelzi (72. ábra).



72. ábra API ZYM teszt eredménye különböző baktériumtörzseken 6 órás 37 °C-on történő inkubációt követően (Fotó: Tóth E.)

118. GYAKORLAT

API gyorsesztnék alkalmazása a bakteriális diagnosztikában

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Escherichia coli ferde tenyészet

ismeretlen baktériumtörzs tenyészet ferde agaron

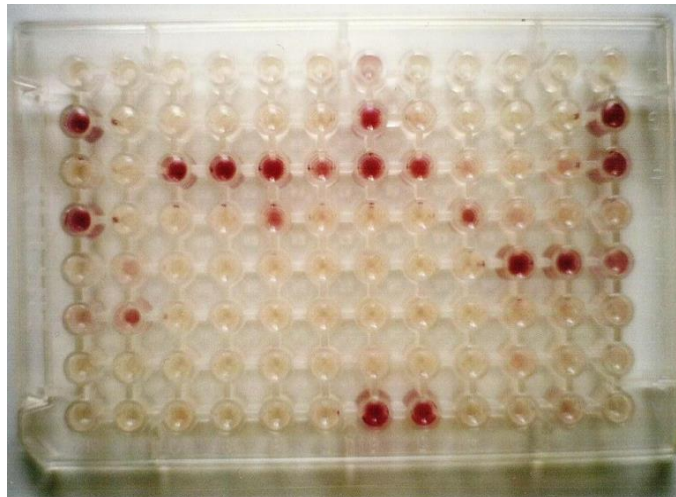
A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

API tesztsíkok és tárolók
pipetta, steril pipettahegyek
fiziológias sóoldat szuszpenzió készítéséhez
kémcsőkeverő (vortex)
optikai denzitás mérésére szolgáló készülék (ELISA reader)
Gram pozitív és Gram negatív bakteriális OD standard
steril vattatamponok
termosztát

A vizsgálat menete

1. A baktériumok ferde tenyészetéből készítsünk megfelelő sűrűségű szuszpenziót steril vattatamponok segítségével. Ne felejtsük el a csövek és későbbiekben a tesztsíkok precíz feliratozását!
2. Ennek a szuszpenzióknak 1 ml-ével inokuláljuk az indikátort tartalmazó tápfolyadékot.
3. A tároló doboz mélyedéseit töltsük fel steril desztillált vízzel.
4. Az inkubálás hőmérséklete és ideje a teszt típusától és baktériumtörzstől függően változhat, ezért ezt mindig a gyakorlatvezető határozza meg.
5. Az inkubációs idő leteltével olvassuk le a teszteredményeket és hasonlítsuk össze eredményeinket az irodalmi adatokkal.

A **BIOLOG gyorsidentifikációs rendszer** 95 különböző szénforrás egyidejű bakteriális oxidációjának vizsgálatán alapul (lásd 119. GYAKORLAT). A teszt eredménye az adott mikroorganizmus egyfajta "anyagcsere ujjlenyomata". A mikrotiter lemezek dehidrált formában tartalmazzák a szénforrásokat, valamint tetrazólium-ibolya festéket, amely segítségével a szénforrások bontásának képessége detektálható: a tetrazólium redoxfesték redukálódva bíborszínű formazánná alakul, ami egyben jelzi a szerves szubsztrátum oxidálódását (73. ábra). A baktériumok faji szintű azonosítását a mikrotiter lemezek kialakult szénforrás hasznosítási mintázat alapján számítógépes adatbázis segíti.



73. ábra Gram-negatív Biolog mikroplate 24 órás, 37 °C-on inkubációt követően (Fotó: Tóth E.)

119. GYAKORLAT

BIOLOG gyorseszteszt alkalmazása a bakteriális diagnosztikában

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Escherichia coli ferde tenyészet
ismeretlen baktériumtörzs tenyészet ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

BUGM tápagar lemez
oltókacs
Bunsen-égő
20 ml-es steril fiziológiás sóoldat
steril vattatampon
oltóvályú
pipetta, steril pipettahegyek
kémcsőkeverő (vortex)
turbidiméter
BIOLOG standard oldatok
optikai denzitás mérésére szolgáló készülék (ELISA reader)
termosztát

A vizsgálat menete

1. A vizsgálni kívánt baktériumtenyészetből oltókacs segítségével végezzünk leoltást (sűrűn cikk-cakk vonalban) BUGM tápagar lemezek felületére, ne felejtünk el mindent precízen feliratozni

2. Helyezzük a fertőzött tápagarlemezeket 16-24 órára 28 °C-os termosztátba.

3. Az inkubációt követően a tápagar lemezeken fejlődött baktériumtenyészetből steril vattatampon segítségével, 20 ml-nyi fiziológiás sóoldat felhasználásával készítsünk szuszpenziót (vigyázzunk arra, hogy a szuszpenzióba ne kerüljön tápagar darab). Kémcsőkeverő segítségével homogenizáljuk a mintát, és állítsuk be a szuszpenzió megfelelő denzitását turbidiméter segítségével a bakteriális OD standardok alapján. Ehhez használjuk a BIOLOG rendszer megfelelő standard oldatát. A transzmittancia szintnek 53-59%-os érték közé kell kerülni, ami körülbelül 3×10^8 sejt/ml koncentrációnak felel meg.

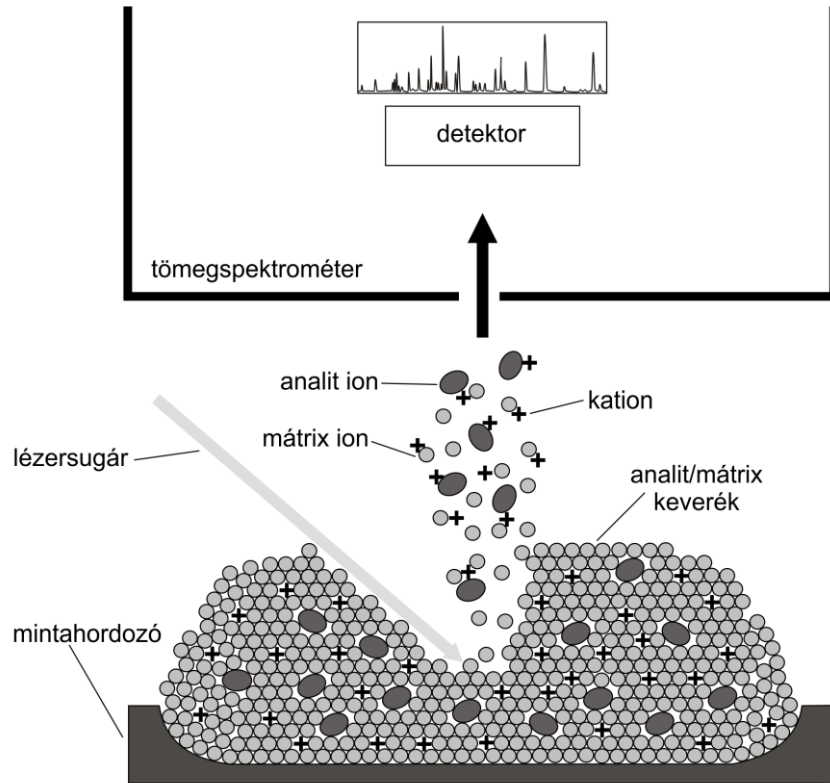
3. Öntsük a sejtsuszpenziót steril műanyag edénybe (oltóvályú), amiből pipetta segítségével mérjük 150-150 µl-nyi mennyiséget a BIOLOG lemez minden egyes csövecskéjébe.

4. A mikrotiter lemezeket inkubáljuk 35 °C-on.

5. A színváltozás mértékét 4 és 24 óra elteltével is olvassuk le ELISA leolvasó segítségével. A pozitív reakciót a csövecskében lévő indikátor bíbor színűvé válása jelzi. Az adott szénforrás hasznosítására utaló színváltozás mértékét a kontrollhoz (az A1 pozícióban lévő csövecskéhez) viszonyítva értékeljük.

A mátrix asszisztált lézer deszorpció/ionizáció (MALDI) az egyik legérzékenyebb **tömegspektrometriás (MS) módszer**, amely lehetővé teszi ionok képződését (elsősorban fehérje, peptid és oligonukleotid) molekulákból. A MALDI-TOF tömegspektrometriás elemzés során a minta ionizálódik, az ionok a tömeg/töltés (m/z) értékkel arányos repülési idő (time-of-flight, TOF) alapján szeparálódnak, majd detektálódnak (74. ábra). Az analízishez a megfelelő mátrix kiválasztása elengedhetetlen. (Általában olyan, könnyen ionizálódó, kis móltömegű, relatíve illékony vegyület, amelynek UV-ben vagy infravörös tartományban abszorpciós maximuma van. Többnyire aromás vegyületek, pl. szinapinsav,), hiszen a spektrum minőségét a mátrix nagymértékben befolyásolja.

Gyorsdiagnosztikában való felhasználásának alapját az intakt sejteken végezhető vizsgálat jelenti. Az elsősorban fehérjékből származó nagy tömegű ionok MALDI segítségével gyorsan és direkt módon detektálhatók. A baktériumtenyészet jellemzése ily módon olyan komplex ujjlenyomatokon alapul, melyek taxononként különbözőek. A spektrumokban egyes taxonok esetében elkülöníthetők nemzetség, faj vagy akár törzsspecifikus csúcsok is, amelyek lehetővé teszik az adott mikroba azonosítását. A rendszerezés alapfeltétele a spektrumok reprodukálhatósága, amely azonos tenyésztési és vizsgálati feltételek mellett valósul meg.



74. ábra A MALDI-TOF MS elvi sémája

Az intakt sejt MALDI-TOF MS napjainkban egyre elterjedtebben használatos a mikroorganizmusok jellemzésében, mivel a technika gyors, érzékeny, egyszerű minta-előkészítést igényel, és alkalmas a baktériumok nemzetség, faj, vagy akár törzs szintű elkülönítésére is.

9 MIKROBIÁLIS KÖRNYEZETÁLLAPOT ELEMZÉSEK

9.1 Felszíni vizek, szennyvizek mikrobiológiája, higiénés ellenőrzése

A természetes vizekben előforduló baktériumokat általában három nagy csoportba oszthatjuk: a víz természetes baktériumbiótájára (pl. *Spirillum*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium* fajok), talajbaktériumokra (pl. *Bacillus*, *Streptomyces*, *Aerobacter* fajok) és (fekális) szennyeződést jelző mikroorganizmusokra (pl. *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Clostridium welchii*).

A természetes vizek bakteriológiai minőségét különféle (pl. higiéniai vagy élelmiszer-mikrobiológiai) szempontból vizsgálhatjuk. Hazánkban a természetes vizek pl. felszíni vizek vagy fürdővizek bakteriológiai minősítése az erre a célra kijelölt akkreditált laboratóriumokban szabványos eljárások (pl. MSZ 12749:1993, MSZ 13690/2:1989) szerint történik. Az ivóvíz minőségi követelményeit és ellenőrzésének módját a 201/2001. kormányrendelet szabályozza.

A higiénés gyakorlatban a víz minősítésére olyan indikátor szervezeteket használnak, amelyek jelenléte arra utal, hogy a víz esetleg humán patogénekkel is fertőződött. Az indikátor szervezetnek az alábbi tulajdonságokkal kell rendelkeznie:

- mindenfajta víz (pl. csapvíz, folyóvíz, talajvíz, üdülési és pihenési célokat szolgáló víz, tengervíz, szennyvíz) jellemzésére alkalmasnak kell lennie;
- az indikátor mindenütt legyen jelen, ahol enterális patogének jelen lehetnek;
- az indikátor szervezet ne legyen obligát patogén;
- az indikátor az enterális patogéneknél hosszabb túlélési idővel legyen jellemezhető;
- az indikátor a fertőzött vízben ne szaporodjon;
- a fertőzött vízmintában lévő indikátor szervezet mennyisége mutasson közvetlen összefüggést a fekális szennyeződés mértékével;
- az indikátor kimutatására szolgáló vizsgálatnak nagy specificitást kell mutatnia;
- az indikátor kimutatására szolgáló teszt módszer legyen könnyen kivitelezhető.

A koliform szervezetek (pl. *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*), az Enterobacteriaceae család tagjai és kítűnő indikátor szervezetek. A higiénés gyakorlatban azokat a fakultatív anaerob, Gram negatív, endospórát nem képező, pálcika alakú baktériumokat nevezzük koliformoknak, amelyek a laktózt 35 °C-on sav és gázképzés mellett 48 órán belül fermentálják. A melegvérű élőlényektől származtatható *Escherichia coli* kimutatásával a víz (illetve bármely vizsgált anyag) fekális szennyezettségét valószínűsíthetjük.

A koliform szervezetek kvantitatív jellemzésére a kolititer és a koliszám értékek szolgálnak. Kolititernek azt a legkisebb vízmennyiséget nevezzük, amelyből tenyésztéses eljárással koliform szervezetet még kimutathatunk. A koliszám (koli-index) pedig a 100 ml vízből kitenyészthető koliform baktériumok számát jelzi.

A koliform szervezetek gyors elkülönítésére, a **koliszám meghatározására** többféle differenciáló táptalajt alkalmazhatunk (lásd 120. GYAKORLAT és 121. GYAKORLAT). Az eozin-metilénkék táptalaj az egyik legkiválóbb differenciáló táptalajunk. Hatása azon alapszik, hogy a laktózt bontó baktériumok esetében a képződő sav az eozint kicsapja, a csapadékot a táptalajban lévő metilénkék megfesti, ezáltal a baktériumtelepek változó árnyalatú lilás-kékes elszíneződést mutatnak. A táptalajban lévő szaharóz a kísérő mikrobióta növekedését segíti, de ezen túl a telepeknél a festékek gátló hatása is érvényesül. Az endo-agarban lévő sötétvörös színű bázikus fukszint Na-szulfittal elszíntelenítjük. A laktózerjesztés során annak egyik köztiterméke, az acetaldehid a szulfidot megköti, és ezáltal a festék színe érvényre jut. A típusos koliform szervezetek az endo-agart pirosítják és rajta sötétpiros, fémfényű telepek formájában nőnek.

120. GYAKORLAT

Koliszám meghatározása membránszűrő technika segítségével

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

vízminta

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

mérőhenger (100 ml víz kiméréséhez)
0,45 µm pórusátmérőjű membránszűrő
steril szűrőberendezés
endo tápagar Petri-csészében
fémcsipesz
Bunsen-égő
termosztát

A vizsgálat menete

1. A steril táptalajt tartalmazó Petri-csészére írjuk rá a minta azonosító jelzését és a vizsgálat megkezdésének időpontját.
2. Szűrjük át 100 ml vízmintát a 0,45 µm pórusátmérőjű steril membránszűrőn, majd a szűrőlapot csipesz segítségével, szűrt felülettel felfelé helyezzük a Petri-csészében lévő differenciáló endo tápagar felületére.
3. Helyezzük a Petri-csészét 24 órára 37 °C-os termosztátba.
4. Az inkubációt követően a koliform szervezetek telepszámának és a szűrt anyag mennyiségének ismeretében határozzuk meg a 100 ml vízmintában lévő koliszámot.

121. GYAKORLAT

Koliszám meghatározása hígításos-szélesztéses eljárással

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

szennyezett vízminta

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

9 ml-es steril víz
pipetta, steril pipettahegyek
endo tápagar lemez
eozin-metilénkék tápagar lemez
szélesztőbot (sterilizéshez alkohol)
Bunsen-égő
termosztát

A vizsgálat menete

1. A steril táptalajt tartalmazó Petri-csészére írjuk rá a minta azonosító jelzését és a vizsgálat megkezdésének időpontját.
2. A szennyezett vízmintából készítsünk 10-es léptékű hígítási sorozatot (lásd 25. GYAKORLAT).
3. Az egyes hígítási tagokból szélesszünk 0,1-0,1 ml-t endo és eozin-metilénkék tápagar lemezekre (lásd 25. GYAKORLAT).
4. A szélesztéssel fertőzött tápagar lemezeket fordított helyzetben (fedelükkel lefelé) helyezzük 37 °C-os termosztátba, és inkubáljuk 24 óráig.
5. Az inkubációt követően a koliform szervezetek telepszámának és a hígítás fokának ismeretében határozzuk meg a 100 ml vízmintából kimutatható koliszámot.

A koliszám meghatározására alkalmazott LMX tápleves működése azon alapul, hogy a táplevesben lévő MUG (4-metilumbelliferil-β-D-glukuronid) szubsztrátot a koliform szervezetek β-glukuronidáz (GUD) enzimük segítségével hasítani képesek (lásd

122. GYAKORLAT). A keletkező hasítási termék (4-metilumbelliferon) 366 nm hullámhosszú UV fény alatt fluoreszkál. A Gram negatív baktériumok közül az *E. coli* 96%-ban, az enterotoxikus *E. coli* 100%-ban, bizonyos *Shigella* fajok 44%-ban, míg a *Salmonella* nemzetségbe tartozó baktériumok 17%-ban termelik a GUD enzimet.

122. GYAKORLAT

Koliszám meghatározása LMX-levesben MPN módszerrel

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus
szennyezett vízminta

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

LMX tápleves
50 ml-es Erlenmeyer-lombik
pipetták, steril pipettahegyek
96 lyukú mikrotitráló lemez
félkémcsővek
kémcsőkeverő (vortex)
termosztát
366 nm hullámhosszú UV-lámpa

A vizsgálat menete

1. A mikrotiter lemezre írjuk rá a minta azonosító jelzését és a vizsgálat megkezdésének időpontját.

2. A mintából készítsünk hígítási sorozatot a következők szerint: 27 ml LMX táplevest tartalmazó 50 ml-es Erlenmeyer-lombikba mérjünk 3 ml vizsgálandó vízmintát, majd vortexeljük. Az így nyert kiindulási szuszpenzióból készítsünk 8 tagú hígítási sorozatot úgy, hogy pipetázzunk 0,3 ml-t egy előre feliratozott és 2,7 ml LMX-táplevest tartalmazó tesztsőbe. Erőteljes vortexelést követően ismét 0,3 ml-t pipetázzunk a következő kémcsőbe, s így tovább.

3. A hígítási sorozat minden tagjából (a kiindulási szuszpenzióból is) pipetázzunk 300 µl-t a 96 lyukú mikrotitráló lemezen egymás mellett lévő 5 zsebbe párhuzamosan (5 tesztsőves MPN-módszer).

4. A mikrotiter lemezt helyezzük 37 °C-os termosztátba, és inkubáljuk 24 óráig.

5. Az inkubációs idő elteltével a 366 nm hullámhosszú UV fény alatt fluoreszkáló csővek száma alapján képzett McCrady féle karakterisztikus szám alapján (lásd 13.6.1 fejezet) becsüljük meg a vízminta 100 ml-ében lévő koliszámot.

Bakteriofágokat különféle élőhelyekről izolálhatunk, s mivel ezek baktériumokban szaporodnak, bárholnan kimutathatók, ahol gazdaszervezeteik jelen vannak (lásd 123. GYAKORLAT). A fekális szennyeződést indikáló ***Escherichia coli* bakteriofágjának kimutatása** adott környezeti mintából a mikrobiológiai vízminősítés egyik alternatív eszköze.

123. GYAKORLAT

Kolifágok mennyiségének kimutatása lemezöntéses módszerrel

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus
szennyezett vízminta

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

ATTC 13706 *Escherichia coli* törzs szuszpenziója
steril lombik (100 ml vízmintához)
mérőhenger
vízfürdő
4 ml CaCl₂ oldat

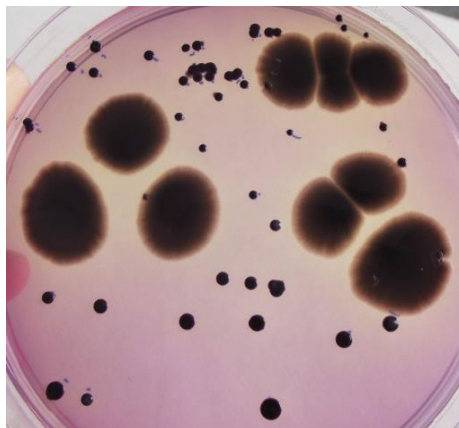
TTC (trifenil-tetrazolium-klorid)
5 ml 96%-os etanol
100 ml steril felolvasztott húspepton tápagar
steril Petri-csészék
Bunsen-égő
termosztát

A vizsgálat menete

1. A steril Petri-csészékre írjuk rá a minta azonosító jelzését és a vizsgálat megkezdésének időpontját.
2. Mérjük egy steril lombikba 100 ml vízmintát, majd helyezzük 45-47 °C-os vízfürdőbe. Tegyük 4 ml steril CaCl₂ oldatot 10 percre ugyanilyen hőfokú vízfürdőbe.
3. Közben oldjunk fel 0,05 g TTC-t 5 ml 96%-os etanolban, majd az 1%-os TTC oldatból 1 ml-nyi, míg a steril CaCl₂ oldatból 1,2 ml-nyi mennyiséget adjunk hozzá a 100 ml felolvasztott húspepton tápagarhoz.
4. A vízmintát inokuláljuk az ATTC 13706 számjelzésű *Escherichia coli* törzs 37 °C-on rázatott 24 órás tenyészetének 5 ml-nyi szuszpenziójával.
5. Néhány perc múlva a vízmintát óvatosan öntsük a tápagarhoz, lassan keverjük össze, és buborék képződése nélkül öntsünk belőle tápagar lemezeket steril Petri-csészékbe.
6. Megszilárdulás után a tápagar lemezeket fordított helyzetben (fedelükkel lefelé) helyezzük 37 °C-os termosztátba, és inkubáljuk 24 óráig.
7. Az inkubációs idő elteltével végezzük el kolifágok mennyiségének meghatározását. Az élő baktériumsejtek redukálják a TTC-t, ezáltal a táptalaj pirosas elszíneződést mutat. Fehér tarfoltok jelzik azokat a helyeket, ahol a fágok elpusztították a baktériumsejteket.

A Gram pozitív kokkusok között a rövidebb-hosszabb láncokat képező *Streptococcus* nemzetség egyes tagjai ember- és állat patogének, de az egészséges emberi vagy állati szervezet is hordozhatja őket. A *Streptococcus faecalis* a vízben gyorsan elpusztul, vizsgálatát mégis az indokolja, hogy a kolibaktériummal szemben – amely a természetben csaknem mindenütt megtalálható – a környezetben nem szaporodik, így módon a ***Streptococcus faecalis* kimutatása** megerősíti a kolibaktériumok vizsgálatával kapott eredményt és a víz friss szennyeződésére utal (lásd 124. GYAKORLAT).

A klinikai járványügyi laboratóriumokban általánosan használt E-67 agar szelektivitását a Na-taurokolát, a kristályibolya és tellurit biztosítja, mely utóbbit a *Streptococcus faecalis* erősen redukálja és ezért a táptalajon fekete telepeket képez, más baktériumok azonban alig nőnek rajta (75. ábra).



75. ábra *Streptococcus* spp. telepek Szita E-67 differenciáló tápagaron (Fotó: Makk J.)

A jellegzetes telepek relative kisméretűek, kör alakúak és feketék.

124. GYAKORLAT

Fekális eredetű *Streptococcus*ok kimutatása Szita-féle E-67 tápagon

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus
szennyezett vízminta

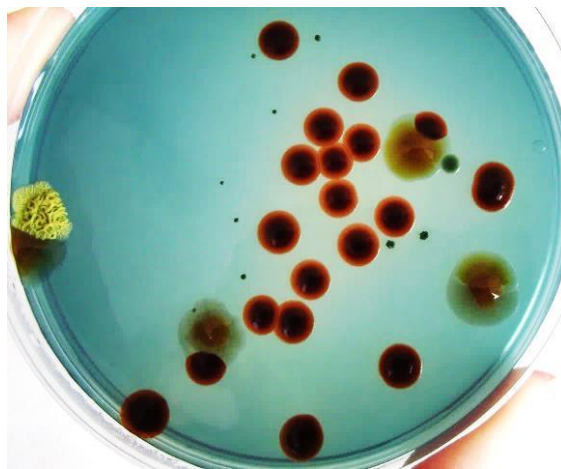
A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök
Szita-féle E-67 tápagar lemez
pipetta, steril pipettahegyek
szélesztőbot (sterilizéshez alkohol)
Bunsen-égő
termosztát

A vizsgálat menete

1. A steril táptalajt tartalmazó Petri-csészére írjuk rá a minta azonosító jelzését és a vizsgálat megkezdésének időpontját.
2. A szennyezett vízmintából készítsünk 10-es léptékű hígítási sorozatot (lásd 25. GYAKORLAT).
3. Az egyes hígítási tagokból szélesszünk 0,1-0,1 ml-t Szita-féle E-67 tápagar lemezekre (lásd 25. GYAKORLAT).
4. A szélesztéssel fertőzött tápagar lemezeket fordított helyzetben (fedelükkel lefelé) helyezzük 37°C-os termosztátba, és inkubáljuk 24 óráig.
5. Az inkubációt követően a fekete színű telepek számának és a hígítás fokának ismeretében határozzuk meg a 100 ml vízmintában lévő *Streptococcus* számot.

A *Pseudomonadaceae* család tagjai a természetben elterjedt, talajokban és vizekben előforduló Gram negatív, poláris csillózatú, szigorúan légző, többségében obligát aerob baktériumok. Képviselőik között a *Pseudomonas aeruginosa* vizekben, szennyvízben és szennyezett ivóvízben közönségesen megtalálható baktérium. Nem jelez friss fekális szennyeződést, bár gyakran kimutatható nedves kórházi berendezéseken (pl. vízcsapok, mosdók) és felszereléseken (pl. altató- és lélegeztetőberendezések csövei). A *Pseudomonas aeruginosa* többnyire csökkent ellenállóképességű, leromlott, immunszuppresszív, sugár- vagy antibiotikum kezelésben részesülő betegeket támad meg (lásd 125. GYAKORLAT).

A **pseudomonasok kimutatására** használhatjuk a brómtimolkék, laktóz, pepton és cisztin tartalmú brolacin tápagart, melyen ezek a szervezetek nagy, barnás központú, a környező táptalajt kékre színező telepeket képeznek (76. ábra).



76. ábra *Pseudomonas* sp. telepek Brolacin differenciáló táptalajon (Fotó: Makk J.)

A tipikus *Pseudomonas* telepek nagyméretűek, barnás középonttal, a környező tápagar kékes színezetű.

125. GYAKORLAT

Pseudomonasok kitenyésztése brolacin agaron

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

vízminta

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

brolacin tápagar lemez
pipetta, steril pipettahegyek
szélesztőbot (sterilizéshez alkohol)
Bunsen-égő
termosztát

A vizsgálat menete

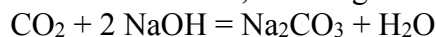
1. A steril táptalajt tartalmazó Petri-csészére írjuk rá a minta azonosító jelzését és a vizsgálat megkezdésének időpontját.
2. A szennyezett vízmintából készítsünk 10-es léptékű hígítási sorozatot (lásd 25. GYAKORLAT).
3. Az egyes hígítási tagokból szélesszünk 0,1-0,1 ml-t brolacin tápagar lemezekre (lásd 25. GYAKORLAT).
4. A szélesztéssel fertőzött tápagar lemezeket fordított helyzetben (fedelükkel lefelé) helyezzük 37 °C-os termosztátba, és inkubáljuk 24 óráig.
5. Az inkubációt követően a kékes udvarú, barna közepű telepek számának és a hígítás fokának ismeretében határozzuk meg a 100 ml vízmintában lévő pseudomonas számot.

Az anaerob spórás *Clostridium* spp. a vízben hosszú ideig életképes marad, ezért jelenléte régi, igen erős, hosszantartó szennyezettséget indikál (lásd 47. GYAKORLAT).

A természetes vizekbe jutó szerves szennyeződések elsősorban a vízben levő aerob mikroorganizmusok bontják le. A folyamat oxigénfogyasztással jár, vagyis a mineralizáció során a természetes vizek oldott O₂ tartalma csökken, akár teljesen el is fogyhat, ami a magasabb rendű szervezetek pl. halak pusztulásához vezethet.

A szennyezett víz **biológiai oxigén igényének (BOI) meghatározásával** arról szerezhetünk információt, hogy a befogadó víztestben milyen oldott oxigéntartalom csökkenés következne be a szennyezett víz adott térfogatának bevezetése hatására (lásd 126. GYAKORLAT). A BOI érték egyúttal jelzi a szennyezett víz mikrobiológiai úton lebontható szerves anyag mennyiségét is. A BOI mérését a gyakorlatban az 5 napos respirometrikus teszt segítségével végezhetjük el, ahol a lebontó aktivitás kimutatására az O₂ parciális nyomásváltozását mérjük zárt palackban. Ennek során a szerves szennyezővel terhelt vízminta adott mennyiségét ismert térfogatú edénybe mérjük, és állandó hőfokon (20°C) inkubáljuk. Ha a palackba zárt levegő nyomását ellenőrizzük, akkor két folyamattal kell számolnunk: nyomásesés következik be, ha egy gáz elfogy (esetünkben az O₂), illetőleg fokozódik a nyomás értéke, ha gáz képződik inkubálás közben (aerob viszonyok között ez CO₂ lehet). Az OxiTop (WTW GmbH, Weilheim, Németország) rendszer segítségével az öt (vagy több) napos inkubáció alatti nyomásváltozást mérhetjük, illetve a mérőfej segítségével elektronikusan tárolhatjuk is az adatokat.

