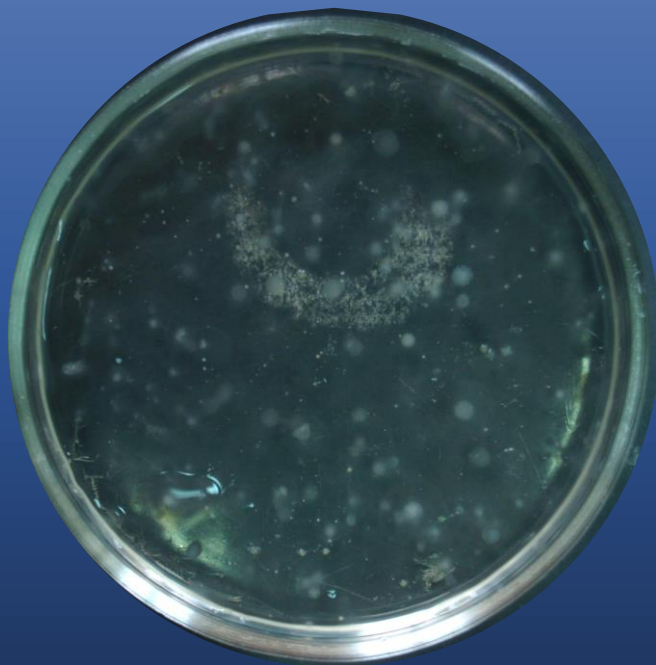




**Kolozsvári István – Sirokai-Kudron
László –
Illár Lénárd**



MIKROBIOLÓGIA II.
(gyakorlati órák anyaga)

**Beregszász
2024**

**Kolozsvári István – Sirokai-Kudron László –
Illár Lénárd**

**Mikrobiológia II.
(gyakorlati órák anyaga)**

Összeállította:
Kolozsvári István – Sirokai-Kudron László – Illár Lénárd

Mikrobiológia II.
(gyakorlati órák anyaga)

A II. Rákóczi Ferenc Kárpátaljai Magyar Főiskola Fodor István
Kutatóközpontjának, valamint a Biológia és Kémia Tanszékének
főiskolai jegyzete



II. RF KMF
Beregszász–Ungvár
2024

ETO

A kiadvány a II. Rákóczi Ferenc Kárpátaljai Magyar Főiskola biológia és az ember egészsége, továbbá a természettudomány szakos hallgatói számára ajánlott a mikrobiológia tárgy gyakorlati tematikáinak sikeres elsajátításához, a tárgy eredményes teljesítéséhez.

Kiadásra javasolta a II. Rákóczi Ferenc Kárpátaljai Magyar Főiskola Tudományos Tanácsa (2024.augusztus 26., 22. számú jegyzőkönyv).

Készült a II. Rákóczi Ferenc Kárpátaljai Magyar Főiskola Kiadói Részlege, Biológia és Kémia Tanszéke, valamint a Fodor István Kutatóközpontja közreműködésével.

Összeállította:

Kolozsvári István, Sirokai-Kudron László, Illár Lénárd

Lektorálta:

Dr. Kohut Erzsébet – II. RFKMF, Biológia és Kémia Tanszék, tanszékvezető,
docens

Dr. Andrik Éva – II. RFKMF, Biológia és Kémia Tanszék, docens/Fodor István
kutatóközpont, tudományos munkatárs

Műszaki szerkesztés, tördelés: *Sirokai-Kudron László, Kolozsvári István*

Borítóterv: Kolozsvári István

ETO-besorolás: a II. RF KMF Apáczai Csere János Könyvtára

Kiadó: a II. Rákóczi Ferenc Kárpátaljai Magyar Főiskola (cím: 90 202, Beregszász, Kossuth tér 6. E-mail: foiskola@kmf.uz.ua)

© A szerzők, 2024

© A szerkesztő, 2024

© II. Rákóczi Ferenc Kárpátaljai Magyar Főiskola, 2024

Tartalomjegyzék

Bevezetés	9
1. Mikrobiológiai eszközök és eljárások.....	10
1.1. Laboratóiumi munkavédelmi szabályok.....	10
1.2. Sterilizés.....	11
1.3. Kémiai eljárással történő sterilizés	11
1.4. Oltási és tenyésztési módszerek.....	11
1.5. Oltási módok.....	13
1.6. Tenyésztési módok	14
1.6.1. Aerob tenyésztési eljárások.....	14
1.6.2. Anaerob tenyésztési eljárások	15
1.6.3. Tisztatenyészetek készítése	15
2. Növénypatogén vírusok	16
2.1.1. Dohány mozaik vírus (TMV).....	16
2.1.2. Burgonya Y vírus	16
2.1.3. Szilva himlő (Pox) vírusa	17
2.1.4. Szójabab mozaik vírus.....	18
2.1.5. Uborka mozaik vírus	18
2.1.6. Répa sárgaság vírus	19
2.1.7. Árpa sárga törpülés vírus.....	19
2.1.8. Paradicsom bronzfoltosság vírus.....	20
2.1.9. Répa levélesúcs foltosodás vírus.....	20
2.2. Általános tudnivalók	21
2.3. Vírusok csoportosítása.....	21
3. Állat- és humánpatogén vírusok	26
3.1. Egyszálú DNS vírusok.....	26
3.2. Kettős szálú DNS vírusok.....	26
3.3. Kettős szálú RNS vírusok.....	26
3.4. Pozitív egyszálú RNS vírusok	27
3.5. Negatív RNS vírusok.....	27
3.6. Reverz-transzkriptáz vírusok	27
3.7. Általános tudnivalók	27
4. Baktérium táptalaj készítése	29
4.1. A táptalajok összetétele	29
4.2. A táptalajok csoportosítása	31
4.2.1. A táptalajok csoportosítása összetétel szerint	31
4.2.2. A táptalajok csoportosítása halmazállapot szerint.....	31
4.2.3. A táptalajok csoportosítása a felhasználás célja szerint	32
5. Winogradsky-oszlop készítése.....	34
6. A Gram-festés módszertana	36
7. A mikroorganizmusok mindennapi felhasználása	38