A BOI értéke a rendszerben történt O₂ parciális nyomásváltozással lesz arányos. Ahhoz, hogy ezt mérni tudjuk a (termelt) CO₂-ot el kell nyeletni. Erre a célra az edény gázterében elhelyezett NaOH pasztillát alkalmazzuk, ami megköti a CO₂-ot:



Az OxiTop rendszer központi egysége a BOI számítást az alábbi képlet alapján el is végzi:

$$BOI = \frac{M_{(O_2)}}{R \times T_m} \times \left[\frac{V_t - V_1}{V_1} + \alpha \frac{T_m}{T_0} \right] \times \Delta p_{(O_2)}$$

ahol BOI a biológiai oxigénigény (mg l^{-1}), $M_{(O_2)}$ az oxigén móltömege ($32000 \text{ mg mol}^{-1}$), R az egyetemes gázállandó ($83,144 \text{ l mbar mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T_0 "referencia" hőmérséklet ($273,15 \text{ K}$), T_m a mérés hőfoka, V_t az edény térfogata (ml), V_1 a minta térfogata (ml), α a Bunsen abszorpciós koefficiens ($0,03103$), $\Delta p_{(O_2)}$ az O_2 parciális nyomásának változása (mbar).

126. GYAKORLAT

Szennyezett vízminta BOI értékének meghatározása OxiTop rendszerben

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus
szennyezett vízminta

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök
mérőhenger
mágneses keverőrúd
mágneses keverő
OxiTop palackok
termosztát

A vizsgálat menete

1. A minta jelzését vezessük rá a mérőpalackra.
2. A gyakorlat során 0,5 l-es mérőedények használatával végzünk BOI_5 mérést. A várható BOI érték függvényében töltjük fel a palackokat megfelelő térfogatú mintával (erről a gyakorlatvezető ad tájékoztatást), és tegyük bele mágneses keverő rudat.
3. A mérőüveg nyakába helyezzük be a NaOH pasztilla tartóedényét, amely egyben tömítésként is szolgál. Az edénybe helyezzünk 2-5 pasztillát, és zárjuk le gondosan a fej rácsavarásával. Ezután a központi egység segítségével kapcsoljuk be a mérőfejet és állítsuk be. (A központi egység és a mérőfej infravörös távkapcsolatban áll.)
4. Az edényt helyezzük $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ termosztátba mágneses keverő berendezésre és inkubáljuk sötétben 5 napig.
5. Az inkubációs idő elteltével a központi egység segítségével a tárolt nyomásváltozás adatokat hívjuk le, és az automatikusan számolt BOI értéket jegyezzük fel.

9.2 Talajok mikrobiológiai vizsgálata

A talajok mikrobiológiai elemzése során a csíraszám-becslésekkel (biomassza meghatározás) párhuzamosan érdemes az általános mikrobiális aktivitást is vizsgálni. A **talaj kataláz aktivitása** alapján a mikroorganizmusok számára, illetve aktivitására is következtethetünk (lásd 127. GYAKORLAT). Az erőteljes kataláz aktivitás arra utal, hogy sok mikroorganizmus van a talajban, és a szervesanyag lebontásában, valamint a humuszképződésben jelentős részt vállalnak. Fontos megjegyezni azonban, hogy kataláz enzimet növényi maradványok is tartalmaznak.

127. GYAKORLAT

Kataláz talajenzim gyorsteszt

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus
4-5 eltérő típusú légszáraz talajminta

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

szita
fecskendő + tű
100 ml-es Erlenmeyer-lombik
2 db átfúrt gumidugó műanyag csővel
speciális mérőhenger
3%-os hidrogén-peroxid oldat

A vizsgálat menete

1. Az apró növényi maradványok eltávolítása érdekében alaposan szitáljuk át a légszáraz talajmintákat.
2. Mérjünk 5 g talajt egy 100 ml-es Erlenmeyer-lombikba, majd zárjuk le a lombik száját egy átfúrt gumidugóval.
3. A furaton vezessünk keresztül egy csövet úgy, hogy annak másik vége egy megfordított („fejre állított”) és vízzel feltöltött mérőhengerben végződjön.
4. Adjunk a talajmintához fecskendővel 10 ml 3%-os hidrogén-peroxidot. A talajban lévő kataláz enzim katalizálja a hidrogén-peroxid vízzé és oxigénné történő bomlását. A termelődött oxigén mennyiségét a mérőhenger vízszintjének csökkenéséből lehet meghatározni. A lombikot folyamatosan forgassuk 3 percig, majd olvassuk le a mérőhengeren a vízszint csökkenést. A kapott mérési eredményt 1 percre határozzuk meg.
5. Hasonlítsuk össze és értékeljük a különböző talajok 1 perces adatait.

A talajok **aerob biológiai aktivitásának becslésére** a képződött mikrobiális anyagcsere termékek, elsősorban a **CO₂ termelés mérését** is alkalmazhatjuk. A szerves anyagok aerob lebomlását a glükóz példáján mutatjuk be (lásd 128. GYAKORLAT). A glükóz CO₂-dá oxidálódásakor a terminális elektron akceptorként szolgáló O₂ vízzé redukálódik, miközben energia (ATP) és redukáló erő (NADH) képződik. Utóbbiak segítségével a szerves anyag egy része sejttanyaggá (C₄H₇O₂N) konvertálódik.

Az ábrán bemutatott ideális esettel ellentétben, a valóságban a termelt CO₂ mennyisége a szerves szubsztrátum degradálhatóságától, valamint a lebontásban résztvevő mikroszervezetek anyagcserejének hatékonyságától függ.

A méréseket legegyszerűbben hagyományos "Biométer"-lombik alkalmazásával végezhetjük. Ez esetben KOH szolgál a képződő CO₂ elnyelésére.

128. GYAKORLAT

Talajok mikrobiális aktivitásának becslése CO₂ termelés mérésével

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

talajminta

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

250 ml-es "Biométer" lombik
0,1 M KOH oldat
frissen kiforralt desztillált víz
2 M BaCl₂ oldat
100 ml Erlenmeyer lombik
0,05 M HCl oldat
fenolftalein indikátor oldat
laboratóriumi mérleg
mérőkanál
20 ml műanyag fecskendő
büretta
szemcseppentő, pipetta, steril pipettahegyek

termosztát

A vizsgálat menete

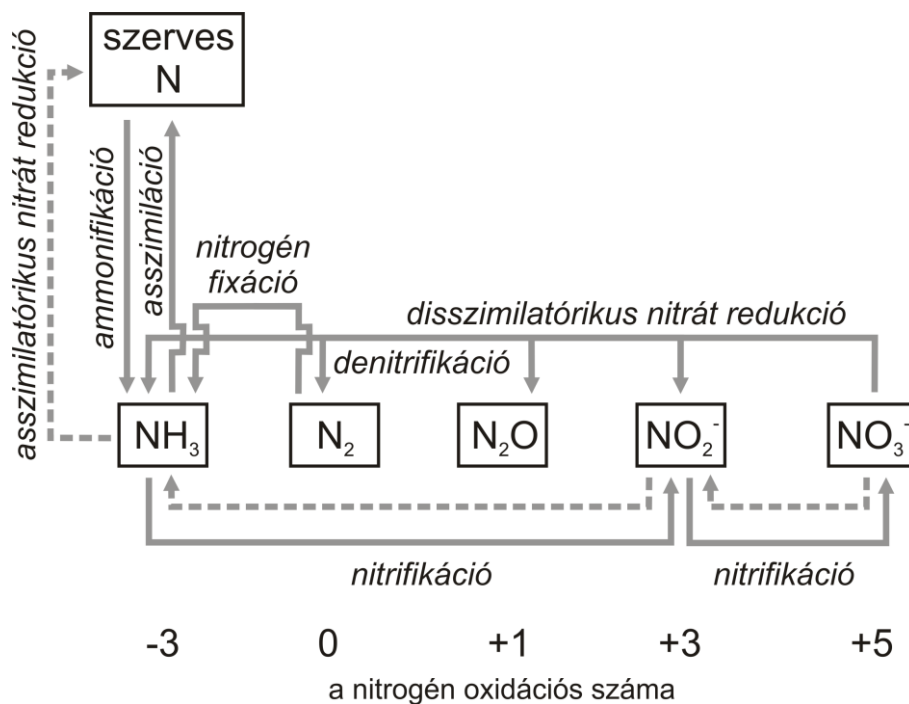
1. A talajmintából mérjük 50 g-ot a "Biométer" lombikba.
2. A lombik oldalcsövébe a fecskendő segítségével mérjük 15 ml 0,1 M KOH oldatot (a fecskendőt hagyjuk rajta az oldalcsövön), majd zárjuk le a lombikot.
3. A "Biométer" lombikot 10°C-on inkubáljuk a gyakorlatvezető által meghatározott ideig.
4. A "Biométer" lombikok oldalcsövéből fecskendővel szívjuk ki a 15 ml 0,1 M KOH oldatot és töltjük egy tiszta 100 ml-es Erlenmeyer lombikba.
5. A KOH tartályt (fecskendő segítségével) mossuk ki 35 ml CO₂ mentes frissen kiforralt desztillált vízzel. A mosóvizet is töltjük a 100 ml-es Erlenmeyer lombikba.
6. A "Biométer" lombikokat ismételtén töltjük fel 15 ml 0,1 M KOH-oldattal, majd zárjuk le.
7. Inkubáljuk tovább 10°C-on a gyakorlatvezető által meghatározott ideig.
8. Az 50 ml oldatot (15 ml KOH + 35 ml mosóvíz) tartalmazó 100 ml-es Erlenmeyer lombikba mérjük 1 ml 2 N BaCl₂ oldatot, valamint 1 csepp fenolftalein indikátort.
9. A 100 ml-es lombikokat titráljuk 0,05 M HCl segítségével.
10. A termelődött CO₂-ot a titrálás során fogyott sósavoldat térfogatából az alábbi képlet segítségével számoljuk ki:

$$V_{\text{CO}_2} = 1,175 \times 10^{-5} \times C_{\text{HCl}} \times (V_{\text{KOH}} - V_{\text{MINTA}})$$

ahol V_{CO_2} a termelődött CO₂ mennyisége m³-ben, C_{HCl} a sósav töménysége (Mol l⁻¹), V_{KOH} a 15 ml KOH mérőoldatra fogyott sósav ml-ben, V_{MINTA} az inkubálás után kivett KOH oldatra fogyott sósav ml-ben.

9.3 A nitrogén körforgalomban résztvevő mikroorganizmusok vizsgálata

A nitrogén a természetben különböző oxidációs állapotú vegyületekben fordul elő, amelyeket az élőlények által végzett átalakítási folyamatok kapcsolnak össze (77. ábra). Ezen folyamatok jelentős részét a baktériumok végzik.



77. ábra A N elemkörforgalmának alapfolyamatai

A **nitrogénkötő** (nitrogénfixáló) **szervezetek** például kivétel nélkül prokarióták. A folyamat során a nitrogéngáz ammóniává redukálódik. A különböző nitrogénkötő fajok alig eltérő struktúrájú nitrogénáz enzimrendszerük segítségével, gyakorlatilag azonos reakció szerint fixálnak nitrogént. Ugyanakkor ökológiai szempontból e szervezetek két nagy csoportba oszthatók: szabadon vagy "laza" (asszociatív) szimbiózisban élők, (pl. *Azotobacter*, *Clostridium* és *Anabaena*), és az obligát szimbionták. Az utóbbiak közül elsősorban a *Bradyrhizobium* nemzetség tagjait kell megemlíteni, amelyek pillangós virágú gazdaszervezetekhez kötődnek. A gyökérszőrök "*Rhizobium* fertőzése" során a növényen gyökérgümők képződnek. A **gyökérgümőkben található bakteroidok** tovább nem osztódó, jellegzetes morfológiájú, a nitrogénkötés szempontjából aktív baktériumsejtek (lásd 129. GYAKORLAT). Mivel a nitrogénáz oxigénre igen érzékeny enzim, aerob körülmények között szükség van a sejten belüli oxigénkoncentráció csökkentésére, úgy, hogy emellett a baktériumsejtek légzésük során megfelelő mennyiségű oxigénhez jussanak. Ezt a problémát a gyökérgümőkben (a növényi sejtek citoplazmájában) található oxigén-szállító molekula, a leghemoglobin oldja fel.

129. GYAKORLAT

Bakteroidok morfológiájának vizsgálata fénymikroszkóppal

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

gyökérgümőkben található bakteroidok

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

gyökérminta (pl. lucerna, lóhere)

szike

csipesz

tárgylemez

metilénkék festékoldat

Bunsen-égő

fénymikroszkóp

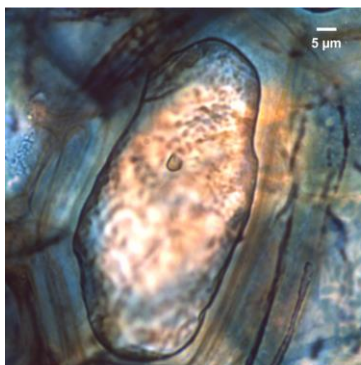
A vizsgálat menete

1. Távolítsunk el egy gyökérgümőt a mosott gyökérről szike és csipesz segítségével (az aktív gyökérgümő színe a leghemoglobin miatt halvány rózsaszínű).

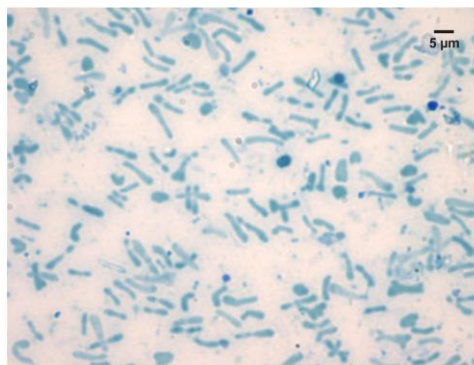
2. Két tárgylemez között óvatosan nyomjuk szét a gümőt.

3. Levegőn szárítsuk meg a preparátumot, majd fixáljuk és fessük metilénkékkel (lásd 54. GYAKORLAT).

4. Figyeljük meg mikroszkóppal, és rajzoljuk le a bakteroidok (nagy méretű, szabálytalan pálcák) morfológiáját (78. ábra).



(a)

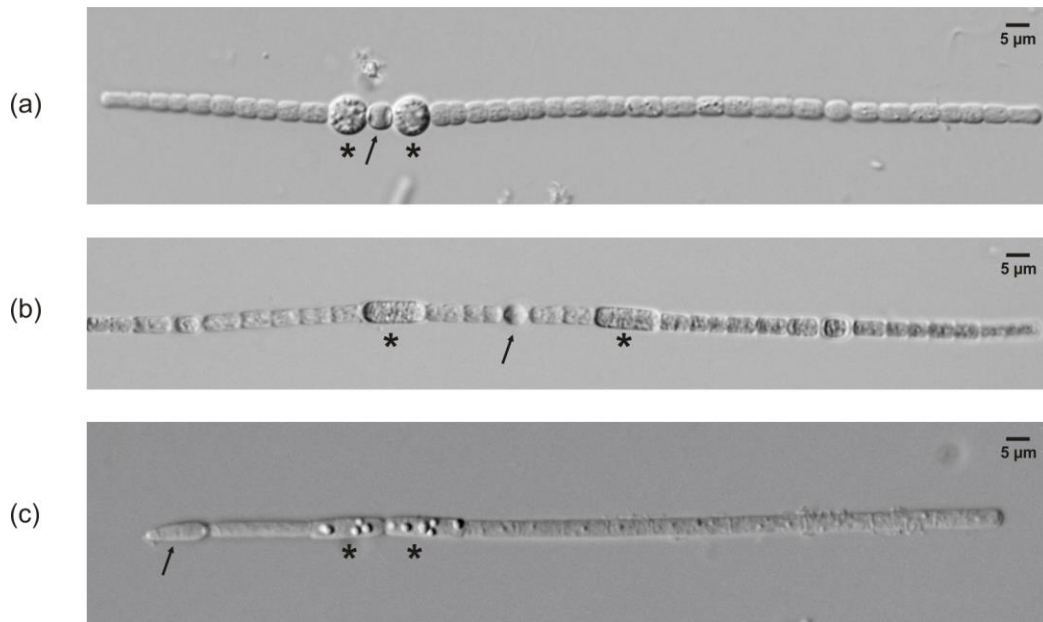


(b)

78. ábra Bakteroidok morfológiája (Fotó: Vajna B.)

Bakteroid tartalmú növényi sejt a gyökérgümőben (a). Metilénkékkel festett bakteroid sejtek (b).

Egyes **szabadon élő cianobaktériumoknál** (pl. *Cylindrospermopsis raciborskii*) a nitrogén-fixálás (79. ábra) megvastagodott falú, differenciálódott fonálsejtekben, a heterocisztákban zajlik (lásd 130. GYAKORLAT).



79. ábra Jellemző balatoni fonalas nitrogénkötő cianobaktériumok (Fotó: Vörös L. és Somogyi B.)

Anabaena sp. (a), *Aphanizomenon* sp. (b), *Cylindrospermopsis raciborskii* (c)
A heterocisztákat nyilak, az akinétákat csillagok jelölik.

130. GYAKORLAT

Cianobaktériumok morfológiai vizsgálata fénymikroszkóppal

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus
szabadon élő cianobaktériumok

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

- vízminta (pl. tó, patak, akvárium)
- szemcseppentő
- tárgylemez
- fedőlemez
- fénymikroszkóp

A vizsgálat menete

1. Cseppentsünk vízmintát a tárgylemezre, majd fedjük le fedőlemezzel.
2. Figyeljük meg mikroszkóppal, és rajzoljuk le az egysejtű, fonalas és kolóniás cianobaktériumok és egyéb algák morfológiáját. Próbáljunk heterocisztákat keresni!

Ammonifikáció során nitrogéntartalmú szerves anyagokból (pl. aminosavak, karbamid) ammónia szabadul fel (ez az egyik módja a szerves nitrogén feleslegtől való megszabadulásnak is) (lásd 131. GYAKORLAT). Az ilyen deaminációs reakciókhoz a mikroorganizmusok általában többféle, különböző szubsztrát-specifitású enzimmel rendelkeznek. A nitrogén biokémiai ciklusában mineralizációnak számító lépés során felszabaduló ammóniát, illetve ammónium iont más élőlények (pl. növények, mikrobák) ismét felvehetik, és aminosav-szintézisük során értékesíthetik, vagy a talajban humuszkolloidok adszorbeálhatják.

131. GYAKORLAT

Ammonifikáció kimutatása

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismeretlen baktériumtörzs tenyészet ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

peptonvíz tápleves
urea tápleves
oltókacs
steril víz kémcsőben
pipetta, steril pipettahegyek
Bunsen-égő
termosztát
Nessler-reagens

A vizsgálat menete

1. Feliratozást követően, készítsünk a tenyészetből szuszpenziót steril vízben, majd pipetta segítségével adjunk a táplevesekhez 0,1-0,1 ml baktérium szuszpenziót.

2. Inkubáljuk a tenyészeteket 1 hétig 28 °C-on.

3. Az inkubációs idő elteltével a képződő ammóniát a táplevesekhez adott néhány csepp Nessler-reagens segítségével mutathatjuk ki. A reakció során képződő narancssárga komplex (bázikus higany-amido-jodid) jelzi a pozitív reakciót. A gyenge pozitív reakció sárga, míg az erős pozitív reakció sárgásbarna színt és precipitációt eredményez. A színváltozás elmaradása esetén negatív a reakció.

Aerob körülmények között az ammónia talajokban, vizekben nem halmozódik fel. Asszimilációja (aminosav szintézis) mellett egyes baktériumok disszimilatórikus energiaszerző folyamataikban elektrononorként (valamint redukáló-képesség előállítására) is felhasználhatják. A **nitrifikáció** két lépésben megvalósuló folyamatát kemolitotróf autotróf baktériumok [ammónia-oxidáció (pl. *Nitrosomonas*, *Nitrospira*): $\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^-$, illetve nitrit-oxidáció (pl. *Nitrobacter*, *Nitrospina*): $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$] és különböző heterotróf mikroorganizmusok (energiatermelés nélkül) végzik (lásd 132. GYAKORLAT). A nitrát ion a növények számára az ammóniánál könnyebben felvehető, viszont mobilisabb lévén a talajokból könnyen kimosódik, és a felszíni vagy felszín alatti vizekbe kerülve vízminőség romlást okozhat.

Az ammónia-oxidáció egyik kulcsenzime az ammónia-monooxygenáz. Ez az enzim rézionok jelenlétében aktív. Az allil-tiourea (ATU) szelektív rézkelátor, ezért képes ezt az enzimet gátolni.

132. GYAKORLAT

Nitrifikáció kimutatása és gátlása allil-tioureával

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

talajban élő nitrifikáló baktériumok

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

ammónia tartalmú tápleves
nitrit tartalmú tápleves
talajminta
9 ml-es steril víz kémcsőben
pipetta, steril pipettahegyek
kémcsőkeverő (vortex)
allil-tiourea (ATU)

laboratóriumi mérleg
termosztát
üres kémcsövek
Nessler-reagens, Griess-Ilosvay-féle reagens
cinkpor

A vizsgálat menete

1. Feliratozást követően a táplevesek feléhez adjunk ATU-t 5 mg/l végkoncentrációban.

2. Készítsünk a talajmintából szuszpenziót steril víz felhasználásával: adjunk 9 ml steril vízhez 1 g talajt, majd alaposan homogenizáljuk kémcsőkeverővel.

3. Pipetta segítségével oltuk be a tápleveseket 0,5 ml talajszuszpenzióval.

4. Inkubáljuk a beoltott tápleveseket 1 hétig 28 °C-on.

5. Az inkubációs idő elteltével a táplevesekből 1-1 ml-t pipetázunk át üres kémcsövekbe. A kivett mintákhoz adjunk néhány csepp Griess-Ilosvay-féle reagenst. Rázzuk össze a mintát. A 30 mp-en belül megjelenő meggypiros szín nitrit jelenlétére utal.

6. Ha nem kapunk színreakciót az ammónia tartalmú tápleves esetében, akkor vagy nem történt ammónia-oxidáció (inhibitor hatása), vagy a képződött nitrit teljes mennyisége tovább oxidálódott nitráttá. Ennek eldöntéséhez adjunk a kémcsövekhez még egy kevés cinkport is (max. 5 mg/ml). Ha nitrát képződött, akkor a fémcink azt redukálja, és a képződött nitritet az előzőleg hozzáadott Griess-Ilosvay-féle reagens jelzi.

7. Ha nem jelenik meg ekkor sem a meggypiros szín, akkor a maradék ammónia tartalmú tápleveshez adjunk néhány csepp Nessler reagenst. A keletkező sárgásbarna szín, csapadék a megmaradt ammónium-ionokat jelzi. Ha a nitrit tartalmú táplevesnél nem kapunk meggypiros színt, akkor a nitrit-oxidáció végbement. Ennek igazolásához, itt is végezzük el a cink poros redukálást.

A **nitrát és nitrit disszimilatórikus redukciója** során a végtermék nitrit, dinitrogén-oxid, nitrogéngáz vagy ammónia (lásd 133. GYAKORLAT). Biokémiai szempontból a folyamat nitrát-redukció: a nitrát elektron-akceptorként való hasznosítása különböző szerves és szervetlen anyagok (pl. H₂S) biológiai oxidációja során megy végbe. Gáz halmazállapotú, vízben gyengén oldódó végtermék (N₂O, NO, N₂) képződése esetén denitrifikációról beszélünk. A folyamat anaerob, tömörödött vagy vízzel átitatott talajokban, folyó- és állóvízi üledékekben, állatok gyomor-bélrendszerében fordul elő. E folyamat jelentős szerepet játszik a talajok, élővizek nitrogén-egyensúlyának fenntartásában és öntisztulásában.

133. GYAKORLAT

Disszimilatórikus nitrát-redukció kimutatása

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

nitrát-redukáló és denitrifikáló baktériumok
ismeretlen baktériumtörzs tenyészet ferde agaron

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

talaj- vagy üledékminta
Durham-csővet tartalmazó nitrát tartalmú tápleves
steril víz kémcsőben
pipetta, steril pipettahegyek
kémcsőkeverő (vortex)
termosztát
Nessler-reagens
Griess-Ilosvay-féle reagensek
cinkpor

üres kémcsövek

A vizsgálat menete

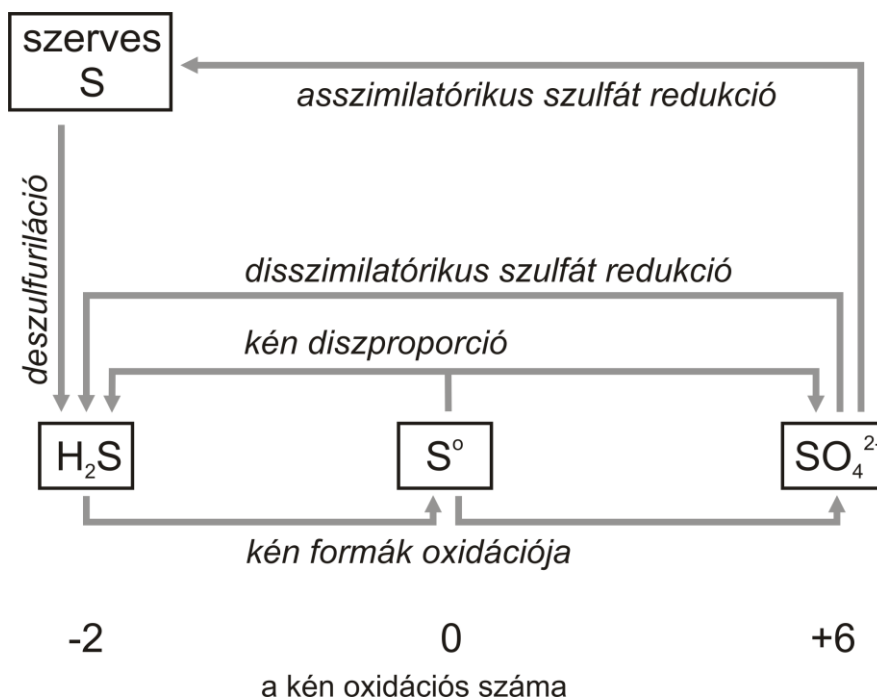
1. Feliratozást követően steril víz felhasználásával készítsünk a környezeti mintából és a tenyészetből szuszpenziót.
2. A táplevesekhez adjunk kb. 0,5 ml talajszuszpenziót, illetve 0,1 ml baktérium szuszpenziót.
3. A beoltott tápleveseket inkubáljuk 2 hétig 28 °C-on.
4. Az inkubációs idő elteltével a gáz halmazállapotú nitrogén-vegyületek (N_2O , NO , N_2) képződését a Durham-csőben megjelenő buborék jelzi. A nitrit és az ammónia kimutatását Griess-Ilosvay-féle reagenssel, illetve Nessler-reagenssel végezzük (lásd 132. GYAKORLAT).

9.4 A kénkörforgalomban résztvevő mikroorganizmusok vizsgálata

A kén mikrobiológiai átalakításának folyamatai még a nitrogénénél is összetettebbek, hiszen a kén több oxidációs állapotot vehet fel, továbbá számos átalakulás a különböző kénformák között abiotikusan is végbemegy (80. ábra). A legjelentősebb kénformák esetében a kén háromféle oxidációs számmal fordul elő: -2 (szulfhidril csoport, R-SH és szulfid, S^{2-}), 0 (elemi kén, S^0), illetve +6 (szulfát, SO_4^{2-}).

A korábbiakban a kén biokémiai ciklusában szerepet játszó anoxikus fotoszintetizáló mikrobákról már szoltunk (lásd 6.3.1 fejezet, Winogradsky-oszlop), ezért ebben a fejezetben részletesebben csak a **szulfát-redukáló baktériumok (SRB)** szerepét tárgyaljuk.

A SRB olyan specializált baktériumcsoport, amelynek tagjai anaerob körülmények között szaporodnak és a növekedésükhöz szükséges energiát főleg különböző szerves tápanyagoknak szulfáttal, mint terminális elektron-akceptorral történő oxidálásával nyerik (lásd 134. GYAKORLAT). A szulfát-redukció eredményeként előálló végtermék a szulfidion, illetve a kén-hidrogén (H_2S). A SRB tipikus szubsztrátjai (elektron-donorok) többnyire kis szénatom számú egyszerű vegyületek, acidogén fermentációs végtermékek (pl. tejsav, ecetsav), ily módon tehát anyagcsere kapcsolatban vannak a fermentatív savképző baktériumokkal.



80. ábra A S elemkörforgalmának alapfolyamatai

A SRB polifiletikus származásúak és az egyes nemzetségek négy nagyobb csoportba sorolhatók: Gram-negatív mezofil SRB, Gram-pozitív spóráképző SRB, termofil eubaktérium SRB és termofil ősbaktérium SRB. Anyagcsere sajátosságaik alapján a SRB két nagy csoportba sorolhatók: a szerves szubsztrátumokat csak acetáig oxidálók ("tökéletesen oxidáció" – *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus* nemzetségek) és a tökéletesen szén-dioxidig oxidálók (*Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina* nemzetségek). Ezen kívül mindkét csoport egyes nemzetségeire jellemző lehet a hidrogenáz aktivitás, azaz a hidrogén elektron-donorként való hasznosításának képessége.

A két leggyakoribb SRB nemzetségbe (*Desulfovibrio* és *Desulfotomaculum*) tartozó fajok kitenyésztésére alkalmas differenciáló tápleves (Postgate's Medium B – PMB) használata a szulfát-redukció következtében képződő fekete színű vas-szulfid csapadék megjelenésén alapul (lásd 134. GYAKORLAT).

134. GYAKORLAT

Szulfát-redukáló baktériumok (SRB) csíraszámának becslése MPN módszerrel

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

szulfát-redukáló baktériumok

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

tavi üledék felszíntől számított 2-5 cm-es rétegéből származó minta

PMB tápleves (Postgate's Medium B)

mérleg

steril félkémcsövek

pipetta, steril pipettahegyek

kémcsőkeverő (vortex)

96 lyukú mikrotitráló lemez

anaerob rendszer

A vizsgálat menete

1. Feliratozást követően, 27 ml PMB tápleveshez mérjük 3,0 g vizsgálandó mintát. Kémcsőkeverő segítségével homogenizáljuk a szuszpenziót 5-10 percig.

2. Készítsünk 6 tagú hígítás sort, és 5 párhuzamosan pipetázzunk 0,3 ml-nyi mennyiséget az egyes tagokból a 96 lyukú mikrotitráló lemez zsebeibe (lásd 27. ábra).

3. Az inkubálást anaerob rendszerben végezzük 30 °C-on 2 hétig.

4. A pozitív (fekete színű) zsebek száma alapján képzett McCrady-féle karakterisztikus szám (Függelék 13.6.1 fejezet) használatával határozzuk meg a SRB összcsíraszámát.

9.5 Xenobiotikumok lebontásának vizsgálata

A környezetbe került xenobiotikumok lebomlása sokszor erőteljesen gátlódik. A gátlást a xenobiotikum biológiai hozzáférhetőségén túl koncentrációviszonyai, valamint a környezet (talaj, víz) fizikokémiai paraméterei okozhatják. Elsősorban a terminális elektron akceptorok / donorok hiánya, valamint az aerob / anaerob környezet a meghatározó. Emellett a környezet pH-ja, tápelemek arányai (N, P stb. források) egyaránt fontosak. Ennek következtében minden aktuális szennyezés esetén újból és újból meg kell becsülni a biológiai bontás számára hozzáférhető ("bioavailable") szennyezőre alapozott biodegradációs képességet (lásd 135. GYAKORLAT).

A gázolaj, vagy a benzin a viszonylag jól bomló, könnyen "biodegradálható" környezetszennyező anyagok közé tartozik. Gázolajat egyedüli szén- és energiaforrásként hasznosító szervezeteket izolálni egyszerű, nem is szólva a nem obligát bontó mikrobákról.

135. GYAKORLAT

Összcsíraszám és a szénhidrogénbontó mikroorganizmusok csíraszámának meghatározása 96 lyukú mikrotitráló lemez használatával, MPN módszerrel

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

szennyezett talaj, vagy talajvíz

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

BHB tápleves
Rezazurin indikátor
50 ml-es Erlenmeyer-lombik
laboratóriumi mérleg
mérőkanál
pipetták, steril pipettahegyek
96 lyukú mikrotitráló lemez
félkémcsővek
kémcsőkeverő (vortex)
termosztát
szűrővel sterilizált nyersolaj

A vizsgálat menete

1. A mintából készítsünk hígítási sorozatot a következők szerint: 27 ml 1 mg/l rezazurinnal kiegészített BBH táplevest tartalmazó 50 ml-es Erlenmeyer-lombikba mérjünk 3 g, vagy 3 ml vizsgálandó mintát, majd vortexeljük. Az így nyert kiindulási szuszpenzióból készítsünk 8 tagú hígítási sorozatot úgy, hogy pipetázzunk 0,3 ml-t egy előre feliratozott és 2,7 ml BBH-táplevest tartalmazó tesztsőbe. Erőteljes vortexelést követően ismét 0,3 ml-t pipetázzunk a következő kémcsőbe, s így tovább.

2. A hígítási sorozat minden tagjából (a kiindulási szuszpenzióból is) pipetázzunk 300 µl-t a 96 lyukú mikrotitráló lemezen egymás mellett lévő 5 zsebbe párhuzamosan (5 tesztsőves MPN-módszer, lásd 27. ábra).

3. A töltött zsebekbe pipetázzunk 1 µl szűrővel sterilizált nyersolajat.

4. A lezárt mikrotiter lemezt helyezzük 10 °C-os termosztátba, és inkubáljuk 2 hétig.

5. Összcsíraszámra az inkubációs idő alatt 24, 72 óra, majd pedig 1 hét elteltével kémlelünk a rezazurin indikátor színváltozása alapján (a redox indikátor rezazurin az oxigénfogyás kimutatására kiválóan alkalmas). A rózsaszínű zsebek száma alapján képzett McCrady féle karakterisztikus szám alapján (Függelék 13.6.1 fejezet) becsüljük meg a minta összcsíraszámát.

6. 2 hét múltán az olajbontás tényét a táptalaj-felületi olajfilm sztereomikroszkópos megfigyelésével állapítjuk meg. A gázolajbontás során ugyanis a baktériumok által termelt felületaktív anyagok hatására az egységes gázolajfilm rögösödik, "kifehéredik", majd széttöredezik, és összecsapódva baktériumtömeg vonja be. A pozitív csövek száma alapján képzett Mc-Cardy féle karakterisztikus szám használatával (Függelék 13.6.1 fejezet) becsüljük meg a gázolajbontó csíraszámot.

A **xenobiotikumok bidegradációjának vizsgálatát** aerob, vagy anaerob mikrokozmosz kísérletben is kivitelezhetjük (lásd 136. GYAKORLAT és 137. GYAKORLAT). Megfelelő kontroll minták viszonylatában a képződött mikrobiális anyagszere termékek (elsősorban CO₂, CH₄) vagy a szennyezőanyag bomlástermékei alapján következtethetünk a szennyezőanyag biológiai bonthatóságára.

136. GYAKORLAT

Mikrobiális szénhidrogén degradáció mértékének becslése CH₄ termelés alapján anaerob mikrokozmoszban (OxiTop® anaerob respiratorikus mérőrendszerben)

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

szennyezett talaj, vagy talajvíz
kontroll talaj, vagy talajvíz

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

N₂ gázpalack
1200 ml-es mikrokozmosz palack
laboratóriumi mérleg
mérőkanál
NaOH tabletták
OxiTop® C mérőfej, zárókupakok, membránok, gumikosár
OxiTop® C-kontroller
Hamilton fecskendő
gázkromatográf

A vizsgálat menete

1. A mintákból 500 g-ot, vagy 500 ml-t mérjük be a légmentesen lezárható, feliratozott 1200 ml-es mikrokozmosz palackokba.
2. Közvetlenül a mintabemérés után N₂ gázzal öblítsük át (30 percen keresztül) a mikrokozmosz rendszert.
3. A mikrokozmosz palack egyik oldalcsövének gumikosarába helyezzünk 4-5 db NaOH tablettát (a tabletták elnyelik a mérőpalack légtérben található CO₂-t).
4. Zárjuk le az oldalcsöveket a megfelelő szeptumokkal és zárókupakkal.
5. Zárjuk le a rendszert az OxiTop® C mérőfej felcsavarásával.
6. Helyezzük a lezárt mikrokozmoszokat 28 °C-os termosztátba.
7. 1 óra múlva OxiTop® C-kontroller segítségével indítsuk el a mérést, P (pressure) üzemmódot és 2 hetes vizsgálati időt meghatározva.
8. Az inkubáció leteltével az OxiTop® C-kontroller segítségével olvassuk le a nyomásváltozás adatokat. A mérés során zárt kísérleti rendszerben (légmentesen zárt, N₂ atmoszférát tartalmazó mikrokozmoszban) keletkezett CH₄ által okozott nyomásváltozás adatokat kapunk.

Ezen nyomás értékekből az alábbi képlet alapján határozható meg a kérdéses biogáz mennyisége:

$$V_{CH_4} = (p_1 * V_1) / p_2$$

ahol V_{CH₄} a CH₄ mennyisége (ml), P₁ a mért abszolút nyomás (hPa), P₂ légköri nyomás (hPa), V₁ a gáztér térfogata (ml)

9. A mikrokozmosz palack gázteréből (a szabad oldalcsövön keresztül) Hamilton-fecskendő segítségével vegyünk 100 µl mintát, majd gázkromatográf segítségével elemezzük (Függelék 13.6.4 fejezet).

10. A kapott eredmények alapján becsüljük meg a szennyezett minta anaerob biodegradációs potenciálját.

137. GYAKORLAT

Mikrobiális szénhidrogén degradáció mértékének becslése CO₂ termelés alapján aerob mikrokozmoszban (OxiTop® aerob respiratorikus mérőrendszerben)

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

szennyezett talaj, vagy talajvíz
kontroll talaj, vagy talajvíz

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

1000 ml-es aerob mikrokozmosz edény
1M KOH oldat
50 ml-es mérőpohár
OxiTop® C mérőfej, tömítés (gumikosár)
OxiTop® C kontroller
2 M BaCl₂
100 ml Erlenmeyer lombik
0,05 M HCl
fenolftalein indikátor oldat
laboratóriumi mérleg
mérőkanál
büretta
szemcseppentő
pipetta, steril pipettahegyek
termosztát

A vizsgálat menete

1. A mintákból 100 g-ot, vagy 100 ml-t mérjünk be a légmentesen lezárható 1000 ml-es aerob mikrokozmosz edényekbe.
2. Közvetlenül a mintabemérés után mérjünk 50 ml 1M KOH oldatot az 50 ml-es mérőpoharakba és helyezzük őket a fedél mérőpohár tartójába.
3. A fedelet 4 db záró elem segítségével rögzítsük az aerob mikrokozmosz edényhez.
4. Zárjuk le a rendszert az OxiTop® C mérőfej felcsavarásával, ügyeljünk a tömítés használatára.
5. Helyezzük a lezárt aerob mikrokozmoszokat 28 °C-os termosztátba.
6. 1 óra múlva OxiTop® C-kontroller segítségével indítsuk el a mérést, P (pressure) mérésimódot és 2 hetes vizsgálati időt meghatározva.
7. Az inkubáció leteltével az OxiTop® C kontroller segítségével olvassuk le a nyomásváltozás adatokat.
8. Az 50 ml-es mérőpoharak tartalmát öntsük 100 ml-es Erlenmeyer lombikba.
9. Az 50 ml oldatot tartalmazó 100 ml-es Erlenmeyer lombikba mérjünk 1 ml 2 M BaCl₂ oldatot, valamint 1-2 csepp fenolftalein indikátort.
10. A 100 ml-es lombikokat titráljuk 0,05 M HCl segítségével.
11. A 9-10. pont alapján titráljunk meg 50 ml eredeti KOH mérőoldatot is.
12. A termelődött CO₂-ot a titrálás során fogyott sósavoldat térfogatából az alábbi képlet segítségével számoljuk ki:

$$V_{CO_2} = 1,175 \times 10^{-5} \times C_{HCl} \times (V_{KOH} - V_{MINTA}),$$

ahol V_{CO_2} a termelődött CO₂ mennyisége m³-ben, C_{HCl} a sósav töménysége (Mol l⁻¹), V_{KOH} a 15 ml KOH mérőoldatra fogyott sósav ml-ben, V_{MINTA} az inkubálás után kivett KOH oldatra fogyott sósav ml-ben.

13. A kapott eredmények (nyomásváltozás adatok, titrálási eredmények) alapján becsüljük meg a szennyezett minta aerob biodegradációs potenciálját.

A **fenol és származékai** gyakori környezetszennyező vegyületek (kokszolóművekben melléktermékként is keletkezik fenol). A fenolok általában könnyen lebonthatóak, biodegradálhatóak. Számos mikroorganizmus képes - eltérő biokémiai utak használatával - a fenol biodegradációjára (lásd 138. GYAKORLAT).

138. GYAKORLAT

Fenolbontó mikroorganizmusok biodegradációs képességének tesztelése rázatott aerob mikrokozmoszban

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

fenolbontó mikroorganizmusok 0.5 optikai denzitású szuszpenziója

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

500 ml-es Erlenmeyer-lombikok
MP tápleves
fenol
rázótermosztát
spektrofotométer
centrifuga
steril kémcső
pipetta, steril pipettahegyek
termosztát

A vizsgálat menete

1. 190 ml MP táplevest tartalmazó 500 ml-es feliratozott Erlenmeyer-lombikokba mérünk 10 ml baktériumszuszpenziót (0,5 OD). A kontroll minta esetén 10 ml MP táptalajt adagolunk.

2. A beoltott lombikokhoz fenolt pipetázunk kizárólagos szénforrásként. A fenol végkoncentrációja 400 mg/l.

3. Vatta dugóval lezárt aerob mikrokozmoszainkat rázógépbe helyezük és 100 RPM fordulaton 28 °C-on 1 hétig inkubáljuk.

4. Az inkubáció végén aseptikus módon 11 ml mintát veszünk a mikrokozmoszokból.

5. A 11 ml-nyi mintát 4000 g-n 5 percig centrifugáljuk, majd a felülúszóból vett 10 ml mintának - spektrofotométer segítségével (Függelék 13.6.2 fejezet) - meghatározzuk a fenolkoncentrációját.

6. A kapott eredmények alapján becsüljük meg a törzsek aerob fenolbontó potenciálját

9.6 Élelmiszerek mikrobiológiai elemzése

A nyers és feldolgozott élelmiszereket különböző mikroorganizmusok szennyezhetik. Ezek a mikrobák természetes forrásokból, a talajból, vízből, levegőből származhatnak, de számos mikroba eleve jellemző lakója a növényi és állati szervezeteknek. Az egészséges növény felszínén mindig található baktériumok és gombák (pl. *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Rhodotorula* fajok), az állatok kültakarója, a testüregeket borító nyálkahártyák mindig szennyezettek mikroorganizmusokkal, nagy részük a normál mikrobiota jellegzetes tagja (pl. *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacteroides* fajok). Az élelmiszerek feldolgozása, tárolása és forgalomba hozatala, valamint konyhai elkészítése és tálalása újabb kontaminációra ad lehetőséget.

Az élelmiszerekre jutó mikrobák az élelmiszer összetételétől, sótartalmától, víztartalmától, pH-jától, a hőmérsékletétől, oxidációs-redukciós viszonyoktól függően szaporodásnak indulhatnak. A szaporodó mikrobák egy része az élelmiszerek romlását idézi elő, de lehetnek köztük olyanok is, amelyek az emberi szervezetbe jutva megbetegedést,

ételfertőzéseket, ételmérgezéseket okozhatnak. Az ételfertőzés az élelmiszer és az ital által közvetített fertőzést jelenti. Ezzel szemben ételmérgezésnek neveznek minden olyan heveny egészségkárosodást, amelyet az ételben vagy italban lévő vegyi anyag, vagy mikroba által termelt toxikus anyag okoz. A fő élelmiszer eredetű baktériumos megbetegedés a fejlett országokban a salmonellózis, kampilobakteriózis, a liszteriózis, a fejlődő országokban pedig pl. a kolera vagy a *Clostridium perfringens* által okozott fertőzés. A penészgombák termelte mikotoxinokon kívül a mérgező gombák, valamint az egyes cianobaktériumok, algák és tengeri állatok toxinjai szintén veszélytényezők.

Az élelmiszerek biztonságának és megfelelő minőségének biztosítása érdekében a romlást okozó és patogén mikroorganizmusok detektálása alapvető eljárás az élelmiszerek vizsgálata során. Ez azonban gyakran nem egyszerű feladat, pl. a szubletálisan károsodott, valamint az élő, de nem tenyésztethető mikrobacejtek, esetenként a nagyszámú kísérő mikroba mellett a kórokozó és a romlást okozó mikroorganizmusok megbízható kimutatása, vagy a ritkábban előforduló, újonnan felbukkanó törzsek, valamint számos baktérium terjedési útvonalának még tisztázatlan volta miatt. Az élelmiszerek mikrobiológiai szennyezettségi mértékének megállapítására nemzetközi testületek által szabványosított módszereket és eljárásokat alkalmaznak.

Az élelmiszerekben előforduló mikrobák kimutatása hosszú múltra tekint vissza. A hagyományos tenyésztésen alapuló, szabványos kimutatási módszerek az élelmiszerekben jelenlévő élő baktériumsejtek izolálásához és számának meghatározásához specifikus mikrobiológiai tápközegeket igényelnek. E módszerek általában kellően érzékenyek, mind kvalitatív, mind kvantitatív adatokat szolgáltathatnak az élelmiszermintában jelenlévő mikrobák számát és természetét illetően. Azonban a hagyományos módszerek igen idő- és munkaigényesek, a szelektív és differenciáló tápközegek nagyon költségesek, az eredmények gyakran csak több napos vizsgálsorozatot követően értékelhetőek, míg a kórokozók biokémiai vagy szerológiai azonosítása további napokat vehet igénybe. Az élelmiszerekkel szemben támasztott fogyasztói igények, az élelmiszer-biztonságra való törekvés, a modern minőségbiztosítási rendszerek bevezetése ezért szükségessé tette új, gyors és megbízható mikrobiológiai módszerek kidolgozását és alkalmazását. Ma már a módszertani fejlesztések a gyors, nem tenyésztésen alapuló, hanem nukleinsav alapú módszerek irányába haladnak (pl. virulenciagének PCR-es kimutatása, hibridizációs technikák, FISH).

9.6.1 Tej és tejtermékek mikrobiológiai vizsgálata

A tej számos mikroorganizmus számára kiváló táptalaj, nagy vízaktivitása, semleges pH-ja és gazdag tápanyagtartalma kedvező a szaporodásukhoz. Azonban a friss tej számos természetes antimikrobiális anyagot (pl. laktoperoxidázt, laktoferrint, lizozimet és specifikus immunglobulinokat) is tartalmaz.

Egészséges állat esetén a tőgy mirigyállományában képződő tej még mikrobamentes, de a frissen fejt tej, ha kis számban is, de már tartalmaz mikroorganizmusokat: *Bacillus*, *Aerococcus*, *Staphylococcus* fajokat, esetenként enterobaktériumokat tartalmaz. A tejsavbaktériumok a szarvasmarha bőrének és tőgyének normál biotájához tartoznak, így minden nyers tej, ha kis számban is, de tartalmaz tejsavbaktériumokat. A hűtött tejben a *Pseudomonas*ok a dominánsak. A mikrobiális szennyeződés forrásai lehetnek az istálló talaja, a széna, a fű, a víz és a levegő, továbbá a tejnyerés eszközei.

A különböző tejtermékek is tápanyagokban, különösen fehérjékben és lipidekben gazdagok, feldolgozásuknál hőkezelés (pl. pasztőrözés) szerepel, és legtöbbször hűtve tárolandók. Ennek megfelelően a tejtermékek mikrobák okozta romlásában két fő élettani csoport játszik szerepet: a hőtűrők, amelyek túlélnek a pasztőrözést, valamint a pszichotrófok, amelyek 5-7 °C-on képesek szaporodni. Azonban a tejtermékek a romlást okozó mikrobákon kívül súlyos kórokozók hordozói lehetnek (pl. *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*,

Listeria monocytogenes, enterohemorragiás *E. coli* O:157, *Yersinia enterocolitica*), melyek kimutatása elengedhetetlen.

A nyers **tejben, illetve a tejtermékekben lévő** baktériumok számának meghatározása fontos információt nyújt az élelmiszer mikrobiológiai állapotáról. Ha pl. az összcsíraszám nagy, a tej nem tartható el sokáig, a kevés csírárt tartalmazó termék huzamosabb ideig eláll (hűtőtárolás szükséges). A nagy **összcsíraszám** nem feltétlenül jelzi, hogy patogén baktériumok vannak jelen, de a kis összcsíraszám sem zárja ki szükségszerűen a kórokozók jelenlétét (lásd 139. GYAKORLAT). A kórokozók jelenlétére közvetlen speciális táptalajokon való kimutatásukon kívül, az indikátor baktériumok (pl. laktóz-pozitív koliformok) kimutatása is utalhat.

139. GYAKORLAT

Tejtermékek összcsíraszámának meghatározása szélesztéssel tejporos tejagaron

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

nyers tej
3 napig hűtőszekrényben tárolt pasztörözött tej
fél napig szobahőmérsékleten tárolt tej
féltartós tej
sajt
joghurt
kefir

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

tejporos tejagar Petri-csészében
steril dörzsmozsár
99 ml steril pepton-só oldat lombikban
9 ml steril pepton-só oldat kémcsövekben
pipetta, steril pipettahegyek
szélesztőbot (sterilizációhoz alkohol)
Bunsen-égő
laboratóriumi mérleg
steril vegyszeres kanál
kés
kémcsőkeverő (vortex)
termosztát

A vizsgálat menete

1. Mérjük 1 ml tejet, vagy valamilyen tejterméket, illetve 1 g steril dörzsmozsárban pépesített sajtot 99 ml steril pepton-só oldathoz, majd homogenizáljuk vortex segítségével.

2. A mintákból készítsünk 3 tagú 10-es léptékű hígítási sorozatot 9 ml-es steril pepton-só oldatokkal (lásd 25. GYAKORLAT).

3. Minden hígítási tagból szélesszünk 0,1 ml-nyi mennyiséget (lásd 25. GYAKORLAT) feliratozott Petri-csészében lévő tejporos tejagar felszínére.

4. A szélesztéssel fertőzött tápagar lemezeket fordított helyzetben (fedelükkel lefelé) helyezzük 30 °C-os termosztátba, és inkubáljuk 1 hétig.

5. Az inkubációs idő elteltével végezzünk csíraszám becslést (lásd 25. GYAKORLAT) és telepmorfológiai vizsgálatokat (lásd 53. GYAKORLAT).

Az **MRS táptalaj** Tween 80-t, acetátot, magnéziumot és mangánt tartalmaz, a ***Lactobacillus*-ok kimutatására** alkalmas (lásd 140. GYAKORLAT). Mivel ennek a táptalajnak rendkívül kicsi a szelektivitása, ezért más tejsavbaktériumok pl. *Pediococcus* és *Leuconostoc* fajok továbbá egyéb, hasonló tulajdonságú baktériumok is képesek nőni rajta.

Ezen a táptalajon telepmorfológiai különbségek alapján a különböző tejsavbaktériumok elkülönítése nem lehetséges.

140. GYAKORLAT

Lactobacillus összcsíraszám meghatározás MRS agaron

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

tej, sajt, joghurt, kefir

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

MRS tápagar Petri-csészében

steril dörzsmozsár

99 ml steril pepton-só oldat lombikban

9 ml steril pepton-só oldat kémcsövekben

pipetta, steril pipettahegyek

szélesztőbot (sterilizációhoz alkohol)

Bunsen-égő

laboratóriumi mérleg

steril vegyszeres kanál

kés

kémcsőkeverő (vortex)

termosztát

A vizsgálat menete

1. Mérjük 1 ml tejet, vagy valamilyen folyékony tejterméket, illetve 1 g steril dörzsmozsárban pépesített sajtot 99 ml steril pepton-só oldathoz, majd homogenizáljuk vortex segítségével.

2. A mintákból készítsünk 3 tagú 10-es léptékű hígítási sorozatot 9 ml-es steril pepton-só oldatokkal (lásd 25. GYAKORLAT).

3. Minden hígítási tagból szélesszünk 0,1 ml-nyi mennyiséget (lásd 25. GYAKORLAT) feliratozott Petri-csészében lévő MRS tápagar felszínére.

4. A szélesztéssel fertőzött tápagar lemezeket fordított helyzetben (fedelükkel lefelé) helyezzük 28 °C-os termosztátba, és inkubáljuk 1 hétig.

5. Az inkubációs idő elteltével végezzünk csíraszám becslést (lásd 25. GYAKORLAT) és telepmorfológiai vizsgálatokat (lásd 53. GYAKORLAT). MRS agaron a *Lactobacillus*-ok általában fehér színű, nagy méretű telepek formájában figyelhetők meg.

A **VRBG tápagar** az élelmiszerekből származó **Enterobacteriaceae családba tartozó törzsek izolálására és számolására** kifejlesztett szelektív táptalaj (lásd 141. GYAKORLAT). A kristályibolya és az epesavas sók széleskörben gátolják a baktériumok többségét. A táptalajban lévő glükóz bontása savképződéssel jár, amit vörös színváltozás és a telepek körül az epesavak kicsapódási zónája jelez. Az Enterobacteriaceae családba tartozó fajok azáltal kimutathatók, hogy képesek glükóz bontásra. A tápközeg azonban nem specifikus ezekre a mikroorganizmusokra, mivel más, szintén jelenlévő baktériumok (pl. *Aeromonas*) is mutatják ezeket a reakciókat.

141. GYAKORLAT

Enterobacteriaceae összcsíraszám meghatározás VRBG agaron

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

tej, sajt, joghurt, kefir

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

VRBG tápagar Petri-csészében

steril dörzsmozsár
99 ml steril pepton-só oldat lombikban
9 ml steril pepton-só oldat kémcsövekben
pipetta, steril pipettahegyek
szélesztőbot (sterilizációhoz alkohol)
Bunsen-égő
laboratóriumi mérleg
steril vegyszeres kanál
kés
kémcsőkeverő (vortex)
termosztát

A vizsgálat menete

1. Mérjük 1 ml tejet, vagy valamilyen folyékony tejterméket, illetve 1 g steril dörzsmozsárban pépesített sajtot 99 ml steril pepton-só oldathoz, majd homogenizáljuk vortex segítségével.

2. A mintákból készítsünk 3 tagú 10-es léptékű hígítási sorozatot 9 ml-es steril pepton-só oldatokkal (lásd 25. GYAKORLAT).

3. Minden hígítási tagból szélesszünk 0,1 ml-nyi mennyiséget (lásd 25. GYAKORLAT) feliratozott Petri-csészében lévő VRBG tápagar felszínére.

4. A szélesztéssel fertőzött tápagar lemezeket fordított helyzetben (fedelükkel lefelé) helyezzük 28 °C-os termosztátba, és inkubáljuk 1 hétig.

5. Az inkubációs idő elteltével végezzünk csíraszám becslést (lásd 25. GYAKORLAT) és telepmorfológiai vizsgálatokat (lásd 53. GYAKORLAT). Az Enterobacteriaceae család tagjai sötétvörös színű, kerek, vörös kicsapódási zónával körülvett telepeket képeznek, míg mások általában szintelen telepek formájában jelennek meg.

A **Sabouraud glükóz tápagar a gombák** optimális **növekedésére** szolgál viszonylag nagy szénhidrát tartalmának köszönhetően (lásd 142. GYAKORLAT). Olyan komponenseket nem tartalmaz, amelyek szelektíven gátolnák a nem kívánatos mikrobiota növekedését. A pH 5,6 gátolja a baktériumok növekedését; ez a hatás fokozható szélsőséges pH-értékek (pl. 3,5 vagy 10,0) alkalmazásával.

142. GYAKORLAT

Gomba összcsíraszám meghatározása Sabouraud glükóz agaron

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

tej, sajt, joghurt, kefir

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

Sabouraud glükóz tápagar Petri-csészében
steril dörzsmozsár
99 ml steril pepton-só oldat lombikban
9 ml steril pepton-só oldat kémcsövekben
pipetta, steril pipettahegyek
szélesztőbot (sterilizációhoz alkohol)
Bunsen-égő
laboratóriumi mérleg
steril vegyszeres kanál, kés
kémcsőkeverő (vortex)
termosztát

A vizsgálat menete

1. Mérjük 1 ml tejet, vagy valamilyen folyékony tejterméket, illetve 1 g

dörzsmozsárban pépesített sajtot 99 ml steril pepton-só oldathoz, majd homogenizáljuk vortex segítségével.

2. A mintákból készítsünk 3 tagú 10-es léptékű hígítási sorozatot 9 ml-es steril pepton-só oldatokkal (lásd 25. GYAKORLAT).

3. Minden hígítási tagból szélesszünk 0,1 ml-nyi mennyiséget (lásd 25. GYAKORLAT) feliratozott Petri-csészében lévő Sabouraud glükóz tápagar felszínére.

4. A szélesztéssel fertőzött tápagar lemezeket fordított helyzetben (fedelükkel lefelé) helyezzük 28 °C-os termosztátba, és inkubáljuk 1 hétig.

5. Az inkubációs idő elteltével végezzünk csíraszám becslést (lásd 25. GYAKORLAT) és telepmorfológiai vizsgálatokat (lásd 53. GYAKORLAT).

Tejből és tejtermékekből (sajtból, joghurtból, kefirből) a ***Streptococcus* összcsíraszám meghatározását** Szita-féle E-67 táptalajon végezhetjük el (lásd 124. GYAKORLAT).