7.1.	Élesztősejtek alkalmazása.....	38
7.2.	Tej feldolgozása joghurtta	39
8.	A védőoltások típusai	40
8.1.	Általános tudnivalók.....	40
8.2.	Védőoltások típusai	41
8.3.	Ukrajnában kötelező/ajánlott védőoltások.....	42
	Felhasznált és ajánlott szakirodalom.....	45

BEVEZETÉS

A mikroorganizmusok világa körbevesz minket. Alapvető hatással vannak ránk élettani és közegészségügyi szempontból egyaránt, de sok iparilag fontos gazdasági ágazat sem létezhetne nélkülük. A mikroorganizmusok származásukat és felépítésüket tekintve igen heterogének. Összességében sokmindenben nagyon különböznek a magasabbrendű létformáktól. A Mikrobiológia I–II. kötetekben a II. Rákóczi Ferenc Kárpátaljai Magyar Főiskola biológia és az ember egészsége, továbbá a természettudomány szakos hallgatói számára gyűjtöttük össze mindazon ismereteket, amelyek a mikrobiológia tárgy sikeres elméleti és gyakorlati teljesítéséhez elengedhetetlenek.

A két kiadványban az olvasó átfogó képet kaphat a vírusok, szubvirális ágensek, prokarióták és a mikrobiológia érdekkörébe tartozó egyes eukarióta csoportok tekintetében is. Mind elméleti, mind az elméleti ismereteket kiegészítő gyakorlati foglalkozások leírását közöljük.

Az egyes rendszertani egységek makro- és mikrostruktúrájának, fiziológiájának, esetleges patogén hatásainak ismerete, valamint a felhasználásuknak, vagy az ellenük való védekezésnek a lehetőségei úgy általános ismereti, mint szakismereti szempontból ajánlottak. Mindezek figyelembevételével az elméleti ismereteket mindenütt igyekeztünk gyakorlati szempontból is megvilágítani. Fontosnak tartjuk, hogy a hallgatók alapvető mikrobiológiai laboratóriumi jártasságot is szerezzenek. Tisztában legyenek a laboratóriumok ajánlott balesetvédelmi és működési szabályaival, megismerjék az alapvető mikrobiológiai eljárásokat, eszközöket, be rendezéseket a főiskola által biztosított infrastrukturális keretek között.

Fontos, hogy az élettudományok és a környezettudományok terén jártas szakemberek ismerjék a különböző mikrobiológiai rendszertani csoportok gyakoribb képviselőit. Tisztában legyenek azzal, hogy hol találkozhatunk velük, milyen ökológiai szerepük van, hogyan befolyásolják életünket, indokolt-e az ellenük való védekezés, ha igen annak milyen lehetőségei vannak.

1. MIKROBIOLÓGIAI ESZKÖZÖK ÉS ELJÁRÁSOK

A mikrobiológia gyakorlati munkák hatékony teljesítéséhez szükséges, hogy tisztában legyünk az alapvető vizsgálati eljárások módszertanával és eszközkészletével.

1.1. Laboratóriumi munkavédelmi szabályok

- Laboratóriumi munka megkezdéséhez szükséges alapfelszerelések, amit minden alkalommal magával kell hoznia a hallgatónak: laborköpeny, gyakorlati jegyzet, füzet, toll.
- A laboratóriumban kizárólag az oktató engedélyével és jelenlétében szabad tartózkodni.
- Munkavédelmi köpeny használata minden gyakorlaton kötelező, melyet a hallgató biztosít magának.
- A laboratóriumban étkezni, italt fogyasztani tilos!
- A laboratóriumból vegyszert, eszközöket kivinni szigorúan tilos!
- A laboratóriumban található vegyszerekhez a gyakorlatvezető engedélyével szabad nyúlni, azokat megköstolni tilos, megszagolni csak óvatosan, fokozatosan az edényszájához közelítve, az edény szája felett, orrunk felé legyezgetve szabad.
- Kiömlő anyagok: a gyakorlatvezető jelenlétében és felügyelete mellett fel kell takarítani, ha szükséges a kiömlő anyag hatástalanítását kizárólag a gyakorlatvezető végezheti.
- Ha szembe kerül vegyszer, azt szemöblögető pohárral többször át kell vízzel mosni, valamint szemorvosi vizsgálatra el kell menni.
- Sérülések esetén ki kell tisztítani a sebet, steril gézlappal, kötözőszerrel be kell kötni és minden esetben orvossal meg kell vizsgáltatni.
- A laboratóriumban történő és a laboratóriumi gyakorlatot megelőző sérülést, mely nyílt sebet okoz és a gyakorlat során is veszélyforrást jelenthet a munkát végző hallgató részére, a gyakorlatvezetőnek, a gyakorlat megkezdését megelőzően jelezni kell!
- A gyakorlat befejezését követően, a laboratórium elhagyását megelőzően, minden alkalommal alaposan kezét kell mosni!

1.2. Sterilizés

- Hővel történő sterilizés
- Áramló vízgőzben történő sterilizés
- Túlnyomásos vízgőzzel történő sterilizés
- Száraz hővel történő sterilizés
- Szűrővel történő sterilizés
- Ultraibolya sugárzással történő sterilizés

1.3. Kémiai eljárással történő sterilizés

Autokláv használatának lépései

- Ellenőrizzük az autokláv tisztaságát, a kipárolgott agar tartalmú táptalaj maradékot el kell távolítani. A desztillált víz szintjét minden alkalommal ellenőrizni kell.
- Helyezzük a sterilizálni kívánt eszközöket/táptalajokat az autoklávba.
- Zárjuk le az autoklávot.
- Kapcsoljuk be az autoklávot.
- Amint az autokláv felfűti magát 100°C-ra, a fekete szelepet teljesen el kell zárni.
- A szelep elzárását követően az autokláv tovább melegszik 121°C-ra.
- Amint a hőmérő eléri a 121°C-t, attól a ponttól kell mérni 20-25 percet.
- A sterilizációs idő leteltét követően az autoklávot ki kell kapcsolni.
- Néhány másodpercet várni kell, míg a nyomás kiegyenlítődik.
- Kinyitható az autokláv.

1.4. Oltási és tenyésztési módszerek

Az oltás a mikroorganizmusok tenyésztését megelőző, alapvetően fontos mikrobiológiai művelet. Lényege: steril oltóeszköz segítségével steril tápközegbe juttatjuk azokat a mikrobákat, amelyeket szaporítani kívánunk. Inokulálásról beszélünk, ha a vizsgálati anyag egy részével (inokulum) beoltjuk a szaporításra szolgáló táptalajt. Minden olyan

esetben, amikor hígítófolyadékban vagy tápközegben elszaporított mikroorganizmusokat viszünk a szaporításra szolgáló táptalajra (törzsfenntartás, tiszta tenyészet készítése stb.) áoltásról beszélünk. Tenyésztés alatt értjük a baktériumok és gombák meghatározott táptalajokon történő mesterséges szaporítását. A mikroba-tenyésztés célja lehet egy már meglévő tenyészet fenntartása, tiszta tenyészet készítése, a szükséges mikroorganizmusok tömeges elszaporítása, illetve egy vizsgálati minta élősejt-számának meghatározása.

Ügyelnünk kell arra, hogy oltás és tenyésztés közben tenyészetünk ne fertőződjön be idegen mikroorganizmusokkal, ezért mindig be kell tartanunk az aszeptikus (fertőzésmentes) munka követelményeit.

Az oltási munka helyes kivitelezése:

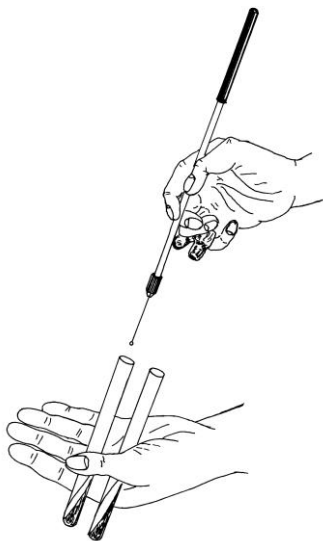
- Soha ne végezzünk oltási munkát nyitott ablak mellett vagy huzatos helyiségben.
- Munkaasztalunk felületét tisztítsuk meg fertőtlenítő szerrel.
- Mindig gázláng mellett dolgozzunk.
- Tenyészetből inokulumot venni, oltást végezni csak steril oltóeszközzel szabad.
- Forró oltóeszközzel ne vegyünk inokulumot, mert a mikróbák elpusztulnak, s oltásra nem használhatók. Várjuk meg az oltóeszköz lehűlését vagy hűtsük le azt oltás előtt steril tápfolyadékba mártással, illetve steril tápközegbe való behúzással.
- Ha nagyobb mennyiségben, pipetta tartóban sterilizett pipettákat használunk, mindig gázláng közelében nyissuk és zárjuk a doboz fedelét egy-egy pipetta kivételekor. A kivett pipettát célszerű használat előtt egyszer gázlángon áthúzni.
- Ha mikroba tenyészetet, vagy steril tápközeget tartalmazó üvegedényt inokulum kivételkor, oltáskor kinyitunk, majd lezárunk, az üvegedény száját lelángolással kell sterilizálnunk rögtön kinyitás után és bezárás előtt is! A gázlángban történő lelángolás (flamálás) egyrészt csírátlanítja az üvegedény száját, másrészt melegítés hatására a kémcsőben lévő levegő kifelé áramlik, így a külső légtérből nem történhet levegőbeszívás. Ezzel kizárható az egyik legjelentősebb külső fertőzési forrás.

- Steril tápközeget vagy tenyészetet tartalmazó üvegedény kinyitása-
kor a vattadugót vagy kémcső kupakot jobb kezünk kis és gyűrűs
ujjával a tenyerünkhöz szorítva vegyük ki, s tartsuk ott a kémcső zá-
rásáig. Vigyázzunk, hogy a dugó kémcsőbe kerülő részét ne fogjuk
meg és ne érintsük semmihez.
- Petri-csészében való tenyésztéshez mindig szilárd tápközeget hasz-
nálunk. A légmentesen záró, steril Petri-csészét gázláng mellett és a
tető oldalra billentésével csak résnyire nyissuk fel, hogy a levegőből
történő mikroba fertőzést elkerüljük.