Míg a tej összcsíraszám meghatározása szélesztéses technikával tápagar lemezeken a legjobb esetben is 24 órát igényel, addig a biokémiai tesztekkel a pozitív eredmény pár óra alatt ismertté válik. A **tej biokémiai aktivitás vizsgálatok** közé tartozó reduktáz tesztek (metilénkék, rezazurin, trifetil-tetrazolium-klorid [TTC] és nitrát redukciós próbák) tájékoztató jellegű vizsgálatok, melyek egyszerű eszközökkel, rövid idő alatt kivitelezhetők (lásd 143. GYAKORLAT). A tejnyerés és tejkezelés higiéniés körülményeinek vizsgálatára kiválóan alkalmasak. Ha a tejmintában sok az élő és aktívan tevékenykedő baktérium, akkor kevés az oldott oxigén az aerob és fakultatív anaerob szervezetek számára. Amennyiben ilyenkor jelen van valamilyen redox indikátor, pl. metilénkék, rezazurin, vagy TTC, akkor az indikátor színváltozásából következtethetünk a redukciós folyamatokra, a fertőzöttség mértékére. A redukált TTC színe piros, a redukált metilénkék színtelen és a redukált rezazurin rózsaszín (10. táblázat).

A nitrát redukciós próba a tejek koliform szennyezettségének kimutatására alkalmas. Ha a tejben csak *Lactobacillus*ok vannak, akkor nitrát redukciós teszttel nem tapasztalható színváltozás, mivel ezek a szervezetek nem redukálják a nitrátot. Ha a teszt során tej rózsaszínűvé, vagy meggypirossá válik, ez a tej koliformokkal való fertőzöttségére utal.

10. táblázat A tej minősítése metilénkék és rezazurin redukciós próba alapján

A tej minősége	Metilénkékes próba ^a	Rezazurinos próba ^b	Csíraszám/ml
I. Jó	>330	halványkék	<5x10 ⁵
II. Közepes	330-120	halványlila	5x10 ⁵ -4x10 ⁶
III. Rossz	120-20	rózsaszín	2x10 ⁷
IV. Nagyon rossz	<20	színtelen	>2x10 ⁷

Magyarázat: ^a, az elszíntelenedési idő percben; ^b, a rezazurinos tej színe 37 °C-on 30 perc után

143. GYAKORLAT

Mikrobiális aktivitás meghatározása tejben biokémiai aktivitás alapján

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

nyers tej
3 napig hűtőszekrényben tárolt pasztörözött tej
fél napig szobahőmérsékleten tárolt tej

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

steril kémcsövek
1% (m/V) TTC (trifenil-tetrazolium-klorid) oldat 96%-os etanolban frissen oldva
0,05% (m/V) rezazurin vizes oldata (steril)
1% (m/V) metilénkék vizes oldata (steril)

nitrit reagens (Griess-Ilosvai reagens)
kémcsőkeverő (vortex)
pipetta, steril pipettahegyek
Bunsen-égő
35 °C-os vízfürdő

A vizsgálat menete

TTC redukciós próba

1. Steril kémcsőbe mérjük 5 ml tejet és adjunk hozzá 0,5 ml TTC oldatot. Az oldatot frissen készítjük el, mert bomlik. Inkubáljuk szobahőmérsékleten és jegyezzük fel hány perc alatt változik meg az oldat színe. Néhány perc utáni intenzív piros szín magas csíraszámot, rossz minőségű tejet jelez.

Metilénkék és rezaurin redukciós próba

1. Steril kémcsővekbe mérjük 10-10 ml tejet, és adjunk hozzá 1-1 ml 0,05%-os rezaurin illetve 1 %-os metilénkék oldatot. Zárjuk le dugóval a kémcsőveket, és összerázás után helyezük 35 °C-os vízfürdőbe. Az indikátorok színváltozása jelzi a redukciót. Figyeljük meg a tejben lévő indikátor színváltozását, ellenőrizzük félóránként. A minta pozitívként értékelhető, ha a tej 4/5-én színváltozás mutatkozik (10. táblázat).

Nitrát redukciós próba

1. Steril kémcsőbe mérjük 10 ml tejet és 2 ml nitrit-reagenst, majd 5 perc után értékeljük a reakciót.

9.6.2 Húskészítmények mikrobiológiai vizsgálata

A színhús izomszövet összetételét nézve jelentős arányban tartalmaz fehérjét, továbbá szénhidrátokat, zsírokat, vitaminokat és ásványi anyagokat, 74-80%-ban pedig kötött és szabad vizet (utóbbi megfelel ~ 0,99 vízáktivitásnak). A hússzövet a baktériumok és egyéb mikroorganizmusok ideális tápközege, kedvező a szaporodásukhoz. A nyers hús ennek következtében gyorsan romlik, hacsak ezt valamilyen feldolgozási és tartósítási módszerrel meg nem gátolják. A **húskészítmények mikrobiológiai vizsgálata** fontos, a húson előforduló mikroorganizmusok nemcsak romlást okozhatnak, hanem a fogyasztó egészségét is veszélyeztethetik (lásd 144. GYAKORLAT). A húskészítmények termékcsoportjai rendkívül változatosak, mind összetételüket és gyártástechnológiájukat, következésképpen mikrobiológiai tulajdonságaikat tekintve. A készítmények többségének tartósítása érdekében mikrobapusztító vagy szaporodást gátló műveleteket alkalmaznak (pl. fagyasztás, hőkezelés, pácolás, füstölés), ritkábban a mikrobák (elsősorban tejsavbaktériumok) erjesztő tevékenységét hasznosítják a tartósítás elősegítésére.

144. GYAKORLAT

Összcsíraszám meghatározás szélesztéssel húspepton tápagon

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

nyershús vagy húskészítmény

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

húspepton tápagar Petri-csészében

dugattyús homogenizátor

99 ml-es steril víz lombikban

9 ml-es steril víz kémcsővekben

pipetta, steril pipettahegyek

szélesztőbot (sterilizéshez alkohol)

Bunsen-égő

laboratóriumi mérleg

steril vegyszeres kanál
kés
kémcsőkeverő (vortex)
termosztát

A vizsgálat menete

1. 1 g-nyi nyershúst vagy húskészítményt homogenizáljuk dugattyús eljárással, majd adjuk hozzá 99 ml steril desztillált vízhez és keverjük el vortex segítségével.

2. A mintákból készítsünk 4 tagú 10-es léptékű hígítási sorozatot (lásd 25. GYAKORLAT).

3. Minden hígítási tagból szélesszünk 0,1 ml-nyi mennyiséget (lásd 25. GYAKORLAT) feliratozott Petri-csészében lévő húspepton tápagar felszínére.

4. A szélesztéssel fertőzött tápagar lemezeket fordított helyzetben (fedelükkel lefelé) helyezük 30 °C-os termosztátba, és inkubáljuk 1 hétig.

5. Az inkubációs idő elteltével végezzünk csíraszám becslést (lásd 25. GYAKORLAT) és telepmorfológiai vizsgálatokat (lásd 53. GYAKORLAT).

A **BPL agar** (Brillant-green phenol-red lactose agar), mint szelektív táptalaj alkalmas *Salmonellak* izolálására székletből, vizeletből, húsból, tejből és egyéb anyagokból (lásd 145. GYAKORLAT). A táptalaj laktózt tartalmaz, amelynek savvá bontását a fenolvörös indikátor sárga színváltozása jelzi. Lúgos közegben az indikátor színe mélyvörös. A laktóz-negatív *Salmonellak* (esetenként *Proteusok* és *Citrobacterek*) ezen a táptalajon átlátszó halványrózsaszín telepeket képeznek vörös zónával körülvéve. A mintában jelenlévő egyéb Gram-pozitív mikroorganizmusokat és a *Shigellak*at a brillantzöld nagymértékben gátolja.

145. GYAKORLAT

Laktóz negatív baktériumok összcsíraszám meghatározása BPL agaron

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

nyershús vagy húskészítmény

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

BPL tápagar Petri-csészében
dugattyús homogenizátor
99 ml-es steril víz lombikban
9 ml-es steril víz kémcsővekben
pipetta, steril pipettahegyek
szélesztőbot (sterilizéshez alkohol)
Bunsen-égő
laboratóriumi mérleg
steril vegyszeres kanál
kés
kémcsőkeverő (vortex)
termosztát

A vizsgálat menete

1. 1 g-nyi nyershúst vagy húskészítményt homogenizáljuk dugattyús eljárással, majd adjuk hozzá 99 ml steril desztillált vízhez és keverjük el vortex segítségével.

2. A mintákból készítsünk 4 tagú 10-es léptékű hígítási sorozatot (lásd 25. GYAKORLAT).

3. Minden hígítási tagból szélesszünk 0,1 ml-nyi mennyiséget (lásd 25. GYAKORLAT) feliratozott Petri-csészében lévő BPL tápagar felszínére.

4. A szélesztéssel fertőzött tápagar lemezeket fordított helyzetben (fedelükkel lefelé) helyezük 30 °C-os termosztátba, és inkubáljuk 1 hétig.

5. Az inkubációs idő elteltével végezzünk csíraszám becslést (lásd 25. GYAKORLAT) és telep morfológiai vizsgálatokat (lásd 53. GYAKORLAT). A szelektív táptalajon a laktózt nem bontók (*Salmonella*, esetenként *Proteus* és *Citrobacter*) halványrózsaszín, átlátszó, vörös zónával körülvett, míg a laktózbontók (pl. *E. coli*, *Enterococcusok*, *Klebsiellak*) sárgászöld, opálos, sárgászöld zónával körülvett telepeket képeznek.

A Gram-pozitív, endospóras ***Clostridiumok*** mindenütt előfordulnak a környezetünkben. Fő lelőhelyük a talaj, de megtalálhatók szennyvizekben, felszíni vizekben, üledékekben, porban. Egyes fajok az ember és állatok bélsatornájának állandó lakói. Számos fajuk élelmiszerek szennyeződését okozza. Jelenlétükből, nagyságrendjükből következtetést vonhatunk le az alapanyagok mikrobiológiai minőségéről, a gyártószemélyzet, a gyártóeszközök higiéniás állapotáról, a késztermék tárolásáról és szállításáról (lásd 146. GYAKORLAT).

A szennyeződést jelző *Clostridiumok* nagy száma figyelmeztet az esetleg jelenlévő kisszámú, vagy sérült, rutinvizsgálattal nem kimutatható patogénekre, például élelmiszereknél a magas szulfitredukáló *Clostridium* számnál gondolni kell a toxintermelő *Clostridiumokra*. Élelmiszereink szempontjából a két legfontosabb a *C. botulinum*, amelynek idegrendszerre ható, súlyos tüneteket, esetenként halált okozó rendkívül mérgező neurotoxinjai okozzák az ételmérgezést és az enterotoxint termelő *C. perfringens*, amely patogenitásához bizonyos nagyságrend feletti csíraszám szükséges az élelmiszerben.

146. GYAKORLAT

***Clostridiumok* kimutatása Wilson-Blair-féle bizmut-szulfid agaron**

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

nyershús vagy húskészítmény

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

Wilson-Blair-féle bizmut-szulfid tápagar Petri-csészében

dugattyús homogenizátor

99 ml-es steril víz lombikban

9 ml-es steril víz kémcsövekben

pipetta, steril pipettahegyek

szélesztőbot (sterilizéshez alkohol)

Bunsen-égő

laboratóriumi mérleg

steril vegyszeres kanál

kés

kémcsőkeverő (vortex)

anaerob zacskó

fóliahegesztő

anaerob tenyésztőedény

termosztát

A vizsgálat menete

1. 1 g-nyi nyershúst vagy húskészítményt homogenizáljuk dugattyús eljárással, majd adjuk hozzá 99 ml steril desztillált vízhez és keverjük el vortex segítségével.

2. A mintákból készítsünk 4 tagú 10-es léptékű hígítási sorozatot (lásd 25. GYAKORLAT).

3. Minden hígítási tagból szélesszünk 0,1 ml-nyi mennyiséget (lásd 25. GYAKORLAT) felíratozott Petri-csészében lévő *Clostridium* tápagar felszínére.

4. Helyezzük a Petri-csészéket anaerob zacskóba, vagy anaerob tenyésztőedénybe.

5. A tenyészeteket inkubáljuk 1 hétig 28 °C-on.

6. Az inkubációs idő elteltével végezzünk csíraszám becslést (lásd 25. GYAKORLAT) és telep morfológiai vizsgálatokat (lásd 53. GYAKORLAT). A táptalajon a H₂S-pozitív *Clostridium*ok vas-szulfid képződés következtében fekete színű telepeket képeznek.

Nyershúsból és húskészítményekből a **laktóz pozitív baktériumok összcsíraszám meghatározását Endo-agaron** (lásd 121. GYAKORLAT), az **Enterobacteriaceae összcsíraszám meghatározását VRBG agaron** (lásd 141. GYAKORLAT), a ***Lactobacillus* összcsíraszám meghatározását MRS tápagaron** (lásd 140. GYAKORLAT), a **gomba összcsíraszám meghatározást Sabouraud glükóz táptalajon** végezhetjük el (lásd 142. GYAKORLAT).

9.6.3 Növényi élelmiszerek mikrobiológiai vizsgálata

A **növényi eredetű élelmiszerek** már a természetnél szennyeződhetnek romlást okozó, vagy éppen egészségre káros baktériumokkal, vírusokkal, protozoonokkal, penészgombákkal, féregpetékkal. Ezek főleg a talajból, trágyából származnak, de közvetítődhetnek szennyvizes öntözéssel is. A rágcsálók, a madarak, a rovarok ugyancsak terjeszthetik a mikrobákat. A szedés, szállítás, tárolás és a feldolgozás körülményei további mikrobiális szennyezésre adhatnak lehetőséget. A tárolás hőmérséklete nagymértékben befolyásolja, hogy melyik kórokozó szaporodhat el a növényi élelmiszeren (lásd 147. GYAKORLAT).

A közvetlen fogyasztásra kerülő zöldségek és gyümölcsök közül a legnagyobb veszélyt azok a termények jelentik, amelyeknek a földben lévő, vagy a talaj feletti részét fogyaszthatjuk (pl. fejes saláta, sárgarépa, földieper). A talajban (gumók, gyökerek) és a talaj közelében fejlődő növényi részek mikrobiotájának összetétele hasonló a talajéval, de ezek között lehetnek akár kórokozók is (pl. *Salmonella*, *Clostridium*ok).

A talaj felszínétől távolabbi növényi részeket (pl. szár, levél, bimbó, virág) sajátos összetételű, sok tekintetben ma még kevésbé ismert epifiton mikrobiális közösségek népesítik be, és főként porral, csapadékkal, rovarok közvetítésével szennyeződnek. Legjobban a levelek felületének, az ún. fillozférának a mikrobaközössége ismert. A levélfelület és a növény környezete között aktív anyagcsere zajlik, melybe pozitív (hasznos) vagy negatív (káros), esetleg neutralista módon az epifiton mikrobák is bekapcsolódnak. A levélfelület kémiai tulajdonságait a fajoként változó mennyiségű viaszréteg szabályozza. A növények leveleiből vizes oldatok, így az esővíz, harmat, köd, valamint pára hatására különböző, akár a mikrobák számára is hasznos anyagok mosódnak ki (pl. ásványi anyagok, cukrok, cukoralkoholok, aminosavak, gibberellinek, vitaminok, alkaloidok, fenolvegyületek). A leveleken és általában a növények föld feletti részein a legnagyobb számban baktériumok élnek, ezeket követik sorrendben élesztők, penészek és sugárgombák.

A nyersen fogyasztott zöldségekkel és gyümölcsökkel közvetített megbetegedések száma világszerte jelentős. A betegség okozója többnyire olyan enterális patogén baktérium (elsősorban *Salmonella* és *E. coli*), ami az élelmiszerben a fogyasztást megelőzően el tudott szaporodni, vagy eleve kicsi az infektív dózisa. Emberi vagy állati eredetű szennyvízzel való öntözés, vagy trágyázás esetén gyakran izolálhatók *Salmonella* szerotípusok, *Shigella* vagy *E. coli* törzsek a zöldségek és gyümölcsök felületéről. A *Listeria monocytogenes* a talajban és a növényi vegetációban mindenütt megtalálható és hosszú ideig életképes. Hűtött körülmények között is tud szaporodni, és a módosított atmoszférás tárolás nem befolyásolja szaporodási sebességét, így a nyers zöldségfélék forrásai lehetnek a humán liszteriózisnak. Az endospóráképző baktériumok közül a *Bacillus cereus* és a talaj eredetű szennyeződésből származó *Clostridium botulinum* előfordulásával is számolni kell. A nyersen fogyasztott, székléttel szennyeződött zöldségfélék a baktériumok mellett szennyezettek lehetnek féregpetékkal (pl. *Ascaris*, *Taenia*) és vírusokkal (pl. hepatitisz, polimielitisz, norovírus).

147. GYAKORLAT

Friss növényi élelmiszerek összbaktériumszám meghatározása húspepton, keményítő-kazein, brolacin és Sabouraud glükóz tápagon

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

növényi levelek
gyümölcsök

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

húspepton tápagar lemez
keményítő-kazein tápagar lemez
brolacin tápagar lemez
Sabouraud-glükóz tápagar lemez
99 ml steril víz lombikban
9 ml steril víz kémcsőben
pipetta, steril pipettahegyek
szélesztőbot (sterilizáláshoz alkohol)
Bunsen-égő
vonalzó
steril olló
steril csipesz
steril vattatampon
96%-os alkohol
kémcsőkeverő (vortex)
termosztát

A vizsgálat menete

1. Számoljuk ki a mintavételhez kijelölt növényi felület nagyságát. Steril vattatamponnal dörzsöljük le a kiválasztott levelek, illetve gyümölcsök előre kijelölt felületéről a mikrobákat és mossuk bele a 99 ml-nyi steril desztillált vízbe.

2. Vortex segítségével homogenizáljuk a szuszpenziót.

3. Készítsünk 4 tagú 10-es léptékű hígítási sorozatot (lásd 25. GYAKORLAT) a mintákból.

4. Minden hígítási tagból 0,1 ml mennyiséget szélesszünk (lásd 25. GYAKORLAT) feliratozott Petri-csészében lévő húspepton, keményítő-kazein, brolacin és Sabouraud tápagar felszínére.

5. A szélesztéssel fertőzött tápagar lemezeket fordított helyzetben (fedelükkel lefelé) helyezzük 28 °C-os termosztátba, és inkubáljuk 1 hétig.

6. Az inkubációs idő elteltével végezzünk csíraszám becslést (lásd 25. GYAKORLAT) és telepmorfológiai vizsgálatokat (lásd 53. GYAKORLAT).

A **gyorsfagyasztott növényi élelmiszerekre** különösen érvényes, hogy a jó mikrobiológiai minőség feltétele a kiváló nyersanyag és a kifogástalan üzemi higiénia (lásd 148. GYAKORLAT és 149. GYAKORLAT).

A zöldség külső részeinek eltávolítása (pl. a borsó kifejtése) a mikrobák szaporodásának kedvez, a mosás általában csak csekély mértékben csökkenti a mikrobaszámot. A zöldségeket fagyasztás előtt rendszerint előfőzik (blansírozzák) az enzimek inaktiválása és a minőségi paraméterek megőrzése céljából. A 90-100 °C-on végzett néhány perces hőkezelés 2-3 nagyságrenddel csökkenti a mikrobiális szennyezettséget, de közben megváltozik a nyersanyag állapota, szerkezete, és az összetevők a mikroorganizmusok számára jobban hozzáférhetővé válnak. Így az előfőzés után a mikrobiológiai veszély elhárítása végett a lehető legrövidebb idő alatt kell lehűteni és fagyasztani a terméket. Az élelmiszerek fagyasztásakor az alacsony hőmérséklet és a kis vízáktívitas nemcsak kizárja a

mikroorganizmusok szaporodását, hanem részben el is pusztítja őket. A fagyasztás, tárolás és felengedés közben sok tényező befolyásolja a mikrobapusztulást. Az élelmiszer eredeti tulajdonságait jobban megőrző fagyasztási mód előnyös a mikroorganizmusok túlélésére is. A termék összetevői közül némelyek védő hatásúak, mások fokozzák a pusztulást. A mikroorganizmusok ellenállóképessége a fagyasztás hatásaival szemben nagyon különbözik a faj és az élettani állapot szerint.

A fagyasztott zöldségek mikrobaszáma átlagosan 10^4 - 10^6 CFU/g. Gyakran izolálhatók *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* fajok, valamint mikrokokkuszok és tejsavbaktériumok. Élesztő- és penészgombák általában kisebb számban fordulnak elő, mint a baktériumok. A mikrobióta nagy része a feldolgozó vonal berendezéseiről származik, számuk az üzem higiéniai gyakorlatát tükrözi. Patogén baktériumok előfordulása viszonylag ritka, mivel a vegetatív baktériumsejtek nem élnek túl az előfőzést, másrészt a túlélő sejtek nem képesek szaporodni a fagyasztás hőmérsékletén, továbbá a termékeket a fagyasztás előtt többnyire megfőzik. Patogének (pl. *Salmonella enterica*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) jelenléte súlyos higiéniai hiányosságokra, vagy az előfőzés elégtelenségére utal.

A gyümölcsök mikrobiótáját egyaránt befolyásolja a talaj, az éghajlat, az érett vagy éretlen állapot, és maga a gyümölcs fajtája. A gyümölcsök héja a mikroorganizmusokkal szemben némi védelmet jelent, de ha sérül a héj, vagy a dörzsöléssel-lemosással eltávolított viaszréteg miatt a mikrobák behatolása felgyorsul. A földhöz közel lévő, alacsonyan fekvő gyümölcsök (pl. szeder, földieper, málna) mikrobiótája a zöldségekhez hasonló. A magasan termő gyümölcsök (pl. alma, cseresznye) viszonylag tisztábbak, mert a nap ultraibolya sugarai fertőtlenítik a porral, rovarokkal, a madarak székletével felszínükre került szennyeződést. Gyümölcsök felületén jellemző módon megtalálhatók a tejsavbaktériumok, élesztők, penészgombaspórák. A földes árú felületére tapadt talajszemcséken baktériumok sejtjei, endospórái, penészek fonalai, spórái, protozoonok cisztái, férgek petéi, lárvái fordulhatnak elő.

A legtöbb fagyasztott gyümölcsöt nyersen fogyasztják, mivel az előfőzés puhává tenné. A gyümölcsökön eredetileg jelen lévő mikroorganizmusok nagy része túléli a fagyasztási-felengedési folyamatot. A szeletelt, magozott, passzírozott termékek a feldolgozó vonalon is szennyeződhetnek. Cukor adagolása mikrobiológiai szempontból egyaránt lehet kedvező, vagy kedvezőtlen, mivel elősegítheti a mikrobák túlélését. A gyorsfagyasztott gyümölcsök leggyakrabban penészsporákat, élesztőgombákat és tejsavbaktériumokat tartalmaznak, amelyek a felengedés után a termék romlását okozhatják.

148. GYAKORLAT

Fagyasztott növényi élelmiszerek összbaktériumszám meghatározása húspepton, Endo és Szita-féle E-67 tápagon

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

mirelit zöldség és gyümölcs

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

húspepton tápagar

kékes homogenizátor

180 ml steril pepton-só oldat

9 ml steril víz kémcsőben

pipetta, steril pipettahegyek

szélesztőbot (sterilizáláshoz alkohol)

Bunsen-égő

laboratóriumi mérleg

steril óraüveg

steril kanál
kémcsőkeverő (vortex)
termosztát

A vizsgálat menete

1. A mélyhűtött terméket tároljuk 15 °C-on 12 óráig, majd mérjük ki belőle 20 g-nyi mennyiséget, és homogenizáljuk késes homogenizátorban 180 ml pepton-só oldattal.
2. Készítsünk 4 tagú 10-es léptékű hígítási sorozatot (lásd 25. GYAKORLAT) a mintákból.
3. Minden hígítási tagból 0,1 ml mennyiséget szélesszünk (lásd 25. GYAKORLAT) feliratozott Petri-csészében lévő nutrient, Endo és Szita-féle E-67 tápagar felszínére.
4. A szélesztéssel fertőzött tápagar lemezeket fordított helyzetben (fedelükkel lefelé) helyezzük 28 °C-os termosztátba, és inkubáljuk 1 hétig.
5. Az inkubációs idő elteltével végezzünk csíraszám becslést (lásd 25. GYAKORLAT) és telepmorfológiai vizsgálatokat (lásd 53. GYAKORLAT).

149. GYAKORLAT

Fagyasztott növényi élelmiszerek anaerob spórás baktériumainak kimutatása

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

mirelit zöldség és gyümölcs

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

Wilson-Blair-féle bizmut-szulfid tápagar Petri-csészében
késes homogenizátor
180 ml steril pepton-só oldat
9 ml steril víz kémcsőben
pipetta, steril pipettahegyek
szélesztőbot (sterilizáláshoz alkohol)
Bunsen-égő
laboratóriumi mérleg
steril óraüveg
steril kanál
kémcsőkeverő (vortex)
anaerob zacskó
fóliahegesztő
anaerob tenyésztőedény
termosztát

A vizsgálat menete

1. A mélyhűtött terméket tároljuk 15°C-on 12 óráig, majd mérjük ki belőle 20 g-nyi mennyiséget, és késes homogenizátorban homogenizáljuk 180 ml pepton-só oldattal.
2. Készítsünk 4 tagú 10-es léptékű hígítási sorozatot (lásd 25. GYAKORLAT) a mintákból.
3. Minden hígítási tagból 0,1 ml mennyiséget szélesszünk (lásd 25. GYAKORLAT) feliratozott Petri-csészében lévő Wilson-Blair-féle bizmut-szulfid tápagar felszínére.
4. Helyezzük a Petri-csészéket anaerob zacskóba, vagy anaerob tenyésztőedénybe.
5. A tenyészeteket inkubáljuk 1 hétig 28 °C-on.
6. Az inkubációs idő elteltével végezzünk csíraszám becslést (lásd 25. GYAKORLAT) és telepmorfológiai vizsgálatokat (lásd 53. GYAKORLAT). A táptalajon a H₂S-pozitív *Clostridium*ok vas-szulfid képződés következtében fekete színű telepeket képeznek.

10 BIOTECHNOLÓGIAI ÉS FERMENTÁCIÓS ELJÁRÁSOK LABORATÓRIUMI KONTROLLJA

A biotechnológia a klasszikus megfogalmazásban olyan gyártási eljárást jelent, amelyben valamilyen élő szervezet, vagy annak alkotórészei (pl. enzimek) végzik a termékek előállítását. Hagyományos biotechnológiai eljárásoknak tekinthetők a "mikrobiális fermentációkra" alapozott technológiák, amelyek során a mikroorganizmusokkal mesterséges körülmények között fermentorokban (aerob vagy anaerob környezetben) különböző anyagokat, így pl. antibiotikumokat, citromsavat, alkoholokat (elsődleges vagy másodlagos anyagcsere termékeket) termeltetnek. Napjainkban a rekombináns DNS-technikák felhasználásával lehetőség nyílt különféle vegyületeknek (pl. inzulin, növekedési hormon, interferon) az ember által bizonyos célból megváltoztatott, genetikai programjukban módosított élő szervezetek felhasználásával történő előállítására.

A mikrobiális anyagcsere-termékek két csoportba oszthatók, elsődleges és másodlagos metabolitokra. Az elsődleges anyagcsere-termékek a növekedési fázisban (trofofázisban) szintetizálódnak, a sejtek életéhez és szaporodásához nélkülözhetetlenek (pl. aminosavak, nukleotidok, etanol és szerves savak). Az iparban az **etanol termeltetés immobilizált *Saccharomyces cerevisiae* sejtekkel** történhet (lásd 150. GYAKORLAT). Az immobilizált sejt-technika alkalmazásának számos előnye van a szabad sejt-technikákkal szemben, így például nagyobb sejtsűrűség érhető el, a mikrobiális biomassza többször ismételve felhasználható, a folyamatos üzemeltetéssel működő fermentációnál nagy átfolyási sebességeket lehet alkalmazni, a nagy átfolyási sebességek mellett kisebb a mikroba-fertőzés veszélye és a termék könnyen tisztítható. Az immobilizációs technikákat három csoportra oszthatjuk: hordozóhoz kötés, kereszt-kötés és befogás (81. ábra). A hordozóhoz kötés technikájának az az alapja, hogy szilárd felülethez adszorpcióval, ionos vagy kovalens kötéssel megkötik a sejteket vagy enzimeket. A kereszt-kötési módszernél két vagy több funkciós csoportú reagenssel, mint például a glutáraldehiddel vagy toluol-izotiocianáttal immobilizálhatók a sejtek, vagy az enzimek. A befogásos eljárásnál polimer anyagba kötődnek a sejtek. Erre a célra leggyakrabban használt polimer a poliakrilamid gél, az alginát gél és az UV-sugárzással térhálósított gyanták.

150. GYAKORLAT

Immobilizált sejt-technika alkalmazása alkoholos fermentációban

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Saccharomyces cerevisiae sejt-suszpenzió (kb. 25 g nedves súlyú sejt-tömeg)

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

pipetta, steril pipettahegyek
glükóz tápleves
maláta tápleves
50 ml 4 tömeg %-os alginát oldat
50 ml 0,05 M-os CaCl₂-oldat (pH 6-8)
szemcseppentő
káliumdikromát oldat
kémcső
termosztát

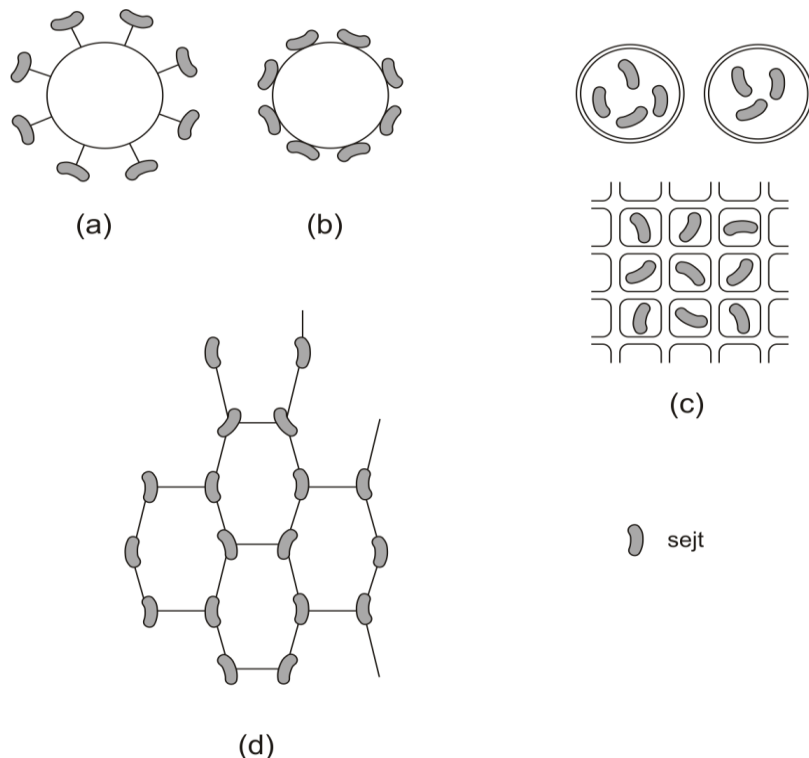
A vizsgálat menete

1. 50 ml felíratozott *Saccharomyces cerevisiae* sejt-suszpenziót sterilén keverjünk össze 50 ml 4 tömeg %-os alginát oldattal.

2 A keverékből csepegtessünk maximum 3 mm átmérőjű cseppeket a 0,05 M-os 37°C-

os CaCl_2 -oldatba.

3. Szilárdítsuk egy óra hosszat $20\text{-}22^\circ\text{C}$ -on az immobilizált sejtömeget.
4. Az immobilizált sejtömeget ezt követően stabilizáljuk 4°C -on egy éjszakán át.
5. Az immobilizált sejtekkel oltuk be a glükóz és a maláta táplevest.
6. A beoltott tápleveseket inkubáljuk 28°C -os termosztátban 1 hétig.
7. Az inkubációs idő elteltével öntsünk a fermentléből 2 ml-t egy üres kémcsőbe, és csepegtessünk bele 6-8 csepp káliumdikromát reagenst.
8. Értékeljük ki a teszt eredményét. Pozitív reakció esetén a káliumdikromát aldehiden át karbonsavig oxidálja az alkoholt, miközben a króm +6-os oxidációs állapotból (barna) +3-as oxidációs állapotig redukálódik (zöld).
9. Hasonlítsuk össze a kétféle tápleves alkalmazásával kapott eredményt.



81. ábra Immobilizált sejt-technika

Sejtek hordozóhoz kötéseinek változatai: kovalens kötés (a), adszorpciós rögzítés (b), gélbefogásos kötés (c), keresztkötés (d).

A másodlagos metabolitok az intenzív növekedési fázist követően az idiofázisban keletkeznek. A sejtek ilyenkor változásokon mennek keresztül, replikációjuk nem működik, aminek oka lehet tápanyaghiány, toxikus anyagok felhalmozódása, oxigénhiány vagy más korlátozó tényező. Ekkor indulnak be olyan másodlagos anyagcsereutak, melyeknek termékei nem esszenciálisak a sejtalkotórészek szintéziséhez, a növekedéshez, illetve a szaporodáshoz. Ezek a sejtekben vagy a tápközegben halmozódnak fel, kémiai szerkezetük és élettani hatásuk (pl. antibiotikumok, mikotoxinok) eltérő.

Napjainkban a citromsavat (2-hidroxi-propán-1,2,3,-trikarbonsav) mikrobiológiai úton az *Aspergillus niger* és az *Aspergillus wentii* segítségével állítják elő. A termelésben a legfontosabb szénforrás a glükóz. A tenyésztés során a rendelkezésre álló glükóz egy része a trofofázisban micéliumképzésre, míg az idiofázisban **citromsav termelésre** használandó fel (lásd 151. GYAKORLAT).

151. GYAKORLAT

Citromsavtermelés rázatott tenyészetben

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

Aspergillus niger tenyészet Petri-csészében

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

pipetta, steril pipettahegyek

Bürker-kamra

vékonyréteg kromatográfias lemez (kb. 5 x 4 cm-es lemez)

mikrokapilláris

festőkád

csipesz

hajszáritó

citromsav termeltető tápleves

futtatószer (benzol-metanol-ecetsav 45:8:4 arányú elegye)

1%-os citromsav oldat (kontroll minta)

előhívó (*Schweppe reagens*)

szárítószekrény (125°C)

A vizsgálat menete

1. Oltókacs segítségével mossuk az *Aspergillus niger* spóráit desztillált vizet tartalmazó felíratotott kémcsövekbe.

2. Bürker-kamrás spóraszámolással készítsünk 80000 spóra/ml és 20000 spóra/ml spórakoncentrációjú szuszpenziókat.

3. A kétféle spóraszuszpenzióból pipetázunk 1-1 ml-nyi mennyiséget 50 ml citromsav termeltető táplevest tartalmazó Erlenmeyer lombikokba.

4. A lombikokat inkubáljuk 1 hétig rázógépből 37°C-on 270/perc fordulattal rázatva.

5. Az inkubációs idő elteltével a citromsavtermelést vékonyréteg-kromatográfiával detektáljuk.

6. A kromatográfias lemezre mikrokapilláris segítségével vigyük fel a mintákat és a kontroll mintát (1%-os citromsav oldat). A lemezt helyezük bele a futtatóelegyebe és addig hagyjuk a futtatókádban, míg az eluens a lemez felső szélét 1 cm-re megközelíti.

7. Vegyük ki a lemezt, és szárítsuk meg hajszáritóval.

8. Ismételjük meg a 6. és 7. pont műveleteit 4-szer.

9. Ezután egyenletesen permetezzük be a vékonyréteg kromatográfias lemezt az előhívó oldattal (*Schweppe reagens*), majd tegyük a lemezt 5 percre 125°C-os szárítószekrénybe.

10. Értékeljük ki a vékonyréteg kromatográfias tesztet (a citromsav sötétbarna foltként jelenik meg a lemezen). Hasonlítsuk össze a különböző spórakoncentrációkkal kapott eredményeket!

11 ALAPVETŐ ALGAVIZSGÁLATI MÓDSZEREK

Ma már elfogadott tény, hogy a túlzott mértékű eutrofizálódás mind az ember, mind a vizek eredeti életközössége, mind a természetes folyamatok szempontjából káros, vagyis a trofitás-fok jelentős, gyors növekedése vízminőség romlást jelez, az ezt kiváltó hatást tehát vízszennyezésként kell felfognunk. Ezért pl. a természetes fürdővizekkel szemben támasztott minőségi követelmények között is szerepel az a-klorofill koncentráció meghatározása (78/2008. (IV. 3.) Korm. Rendelet).

A vízi életközegben biológiai szempontból négyféle oldott, vagy lebegő anyag található: szervetlen növényi táplálék, szerves táplálék, mérge és az élőlények számára közömbös anyagok. Természetes felszíni vizeink minőségére a biológiai vízminősítésben használatos paraméterek (halobitás, trofitás, szaprobítás, toxicitás) meghatározásával következtethetünk, melyek szorosan összefüggenek egymással. A négy tulajdonságcsoporthoz közül algavizsgálatokkal legjobban a trofitás foka becsülhető. Az EU 3. irányelve, a Víz Keretirányelv (VKI), mely előírja felszíni vizeink ökológiai állapotértékelését. A VKI által előírt 5 vizsgálandó élőlénycsoport közül az egyik a vízben lebegve élő, fotoszintetizáló élőlények csoportja, a fitoplankton. A hazai gyakorlatban a **fitoplankton a-klorofill tartalmának meghatározása** az egyik paraméter az ökológiai állapotbecslés során (<http://www.vizeink.hu/?module=doklista&f=14>). Jelenleg Magyarországon ezt az MSZ ISO 10260 szabvány útmutatásai alapján, etanolos extrakcióval végzik. A módszernek azonban számos hibája van, ezért itt a pontosabb, metanolos módszert ismertetjük (lásd 152. GYAKORLAT).

152. GYAKORLAT

Fitoplankton minták a-klorofill tartalmának meghatározása

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

merített vízminta, vízben lebegve élő alga szervezetek

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

tömény metanol
üvegszálas membrán
papírszűrő
méregpipetta
tölcsér
mérőhenger
vákuum-szűrőkészülék szűrőlap tartó szorítóval
csiszolt dugós kémcső hűtőfeltéttel
vízfürdő
kémcsőfogó csipesz
gumikesztyű
papírvatta
elszívó fülke
spektrofotométer, üvegkuvetta

A vizsgálat menete

1. Szűrjük át üvegszálas szűrőn 500 ml-t a természetes felszíni vízből merített vízmintából. Ha a szűrés intenzitása csökken, folytassuk a szűrést vákuum-szűrőkészülékkel egészen addig, míg a szűrőt folyadék mentesre nem szűrtük.

2. A csiszolt dugós kémcsőbe méregpipettával pipetázzunk 10 ml metanol, majd a szűrőlapot a rászűrt mintával befelé fordítva hajtsuk ketté, vágjuk csíkokra és dobjuk bele a metanolba.

3. Zárjuk le a kémcsövet a dugóval, majd tartsuk a kémcsövet kémcsőfogó segítségével 74 °C-os vízfürdőben 3 percig. *Vigyázzunk, a forró vízfürdő égési sérüléseket okozhat! A metanol gyúlékony folyadék vagy gőz, belélegezve, bőrrel érintkezve és lenyelve erősen mérgező.*

4. A vízfürdőről kivéve pipettázzunk még 10 ml tömény metanolt a kémcsőbe, húzzunk gumikesztyűt, és a kémcső végét a hüvelykujjunkkal befogva alaposan rázzuk össze.

5. Az extraktumot szűrjük át hagyományos szűrőpapíron, majd töltjük küvetába. Ha a betöltéskor a folyadék melléfolyt, a küvetta külsejét papírvattával töröljük tisztára.

6. Az extraktum extinkcióját spektrofotométer segítségével 3 hullámhosszon (750, 666, 653 nm) mérjük. A spektrofotométert kalibráljuk az extrahálószerként használt metanollal (vak) szemben.

7. Az a-klorofill koncentráció kiszámolásakor a 750 nm-en mért extinkció értékét levonjuk mind a 666 nm-en, mind a 653 nm-en mért extinkció értékéből. Így megkapjuk a képletben szereplő E666 és E653 értékeket.

8. A továbbiakban az alábbi egyenlet szerint számolunk:

$$C_a = 17,12 \times E_{666} - 8,68 \times E_{653}.$$

Az a-klorofill koncentrációja = $m \times C_a \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (m = a metanol térfogata ml-ben; M = az átszűrt vízminta térfogata ml-ben). Az eredményt ($\mu\text{g l}^{-1}$) egységben kapjuk meg. A kapott érték segítségével a Függelék 13.6.5 fejezete alapján keressük ki a trofitás mértékét, illetve a minősítés eredményét.

A Víz Keretirányelv által előírt 5 vizsgálandó élőlénycsoport közül a fitoplankton mellett a másik mikroszkópikus méretű fotoszintetizáló élőlény együttes a rögzülten élő, ún. bevonatalkó kovaalgák, vagy más néven fitobentosz szervezetek, melyeket szintén felhasználhatunk az ökológiai állapotértékelés során. A kovaalgák meghatározása ma még alapvetően héj struktúrájukon alapul, amit a határozáshoz láthatóvá kell tenni. Így a kovasejt szerves anyag tartalmának roncsolásával a **kovaalgák vizsgálatára alkalmas tartós preparátum** készíthető (lásd 153. GYAKORLAT).

153. GYAKORLAT

Tartós preparátum készítése fitobentosz minták vizsgálata céljából

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

bevonat minta, aljzathoz rögzülten élő kovaalgák

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

tömény hidrogén-peroxid

Naphrax műgyanta

toluol

tárgylemez

fedőlemez

fémcsipesz

elektromos főzőlap

elszívó fülke

gumikesztyű

papírvatta

cseppentő

fogpiszkáló

A vizsgálat menete

1. A minta üledékéből 1 cseppet vigyünk fedőlemezre, és elektromos főzőlap fölé

tartva párologtassuk el annak víztartalmát. Vigyázat, elektromos főzőlapok használatakor fokozott az égésveszély!

2. Cseppentsünk tömény hidrogén-peroxidot a fedőlemezre, pontosan a beszárított minta tetejére és ezt is szárítsuk be óvatos melegítéssel, majd ismételjük meg a műveletet.

3. Fogpiszkálóval tegyünk a tárgylemezre kb. lencsényi nagyságú Naphraxot.

4. Helyezzük a fedőlemezt a beszárított mintával lefelé a tárgylemezen lévő Naphrax csepre és az ujjunkkal kissé nyomjuk rá a fedőlemezt a tárgylemezre.

5. A tárgylemezt (rajta a beszárított, roncsolt mintánkat tartalmazó fedőlemezrel és beágyazó anyaggal) fémcsipesszel megfogva elektromos főzőlap fölé tartva melegítsük mindaddig, amíg a gyanta finoman buborékolva el nem kezd forni (oldószerét elpárologtatjuk). Ha elkezdett forni, vegyük el az elektromos főzőlaptól, és várjunk addig, míg abbamarad a forrás. Ezt a műveletet ismételjük meg.

6. A tárgylemezt a még buborékosan forró mintával vegyük el az elektromos főzőlap fölül, gyors mozdulattal tegyük az asztalra, és a csipesz tompa végével finom nyomást mérve a fedőlemezre nyomjuk ki a műgyantában maradt apró buborékokat, s közben a fedőlemezt nyomjuk teljesen a tárgylemezre (ezt a műveletet csak addig végezhetjük sikerrel, amíg forró a beágyazó szer, ezért sietnünk kell vele). Hagyjuk kihűlni a tárgylemezt, majd legalább egy fél óráig tegyük félre.

7. Ha a műgyanta teljesen megszilárdult, akkor a fedőlemezen kívülre jutott beágyazó anyagot elszívó fülke alatt, gumikesztyűben toluollal átitatott papírvattával óvatosan letöröljük, vigyázva arra, hogy a fedőlemez ne csússzon el a helyéről.

8. Az elkészült tartós preparátumot a mikroszkóp tárgyasztalára helyezzük és a fedőlemezre immerziós olajat cseppentünk. 100 x-os nagyítású, immerziós objektívvel vizsgáljuk meg a mintát, figyeljük meg a kovavázak szerkezetét, rajzoljuk le a különböző formákat és próbáljuk meg meghatározni a különböző nemzetségekbe tartozó egyedeket.

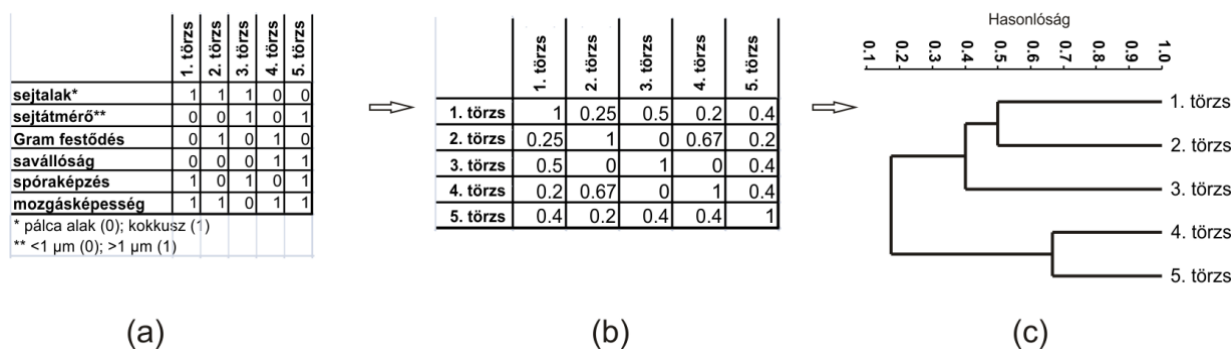
12 ADATELEMZÉS

A mikrobiológiai vizsgálatok során számos adathoz jutunk. Amíg csak egyféle vizsgálatot végzünk (pl. Gram-festés), az eredmények táblázatba foglalva könnyen áttekinthetők. Gyakran szükség van azonban többféle adat összevetésére, ami táblázatos formában már nehezen megvalósítható. Léteznek olyan adatok is, mint a nukleinsav szekvenciák, amelyek értelmezéséhez további módszerek szükségesek.

12.1 Numerikus taxonómia

A gyakorlatok során a kódjelzéssel ellátott baktériumtörzsek mintegy 40-50 fenotípusos bélyegét vizsgáltuk meg. Ha az így kapott teszteredményeket táblázatba foglaljuk, a kapott „adatmátrix” áttekintése meglehetősen nehéz feladat, hiszen nem tudjuk az azonos bélyegeket mutató törzseket kiválasztani, nem is beszélve az egymáshoz való – csak kulcsbélyegekre alapozott – hasonlóság megállapításáról. E célra számítógépes statisztikai módszerek alkalmazhatók.

A numerikus taxonómia során az ismeretlen baktériumokat taxonómiai értékű tulajdonságaik (pl. fenotípusos bélyegek) alapján numerikus módszerekkel, például csoportelemzéssel csoportosítjuk (82. ábra).



82. ábra Baktériumok fenotípusos tulajdonságaira alapozott csoportelemzés

Az egyes törzsek fenotípusos bélyegeit tartalmazó táblázat (a). A Jaccard koefficiens segítségével számított törzsek közötti hasonlóság mátrixa (b). Az UPGMA algoritmussal előállított hasonlósági fa (c).

A **csoportelemzés** során abból a feltevésből indulunk ki, hogy a baktériumtörzsek vizsgált fenotípusos (pl. morfológiai, biokémiai, élettani) tulajdonságai (többé-kevésbé) állandóak (pl. nem terjednek horizontális géntranszferrel), jellemzőek az egyes fajokra, egymással egyenértékűek (lásd 154. GYAKORLAT). A csoportelemzésben a teszteredményeket a törzsekhez, mint objektumokhoz (OTU; operational taxonomic unit; számításba bevont rendszertani egység) bináris változókként rendeljük hozzá, vagyis a tesztek során feltett kérdésekre igen-nem típusú válaszokat adunk (pl. képez-e a törzs peptonból ammóniát, amely Nessler-reagenssel kimutatható?). Vannak azonban olyan adatok, pl. a mennyiségi jellegű eredmények, melyek binárisan közvetlenül nem kódolhatók (pl. sejtméret). A csoportelemzés során ezeket a mennyiségi karaktereket is célszerű átalakítanunk binárisan kódolható kategóriákba (pl. kisebb-e a sejthossz 2,3 μm-nél?). Az ily módon létrehozott objektum (OTU) / változó (teszteredmények) mátrix sorain leggyakrabban a Simple Matching és a Jaccard koefficienseket alkalmazva végzünk hasonlósági számítást. Ennek eredményeképpen minden OTU-nak minden másik OTU-hoz való hasonlóságértékét kapjuk meg. E hasonlóságokra alapozva általában UPGMA (Unweighed Pair Group Method of Averages; csoportátlag módszer), vagy egyszerű lánc (single linkage) algoritmus segítségével hierarchikus osztályozást végzünk, amit a törzsek hasonlósági viszonyait tükröző

dendrogram grafikusan szemléltet. Ha az OTU körbe már identifikált törzseket is bevonunk, egy-egy csoport azonosítása könnyebb lesz (a csoport jellemző képviselője a típustörzs). A műveletet és az eredményt összefoglalóan taxometria néven ismerik a mikrobiológiában. A törzsek fenotípusos tulajdonságokra alapozott faji szintű azonosításában a „Bergey's Manual of Systematic Bacteriology” c. taxonómiai mű jelenti a legnagyobb segítséget, melyben család, nemzetség és faji szintű leírások, összefoglaló táblázatok teszik lehetővé a vizsgált törzsek és a típustörzsek tulajdonságainak összehasonlítását.

154. GYAKORLAT

Csoportelemzés ismeretlen baktériumtörzsek fenotípusos tulajdonságai alapján

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismeretlen baktériumtörzs

A vizsgálathoz szükséges anyagok és eszközök

ismeretlen baktériumtörzs teszteredményei táblázatos formában

ismert baktériumtörzsek teszteredményei táblázatos formában

számítógép telepített Excel és statisztikai (pl.: Past 3) programmal

A vizsgálat menete

1. Az ismeretlen és már azonosított baktériumtörzsekre (mint objektumokra) jellemző adatokat (a fenotípusos tesztek igen/nem eredményét) foglaljuk össze egy Excel táblázatban. Ezek a bináris adatok szolgálnak a numerikus analízis alapjául.

2. A táblázatot vigyük be a Past 3 statisztikai programba. Indítsuk el a Past 3 programot, a táblázat rész felett kattintsunk az „Row attributes” és „Column attributes” négyzetekre, majd a táblázat A1 cellájától eggyel balra és fentebb elhelyezkedő cellájára kattintás után illesszük be az Excel táblázatot, végül kattintsunk újra az „Row attributes” és „Column attributes” négyzetekre. Ezzel bevittük az adatokat a Past 3 programba.

3. Készítsünk hasonlósági dendrogramot a törzsekre UPGMA módszerrel, Jaccard koefficiens felhasználásával. Ehhez jelöljük ki a teljes táblázatot és transzponáljuk azt (Felső menü: Edit> Rearrange>Transpose). Erre azért van szükség, mert a dendrogram készítésénél a sorokban kell lenniük a mintáknak és az oszlopokban a változóknak. A teljes táblázat kijelölésével készítsük el a dendrogramot (Felső menü: Multivariate>Clustering>Classical) „paired group” algoritmust – ez felel meg az UPGMA módszernek – és Jaccard koefficiens használva.

4. A dendrogramon keressük meg az ismeretlen törzsekhez legközelebb elhelyezkedő azonosított törzseket.

12.2 Mikrobiológiai és környezeti változók együttes elemzése

Mikrobiológiai vizsgálatok eredményeinek értékelését elősegítheti, ha a biológiai eredményekkel együtt kémiai vagy fizikai adatokat is elemzünk. Ilyen lehet például, ha különböző mintákból csíraszám becsléseket (5. fejezet) végzünk, T-RFLP ujjlenyomatot (7.1.2.2 fejezet) vagy közösségi enzimprofil (7.2.1 fejezet) határozzuk meg, és ezzel párhuzamosan környezeti változókat is vizsgálunk (pl. pH, hőmérséklet).

A **változók közti kapcsolatrendszer felderítésére** legegyszerűbben korrelációt számolhatunk, és megnézzük, hogy az adott összefüggés szignifikáns-e. Ez a megközelítés, akkor alkalmazható, ha csak kevés mért változót (<10) akarunk összehasonlítani. Például egy mintából különböző tápközegekben meghatározott csíraszám becslés eredményét néhány környezeti változóval (pl. pH, NO₃⁻, SO₄²⁻ koncentráció) vetjük össze (lásd 155. GYAKORLAT).

Egy közösségi enzimprofil vagy egy molekuláris ujjlenyomat vizsgálat elvégzése során azonban már nagyszámú (akár 100 feletti) változóval kell dolgoznunk. Ekkor a rengeteg párhuzamos korreláció elvégzése nehezíti az adatok áttekintését. Ezért először a biológiai

adatsorok redukcióját, ordinációját célszerű elvégezni. Azokat a módszereket nevezzük így, melyeknek elsődleges feladata az eredeti sok változó behelyettesítése kevés számú, de az eredeti adatstruktúrát többé-kevésbé jól tükröző változóval. Ezek közül a legelterjedtebb a főkomponens elemzés (PCA, Principal Component Analysis). A főkomponens elemzés az eredeti sokváltozós adatfelhőben megkeresi azokat az új tengelyeket (főkomponenseket), amelyek az összvariancia legjelentősebb hányadát magyarázzák meg. (Az összvarianciát az adatmátrix egyes értékeinek a sor- és oszlopátlagoktól való eltérés-négyzetösszege adja.) Az első főkomponens lesz az összvariancia legnagyobb hányadáért a felelős, a következő – amelynek merőlegesnek kell lennie az elsőre (vagyis a tengelyek nem korrelálhatnak egymással) – már kisebbért, és így tovább. A PCA előnye, hogy egy diagramon lehet ábrázolni a mintákat és az elválásukat okozó eredeti változókat, ezt nevezzük biplotnak. (Részletesebb leírás: Ordination Methods for Ecologists/PCA <http://ordination.okstate.edu/PCA.htm>) Ezután már nem az eredeti változók között kell elvégezni a korrelációt, csak a minták első néhány tengelyen felvett új koordinátája és a környezeti változók között. Vagyis sikerül a sokváltozós esetet is az előző kevés változós esetre visszavezetni.

155. GYAKORLAT

Mikrobiológiai és környezeti változók együttes elemzése

A vizsgálat tárgya

környezeti minták mikrobiológiai és fiziko-kémiai adathalmaza

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

környezeti minták csíraszám adatai

T-RFLP ujjlenyomat vizsgálat adatai

fiziko-kémiai adatok

számítógép telepített Excel és statisztikai (pl.: Past 3) programmal

A vizsgálat menete

1. A gyakorlat első részében csíraszámokat és környezeti változókat hasonlítunk össze.
2. Ehhez Excel program segítségével rendezzük táblázatos formába az adatokat. Gondoljuk végig előre, hogy mely változók között várunk pozitív vagy negatív összefüggéseket! Másoljuk ki a táblázatot.
3. Indítsuk el a Past 3 programot, a táblázat rész felett kattintsunk az „Row attributes” és „Column attributes” négyzetekre, majd a táblázat A1 cellájától eggyel balra és fentebb elhelyezkedő cellájára kattintás után illesszük be az Excel táblázatot, végül kattintsunk újra az „Row attributes” és „Column attributes” négyzetekre. Ezzel bevittük az adatokat a Past 3 programba.
4. A teljes táblázat kijelölésével végezzük el a korrelációs számítást (Felső menü: Univariate>Correlation).
5. A kapott táblázat bal alsó mátrixában találjuk a korrelációs együtthatót. A hozzátartozó jobb felső mátrixban lévő érték mutatja meg, hogy az adott korrelációs együttható szignifikáns-e. Ez akkor teljesül, ha a $p < 0,05$.
6. Hasonlítsuk össze a kapott szignifikáns összefüggések listáját az előzetes várakozásainkkal (2. pont). Értékeljük a kapott eredményeket!
7. A gyakorlat második részében T-RFLP ujjlenyomatokat és környezeti változókat hasonlítunk össze.
8. A létrehozott adatmátrixból készítsünk Excel táblázatot.
9. A táblázatot másoljuk ki, és illesszük be a Past 3 programba a 3. pont szerint. A teljes táblázatot jelöljük ki, és transzponáljuk (Felső menü: Edit> Rearrange>Transpose). Erre azért van szükség, mert a főkomponens elemzéshez a sorokban kell lenniük a mintáknak és az oszlopokban a változóknak a Past 3 program esetén.

10. A teljes táblázat kijelölésével végezzük el a főkomponens elemzést (Felső menü: Multivariate>Ordination>Principal components). Az előjövő ablakon kattintsunk a „view scatter” gombra, hogy megkapjuk a PCA ábrát, ahol a pontok (minták) egymáshoz képest való elhelyezkedése mutatja, mennyire hasonlóak az egyes minták eredeti ujjlenyomatai.

11. A minták PCA ábrán felvett új koordinátáinak megtekintéséhez a „Scores” földre kattintsunk. Majd másoljuk ki ezeket a koordinátákat.

12. Egy új Excel munkalapról illesszük be a koordinátákat, majd transzponáljuk az adatokat, hogy a 2. pontban leírt táblázathoz hasonlókat kapjunk. Csak itt a csíraszámok helyett a minták egyes tengelyeken felvett koordinátái szerepelnek. Rakjuk ezután melléjük a környezeti változók adatsorait, és végezzük el a korrelációs számításokat a minták PCA koordinátái és a környezeti változók között a 2.-6. pontoknak megfelelően.

12.3 Taxoneloszlás, fajszámbecslés és diverzitás indexek

Többféle módszer áll a kutatók rendelkezésére, amivel azonosíthatók a taxonok, meghatározható vagy legalábbis becsülhető a vizsgált mintában előforduló taxonok száma, a közösség diverzitása (lásd 156. GYAKORLAT). Fénymikroszkópos módszerekkel is azonosíthatók a morfológiai szempontból változatos mikrobacsoportok tagjai, a prokarióták közül azonban egyedül a cianobaktérium taxonok különíthetők el viszonylagos megbízhatósággal ezeknek technikáknak a segítségével. A baktériumok körében mind a taxonok azonosítására, mind a közösség diverzitásának becsülésére a DNS alapú módszerek a legalkalmasabbak. A különböző közösség-vizsgáló eljárásokat e tekintetben a 11. táblázat hasonlítja össze.