1.5. Oltási módok

Az oltási módokat különféle szempontok alapján csoportosíthatjuk:
a használt oltóeszköz fajtája, az oltásra használt tenyészet halmazál-
lapota, a beoltott tápközeg halmazállapota, az oltás formája, típusa
szerint.

- Kémcsőből kémcsőbe történő (szilárd táptalajon) átoltás esetében az
oltásra kerülő kémcsövet lássuk el megfelelő jelzéssel.
- Vegyük bal kezünkbe a két kémcsövet (amibe, illetve amelyből át-
oltunk) úgy, hogy azok biztos távolságra legyenek egymástól és nyí-
lásuk jobbfelé essen (amennyiben jobb kezesek vagyunk).
- A kémcsöveket hüvelykujjunkkal szorítsuk a tenyerünkhöz.
- Vegyük jobb kezünkbe az oltókacsot ceruzaszerűen. Égessük le az
oltókacsot alaposan (izzásig), azután hagyjuk kihűlni.
- Lángoljuk le a tenyészetet és a táptalajt tartalmazó kémcsövek du-
góit.
- Jobb kezünk kisujjával és gyűrűsujjával fogjuk meg egyszerre a két
kémcső vattadugóját a külső kézfelület felőli oldalról és vegyük ki.
Égessük le a kémcsövek száját.
- Az oltókacsot érintsük hozzá a tenyészet felső széléhez. Húzzuk vé-
gig a kacsot a tenyészet felszínén (az agar felszínét ne szántssuk fel),
és vegyünk ki egy kacsnyi mennyiségű baktériumot. A kacson lévő
mikroorganizmusokat hullámos (kígyózó) vagy egyenes vonal men-
tén, alulról kiindulva kenjük szét a táptalaj felületén.
- Lángoljuk le a két kémcső száját és tegyük vissza a két vattadugót.
- Az oltókacsot kiizzítjuk.
- A frissen beoltott táptalajt rakjuk be a megfelelő helyre.



1. ábra. A kémcsövek és az oltókacs helyes tartása áttöltéskor

1.6. Tenyésztési módok

A tenyésztés a mikroorganizmus oxigénigényének megfelelően aerob vagy anaerob körülmények között történik. Aerob módon tenyészthető minden olyan mikroorganizmus, amely anyagcseréjéhez oxigént igényel, vagy amelyek szaporodását az oxigén nem gátolja jelentős mértékben (aerotolerans). Anaerob módon kell tenyésztetni minden olyan mikrobát, amelynek anyagcseréjét, szaporodását az oxigén gátolja. A mikroorganizmusoknak egy csoportja viszont csak csökkentett oxigénnyomáson, szén-dioxiddal dúsított légtérben képes szaporodni. Ezeket a mikrobákat mikroaerofileknek nevezzük.

1.6.1. Aerob tenyésztési eljárások

Az aerob tenyésztési eljárásoknál biztosítani kell a szaporításra szolgáló közeg oxigénellátását. Ez a legtöbb esetben nem jelent problémát, mert a Petri-csészékbe öntött és megszilárdult, néhány mm vastag táptalajba a levegőből bediffundáló oxigén elegendő a szaporodáshoz. Hasonló módon, fémkupakkal, vagy laza papírvatta-dugóval lezárt kémcsövekben is elegendő az oxigén-ellátás ferde agaros tenyészetek vagy egyszerű levestenyészetek esetében.

1.6.2. *Anaerob tenyésztési eljárások*

Anaerob tenyésztési körülmények eléréséhez csökkenteni kell a redoxpotenciált. A redoxpotenciál csökkenthető az oxigén kizárásával, vagy redukálóanyagok hozzáadásával. A levegő kiszorításának egyik leegyszerűbb módja a tápközeg fedése paraffindugóval, vagy paraffinolajjal. Ezt az eljárást kémcsőben készített tenyészetek esetén célszerű alkalmazni. Az anaerob edények olyan légmentesen zárható edények, amelyekből az oxigént kémiai úton vonjuk el.

1.6.3. *Tisztatenyészetek készítése*

Az elektív, szelektív és differenciáló táptalajok alkalmazásával csak a mikroorganizmusok egy-egy szűkebb csoportját tudjuk elkülöníteni, de ezek teljeskörű azonosításra nem alkalmasak, ezt a célt a különböző diagnosztikai vizsgálatok (biokémiai, szerológiai stb.) szolgálják. Az azonosíthatóságnak, a mikrobafaj meghatározásának minden esetben előfeltétele a tiszta tenyészet előállítása. A tiszta tenyészet más mikroorganizmusoktól mentes, egyetlen sejtből vagy telepkepző egységből fejlődő sejtömeg.

A tiszta tenyészet készítése során egyetlen sejt elszaporodásából származó telepből kell kiindulni. Az átoltás során a vizsgálandó mikroorganizmusokat tartalmazó tenyészetből egysejt eredetű mikroorganizmusokat viszünk át friss, steril táptalajra. A tiszta tenyészet készítésének számos formája használatos a kiindulási és a készítendő táptalaj típusának függvényében. A leelterjedtebb forma az elektív, szelektív vagy, differenciáló, folyékony, vagy szilárd táptalajból alaptáptalajra történő átoltás ritkító szélesztéssel. Tenyésztés után újra kiválasztunk egy jól elkülönült telepet. Az eljárást addig ismételjük egy nem szelektív táptalaj két lemezén, amíg csak egyféle teleptípus nő a lemezen.