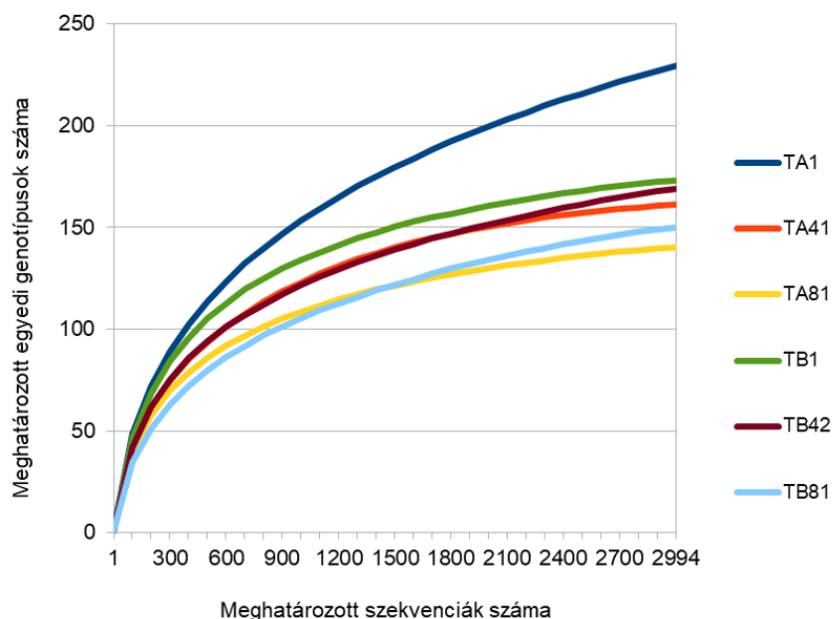
11. táblázat A prokarióta közösségek taxonómiai összetételének feltárására használt módszerek összehasonlítása

	Azonosítás alapja	Azonosítás lehetséges szintje (általában)	Fajszámbecslés megbízhatósága	Diverzitásbecslés megbízhatósága
Törzsek izolálása és szekvenálása	törzs	faj	alacsony	alacsony
Klónozás és szekvenálás	klón	faj	közepes	közepes
T-RFLP	T-RF	nem lehetséges az azonosítás	közepes	közepes
DGGE és szekvenálás	DGGE sáv	nemzetség	alacsony	alacsony
NGS	egyedi szekvencia leolvasás	nemzetség	nagy	nagy

A taxonokat különböző szinteken azonosíthatjuk, ez leginkább a 16S rRNS gén összehasonlító elemzésén alapul és a szekvenált szakasz hosszától függ: 200 nukleotid család, 400-500 nukleotid nemzetség, míg 700 nukleotid hossz fölött faji szintű azonosítás válik lehetővé. Az elkészült taxon lista alapján következtethetünk a mikrobaközösség működésére a kimutatott fajok és nemzetségek tulajdonságainak ismeretében. A fajok, taxonok azonosításához használjuk a korábbi fejezetekben ismertetett adatbázisokat és hasonlósági küszöbértékeket.

Megbecsülhetjük egy-egy élőhely sokféleségét, vagyis diverzitását. Ennek első szintje, hogy a vizsgált élőhelyeken előforduló fajok számát becsüljük. Egyszerűen megadhatjuk a

kimutatott fajok számát (sobs; species observed), ez azonban nem veszi figyelembe azt, hogy a taxonok mintavételezése megfelelő mélységben megtörtént-e a vizsgálatunk során; más szavakkal, elegendő genotípust meghatároztunk-e ahhoz, hogy minden egyes fajt „megtaláljunk”. Vegyünk egy példát! Egy tó vizében 100-200 különböző baktériumfaj fordul elő, természetesen van olyan közülük, ami jelentős közösségalkotó (néhány %-át alkotja a teljes prokarióta közösségnek), míg mások csak elenyésző mennyiségben fordulnak elő (néhány tized vagy század százalékban). Könnyű belátni, hogy az ilyen alacsony sejt-számban előforduló közösségalkotók detektálásához több ezer (de inkább több tízezer) közösségi DNS molekula szekvenciájának meghatározására van szükség. Azt, hogy a vizsgálatunk mennyire fedte le a közösségben található taxonokat, az ún. fajtelítődési görbével érzékeltethetjük (83. ábra). Ha a fajtelítődési görbe eléri a plató fázist, akkor minden fajt kimutattunk a vizsgált mintában. Ez azonban csak a legritkább esetekben fordul elő, de a valós fajszámot a görbe lefutásának segítségével becsülhetjük. A mikrobiális ökológiában legelterjedtebben használt fajszámbecslő indexek a Chao1 (az indexet megalkotó kutató nevéből) és ACE (abundance-based coverage estimator, mennyiség-alapú telítődés becslő) indexek.



83. ábra Fajtelítődési görbe egy NGS elemzés esetén

A további indexek már nem csak a kimutatott fajok számát, hanem azok mennyiségi viszonyait is figyelembe veszik. (A szövegben fajokat említünk, de ugyanúgy használhatóak az indexek OTU-k alkalmazása esetén is.) Ezek közül hármat mutatunk be, a Shannon, a Simpson és az inverz Simpson indexet.

A Shannon-index képlete a következő: $-\sum p_i \ln(p_i)$, ahol p_i az adott faj részaránya az összes fajhoz képest. Értéke 0-tól (csak egy faj van a mintában) egészen magas értékekig (ha sok faj van, de mindegyik aránya alacsony a közösségben) változhat. Két tulajdonságát emeli ki az irodalom. Egyrészt a logaritmikus transzformáció következtében nagyobb súlyt ad a ritkább fajoknak, mint a gyakoriaknak. Másrészt értékét nehéz valamihez viszonyítani, hiszen nincsen felső határa.

A Simpson-index képlete a következő: $1/\sum(p_i)^2$, ahol p_i az egyes fajok részaránya a mintákban. Értéke 0 (csak egy faj van a mintában) és 1 (minden faj egyenlő arányban fordul elő a mintában) közé esik. Ez az index, szemben a Shannon-indexszel pont a domináns fajoknak ad nagyobb súlyt.

Inverz Simpson index: $1/(\sum(p_i)^2)$, ahol p_i az egyes fajok részaránya a mintákban. Népszerűségét annak köszönheti, hogy értékét könnyebb biológiailag értelmezni. Értéke azt

mutatja meg, hogy hány fajt találnánk az adott mintában, ha minden faj egyenlő arányban fordulna elő a mintában. Vagyis az index maximum értéke a mintában található fajok száma.

156. GYAKORLAT

Fajszámbecslés és diverzitási indexek számolása taxonösszetétel vagy ujjlenyomat-mintázat alapján

A vizsgálat tárgya

Mikrobiológiai minták adathalmaza

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

Környezeti minták fajlistája (klóntár- vagy NGS elemzés alapján)

Környezeti minták ujjlenyomat mintázata alapján készített OTU-abundancia táblázat

számítógép telepített Excel és statisztikai (pl.: Past 3) programmal

A vizsgálat menete

1. A gyakorlat során környezeti minták fajszámait becsüljük, diverzitási indexeit számoljuk ki és hasonlítjuk össze.

2. Ehhez a korábban létrehozott fajlistákat (7.1.2.3 fejezet klóntár és 7.1.2.4 fejezet NGS elemzés) vagy ujjlenyomatmintázat elemzések alapján létrehozott adatmátrixokat (7.1.2.2 fejezet PCR alapú ujjlenyomat technikák) Excel program segítségével rendezzük táblázatos formába. Másoljuk ki a táblázatot.

3. Indítsuk el a Past 3 programot, a táblázat rész felett kattintsunk az „Row attributes” és „Column attributes” négyzetekre, majd a táblázat A1 cellájától eggyel balra és fentebb elhelyezkedő cellájára kattintás után illesszük be az Excel táblázatot, végül kattintsunk újra az „Row attributes” és „Column attributes” négyzetekre. Ezzel bevittük az adatokat a Past programba.

4. A teljes táblázat kijelölésével végezzük el a fajszámbecslést és diverzitási indexek kiszámolását (Felső menü: Diversity>Diversity indices), valamint készítsük el a fajtelítődési görbét (Felső menü: Diversity>Individual rarefaction)!

12.4 Filogenetikai elemzések

A bakteriális taxonómia esetében a vizsgált organizmus sejtjeiből, és más, ismert szervezetekből (itt a típusörzsek szerepe nélkülözhetetlen) származó DNS-ből (vagy RNS-ből) kell rendszertani szempontból értékelhető információt kapnunk, majd ezeket összehasonlítva értékelnünk, hogy az adott törzsek mennyire hasonlítanak egymásra.

Ez az információ lehet genom-szintű és egyes génekre vonatkozó. Az előbbi csoportba tartozó módszerek 1) a genom G+C tartalmának meghatározása, 2) a DNS-DNS hibridizálás 3) a ribotipizálás 4) és egyéb, specifikus amplikon-mintázatot vagy hasítási mintázatot adó módszerek. Egyes génekről részleges vagy teljes bázissorrendjük meghatározásával vagy a sokszorozott génszakasz restriktív hasításával kaphatunk információt. Valamennyi esetben a törzsek egymás közti hasonlósága számszerűen (%-ban) megadható.

A ma elfogadott bakteriális fajdefiníció mindkét megközelítést tartalmazza, hiszen két törzs akkor tekinthető azonos fajhoz tartozónak, ha a teljes genomjuk DNS-DNS hibridizációs értéke a 70%-ot, a 16S rRNS génjük bázissorrendjének hasonlósága a 97%-ot meghaladja. (Bár kivételek több baktériumcsoportban is vannak.)

Több világméretű **online adatbázist** is létrehoztak arra a célra, hogy az összes, eddig meghatározott bázissorrendet összegyűjtsék és kereshető formában a kutatók rendelkezésére bocsássák. Ezek legismertebb és legnépszerűbb képviselője az GenBank/EMBL/DDBJ rendszer, ami ugyanannak az adatbázisnak három (amerikai, európai és japán), egymást frissítő másolata.

Az rRNS unikális szerepe és speciális szerkezete miatt több, ezekre a génekre optimalizált adatbázis és keresőprogram is létezik, a legismertebb az EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) és az ARB-Silva adatbázisa (<http://www.arb-silva.de>).

Napjainkban az újgenerációs DNS-szekvenálási technikák előretörésének köszönhetően egyre több teljes genom kerül meghatározásra, amik új lehetőségeket nyitottak a bakteriális taxonómia területén is (sok gén összehasonlításán alapuló filogenetikai elemzések, teljes genomok összehasonlítása stb.).

12.4.1 Illesztés, rokonok keresése, filogenetikai fák szerkesztése

A filogenetikai viszonyok tisztázásához nélkülözhetetlen az adott génen belül a homológ pozíciók összerendezése, vagyis a szekvencia „illesztése” (lásd 157. GYAKORLAT). Ez alapján történhet a közeli rokonok keresése, a hasonlóság megállapítása. Általában az online adatbázisok saját illesztő-kereső szoftverrel rendelkeznek. Ezek sebessége és precizitása sajnos fordítottan arányos. A BLAST algoritmus gyors, és „univerzális” módszer, vagyis valamennyi szervezet valamennyi génjét kereshetjük vele. Az EzTaxon honlapon lehetőség van arra, hogy a BLAST algoritmussal csak az elfogadott fajok típusörzseinek szekvenciái között keressünk.

Különleges és nagyon hasznos az ARB-Silva speciális adatbázisa, amiben csak a riboszóma kis- és nagy alegységének (vagyis 16/18S illetve 23/28S) rRNS génjei között kereshetünk. Ez egy illesztett adatbázis, aminek létrehozása során figyelembe vették az rRNS-ek sajátos másodlagos szerkezetét, a konzervatív/variábilis régióinak helyzetét, így a legpontosabb illesztést ennek használatával kaphatjuk. Alkalmas mindhárom domén filogenetikai elemzésére.

Az illesztett bázissorrendek már alkalmasak filogenetikai elemzésre. Ennek során páronként összehasonlítjuk a bázissorrendeket, az eltérésekből kiszámoljuk a közöttük lévő távolságot. Ezeket az értékeket egy mátrixban összesítjük, majd e távolságokat 2D-s gráffá alakítjuk, vagyis filogenetikai fát szerkesztünk. A gyakorlat során a MEGA szoftvercsomagot használjuk erre a célra.

157. GYAKORLAT

DNS bázissorrendek illesztése és keresése NCBI-BLAST segítségével

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

parciális DNS bázissorrendek illesztése és a teljes bázissorrend összehasonlítása az NCBI nukleotid adatbázisával BLAST algoritmus segítségével.

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

összetartozó, átfedő DNS bázissorrend leolvasások (Fasta formátumban)
számítógép internet hozzáféréssel
MEGA 6 szoftver

A vizsgálat menete

1. A MEGA program megnyitása
2. Új illesztés indítása:
Align -> Edit/Build alignment -> Create a new alignment -> DNA
3. DNS bázissorrend leolvasások importálása:
Edit -> Insert sequence from file
4. Az esetlegesen reverz primerrel meghatározott DNS szakaszok átfordítása:
Data -> Reverse Complement
5. Az első szakasz vége felé jelöljük ki egy kb. 10 bp hosszú szakaszt, majd kerestessük meg ezt a motívumot a másik DNS bázissorrend leolvasáson:
Search -> Find motif

6. Amennyiben csak egy helyen találta meg ezt a motívumot a program a második leolvasáson, akkor ennél a pontnál kijelöléssel és copy/paste parancsokkal másoljuk egybe a két DNS bázissorrend leolvasást.

7. A teljesebb leolvasást nevezzük el (baloldali oszlopban megfelelő sorra dupla kattintás)

8. A teljesebb leolvasást kijelölve küldjük be az NCBI Blast keresőoldalra:

Web -> Do BLAST search

9. Az ekkor megnyíló BLAST ablakban a „Choose Search Set” fül alatt a „Database” sorban válasszuk ki az „Others” opciót, majd nyomjuk meg a BLAST ikont

10. A megnyíló ablakban megtekinthetjük az általunk vizsgált DNS bázissorrendhez leginkább illeszkedő nyilvános DNS szakaszt, ezek származását, annotációját, taxonómiai besorolását, publikációs információkat.

158. GYAKORLAT

DNS bázissorrend leolvasások *in silico* hasítása

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismert DNS bázissorrend leolvasások terminális restrikciós fragmentum hosszának meghatározása adott primer, illetve restrikciós enzim alkalmazásával

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

DNS bázissorrend (amely tartalmaz egy ismert bázissorrendű primer kötőhelyet)

primer bázissorrendje

számítógép

MEGA 6 szoftver

A vizsgálat menete

1. A MEGA program megnyitása

2. Új illesztés indítása:

Align -> Edit/Build alignment -> Create a new alignment -> DNA

3. DNS bázissorrend leolvasások importálása:

Edit -> Insert sequence from file

4. Az esetlegesen reverz primerrel meghatározott DNS szakaszok átfordítása:

Data -> Reverse Complement

5. Keressük meg a primer helyét a leolvasáson:

Search -> Find motif

6. Töröljük a primerkötőhelytől balra (5' irányba eső) nukleotidokat

7. Keressük meg egy restrikciós endonukleáz hasítóhelyét a DNS szakasz bázissorrendjében: Search -> Find motif (*Bsu*RI: GG↓CC, *Alu*I: AG↓CT)

8. A hasítóhely bal oldalán levő nukleotidra ráállva olvassuk le annak számát a képernyő bal alsó sarkában „Site #”. Így megkapjuk az adott primerrel és restrikciós enzimmel előállítható terminális restrikciós fragmentum elméleti hosszát.

A filogenetikai fa különböző taxonok közötti evolúciós (leszármazási) viszonyok megjelenítésére szolgáló, elágazásokat tartalmazó ábra. Az összehasonlítás alapulhat fizikai jellemzőkön (pl. méretadatok) vagy genetikai távolságokon (pl. nukleotid sorrend). Természetesen nagyon fontos ismernünk azt, hogy az adott jellemzők, karakterek egyáltalán rendelkeznek-e evolúciós tartalommal, azaz felhasználhatók-e ilyen vizsgálatokhoz.

12. táblázat A filogenetikai fák szerkesztésénél használt ismertebb DNS helyettesítési modellek és faépítési módszerek

Név	Jellemző
<i>DNS helyettesítési modellek</i>	
p-távolság	a különböző nukleotidok arányát fejezi ki (különböző nukleotid/összes nukleotid)
Jukes-Cantor	minden hely és nukleotid azonos sebességgel változhat, egyenlő nukleotid gyakoriságokat feltételez (0,25) az evolúciós folyamat végére
Tajima-Nei	a nukleotid gyakoriságok nem egyenletes voltára korrigál
Kimura 2-parameter	tranzíciók és transzverziók eltérő gyakoriságának figyelembe vétele
Tamura 3-parameter	tranzíció és transzverzió, GC-tartalom figyelembe vétele
<i>Távolság alapú faépítési módszerek</i>	
Neighbor Joining (NJ)	egy csillag alakú fából kiindulva a legközelebbi szomszédokat összekapcsolja, helyettesíti őket az átlagukkal, ezt ismételteti a teljes fa kialakulásáig
Minimum Evolution (ME)	a legrövidebb olyan fát találja meg, amely összeegyeztethető a szekvenciák közötti távolságokkal (a fa ágainak hosszával), az ághosszak összegének minimumára törekszik
<i>Karakter alapú faépítési módszerek</i>	
Maximum Parsimony (MP) (legnagyobb takarékoság)	olyan fát épít, ami a lehető legkevesebb mutációs eseménnyel magyarázza meg a meglévő szekvenciák létrejöttét, a szubsztitúciók számának minimumára törekszik
Maximum Likelihood (ML) (legnagyobb valószínűség)	minden pozícióra kiszámítja, hogy adott fa és helyettesítési modell mellett mi a valószínűsége annak, hogy a megfigyelt mintázat jöjjön létre az adott pozícióban (az egyes pozíciókra kapott valószínűségek összeszorzásával adódik a teljes fa valószínűsége); igen számításigényes, de ez a legmegbízhatóbb

A fehérjék és **nukleinsavak összehasonlításán alapuló filogenetikai fák szerkesztésének** négy fő lépése van:

(1) *A DNS szakaszok illesztése* során olyan elrendezést keresünk, amely megmutatja, hogy a szekvenciák hol hasonlítanak, és hol különböznek. Az illesztéseket különböző helyettesítési mátrixok alkalmazásával számszerűsíthetjük, amelyek pl. az eltéréseket, egyezéseket, a kémiai szerkezet hasonlóságait/különbözőségeit eltérő súlyozással veszik figyelembe. Így az illeszkedések jósága számértékkel jellemezhető. Az eltérésekhez hasonlóan pontlevonással büntethetjük a hézagokat és azok hosszát.

(2) *A filogenetikai szignál meglétének becslése:* a két szélsőséges esetben minden szekvencia egyforma, illetve annyira eltérők, hogy filogenetikai szempontból véletlenszerűnek tekinthetők.

(3) *A helyettesítési modell megválasztásával* az evolúciós változások és távolságok becsülhetők, illetve számszerűsíthetők. Nagyon sok ilyen modell létezik, néhány példát DNS esetében a 12. táblázat tartalmaz.

(4) A *faépítés*nek két fő típusa különíthető el, a távolság alapú és a karakter alapú módszerek. Az előbbi a szekvenciák közötti páronkénti hasonlóságok becslése után már csak ezekkel az értékekkel dolgozik tovább, míg a karakter alapú módszereknél a szekvencia összes pozícióját figyelembe veszik a faépítés során. Néhány ismertebb módszert a 12. táblázat tartalmaz. A fák megjelenítésének is több módja lehet. Ismeretesek gyökér nélküli és gyökeres fák, ez utóbbinál külső csoport alkalmazásával a leszármazási viszonyokról pontosabb kép alkotható, hiszen a vizsgált csoport közös ősének helyét is megadja. Kladoqramról beszélünk, ha a fa csak az elágazási sorrendet ábrázolja, míg a filogram e mellett az ághosszakat is mutatja, így két taxon evolúciós távolsága arányos az őket összekapcsoló ágak hosszának összegével.

(5) A *kapott fa kiértékelése* során megbecsüljük a kapott topológia (elágazási sorrend) megbízhatóságát statisztikai módszerekkel. Legismertebb formája a bootstrap teszt: a többszörös szekvencia illesztéssel véletlenszerű, visszatevéses mintavételezést végzünk az egyes pozíciókra (így ugyanannyi oszlop marad, de némelyek többször szerepelnek, míg mások egyszer sem); több ilyen mesterségesen generált szekvencia adatsorra is készítünk fát az adott módszerrel; vizsgáljuk, hogy az egyes ágak/ágcsoportok a bootstrap-fák hány százalékában jelennek meg (>95%, az adott belső ág statisztikailag szignifikáns, >70%, „elfogadható” elágazás, nagyon alacsony értéknél célszerű többszörös elágazásként ábrázolni).

Az egyes lépések megvalósítására számos algoritmust és programot kifejlesztettek (lásd 159. GYAKORLAT). Az ilyen programok közé tartozik a MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) nevű, filogenetikai elemzések elvégzésére alkalmas program, amely több segédprogram behívására képes az egyes funkciók elvégzése érdekében (pl. a többszörös szekvencia illesztésekhez a Clustal W használható, az adatbázisokkal való összevetéshez az NCBI Blast felületét hívja be). A MEGA mellett a másik elterjedten használt filogenetikai elemző program a PAUP*.

159. GYAKORLAT

Filogenetikai fa szerkesztése MEGA 7 programmal

A vizsgálat tárgya, a vizsgált mikroorganizmus

ismeretlen baktériumtörzsek filogenetikai viszonyai

A vizsgálatához szükséges anyagok és eszközök

számítógép telepített MEGA 7 programmal
internet hozzáférés

A vizsgálat menete

1. Nyissuk meg a MEGA 7 programot.
2. Nyissunk meg egy új illesztési ablakot (az „Align” legördülő ablakra kattintva, „Edit/Build Alignment”, majd válasszuk az előreugró ablakban a „Create a new alignment” opciót, a következő előreugró ablaknál pedig a „DNA” opciót). Megnyílik az „Alignment Explorer” ablak.
3. Hívjuk be az elemezni kívánt DNS leolvasásokat (az „Edit” menüpontra kattintva, az „Insert Sequence From File”-t választva). Az egyes bázissorrendek átnevezhetőek az egér jobb gombjával a DNS leolvasás nevére kattintva és itt az „Edit Sequence Name” opciót választva.
4. Az egyes DNS leolvasások legközelebbi rokonait behívhatjuk az NCBI adatbázisból (kijelölése után a „Web” menüben a „Do BLAST Search”-re kattintva; a BLAST keresést lásd 157. GYAKORLAT; a kívánt DNS rekord hozzáadható az illesztéshez a MEGA előreugró ablakjából az „Add to Alignment” opcióra kattintva; a név az ekkor előreugró ablakban vagy az előző pontban megadott módon módosítható).
5. Végezzük el a többszörös illesztést: jelöljük ki az összes DNS leolvasást

(„Edit”/”Select all”), majd válasszuk az „Alignment” menüpontból a „Align by ClustalW” opciót (tartsuk meg a program által javasolt beállításokat).

6. Mentsük el az illesztett leolvasásokat tartalmazó fájlt („Data”/”Save Session”).

7. Válasszuk ki a „Data” menüpontból a „Phylogenetic analysis” opciót.

8. Lépünk át az „Alignment Explorer” ablakból a MEGA központi ablakába (kattintás az egér bal gombjával).

9. Válasszuk ki a „Phylogeny” legördülő ablakban a megfelelő faépítési módszert. Az előreugró ablakban állítsuk be az adott elemzésnek megfelelő paramétereket a gyakorlatvezető útmutatásainak megfelelően. A számolási idő elteltét követően megjelenik a „Tree Explorer” ablak a filogenetikai fával.

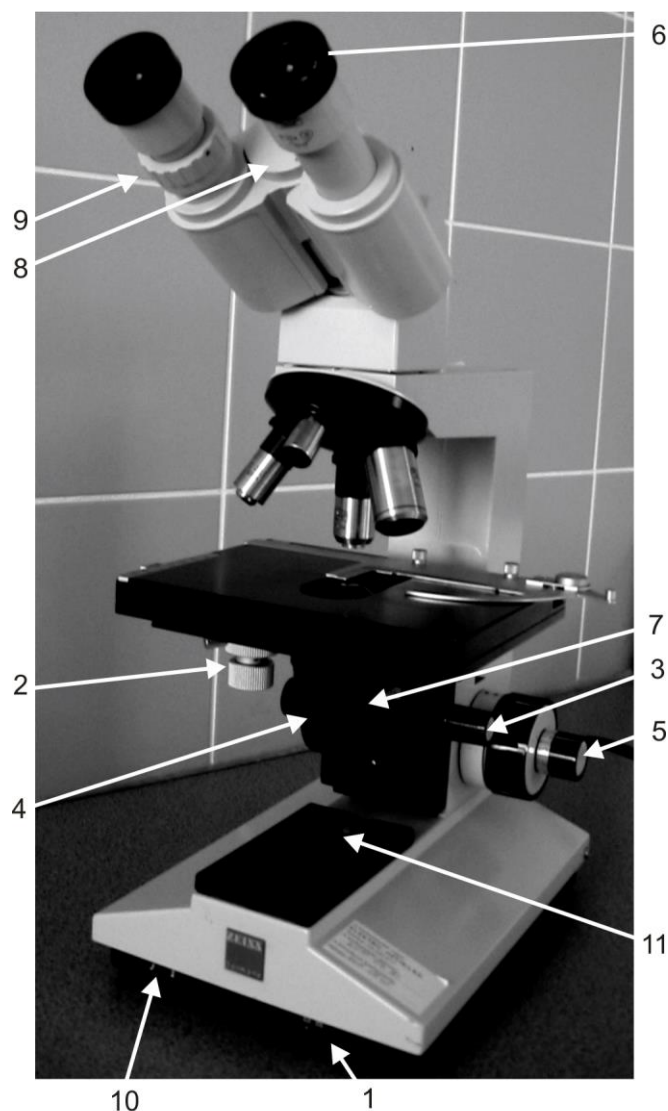
10. Mentsük el a kapott fát („File”/”Save Current Tree Session”). Igény szerint különböző képformátumokban, illetve pdf-ben is elmenthetjük a fát („Image” menü megfelelő opciója).

13 FÜGGELÉK

13.1 A Laboval 4 típusú mikroszkópok használata áteső fényben történő, világos látóterű megfigyeléseknél

1. A mikroszkópról vegyük le a porvédő polietilénsákokat majd a statívnál megfogva óvatosan vegyük ki a szekrényből és a tárgyasztallal magunk felé fordítva állítsuk a laborasztalra. Csatlakoztassuk az elektromos hálózatra (védőföldeléssel ellátott 220 V háztartási dugaszoló aljzatba).

2. Az 1. kapcsoló benyomásával kapcsoljuk be a világítást. Helyezzünk a tárgyasztalra egy preparátumot és az asztal megfelelő mozgatásával (2. gombok) válasszuk ki a preparátum vizsgálni kívánt területét. Forgassuk a 10x objektívet a fény útjába és a kondenzor rendszert a 3. gomb segítségével állítsuk a felső ütközési pontra.



Laboval4 típusú mikroszkóp

1. kapcsoló, 2. tárgyasztal mozgató gombok, 3. kondenzor állító csavar, 4. nagylátóteres lencse, 5. durva és finom élességállító csavar, 6. okulár, 7. apertúra rekesz, 8. binokuláris tubus pupillatávolság állítási lehetőséggel, 9. dioptria gyűrű, 10. fényerő-szabályozó, 11. szűrtartó

3. A 4. nagylátóteres lencsét fordítsuk a fény útjába és az 5. durva és finombeállítókkal keressük meg a tárgysíkot, állítsuk élesre a tárgyat. A 4. lencsét forgassuk ki a fény útjából, és váltsunk át a 40x objektívre. Az egyik okulárt (6.) vegyük ki a tubusból és az apertúra blendét (7.) nyissuk ki teljesen. A kondenzort mindaddig süllyesszük (3. gomb), mígnem a hátsó objektívlencse optimálisan megvilágított lesz, vagyis területének fele, maximum kétharmada kivilágított. Az okulárt helyezzük vissza a tubusba.

4. Az apertúrablendét (7.) az egyes nagyításoknál a megfelelő kontraszt, illetve élességi mélység elérésére mindig állítsuk be. Igazítsuk a szemtávolságot a binokuláris tubus (8.) mozgatásával a nekünk megfelelő értékre. Ezután a dioptria gyűrű segítségével (9.) korrigáljuk a két szemünk között esetleg fennálló fókusz távolság különbséget.

5. A fényintenzitás a fényerő-szabályozóval (10.) is változtatható, vagy pedig szürke szűrők alkalmazásával módosítható (11. szűrőtartó). A fényerő-szabályozó normál állásában a 6. értéken van. Kisnagyítású objektíveknel (3,2x, 10x) a teljes látómező kivilágítására fordítsuk a fény útjába a 4. nagylátóteres lencsét.

6. A 100x objektív használatánál cseppentsünk a tárgy megvilágított részére immerziós olajat. A durva hajtóművel (5.) maximálisan közelítsük meg az immerziós lencsével a tárgyat, miközben oldalról figyeljük a preparátum és az objektív távolságát. Ezután a mikroszkópba betekintve, az objektívet a mikrocsavar segítségével emelve, állítsuk élesre a tárgy képét. Használat után az immerziós lencsét benzinnel megnedvesített vászonronggyal tisztítsuk le.

7. A mikroszkópokat gyakorlat végén mindig a helyére kell tenni, a porvédő huzattal letakarni és a mikroszkópszekrényeket bezárva a kulcsot a gyakorlatvezetőnek leadni!

13.2 A mikrobiológiai laboratóriumi gyakorlatok során használt táptalajok

Ammónia tartalmú tápleves

(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0	g
MgSO ₄ x H ₂ O	0,5	g
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,03	g
NaCl	0,3	g
MgCO ₃	10,0	g
K ₂ HPO ₄	1,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,0

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Benzil-viologén agar

Tris(hidroximetil)-aminometán	1,2	g
Benzil-viologén (1,1'-dibenzil-4,4'-bipiridinium diklorid)	0,1	g
Agar	18,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,0

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

BHB (Bushnell Haas Broth) tápleves

MgSO ₄ x H ₂ O	0,2	g
CaCl ₂	0,02	g
KH ₂ PO ₄	1,0	g
K ₂ HPO ₄	1,0	g
NH ₄ NO ₃	1,0	g
FeCl ₃	0,05	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,0

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

BPL (Brillant-green Phenol-red Lactose) tápagar

Pepton	7,0	g
NaCl	5,0	g
Laktóz	15,0	g
Fenolvörös	0,04	g
Brillantzöld	0,005	g
Agar	18,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 6,5

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Brolacin tápagar

Pepton	7,0	g
Élesztőkivonat	2,0	g
Húskivonat	2,0	g
Laktóz	10,0	g
Cisztin	0,128	g
Brómtimolkék	0,03	g
Agar	18,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,0-7,3

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Cellulóz tartalmú dúsító tápleves

Cellulóz	10,0	g
Élesztőkivonat	0,1	g
NH ₄ Cl	0,5	g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,5	g
KH ₂ PO ₄	0,5	g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5	g
NaCl	4,0	g
Nyomelem oldat	1,0	ml

pH: 7,0

Sterilizálás autoklávban: 115 °C, 15 perc

Nyomelem oldat

CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,64	g
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,11	g
MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,79	g
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,15	g
Desztillált víz	100,0	ml

Citromsav termeltető tápleves

Glükóz	140,0	g
NH ₄ NO ₃	2,5	g
KH ₂ PO ₄	2,5	g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	2,5	g
Nyomelem oldat	1,0	ml
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 3,8

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Nyomelem oldat

CuSO ₄	0,006	g
-------------------	-------	---

ZnSO ₄	2,5	g
FeSO ₄	0,13	g
MnSO ₄	0,1	g
Desztillált víz	100,0	ml

Czapek tápagar

Szacharóz	30,0	g
NaNO ₃	3,0	g
K ₂ HPO ₄	1,0	g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5	g
KCl	0,5	g
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,01	g
Élesztőkivonat	2,0	g
Pepton	5,0	g
Agar	15,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,0

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

DNS tartalmú tápagar

DNS	2,0	g
Glükóz	5,0	g
Kazamínosav	5,0	g
K ₂ HPO ₄	5,0	g
NaCl	2,0	g
FeSO ₄	0,05	g
MgSO ₄	0,5	g
Agar	18,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,0-7,2

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

DRCM tápleves

Húskivonat	8,0	g
Pepton	5,0	g
Kazein	5,0	g
Élesztőkivonat	1,0	g
Glükóz	1,0	g
Keményítő	1,0	g
Na-biszulfít	0,5	g
Ammónium-vas(III)-citrát	0,5	g
Na-acetát	5,0	g
Ciszteín-HCl	0,5	g
Resazurin	2,0	mg
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 6,9-7,3

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Endo tápagar

Laktóz	13,0	g
Pepton	10,0	g
K ₂ HPO ₄	3,5	g
Na ₂ O ₃	2,5	g
Bázikus fukszin	0,4	g
Agar	18,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,0-7,2

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Eozin-metilénkék tápagar

Pepton	10,0	g
Laktóz	10,0	g
K ₂ HPO ₄	2,0	g
Eozin	0,4	g
Metilénkék	0,065	g
Agar	18,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,0

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Eszkulin tápleves

Eszkulin	1,0	g
Fe(III)-citrát	0,5	g
Peptonvíz	1000,0	ml

pH: 7,2-7,4

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Félszilárd magas húspepton tápagar

Húskivonat	3,0	g
Pepton	5,0	g
Agar	3,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,2-7,4

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Gázolaj tartalmú dúsító tápleves

Gázolaj	10,0	g
NH ₄ Cl	0,5	g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,5	g
KH ₂ PO ₄	0,5	g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5	g
NaCl	4,0	g
Nyomelem oldat	1,0	ml

pH: 7,0

Sterilizálás autoklávban: 115 °C, 15 perc

Nyomelem oldat

CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,64	g
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,11	g
MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,79	g
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,15	g
Desztillált víz	100,0	ml

Glükóz tápleves

Glükóz	150,0	g
NH ₄ NO ₃	2,5	g
KH ₂ PO ₄	5,62	g
KH ₂ PO ₄	2,13	g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	2,5	g
Nyomelem oldat	1,0	ml
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 3,8

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Nyomelem oldat

CuSO ₄	0,006	g
ZnSO ₄	2,5	g
FeSO ₄	0,13	g
MnSO ₄	0,1	g
Desztillált víz	100,0	ml

HgCl₂ tartalmú dúsító tápleves

Pepton	5,0	g
Glükóz	0,5	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1	g
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,1	g
HgCl ₂	2,0	mg
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,0

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Hugh-Leifson félszilárd magasagar

Pepton	2,0	g
NaCl	5,0	g
K ₂ HPO ₄	0,3	g
Agar	3,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,1

Brómtimolkék 0,2%-os vizes oldata 15,0 ml

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Az 50 °C-ra hűtött, sterilizált alaptáptalajhoz adjunk szűrővel sterilizált glükózoldatot 1%-os végkoncentrációban.

Húspepton tápagar

Húskivonat	3,0	g
Pepton	5,0	g
Agar	18,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,2-7,4

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Húspepton tápleves

Húskivonat	3,0	g
Pepton	5,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,2-7,4

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Keményítő-kazein tápagar

Keményítő (vízoldható)	10,0	g
Kazein (0,1 N NaOH-ban feloldva)	1,0	g
K ₂ HPO ₄	0,5	g
Agar	18,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,2-7,4

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Keményítő tápagar

Keményítő (vízoldható)	10,0	g
Desztillált víz	50,0	ml

Oldjuk fel a keményítőt a desztillált vízben, majd adjuk hozzá a húspepton tápagarhoz.

Húspepton tápagar 950,0 ml

pH: 7,2-7,4

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

LB-Ampicillin táptalaj

Tripton	10,0	g
Élesztőkivonat	5,0	g
NaCl	5,0	ml
Agar	15,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,0

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc. A tápleves kb. 50 °C-ra történő lehűlése után adjunk hozzá 1 ml 0,1g/ml koncentrációjú ampicillin oldatot (vizes oldat), majd ezt követően öntsük meg a lemezeket

LMX tápleves

Triptóz	5,0	g
NaCl	5,0	g
Szorbitol	1,0	g
Triptofán	1,0	g
K ₂ HPO ₄	2,7	g
KH ₂ PO ₄	2,0	g
Na-lauril-szulfát	0,1	g
1-izopropil-β-D-1-tio-galactopiranozid (IPTG)	0,1	g
5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galactopiranozid (X-GAL)	0,08	g
4-metilumbelliferil-β-D-glukuronid	0,05	g
Desztillált víz	1000,0	mL

pH: 6.8

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Maláta tápagar

Maláta kivonat	50,0	g
Agar	18,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 5,6

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Metilénkék tápleves

Tripton	5,0	g
Húskivonat	3,0	g
Metilénkék 0,1%-os vizes oldata	6,6	ml
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,0

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

MRS tápagar

Húskivonat	9,0	g
Pepton kazeinből	10,0	g
Élesztőkivonat	4,0	g
D-glükóz	20,0	g
K ₂ HPO ₄	2,0	g
Tween80	1,0	g
Diammónium-hidrogén-citrát	2,0	g
Nátrium-acetát	5,0	g
MgSO ₄	0,2	g
MnSO ₄	0,04	g
Agar	18,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 5,7

Sterilizálás autoklávban: 115 °C, 15 perc

MR-VP (güköz-foszfát) tápleves

Pepton	5,0	g
K ₂ HPO ₄	5,0	g
Glükóz	5,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,5

Sterilizálás autoklávban: 115 °C, 15 perc

Na-fenoltalein-difoszfát tartalmú tápagar

Na-fenoltalein-difoszfát 1%-os vizes oldata	10,0	ml
Húspepton tápagar	1000,0	ml

Az 50 °C-ra hűtött steril húspepton tápagarhoz aszeptikus körülmények között adjuk hozzá a szűrővel sterilizált és hűtve (4 °C-on) tárolt fenoltalein-foszfát oldatot.

Na-tioglikolát tartalmú magasagar

Húskivonat	1,0	g
Élesztőkivonat	2,0	g
Pepton	5,0	g
Glükóz	5,0	g
NaCl	5,0	g
Na-tioglikolát	1,1	g
Agar	1,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,2

Metilénkék 0,02%-os vizes oldata 10,0 ml

Sterilizálás autoklávban: 115 °C, 15 perc

Nitrát tartalmú tápleves

KNO ₃	1,0	g
Húspepton tápleves	1000,0	ml

pH: 7,2-7,4

Az üres kémcsövekbe a tápleves bemérése előtt tegyünk Durham csöveket (fordított helyzetben, nyílásukkal lefelé).

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Nitrit tartalmú tápleves

NaNO ₂	1,0	g
MgSO ₄ x H ₂ O	0,5	g
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,03	g
NaCl	0,3	g
Na ₂ CO ₃	1,0	g
K ₂ HPO ₄	1,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,2-7,4

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Peptonvíz tápleves

Pepton	1,0	g
NaCl	5,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,2-7,4

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Pepton-só oldat

Pepton	1,0	g
NaCl	8,5	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,0-7,1

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

PMB (Postgate's Medium B) tápleves

Na-laktát	3,5	g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	2,0	g
NH ₄ Cl	1,0	g
CaSO ₄	1,0	g
Élesztőkivonat	1,0	g
KH ₂ PO ₄	0,5	g
dH ₂ O	1000,0	ml

pH: 7,0-7,5

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Vas-szulfát oldat

FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,5	g
dH ₂ O	10,0	ml

Reduktáns oldat

Na-tioglikolát	0,1	g
Aszkorbinsav	0,1	g
dH ₂ O	10,0	ml

A vas-szulfát oldat és a reduktáns oldat hőre és oxidációra érzékeny, ezért anaerob rendszerben készítjük el, majd szűrővel sterilizáljuk (0,22 µm pórusátmérő). Az alaptápleveshez annak kb. 50 °C történt lehűlését követően adjuk hozzá ezeket az oldatokat.

Rich tápagar

Pepton	10,0	g
Élesztőkivonat	5,0	g
Kazamínosav	5,0	g
Húskivonat	2,0	g
Malátakivonat	5,0	g
Glicerin	2,0	g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,0	g
Tween80	0,05	g
Agar	18,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,2

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Rich tápleves

Pepton	10,0	g
Élesztőkivonat	5,0	g
Kazamínosav	5,0	g
Húskivonat	2,0	g
Malátakivonat	5,0	g
Glicerin	2,0	g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,0	g
Tween80	0,05	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,2

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

RMAC (Reinforced Medium for Alkalophilic Clostridia) tápagar

Pepton	10,0	g
Kazein	10,0	g
NaCl	5,0	g
Húskivonat	3,0	g
Élesztőkivonat	1,5	g
Keményítő	1,0	g
Cisztein	1,0	g
Tris puffer	1,0	g
Na ₂ SO ₃	0,4	g
Fe-citrát	0,7	g
Agar	5,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,3-7,7

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Sabouraud glükóz tápagar

Pepton kazeinből	10,0	g
Glükóz	40,0	g
Agar	5,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 5,6

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Szita-féle E67 tápagar

Húspepton tápagar	1000,0	ml
Glükóz	10,0	g
Na-taurokolát	0,5	g
Kristályibolya 1%-os vizes oldata	0,4	ml

pH: 7,0

Az alaptáptalajt áramló gőzben 30 percig sterilizáljuk.

K-tellurit 1%-os vizes oldata 5,0 ml

Az 50 °C-ra hűtött steril alap tápagarhoz aseptikus körülmények között adjuk hozzá a K-tellurit oldatot.

SOC tápleves

Tripton	2,0	g
Élesztőkivonat	0,5	g
1 M NaCl oldat	1,0	ml
1 M KCl oldat	0,25	ml
2 M Mg-oldat	1,0	ml
2 M glükóz oldat	1,0	ml
ddH ₂ O	97,0	ml

pH: 7,0

Sterilizálás szűréssel (0,22 µm pórusátmérő)

MgCl ₂ x 6 H ₂ O	20,33	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	24,65	g
ddH ₂ O	100,0	ml

Sterilizálás szűréssel (0,22 µm pórusátmérő)

Tejagar

Homogénezett, pasztörizált tej	500,0	ml
Húspepton agar (kétszeres erősségű)	500,0	ml

pH: 7,2-7,4

Sterilizálás autoklávban: 115 °C, 15 perc

Tejporos tejagar

D-glükóz	1,0	g
Élesztőkivonat	2,5	g
Tripton	5,0	g
Sovány tejpor	1,0	g
Agar	18,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 6,9

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Tioglikolát tápleves

Pepton	15,0	g
--------	------	---

Élesztőkivonat	5,0	g
NaCl	5,0	g
Tioglikolsav	1,0	g
Glükóz	5,0	g
Agar	1,0	g
Metilénkék 1%-os vizes oldata	0,2	ml
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,2

Sterilizálás autoklávban: 115 °C, 15 perc

TS tápagar

Kazein hidrolizátum (pankreász)	14,5	g
Szója hidrolizátum (papainos)	5,0	g
NaCl	5,0	g
Növekedési faktorok	1,5	g
Agar	18,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,0-7,2

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

TS (Tryptone Soya Broth) tápleves

Pepton kazeinből	17,0	g
Pepton szójából	3,0	g
Glükóz	2,5	g
NaCl	5,0	g
K ₂ HPO ₄	2,5	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,0-7,3

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

TSI (Triple Sugar Iron) tápagar

Húskivonat	3,0	g
Élesztőkivonat	3,0	g
Pepton	20,0	g
Glükóz	1,0	g
Laktóz	10,0	g
Szacharóz	10,0	g
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,2	g
NaCl	5,0	g
Na ₂ S ₂ O ₃ x 5H ₂ O	0,3	g
Agar	20,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml
Fenolvörös 0,2%-os vizes oldata	12,0	ml

pH: 7,0

Sterilizálás autoklávban: 115 °C, 15 perc

Tween80 tartalmú tápagar

Pepton	10,0	g
CaCl ₂	0,1	g
NaCl	5,0	g
Tween80	10,0	ml
Agar	18,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,0-7,4

Sterilizálás autoklávban: 115 °C, 15 perc

Urea tápleves

Pepton	1,0	g
Glükóz	1,0	g
NaCl	5,0	g
KH ₂ PO ₄	2,0	g
Fenolvörös	0,12	g
Desztillált víz	900,0	ml

pH: 6,8

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Karbamid 40%-os vizes oldata	100,0	ml
------------------------------	-------	----

Az 50 °C-ra hűtött steril tápleveshez aszeptikus körülmények között adjuk hozzá a szűrővel sterilizált karbamid oldatot.

Véres tápagar

Húspepton tápagar	950,0	ml
Defibrinált steril marhavér vagy birkavér	50,0	ml

Az 50 °C-ra hűtött steril húspepton tápagarhoz aszeptikus körülmények között adjuk hozzá a vért.

VRBG (Violet Red Bile Glucose) tápagar

Pepton	7,0	g
Élesztőkivonat	3,0	g
NaCl	5,0	g
D-glükóz	10,0	g
Epésókeverék	1,5	g
Neutrálvörös	0,03	g
Kristályibolya	0,002	g
Agar	13,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,3

Sterilizálás: forrásig melegítés sűrű kevergetés mellett, míg teljesen fel nem oldódnak a komponensek. Ezután már 2 percnél tovább nem szabad forralni.

Wilson-Blair-féle bizmut-szulfid tápagar

Pepton	8,0	g
Glükóz	10,0	g
FeSO ₄	0,3	g
Brillantzöld	0,016	g
Bizmut-szulfid	26,0	g
Agar	18,0	g
Desztillált víz	1000,0	ml

pH: 7,3

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Zselatin tartalmú tápagar

Zselatin	4,0	g
Desztillált víz	50,0	ml

Áztassuk a zselatint a vízben, és ha teljesen meglágyult adjuk hozzá az olvasztott húspepton tápagarhoz.

Húspepton tápagar	950,0	ml
-------------------	-------	----

pH: 7,2-7,4

Sterilizálás autoklávban: 115 °C, 15 perc

13.3 A laboratóriumi gyakorlatok során használt festékek

Gram-féle jóddoldat

Jód	1,0	g
KJ	2,0	g
Desztillált víz	300,0	ml

Karbolos fukszin festékoldat

Bázikus fukszin	1,0	g
Etanol (95%-os)	10,0	ml
Fenol 5%-os vizes oldata	100,0	ml

Krizoidin festékoldat

Krizoidin-Y 1%-os vizes oldata	33,3	ml
Desztillált víz	100,0	ml

Kristályibolya festékoldat

A oldat:		
Kristályibolya	10,0	g
Etanol (95%-os)	100,0	ml

B oldat:
Ammónium-oxalát 1%-os vizes oldata

Az alkotók oldódása után keverjük össze 20 ml A oldatot 80 ml B oldattal.

Malachitzöld festékoldat

Malachitzöld	5,0	g
Desztillált víz	100,0	ml

Metilénkék festékoldat

Metilénkék	0,3	g
Etanol (96%-os)	30,0	ml
Desztillált víz	1000,0	ml

Neisser festékelegy

Ecetsavas metilénkék oldat

Metilénkék	0,1	g
Jégecet	5,0	ml
Etanol (96%-os)	5,0	ml
Desztillált víz	1000,0	ml

Kristályibolya oldat

Kristályibolya 10%-os oldata 96%-os etanolban	3,3	ml
Etanol (96%-os)	6,7	ml
Desztillált víz	100,0	ml

A festékelegy 2 rész ecetsavas metilénkék oldat és 1 rész kristályibolya festékoldat keveréke.

Ryu festékoldat

A oldat

Csersav	10,0	g
Fenol 5%-os vizes oldata	50,0	ml
AlK(SO ₄) ₂ x 12H ₂ O telített oldata	50,0	ml

B oldat

Kristályibolya	12,0	g
Etanol	100,0	g

A festékoldat 10 rész A oldat és 1 rész B oldat keveréke. Felhasználás előtt hagyjuk állni 2-3 napig.

Savas etanol

HCl (cc.)	3,0	ml
Etanol (95%-os)	97,0	ml

Szafranin festékoldat

Szafranin	1,0	g
Desztillált víz	100,0	ml

Szudán-fekete B festékoldat

Szudán-fekete B	0,3	g
Etanol (70%-os)	100,0	ml

13.4 A laboratóriumi gyakorlatok során használt oldatok, anyagkeverékek és reagensek

Barritt reagens

A oldat

α -naftol	6,0	g
Etanol (96%-os)	94,0	ml

B oldat

KOH	16,0	g
Desztillált víz	84,0	ml

1%-os DNSA reagens

3,5-dinitroszalícilsav	5	g
K-Na-tartarát	150	g
KOH-NaOH oldat: 9,6 g NaOH, 13,44 g KOH, 60 ml ddH ₂ O	50	ml
ddH ₂ O	450	ml

Fenolftalein 1,0 %-os (m/V) alkoholos oldata

Fenolftalein	1,00	g
Absz. etanol	100,00	ml

Formaldehid 3,2%-os oldata pH 7-es 0,2 M kakodilátpufferben (10 ml)

Formaldehid oldat (37%-os)	0,86	ml
Kakodilátpuffer (0,2 M)	5,0	ml
Desztillált víz	4,14	ml

Formvar 0,3%-os (m/V) kloroformos oldata

Formvar	0,3	g
Kloroform	100,0	ml

Foszfor-volframát 1%-os (m/V) vizes oldata (pH 7,0)

Foszfor-volfrámsav	1,0	g
Desztillált víz	100,0	ml

pH 7 beállítása 0,1 M NaOH vagy KOH odattal

Glutáraldehid 2,5%-os oldata pH 7-es 0,2 M-os kakodilátpufferben (10 ml)

Glutáraldehid oldat (25%-os)	1,0	ml
Kakodilátpuffer (0,2 M)	5,0	ml
Desztillált víz	4,0	ml

Glutáraldehid 5%-os oldata pH 7-es 0,2 M-os Na-K

foszfátpufferben (10 ml)

Glutáraldehid oldat (25%-os)	2,0	ml
Na-K foszfátpuffer (0,2 M)	5,0	ml
Desztillált víz	3,0	ml

Griess-Ilosvay reagens*Reagens 1*

Szulfanilsav	8,0	g
5 M esetsav oldat	1000,0	ml

Reagens 2

α -naftilamin	5,0	g
5 M esetsav oldat	1000,0	ml

IPTG 50 mg/ml oldata

IPTG	1,2	g
ddH ₂ O	2,0	ml

Sterilizálás szűréssel (0,22 μ m pórusátmérő)

Kakodilátpuffer 0,2 M-os oldata (pH 7)

A. 0,2 M kakodilát törzsoldat:

Na(CH ₃) ₂ AsO ₂ x 3H ₂ O	42,8	g
Desztillált víz	1000,0	ml

B. 0,2 M HCl törzsoldat:

HCl oldat (36-38%-os)	10,0	g
Desztillált víz	603,0	ml

A pH 7-es 0,2 M Na-kakodilátpuffert úgy kapjuk meg, hogy 50 ml-nyi **A** oldatot és 6,3 ml-nyi **B** oldatot keverünk össze és kiegészítjük a térfogatát 100 ml-re desztillált vízzel, vagy 1:1 arányban hígítjuk a kívánt fixálóval.

Kálium-ferricianid 10%-os (m/V) oldata

Kálium-ferricianid	10,0	g
ddH ₂ O	100,0	ml

Kálium-ferrocianid 1%-os (m/V) oldata

Kálium-ferrocianid	1,0	g
1 M sósav oldat	100,0	ml

Kovács reagens

<i>para</i> -dimetil-amino-benzaldehid	5,0	g
Butanol	75,0	ml
Sósav, koncentrált, p.a.	25,0	ml

Lugol oldat

Jód, p.a.	5,0	g
KI, p.a.	10,0	g
Desztillált víz	100,0	ml

Metilénkék 1%-os (m/V) vizes oldata

Metilénkék	1,0	g
Desztillált víz	100,0	ml

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Metilvörös oldat

Metilvörös	0,1	g
Etanol (96%-os)	300,0	ml
Desztillált víz	200,0	ml

Na-acetát puffer (pH 4,6)

Na-acetát	24,6	g
ddH ₂ O	100,0	ml

pH beállítása 1 M HCl oldattal. Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Na-K foszfátpuffer 0,2 M-os oldata (pH 7)

A oldat összetétele:

KH ₂ PO ₄	2,72	g
Desztillált víz	100,00	ml

B oldat összetétele:

Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	3,56	g
Desztillált víz	100,00	ml

A pH 7-es 0,2 M-os 50 ml Na-K foszfátpuffert úgy kapjuk meg, hogy 19,5 ml-nyi **A** oldatot és 30,5 ml-nyi **B** oldatot keverünk össze.

Na-K foszfátpuffer 0,1 M-os oldata (pH 7)

0,2 M Na-K foszfátpuffert (pH 7) desztillált vízzel felére hígítjuk

NaOH 50%-os (m/m) vizes oldata

NaOH	100,00	g
Desztillált víz	100,00	ml

Nessler reagens

KI	8,0	g
HgCl ₂	11,5	g
6 M NaOH oldat	50,0	ml
ddH ₂ O	50,0	ml

Oldjuk fel a reagenseket 20 ml vízben, majd adjuk hozzá a maradék vizet. Adjuk hozzá a NaOH oldatot és hagyjuk állni 24 órán át. Ezt követően a felülúszót mérjük át egy tiszta üvegbe.

PBS puffer

10× töménységű oldat készítése:

KCl	2,00	g
Na ₂ HPO ₄	11,50	g
KH ₂ PO ₄	2,00	g
ddH ₂ O	1000,00	ml

Sterilizálás szűrővel (0,22 µm pórusátmérő)

1× töménységű munkaoldat készítése:

10×PBS	100,00	ml
NaCl	8,00	g
ddH ₂ O	900,00	ml

Sterilizálás szűrővel (0,22 µm pórusátmérő)

Rezaurin 0,05%-os (m/V) vizes oldata

Rezaurin	0,05	g
Desztillált víz	100,00	ml

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Rezaurin 1%-os (m/V) vizes oldata

Rezaurin	1,00	g
Desztillált víz	100,00	ml

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Sósavas higanyklorid oldat

HgCl ₂	15,0	g
Sósav, koncentrált	20,0	ml
Desztillált víz	100,0	ml

1×TBE oldat (pH: 8,3)

Trizma bázis	10,78	g
Bórsav	5,5	g
EDTA	0,74	g
ddH ₂ O	800	ml

Ellenőrizzük a puffer pH-ját, majd egészítsük ki az oldat térfogatát 1 l-re ddH₂O-val.

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

Töltőpuffer agaróz gélelektroforézishez

Glicerín (87%)	57,5	ml
1 M-os Bromofenol kék oldat	25,0	µl
1 M-os Xilén cianol oldat	25,0	µl
ddH ₂ O	32,5	ml

1 M-os TRIS (tris-hidroximetil-aminometán) puffer (pH 8,0)

Trizma bázis	121,1	g
ddH ₂ O	800	ml
HCl (cc.)	42,2	mL

Ellenőrizzük a puffer pH-ját, majd egészítsük ki az oldat térfogatát 1 l-re ddH₂O-val.

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc

TTC 1%-os (m/V) oldata 96%-os etanolban

TTC	0,05	g
Etanol (96%-os)	5,00	ml

Vazpar

vazelin és paraffin 1 : 1 arányú keveréke

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc, kevés víz hozzáadásával. Forrón alkalmazzuk, mert elválik dermedéskor az üvegfelszíntől, és nem zár rendesen.

X-Gal oldat

5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid	0,10	g
N,N'-dimetil-formamid	2,00	ml

Zselatinos foszfátpuffer

NaCl	8,00	g
KCl	0,20	g

Na ₂ HPO ₄	1,15	g
KH ₂ PO ₄	0,20	g
Zselatin	0,40	g
Desztillált víz	1000,0	ml
pH: 7,2		

Sterilizálás autoklávban: 121 °C, 15 perc.

13.5 Kemotaxonómiai vizsgálatokhoz szolgáló futtató elegyek és reagensek

DAP futtató elegy

Metanol	80	ml
Desztillált víz	26	ml
6 M sósav	4	ml
Piridin	10	ml

Teljes sejt cukormeghatározáshoz futtató elegy

n-butanol	40	ml
Desztillált víz	24	ml
Piridin	24	ml
Toluol	4	ml

Kinonok vékonyréteg kromatográfiás meghatározáshoz futtató elegy

Hexán	110	ml
Dietiléter	20	ml

Poláris lipidek extrakciós elegye

Kloroform	50	ml
Metanol	100	ml
0,3 m/V %-os NaCl oldat	40	ml

Környezeti mintákhoz alkalmazott reakcióelegy

Metanol	100	ml
KOH	1,12	g

Zsírsav extrakció reagensei

1. szaponifikációs reagens

NaOH (at.)	45	g
metanol (at.)	150	ml
bdH ₂ O	150	ml

2. metiláló reagens

6N HCl-oldat	325	ml
metanol (at.)	275	ml

3. extrakciós reagens

hexán (HPLC minőségű)	200	ml
terc-metil-butil éter (HPLC minőségű)	200	ml

4. bázikus mosófolyadék

NaOH (at.)	10,8	g
bdH ₂ O	900	ml

GC analízis körülményei membrán zsírsavak kimutatása során: splitless injektálás. Alkalmazott oszlop: kapilláris oszlopot (SPB-1, 30x32mm id.), hőmérséklet: 150°C-250°C ig 4 °C/perc sebességgel emelve, vivőgáz: hélium, 150°C-on. Detektor típusa: FID, 280°C.

Volatilis végtermék analízis

Kromatográfias körülmények:

Oszlop típusa: 19001c-003
6 ft 10% FFAP
1% H₃PO₄ töltött oszlop

Detektor típusa: FID (Flame ionisation detector)

Oszlop hőmérséklete: 145 °C
Injektor hőmérséklete: 180 °C
Detektor hőmérséklete: 190 °C

Standard

100 ml desztillált vízben:

hangyasav (50%)	0,114ml
ecetsav (96%)	0,037ml
propionsav	0,075ml
izovajsav	0,092ml
vajsav	0,091ml
valeriánsav	0,109ml
izovaleriánsav	0,109ml

13.6 A laboratóriumi gyakorlatok során alkalmazott mérési módszerek

13.6.1 A McCrady féle karakterisztikus szám meghatározása

McCrady féle karakterisztikus táblázat, melynek segítségével ki lehet számolni a legvalószínűbb élő csíraszámot a növekedést mutató pozitív csövek számából MPN módszer alkalmazásával.