2. NÖVÉNYPATOGÉN VÍRUSOK

Téma: A növénypatogén vírusfertőzések

Cél: Gyűjtött és herbáriumi levélmintákon történő vírusfertőzések tüneteinek felismerése

Eszközök és anyagok: Különböző növényfajok levélmintái, kórtani herbárium, kézi nagyító, fénymikroszkóp.

A gyakorlat menete: Az általunk gyűjtött levélmintákon elváltozásokat keresünk, amelyeket kézi nagyító és fénymikroszkóp segítségével megfigyelünk, tapasztalatainkat leírjuk a gyakorlati munkafüzetbe.

Háttérismeretek:

2.1.1. *Dohány mozaik vírus (TMV)*

A Tobamovírus csoportba tartozik, ssRNA, helikális szimmetria, széles gazdaspektrum, hőstabilak, hosszú ideig fertőzőképesek, mechanikai átvitelrel terjednek.



2. ábra. Dohány mozaik vírus tünetei

2.1.2. *Burgonya Y vírus*

Potyvírus csoportba tartozik, ez a legnagyobb csoport, hajlékony pálcika alakúak, ssRNA, foltok és satnyulás, dohány, burgonya, paradicsom növényeken, levéltetvek és burgonya szemek terjesztik.



3. ábra. Burgonya Y vírus tünetei

2.1.3. Szilva himlő (Pox) vírusa

Poty vírus csoport, szilva, barack, nektarin, és sárgabarack állományokban óriási veszteségeket okozhat.



4. ábra. Szilva himlő vírus tünetei levélen

2.1.4. Szójabab mozaik vírus

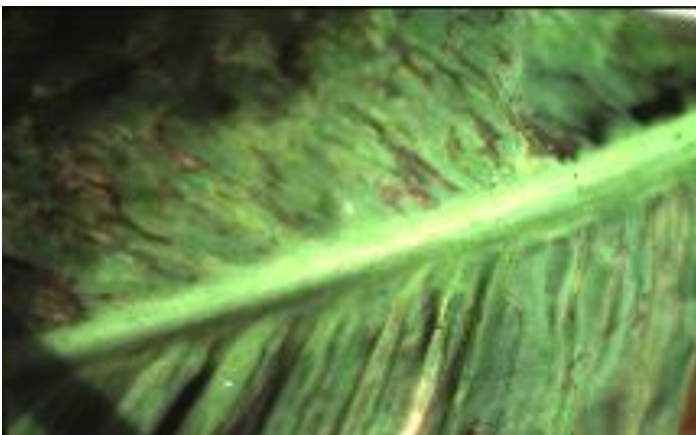
Poty vírus csoport, levéltetvek és magátvitel útján terjed, foltosság, mozaikosság, ráncosság, satnyaság, és magfoltosság jellemző rá.



5. ábra. Szójabab mozaik vírus tünetei

2.1.5. Uborka mozaik vírus

Cucomovirus csoport, a legszélesebb gazdaspektruma van a növényi vírusok között, levéltetvek viszik át nem perzisztens módon, mechanikai átvitel, élő gyom- és gazdasági növények gyökereiben telel ki.



6. ábra. Uborka mozaik vírus tünetei levélen

2.1.6. Répa sárgaság vírus

Closterovirus csoport, igen hosszúak, helikális szimmetria jellemzi őket, levéltetvek útján félig perzisztens módon terjed, az időjárás alapján lehet számítani nagymértékű terjedésére.



7. ábra. Répa sárgaság vírus tünetei

2.1.7. Árpa sárga törpülés vírus

Luteovirus csoport, izometrikus szimmetria, levéltetvek terjesztik, búza, zab és árpa növényeket veszélyeztet leginkább.



8. ábra. Árpa sárga törpülés vírus tünetei

2.1.8. *Paradicsom bronzfoltosság vírus*

Tospovirus csoport, tripszek terjesztik, főleg üvegházakban okoz nagy károkat.



9. ábra. Paradicsom bronzfoltosság vírus tünetei

2.1.9. *Répa levélsúcs foltosodás vírus*

Geminivirus csoport, kabócák terjesztik, perzisztens vírus, az egész termést elviheti.



10. ábra. Répa levélsúcs foltosodás vírus tünetei

2.2. Általános tudnivalók

A növényeket megfertőző vírusok többsége egyfonalú ribonukleinsavból (**RNS**) épül fel, külső burokkal nem rendelkezik. Ismertek dezoxiribonukleinsavból (**DNS**) álló vírusok is.

A növénypatogén vírusok elleni védekezés lehetőségei meglehetősen korlátozottak. Az agrotechnikai védekezés nem a kórokozó ellen hat, hanem a fertőzés lehetőségét igyekszik elkerülni a fertőzési források megszüntetésével (egészséges vető- és szaporítóanyag biztosítása, gyomfajok irtása, árvakelések megszüntetése, és a vektorok elleni kémiai védekezés) a növénytermesztési- (helyes fajtaválasztás, fogékony fajok egymás mellett való termesztésének elkerülése, ültetési idők helyes megválasztása), és növényápolási munkákkal, a technológiai fegyelem betartásával (harmónikus tápanyagutánpótlás, növényhigiénia, talaj- és eszközfertőtlenítés).

A fertőzött növényeket gyakorlatilag nem lehet vírusmentesíteni azaz kigyógyítani a fertőzésből. Ezért elsődleges fontosságú a fertőzés megelőzése, ehhez ismernünk kell vírusátvitel módjait.

2.3. Vírusok csoportosítása

Család	Nemzetség	Faj	Átvitel
<i>Bromoviridae</i>	<i>Alfamovirus</i> <i>Cucumovirus</i> <i>Iilarvirus</i>	<i>Alfalfa mosaic virus</i> <i>Cucumber mosaic virus</i> <i>Prunus necrotic ring-spot virus</i>	Lt, M, P, Mag Lt, M P, Mag, O
<i>Comoviridae</i>	<i>Nepovirus</i>	<i>Grapevine fanleaf virus</i>	N, O
<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Onion yellow dwarf virus</i> <i>Plum pox virus</i> <i>Tulip breaking virus</i>	Lt, M, P, Mag, Lt, M, P, Mag, O Lt, M,
-----	<i>Tobamovirus</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i> <i>Tomato mosaic virus</i>	M, T, Mag M, T, Mag

Lt: levéltetű, **M**: mechanikai, **Mag**: mag, **N**: fonálféreg, **O**: oltás, **P**: pollen **T**: talaj

A vírusok passzív úton kerülnek a növényekbe, a sejtek fertőzése sebzések révén történik.

A **növények vírushatás** leggyakrabban mechanikai úton, oltással vagy szemzéssel, vegetatív szaporítási módszerekkel, állati vektorokkal, valamint pollennel történik. Sok vírusra többféle terjedési mód jellemző.

A **mechanikai úton** történő vírusátvitelnél a vírushatósított növény nedve az egészséges növény sejtjeibe sérüléseken keresztül hatol be (szaporító anyag vágása, kacsolás, ápolás során okozott sérülések). Az alfamó, a cucumó, a potyó és a tobamó vírusscsoportba tartozó vírusokra jellemző a mechanikai vírusátvitel. Ez a terjedési mód különösen veszélyes azoknál a hajtattott, hosszú tenyészidejű kultúráknál, amelyek gyakori és rendszeres sérülésekkel járó ápolási munkát igényelnek.

Oltással, szemzéssel a vírushatósított növényi szövetet visszük át a kórokozót. Az egészséges szaporítóanyag biztosítása érdekében mind az oltóvessző, mind az alany vírusmentességét biztosítani kell. Ez a terjedési mód a gyümölcsfajok, a szőlő és a fás dísznövények vírusaira jellemző (apple mosaic ilarvirus, prunus necrotic ringspot ilarvirus, grapevine fanleaf nepovirus, plum pox potyvirus).

A kertészeti gyakorlatban kiterjedten alkalmazott vegetatív szaporítási módoknál – mikroszaporításnál is –, ha a leválasztott növényi rész vírushatósított, az ezekből fejlődött utódnövények is vírushatósítottak lesznek. A potato leafroll luteovirus, az onion yellow dwarf potyvirus, potato Y potyvirus és a tulip breaking potyvirusokra jellemző ez a terjedési mód.

A növényi vírusok megfertőzhetik a magokat is: vagy a mag felszínére, a maghéjra tapadnak, vagy a mag belsejét fertőzik (valódi magfertőzés). A magvak fertőzése történhet a fertőzött növényen keresztül, illetve a virágra kerülő fertőzött pollen révén. Vírushatósított magvakból fertőzött növények fejlődnek. Ez a terjedési mód ismert az alfalfa mosaic alfamovirus, a lettuce mosaic és a plum pox potyvirusoknál.

A vírusok terjesztését, a vírusátvitelt igen gyakran rovarok végzik. A **vírusvektorok** olyan élő szervezetek, melyek a vírust felveszik, hordozzák és továbbadják. A vírusvektorok többsége szűrő-szívó szájszervű rovar (levéltetvek, pajzstetvek, atkák, tripszek, fonálférgek stb.), de rágó szájszervű állatok is terjeszthetik a vírust (bogarak, csigák), bár ezek jelentősége kisebb. A legelterjedtebb vírusvektorok a levéltetvek. Említést érdemelnek közülük a talajban élő vektor fonálférgek (*Xiphinema*- és *Longidorus*-fajok), tetvek és mikroszkópikus gombák (*Polymyxa*, *Olpidium*). Vektorként szerepelhetnek élősködő virágos növények, így pl. *Cuscuta*-fajok is, de ezek járványtani szerepe csekély. A vektorátvitel zömét a szűrő-szívó szájszervű ízeltlábúak adják, közöttük is elsősorban a levéltetvek és a kabócák, de vektorként szerepelhetnek még aknázómolyok, poloskák, tripszek, rágó szájszervű bogarak is, amelyek a specializáltság különböző fokait mutathatják, de mindenesetre az adott víruskórokozóra jellemzőek.

A vírus és vektorának kapcsolata sajátos és az adott vírusra jellemző. A vektorspecifikus vírust csak bizonyos, adott vektorfaj(ok) viheti(k) át másik növényre. A nem vektorspecifikus vírusoknál számos vektorfaj végezheti a terjesztést. A CMV-t az adott gazdanövényen megtelepedő bármelyik levéltetűfaj képes átvinni másik növényre. A levéltetűvel történő terjedés az **afidofil** vírusokra jellemző.

A levéltetű vektor és a vírus kapcsolata különböző lehet. A **stylet-borne** vírusátvitelnél a vektor szűrő-szívó szájszervének felületére tapad a vírusrészecskéket tartalmazó növényi nedv. A levéltetű a szívás után azonnal fertőzőképesé válik, de a további szivogatásokkal a szipókájának felszínéről a vírusrészecskék elfogynak, így fertőző képességét hamar elveszti. Ez a **nem perzisztens** vírusátvitel jellemző az alfamo, a cucumo és a poty víruscsoport tagjaira.