A karakterisztikus számot az utolsó három, még növekedést mutató hígítási tagból képezzük:

Minta	Hígítási foka	Egyes hígítási tagokban lévő pozitív minták száma						Karakterisztikus szám
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	
A		5	5	4	3	1	0	431
B		5	4	0	0	0	0	540
C		5	4	3	2	2	1	221

A baktériumok száma MPN/ml (vagy MPN/g) értékben olvasható le (ha 5 párhuzamos leoltást készítünk, és 10-es hígítási sorozatot alkalmazunk). Ez a számérték megadja, hogy a karakterisztikus szám első számértékéhez tartozó mintában mennyi baktérium található.

Karakterisztikus szám MPN/ml				Karakterisztikus szám MPN/ml				Karakterisztikus szám MPN/ml			
0	0	0	<1.8	3	0	2	13	4	5	1	48
0	0	1	1.8	3	1	0	11	5	0	0	23
0	1	0	1.8	3	1	1	14	5	0	1	31
0	1	1	3.6	3	1	2	17	5	0	2	43
0	2	0	3.7	3	2	0	14	5	0	3	58
0	2	1	5.5	3	2	1	17	5	1	0	33
0	3	0	5.6	3	2	2	20	5	1	1	46
1	0	0	2.0	3	3	0	17	5	1	2	63
1	0	1	4.0	3	3	1	21	5	1	3	84
1	0	2	6.0	3	3	2	24	5	2	0	49
1	1	0	4.0	3	4	0	21	5	2	1	70
1	1	1	6.1	3	4	1	24	5	2	2	94
1	1	2	8.1	3	5	0	25	5	2	3	120
1	2	0	6.1	4	0	0	13	5	2	4	150
1	2	1	8.2	4	0	1	17	5	3	0	79
1	3	0	8.3	4	0	2	21	5	3	1	110
1	3	1	10	4	0	3	25	5	3	2	140
1	4	0	11	4	1	0	17	5	3	3	180
2	0	0	4.5	4	1	1	21	5	3	4	210
2	0	1	6.8	4	1	2	26	5	4	0	130
2	0	2	9.1	4	1	3	31	5	4	1	170
2	1	0	6.8	4	2	0	22	5	4	2	220
2	1	1	9.2	4	2	1	26	5	4	3	280

2	1	2	12	4	2	2	32	5	4	4	350
2	2	0	9.3	4	2	3	38	5	4	5	430
2	2	1	12	4	3	0	27	5	5	0	240
2	2	2	14	4	3	1	33	5	5	1	350
2	3	0	12	4	3	2	39	5	5	2	540
2	3	1	14	4	4	0	34	5	5	3	920
2	4	0	15	4	4	1	40	5	5	4	1600
3	0	0	7.8	4	4	2	47	5	5	5	>1600
3	0	1	11	4	5	0	41				

13.6.2 Fenol-index meghatározása spektrofotometriás módszerrel

A fenolindex azokra a fenolvegyületekre vonatkozik, amelyek 4-amino-antipirinnel – meghatározott körülmények között – színes vegyületeket képeznek. A meghatározás megkezdése előtt a fenolvegyületeket desztillációval választjuk el a szennyeződésektől és a tartósítás során alkalmazott vegyszerektől.

Reagensek:

- alfa-amino-antipirin 2 g / 100 ml töménységű desztillált vizes oldata
- kálium-hexaciano-ferrát 8 g / 100 ml töménységű desztillált vizes oldata
- NH₄Cl-NH₄OH pufferoldat (67,5 g ammónium-kloridhoz 570 ml 25%-os ammónia-oldatot adunk, majd ezt feltöltjük desztillált vízzel 1000 ml-re, 10,2-10,5 pH)

Minta összetétele:

- 10,0 ml vízminta (eredeti v. desztillált vízzel ismert mértékben hígított) .
- 0,5 ml pufferoldat (c. reagens)
- 0,2 ml antipirin oldat (a. reagens)
- 0,2 ml hexaciano-ferrát oldat (b. reagens)

A puffer és az egyes reagensek hozzáadása után a mintát homogenizáljuk! 15 perc állásidő után végezzük el az abszorbancia mérést 510 nm-en, reagens vak mintával szemben Hach DR/2000 típusú spektrofotométerrel.

Fontos: színes oldatok esetén a pufferoldat hozzáadása után is mérjük le 510 nm-en az abszorbanciát (vak minta ez esetben: desztillált víz+pufferoldat) és ezzel az értékkel korrigáljuk a két reagenssel mért abszorbanciát.

A fenolindexmeghatározáshoz szükséges kalibráló görbe elkészítéséhez alkalmazott oldatok

Törzsoldat I.: Analitikai pontossággal mérő lombikba mérünk 1 g analitikai tisztaságú fenolt (a fenolból enyhe melegítéssel folyékony fenolt öntünk ki kis pohárba, ezt desztillált vízzel oldjuk és bemossuk mérőlombikba), majd desztillált vízzel egy literre jelíg töltjük. Koncentrációja: 1000 mg/l fenol.

Alkalmazható hígítások a százszorosára hígított, 10 mg/l fenol koncentrációjú **II. törzsoldatból:**

10,0 ml össztérfogatra desztillált vízzel feltöltve:

- 1 ml törzsoldat II. (1 mg/l)
- 2 ml törzsoldat II. (2 mg/l)
- 4 ml törzsoldat II. (4 mg/l)
- 5 ml törzsoldat II. (5 mg/l)
- 7 ml törzsoldat II. (7 mg/l)
- 10 ml törzsoldat II. (10 mg/l).

13.6.3 A triklóretén és bomlástermékei koncentrációjának meghatározása gázkromatográfias módszerrel

Az összeállított mikrokozmoszokban zajló biodegradációs folyamatokat a triklóretén és bomlástermékei koncentrációjának változásán keresztül gázkromatográfias mérésrel követjük. A módszer alkalmas a metán, az etén, a vinil-klorid, a cisz- és transz-diklóretén, valamint a triklóretén elválasztására.

1. A méréseket HP 5890 típusú, lángionizációs detektorral és HP-PLOT/Q típusú kapilláris oszloppal felszerelt gázkromatográfival végezzük.
2. Vivőgázként 5.0-ás tisztaságú héliumot alkalmazunk.
3. Az injektálás 1:20 split arány mellett történik.
4. Az alkalmazandó hőmérsékleti program jellemzői: 2 perc 60°C-on, majd felfűtés 250°C-ra 25°C/perc sebességgel, végül 2 perc 250°C-on.
5. A mikrokozmoszok (mérendő minták és kalibrációs céllal összeállított standardok) gőzteréből minden alkalommal 100 µl mintát veszünk és injektálunk a készülékbe Hamilton-fecskendővel.
6. A triklóretén és bomlástermékei koncentrációját a mikrokozmoszokkal megegyező fázisarányokkal összeállított és azokkal azonosan kezelt standard oldatok felhasználásával létrejött kalibráló oldatsorozatra kapott eredmények alapján határozzuk meg.

13.6.4 Anaerob mikrokozmoszokban keletkező metán koncentrációjának meghatározása gázkromatográfival

1. A méréseket HP 5890 típusú, lángionizációs detektorral és HP-PLOT/Q típusú kapilláris oszloppal felszerelt gázkromatográfival végezzük.
2. Vivőgázként 5.0-ás tisztaságú héliumot alkalmazunk.
3. Az injektálás 1:20 split arány mellett történik.
4. Az alkalmazandó hőmérsékleti program: 3 perc 60°C-on.
5. A mikrokozmoszok gőzteréből minden alkalommal 100 µl mintát veszünk és injektálunk a készülékbe Hamilton-fecskendővel.
6. A metán koncentrációját kereskedelmi forgalomban kapható, ismert térfogatszázalékos összetételű gázstandard (Scotty Analyzed Gases 4*) segítségével határozzuk meg: egy teflondugóval és alumíniumkupakkal lezárt üveget teljes térfogatában feltöltünk a gázstandarddal. A lezárt üvegből Hamilton-fecskendő segítségével 25, 50 és 100 µl mintát veszünk és injektálunk a készülékbe. Az így elkészített kalibráció alapján kiszámítjuk a mikrokozmoszok gőzterében lévő metán koncentrációját.

*A gázstandard összetétele: összetevői: 1% acetilén, 1% szén-dioxid, 1% szén-monoxid, 1% etán, 1% etén és 1% metán nitrogénben.

13.6.5 A hazai gyakorlatban a különféle vizek vízminősítése a-klorofill tartalom alapján
Az állóvizek fitoplankton a-klorofill határértékei ($\mu\text{g L}^{-1}$) az egyes minőségi osztályokban

Típusok	Klorofill metrika kódja	kiváló	jó	mérsékelt	gyenge	rossz
Balaton (1. biológiai típus)	Chl ₁	11	23	35	50	> 50
Egyéb sekély tavak (2., 3., 4., 5., 8. biológiai típusok)	Chl ₂	18	40	75	100	> 100
Mély tavak (6., 7. biológiai típusok) (bányatavak)	Chl ₃	8	15	30	50	> 50

A vízfolyások fitoplankton a-klorofill határértékei ($\mu\text{g L}^{-1}$) az egyes minőségi osztályokban

Típuscsoportok és biológiai típusok*	kiváló	jó	közepes	gyenge	rossz
1. Típuscsoport (1/2/3/5)	2,7	5,6	10,5	15,5	> 15,5
2. Típuscsoport (4)	5,9	10,0	18,3	27,6	> 27,6
3. Típuscsoport (6/7)	4,2	8,7	18,5	28,0	> 28,0
4. Típuscsoport (8)	6,0	10,0	18,0	28,0	> 28,0
5. Típuscsoport (9/10)	15,0	30,0	45,0	60,0	> 60,0

* Magyarország felszíni vizeit abiotikus változók alapján különböző típusokba soroljuk (pl. hegyvidéki vízfolyások, síkvidéki vízfolyások, szerves talajon átfolyó folyók, szikes tavak stb.). Majd pedig ezeket az abiotikus típusokat az élőlényegyüttesek összetétele alapján biológiai típusoknak feleltetjük meg. Ennek a megfeleltetésnek a során jönnek létre ezek a típuscsoportok. Bővebb információ a <http://www.vizeink.hu/> weboldalon és Borics & Kiss (2015) Módszertani útmutatójában található.

A természetes fürdővíz vízminőségi követelményei

	kiváló minőség	jó minőség	tűrhető minőség
a-klorofill ($\mu\text{g L}^{-1}$) cianobaktérium dominancia esetén	10	25	50

13.7

A mikrobiológiai vizsgálólaboratóriumokban alkalmazott szabványokban szereplő leggyakoribb rövidítések és az akkreditációs eljárással kapcsolatos szervezetek elérhetősége

ISO:	International Organization for Standardization
IEC:	International Electrotechnical Commission
ILAC:	International Laboratory Accreditation Cooperation
EA:	European co-operation for Accreditation
IAF:	International Accreditation Forum
NAT:	Nemzeti Akkreditáló Testület
NAR:	Nemzeti Akkreditálási Rendszer
SZAB:	Szakmai Akkreditáló Bizottság
MSZT:	Magyar Szabványügyi Testület
MMT:	Magyar Minőség Társaság
EOQ MNB:	European Organization for Quality Magyar Nemzeti Bizottság
KES:	Kórházi ellátási standard

Nemzeti Akkreditáló Hatóság	www.nah.gov.hu
Magyar Szabványügyi Testület	www.mszt.hu
International Organization for Standardization	www.iso.com

14 IRODALOMJEGYZÉK

- Ács, É., Kiss, K.T. (szerk.) 2004. Algalógiai praktikum. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest. (ISBN: 963-463-658-6)
- Atlas, R.M. 1996. Principles of Microbiology, 2nd revised edition, Mosby College
- Atlas, R.M. 2010. Handbook of Microbiological Media, 4th edition, CRC Press, New York
- Barrow, G.I., Feltham, R.K.A. (eds.) 2003. Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge University Press (ISBN: 0-521-54328-2).
- Bernolák, K., Szabó, D., Szilas, L. 1979. A mikroszkóp zsebkönyv. Műszaki Könyvkiadó, Budapest. (ISBN: 963-10-2455-5)
- Blodgett, R.J. 2005. Serial dilution with a confirmation step. Food Microbiology 22: 547-552.
- Borics, G., Kiss, K.T. 2015. Módszertani útmutató a Fitoplakton élőlénycsoport VKI szerinti gyűjtéséhez és feldolgozásához. - kézirat, pp. 21.
- Borsodi, A., Márialigeti, K. 2015. Mire képesek a baktériumok? A prokarióták világáról tanároknak. ELTE TTK BI Mikrobiológiai Tanszék, Budapest
- Coenye, T., Spilker, T., Martin, A., LiPuma, J., J. 2002. Comparative assessment of genotyping methods for epidemiologic study of *Burkholderia cepacia* genomovar III. J. Clin. Microbiol. 40, 3300-3307.
- Deák, T. 2006. Élelmiszer-mikrobiológia. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. (ISBN: 963-286-300-3)
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H., Stackebrandt, E. (eds) 2006. The Prokaryotes, 3rd edition, Springer, New York
- Euzéby, J.P. 2010. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. URL: www.bacterio.net
- Felföldi, T., Somogyi, B., Vörös, L., Márialigeti, K. 2009. A fotoszintetikus gének szerepe a pikoalgák molekuláris azonosításában és diverzitásuk vizsgálatában. Hidrológiai Közöny 89: 105-109.
- Fleming, O.D., Hunt, D.L. 2006. Biological Safety: Principles and Practices, 4th edition, ASM Press
- Garrity, G.M. (Editor-in-chief) 2001-2012. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition, Springer, New York
- Garrity, G.M. 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two: The Proteobacteria, Part A Introductory Essays, 2nd edition, Springer, New York
- Garrity, G.M., Boone, D.R., Castenholz, R.W. 2001. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume One: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria, 2nd edition, Springer, New York
- Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.R. 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria, 2nd edition, Springer, New York
- Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two: The Proteobacteria (Part C), 2nd edition, Springer, New York
- Gergely, L. 1999. Orvosi mikrobiológia. Semmelweis Kiadó, Budapest. (ISBN: 963-8154-93-4)
- Glick, B.R., Pasternak, J.J., Patten, C.L. 2010. Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA, 4th edition, ASM Press
- Harley, J.P., Harley, J. 2004. Laboratory Exercises in Microbiology, 6th edition, McGraw-Hill
- Kiss, K.T. 1998. Bevezetés az algológiába. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest. (ISBN: 9634631681)

- Krieg, N.R., Ludwig, W., Whitman, W.B., Hedlund, B.P., Paster, B.J., Staley, J.T., Ward, N., Brown, D., Parte, A. 2010. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 4: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes*, 2nd edition, Springer, New York
- Legendre, P., Legendre, L. 1998. *Numerical ecology*, 2nd English edition, Elsevier, Amsterdam
- Lepš, J., Šmilauer, P. 2003. *Multivariate analysis of ecological data using CANOCO™*, Cambridge University Press, Cambridge
- Li, Y., Dick, W.A., Tuovinen, O.H. 2004. Fluorescence microscopy for visualization of soil microorganisms – a review. *Biol. Fertil. Soils* 39: 301-311.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D., Clark, D.P. 2010. *Brock Biology of Microorganisms*, 13th edition, Benjamin/Cummings Pub Co
- Magyar Élelmiszerkönyv (Codex Alimentarius Hungaricus) 2003. A nyers- és a hőkezelt tej vizsgálati módszerei (3-1-91/180 számú előírás)
- Molnár, L., Gábrriel, R. 2001. *Fény- és elektronmikroszkópos mikrotechnika*. Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs. (ISBN: 963-9123-24-2)
- Pechó, Z., Milassin, M. 1999. *Tájékoztató a fertőtlenítésről. A betegellátásban és a járványügyi gyakorlatban alkalmazható fertőtlenítő eljárások*. Johan Béla Országos Epidemiológia Központ kiadványa, Budapest.
- Pechó, Z., Milassin, M. 1999. *Tájékoztató a sterilizálásról. A betegellátásban alkalmazható sterilizáló eljárások*. Johan Béla Országos Epidemiológia Központ kiadványa, Budapest.
- Podani, J. 2000. *Introduction to the exploration of multivariate biological data*, Backhuys, Leiden
- Pollack, R.A., Findlay, L., Mondschein, W., Modesto, R.R. 2005. *Laboratory exercises in microbiology*. John Wiley & Sons, Inc. (ISBN: 0-471-42082-4)
- Pozsgai, I. 1995. *A pásztázó elektronmikroszkópia és az elektronsugaras mikroanalízisek alapjai*. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest. (ISBN: 963-463-000-6)
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A. 2002. *Microbiology*. The McGraw-Hill Companies, Inc., North America. (ISBN-13: 978-0072320411)
- Sambrook, J., Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Schaechter, M. (Editor-in-chief) 2009. *Encyclopedia of Microbiology*, 3rd edition, Elsevier Inc
- Singleton, P., Sainsbury, D. 2006. *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, 3rd edition, Wiley
- Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B. 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 3: The Firmicutes*, 2nd edition, Springer, New York
- Whitman, W.B., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M.E., Ludwig, W., Suzuki, K.-i., Parte, A. 2012. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 5: The Actinobacteria*, 2nd edition, Springer, New York
- Willey, J.M., Sherwood, L.M., Woolverton, C.J. 2011. *Prescott's Microbiology*, 8th edition, The McGraw-Hill Companies

15 GYAKORLATOK JEGYZÉKE

Mintafeldolgozás a laboratóriumba érkezéstől az eredmények kiadásáig	26
Egy szabványos módszer áttekintése és alkalmazása.....	26
Autokláv (gyógyszertári sterilizáló) üzemeltetése	29
Gőzsterilizátorok (autoklávok) mikrobiológiai ellenőrzése <i>Geobacillus stearothermophilus</i> spórapreparátum túlélési próbájával.....	34
Fertőtlenítőszer mikrobiológiai hatásosságának meghatározása	34
Laboratóriumi levegő mikrobiológiai vizsgálata szedimentációs módszerrel	36
Laboratóriumi levegő mikrobiológiai vizsgálata MAS -100 készülékkel	37
Laboratóriumi levegő mikrobiológiai vizsgálata AES Sample Air-MK2 készülékkel.....	37
Laboratóriumi levegő mikrobiológiai vizsgálata RCS Plus készülékkel.....	38
Talaj mintavétel mikrobiológiai vizsgálatokhoz	39
Vízmintavétel mikrobiológiai vizsgálatokhoz	40
Mintavétel felületekről mikrobiológiai vizsgálatokhoz	41
Mintavétel személyi tisztaság ellenőrzésére I.	43
Mintavétel személyi tisztaság ellenőrzésére II.	43
Természetes vizek mikrobaközösségének mikroszkópos vizsgálata áteső fényben	45
Gridék hártázása formvarral	50
Baktériumok morfológiájának vizsgálata TEM negatív festési eljárással	52
TEM preparátum készítése kovaalga vizsgálatok céljából.....	53
Baktériumtenyészetek pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálata	56
Pásztázó elektronmikroszkópos preparátum készítése kovaalga vizsgálat céljából	57
<i>Aspergillus niger</i> spóraszuszpenzió koncentrációjának meghatározása Bürker-kamrás sejtszámlálással	59
DAPI festésen alapuló mikroszkópos sejtszám meghatározás.....	60
Pikoalgák sejtszámának meghatározása epifluoreszcens mikroszkóppal	62
Algaszámlálás Utermöhl-féle módszerrel (algaminták mennyiségi vizsgálata I.).....	64
Környezeti minták heterotróf csíraszámának becslése szélesztéses technikával	67
Környezeti minták heterotróf csíraszámának becslése lemezöntéses technikával.....	68
Membránszűrése alapuló csíraszámbecslés.....	68
Mezofil (szulfitredukáló) anaerob spórás baktériumok (vegetatív és spórás alak) számának meghatározása MPN-módszerrel	71
Vízminta mikrobiális biomassza becslése sejtszám alapján.....	72

Vízminta mikrobiális biomassza becslése ATP-tartalom meghatározás alapján	73
Kemotaxonómiai markerek kinyerése és frakcionálása környezeti mintákból	74
Környezeti minták biomasszájának becslése foszfolipid foszfát alapon.....	75
Térfogatmérésen alapuló biomassza becslés (algaminták mennyiségi vizsgálata)	76
Savanyú káposzta laboratóriumi előállítása	77
Kenderáztatás – pektináztermelő anaerob rothasztó baktériumok kimutatása.....	78
Lágyrothasztó baktérium hatásának tesztelése	79
Mikrobiológiai ferde tápagar készítése	81
Mikrobiológiai tápagar lemez készítése	82
Rétegzett tápagar lemez készítése	83
Táptalaj készítése automata készülékkel	85
Dúsító tenyészetek létrehozása, majd tenyésztés szelektív táptalajon	86
Winogradsky-oszlop készítése fototróf baktériumok dúsítására.....	86
Környezetünkben lévő mikroorganizmusok kimutatása szélesztéssel	88
Izolátum létrehozása ferde tápagaron.....	89
Tiszta tenyészetek létrehozása kevert tenyészetből.....	91
<i>Clostridium</i> ok tenyésztése anaerob tenyésztőedényben.....	94
Anaerob tenyésztés nátrium-tioglikolát tartalmú „magasagarban”	95
Anaerob baktériumok tenyésztése Marino-lemezen	96
Baktériumtenyészetek fenntartása átoltással	98
Baktériumtenyészetek fenntartása liofilizálással.....	99
Klórozott szénhidrogénekkal szennyezett talajvíz biodegradációjának tesztelése 100 ml-es anaerob mikrokozmoszban.....	101
Telepmorfológiai megfigyelések.....	102
Egyszerű festés	104
Gram-festés	107
Ziehl-Neelsen-féle saválló festés	108
Schaeffer-Fulton-féle spórafestés.....	110
Leifson-féle tokfestés	111
Poli- β -hidroxivajsav szemcsék kimutatása	112
Neisser-féle festés polifoszfát szemcsék kimutatására.....	113
Csillófestés Ryu-festékoldattal.....	114
Mozgásképeség vizsgálata függőcsepp preparátum segítségével.....	115
Paránytenyészetek készítése.....	117

Japán Gram-próba	118
Növekedés és pigmentképzés ISP tápagar lemezekon	119
Növekedés képessége szintetikus tápközegen.....	119
Kataláz teszt	120
Oxidáz teszt.....	120
Metilénkék redukció vizsgálata.....	121
Kazeáz aktivitás kimutatása	122
Zselatináz aktivitás kimutatása.....	122
Keményítő hidrolízis vizsgálata	123
Lipolitikus aktivitás vizsgálata.....	123
Nukleáz aktivitás kimutatása.....	124
Hugh-Leifson teszt	124
Metilvörös és Voges-Proskauer reakció.....	125
Eszkulin hidrolízis vizsgálata.....	126
Kénhidrogén termelés vizsgálata	127
Indol képzés kimutatása	127
Foszfátáz aktivitás vizsgálata	128
Hemolízis kimutatása	128
Politróp táptalaj alkalmazása a baktérium diagnosztikában.....	129
Baktériumok szaporodása eltérő hőmérsékleti feltételek között.....	130
A baktériumok hőtűrésének vizsgálata.....	131
A pH hatása a mikroorganizmusok szaporodására.....	132
Vízaktivitás hatása a mikrobák szaporodására.....	133
Az UV sugárzás hatása baktériumok szaporodására.....	134
Tojás lizozim tartalmának meghatározása	135
Antibiotikumok hatásának vizsgálata korong tesztel.....	136
Szinergizmus vagy antagonizmus kimutatása antimikrobiális szerkombinációk esetén	137
<i>Streptomyces</i> törzsek rázatott tenyészet szűrletének "screenelése"	138
Mikrobák antagonizmusának vizsgálata keresztcsíkolatos módszerrel	139
Replika-technika alkalmazása antibiotikum rezisztens mikrobák izolálására	141
Növényi antimikrobiális vegyületek hatásának vizsgálata.....	142
Nehézfémionok gátló hatásának vizsgálata.....	142
Baktériumtörzsek sejtfal diamino pimelinsav (DAP) tartalmának meghatározása.....	144
Baktériumsejtek karakterisztikus cukormolekuláinak meghatározása.....	145

Kinonok kimutatása baktériumtörzs tenyészetből.....	147
Poláris lipidek kimutatása baktériumtörzs tenyészetből	151
Membrán zsírsavak kimutatása baktériumtörzs tenyészetből	154
Baktérium tenyészetek és élelmiszerek illó zsírsavtartalmának meghatározása.....	155
DNS izolálása és tisztítása baktériumtenyészetekből.....	157
16S rDNS sokszorozása PCR segítségével és a PCR termék tisztítása	159
PCR termékek restrikciós emésztése.....	161
DNS bázissorrendjének elemzése	163
Törzsek elválasztása RAPD ujjlenyomat módszer segítségével	166
Kemotaxonomiai markerek (zsírsavak és kinonok) kinyerése és frakcionálása környezeti mintából.....	168
Membránzsírsavak vizsgálata környezeti mintából	169
Bakteriális kinonok vizsgálata környezeti mintából	170
Közösségi DNS kivonása környezeti mintából	171
Baktériumközösségek vizsgálata Denaturáló Gradiens Gélelektroforézissel (DGGE)	172
Baktériumközösségek vizsgálata T-RFLP módszerrel	174
Baktérium- és gombaközösségek vizsgálata LH-PCR-rel	176
Klontár létrehozása Promega pGEM-T klónozó kit alkalmazásával	178
Közösségi szénforrás értékesítés vizsgálata BIOLOG mikrotiter lemezekkel.....	182
Xilanáz aktivitás mérése környezeti mintából	183
API gyorsteszt alkalmazása a bakteriális diagnosztikában	187
BIOLOG gyorsteszt alkalmazása a bakteriális diagnosztikában.....	188
Koliszám meghatározása membránszűrő technika segítségével	192
Koliszám meghatározása hígításos-szélesztéses eljárással	192
Koliszám meghatározása LMX-levesben MPN módszerrel	193
Kolifágok mennyiségének kimutatása lemezöntéses módszerrel	193
Fekális eredetű <i>Streptococcus</i> ok kimutatása Szita-féle E-67 tápagon	195
Pseudomonasok kitenyésztése brolacin agaron.....	196
Szennyezett vízminta BOI értékének meghatározása OxiTop rendszerben.....	197
Kataláz talajenzim gyorsteszt.....	197
Talajok mikrobiális aktivitásának becslése CO ₂ termelés mérésével	198
Bakteroidok morfológiájának vizsgálata fénymikroszkóppal.....	200
Cianobaktériumok morfológiai vizsgálata fénymikroszkóppal	201
Ammonifikáció kimutatása	202

Nitrifikáció kimutatása és gátlása allil-tioureával	202
Disszimilatárikus nitrát-redukció kimutatása.....	203
Szulfát-redukáló baktériumok (SRB) csíraszámának becslése MPN módszerrel.....	205
Összcsíraszám és a szénhidrogénbontó mikroorganizmusok csíraszámának meghatározása 96 lyukú mikrotitráló lemez használatával, MPN módszerrel	206
Mikrobiális szénhidrogén degradáció mértékének becslése CH ₄ termelés alapján anaerob mikrokozmoszban (Oxítóp® anaerob respiratorikus mérőrendszerben)	207
Mikrobiális szénhidrogén degradáció mértékének becslése CO ₂ termelés alapján aerob mikrokozmoszban (Oxítóp® aerob respiratorikus mérőrendszerben).....	208
Fenolbontó mikroorganizmusok biodegradációs képességének tesztelése rázatott aerob mikrokozmoszban	209
Tejtermékek összcsíraszámának meghatározása szélesztéssel tejporos tejagaron.....	211
<i>Lactobacillus</i> összcsíraszám meghatározás MRS agaron	212
Enterobacteriaceae összcsíraszám meghatározás VRBG agaron	212
Gomba összcsíraszám meghatározása Sabouraud glükóz agaron	213
Mikrobiális aktivitás meghatározása tejben biokémiai aktivitás alapján	214
Összcsíraszám meghatározás szélesztéssel húspepton tápagaron	215
Laktóz negatív baktériumok összcsíraszám meghatározása BPL agaron	216
<i>Clostridium</i> ok kimutatása Wilson-Blair-féle bizmut-szulfid agaron	217
Friss növényi élelmiszerek összbaktériumszám meghatározása húspepton, keményítő-kazein, brolicin és Sabouraud glükóz tápagaron.....	219
Fagyasztott növényi élelmiszerek összbaktériumszám meghatározása húspepton, Endo és Szita-féle E-67 tápagaron	220
Fagyasztott növényi élelmiszerek anaerob spórás baktériumainak kimutatása	221
Immobilizált sejt-technika alkalmazása alkoholos fermentációban.....	222
Citromsavtermelés rázatott tenyészetben	224
Fitoplankton minták a-klorofill tartalmának meghatározása.....	225
Tartós preparátum készítése fitobentosz minták vizsgálata céljából	226
Csoportelemzés ismeretlen baktériumtörzsek fenotípusos tulajdonságai alapján.....	229
Mikrobiológiai és környezeti változók együttes elemzése.....	230
DNS bázissorrendek illesztése és keresése NCBI-BLAST segítségével	234
DNS bázissorrend leolvasások <i>in silico</i> hasítása.....	235
Filogenetikai fa szerkesztése MEGA 7 programmal.....	237