A **cirkulatív, azaz perzisztens** vírusátvitelnél a fertőzött növény nedve a vektor testüregebe kerül, és hosszú inkubációs időre van szükség ahhoz, hogy a vektor fertőzőképesé váljon. A fertőzőképességüket életük végéig megtartják. Pl.: luteo víruscsoport tagjai.

A talajban található szabadon élő fonálférgék számos, a nepo víruscsoportba tartozó vírus terjesztéséért felelősek. Ezeket a vírusokat nevezzük **nematofil** vírusoknak.

A vírusfertőzést követően a vírus a növényben a behatolás helyétől sejtről-sejtre továbbhalad, később a tracheák segítségével a növényben szétterjed, azaz szisztemizálódik. A növény a vírusfertőzöttségét élete végéig megtartja, abból nem gyógyítható ki.

A vírusfertőzés után a növényen tipikus **tünetek** jelennek meg, melyekről a vírusfertőzés észlelhető. A leveleken gyakori a zöld és sárgás színű mozaikosság, de kifejlődhetnek gyűrű vagy szalag alakú elszíneződések az erek között vagy azok mentén. A vírusfertőzött levelek magvastagodnak, keményebbek, mint az egészségesek, rugalmasságukat elveszítik. A termések torzulnak, deformálódnak, a vírusfertőzés hatására rügy- és ágelhalás is felléphet. Tünetmentesen is vírusfertőzött lehet egy növény (**látens fertőzés**). Ennek veszélyessége felülmúlja a tünetes növényekét, mivel ezek a tünetmentes növények egészségesnek látszanak, de valójában vírusfertőzöek.

A vírusbetegségek elleni védekezés alapja a **vírusfertőzés megelőzése**, azaz a **prevenció**. Bármilyen növény termesztésére csak vírusmentes szaporítóanyagot szabad felhasználni. Magyarországon az Európai Unióban érvényes növény-egészségügyi előírásokkal összhangban a szaporító-anyagok (oltvány, dugvány, vetőmag) vírusmentességét hatóságilag ellenőrzik.

Gyümölcsfák oltványainak vírusmentességét, annak fokozatait az azokra rögzített címke (certifikáció) tartalmazza. Ezek típusai:

- **vírusmentes** (VF=virusfree), az adott növényfaj valamennyi ismert vírusától mentes
- **vírustesztelt** (VT=virustested), az adott növényfaj jelentős vírusaitól mentes
- **ellenőrzött** (C.A.C.), államilag ellenőrzött állományból származó szaporítóanyag.

Számos növényfajnál kereskedelmi forgalomban kaphatók vírus-rezisztens vagy vírus-toleráns fajták, ezek termesztése javasolt.

A termesztés során legfontosabb feladat a növényállományban a vírusátvitel, a vírusfertőzés megelőzése. Az állományból a vírusos egyedeket észlelés után azonnal el kell távolítani és megsemmisíteni. A növényápolás során a sebzések számát minimálisra kell csökkenteni. A vírusvektorok folyamatos ellenőrzésével a kémiai védekezést a vektorok megjelenésének korai stádiumában hatékonyan lehet elvégezni. A kémiai védekezést a vektorok jelenléte határozza meg.

A mechanikai vírusátvitelt a vágóeszközök és a kéz (gumikesztyű) gyakori és rendszeres Hypo-s (Na-hypokloritos) oldatban történő 10-20 mp-es áztatásával lehet megelőzni. A vetőmagvak felületén megtapadó vírusrészecskék ellen a forgalmazók NaOH-os csávázást alkalmaznak.

A pollennel történő terjedést a megfelelő izolációs távolsággal lehet megakadályozni.

3. ÁLLAT- ÉS HUMÁNPATOGÉN VÍRUSOK

Téma: Állat- és humánpatogén vírusfertőzések

Cél: Megismerni a közegészségügyi szempontból fontos gyakoribb állat- és humánpatogén vírusfertőzések lefolyásának menetét, megelőzésük lehetőségeit.

Eszközök és anyagok: Állat- és humánpatogén vírusok elektronmikroszkópos képei, az általuk kiváltott patogenitás tüneteinek és háttérinformációinak szemléltetőanyaga

A gyakorlat menete: Számba vesszük a vizsgált vírusok morfológiai bélyegeit, megismerjük az általuk kiváltott emberekben és/vagy állatokban kiváltott kóros folyamatok élettani hátterét, számba vesszük a megelőzés és a kezelés lehetséges módjait.

Háttérismeretek:

3.1. Egyszálú DNS vírusok

- **Circoviridae:** sertés és baromfi circo vírus (csirke anaemia vírus – CAV; sertés circovírus – PCV).
- **Parvoviridae:** kutya parvo vírus-2; macska panleukopenia vírus, sertés parvo vírus (SMEDI).

3.2. Kettős szálú DNS vírusok

- **Papoviridae:** Papilloma vírusok (szemölcsök).
- **Adenoviridae:** Adeno vírusok (légúti fertőzések).
 - **Herpesviridae:** tehén herpesz vírus – 1, – 2; ló herpesz vírus – 1, – 4; humán herpesz vírus.
- **Poxviridae:** Pox vírusok (feketehimlő).

3.3. Kettős szálú RNS vírusok

- **Reoviridae:** Reo vírus (Bluetonge vírus – juhok; afrikai lópestis; Rota vírusok).
- **Birnaviridae:** fertőző burzitisz vírus (csirkék); fertőző hasnyálmirigy elhalás (pisztráng).

3.4. Pozitív egyszálú RNS vírusok

- **Picornaviridae:** száj- és körömfájás; sertés entero vírusok.
- **Caliciviridae:** macska calicivírusos nátha; sertés calicivírus; szarvasmarha calicivírus.
- **Coronaviridae:** Corona vírusok (hasmenés, felső légúti megbetegedések).
- **Arteriviridae:** ló arteritisz vírus (érgyulladás).
- **Flaviviridae:** Flavi vírusok (WNV, sárgaláz); pestis vírusok (BVB, sertéspestis).
- **Togaviridae:** Rubeola.

3.5. Negatív RNS vírusok

- **Orthomyxoviridae:** influenzavírusok.
- **Paramyxoviridae:** parainfluenza vírus (hurutos betegségek); Canine distemper vírus; mumpsz vírus.
- **Rhabdoviridae:** veszettség.
- **Filoviridae:** Ebola vírus (vérzéses láz).
- **Bunyaviridae:** Hanta vírus (vérzéses láz).

3.6. Reverz-transzkriptáz vírusok

- **Retroviridae:** HIV (AIDS); macska leukémia vírus (macska, tehén immunhiány).
- **Hepadnaviridae:** Hepatitisz-B vírus.

3.7. Általános tudnivalók

A vírusok obligát patogének, tehát csak élő szervezetben vagy élő szövetekben tudnak fennmaradni, replikálódni. A replikációhoz a gazdaszervezet organelleumait használják fel. A vírusok elleni küzdelem bármely formája azért nehéz, mert a vírusnukleinsavakat vagy

vírusfehérjéket úgy kell szelektíven elpusztítani, hogy a gazdaszervezet ugyanolyan típusú anyagai ne károsodjanak. A vírusok elleni védekezés kétféle módon is történhet, egyrészt közvetlenül, fizikai vagy kémiai úton, vagy *in vivo* vírusellenes ún. virucid anyagokkal. Legeredményesebb természetesen a fertőzés megelőzése, ami azonban nem nevezhető szoros értelemben vett védekezésnek.

A vírusok nagy része hőhatásra elveszíti fertőzőképességét, a felület fehérjei denaturálódnak. Más részük, pl. a parvovírusok magasabb hőmérsékletet tartósan elviselnek. A kémiai anyagok közül több fertőtlenítőszert (savak, lúgok, detergensok, fenolszármazékok, klór, aldehidek stb.) eredményesen lehet használni a felületi fertőzések megszüntetésére. A hatékonyság nagyban függ a virionok stabilitásától és attól, van-e védőburkuk. Az ultraibolya sugárzás közvetlenül roncsolja a virionokat.

A vírusellenes szerek csak abban az esetben hatásosak, ha elég szelektívek, csak egyes víruscsoportokra hatnak, vagy a replikáció adott szakaszait gátolják. Ezért általános vírusellenes szer nincs.

A vírusok elleni védekezésben a legtöbb eredményt a vakcinák kidolgozásával érték el. A vakcinák kétfélék lehetnek, inaktívált, vagy élővírusos vakcinák. Első esetben olyan oltóanyagokról van szó, amelyeket fizikai vagy kémiai úton inaktíváltak, fertőzésre már nem képesek. Az inaktívált vírusok a szervezetbe kerülve nem okoznak megbetegedést, de külső immunogén komponenseik antigénként viselkednek, és kiváltják a szervezet védekezési reakcióit. Az újabb vakcinák már csak a virion tisztított, antigén hatású fehérjeit tartalmazzák. Az élővírusos vakcinák csökkent megbetegítőképességű, ún. attenuált kórokozók. A szervezetben gyenge megbetegedést okoznak, de felszaporodásuk révén aktiválják a szervezet immunrendszerét. A csökkentett virulencia nem fogékony állatokon történő sorozatos passzálassal (átoltással), vagy szövettényeszetekben való átoltással is kialakítható.

4. BAKTÉRIUM TÁPTALAJ KÉSZÍTÉSE

Téma: Baktérium táptalaj készítése

Cél: Elsajátítani a laboratóriumi baktériumtenyésztés alapközegéül szolgáló alaptáptalajok készítésének menetét

Eszközök és anyagok: steril Petri-csésze, analitikai mérleg, kiskanál, desztillált víz, glükóz, zselatin, agar-agar, vatta, oltókacs.

A gyakorlat menete:

- a) **Zselatinos táptalaj:** 25 g étkezési zselatint és 10 g glükózt feloldunk 300 ml desztillált vízben, majd az elegyet 80°C hőmérsékletűre melegítjük. Amint a zselatin feloldódott az előkészített steril Petri-csészékbe töltjük az oldatot, a Petri-csészét lefedjük és a zselatin megdermedése után a táptalajt beoltjuk.
- b) **Agar-agar táptalaj:** 4 g agar-agart és 5 g glükózt feloldunk 300 ml desztillált vízben, majd az elegyet 60°C hőmérsékletűre melegítjük. Amint az agar-agar és a glükóz feloldódott az előkészített steril Petri-csészékbe töltjük az oldatot, a Petri-csészét lefedjük és az elegy megdermedése után a táptalajt beoltjuk.

Az elkészült tápközegeket beoltjuk a környezetünkben fellelhető mikróbaközösségekkel. Egy vatta segítségével letörölgetjük az ablakpárkányt, kilincset, kézmosót stb., majd a vattával bedörzsölt oltókacssal a mikrobákat a tápközeg felületére oltjuk. A Petri-csészét lefedjük és inkubációs környezetbe helyezzük.

Háttérismeretek: A táptalajok a mikroorganizmusok szaporodásának és életképességének fenntartására szolgálnak. Fedezniük kell a mikrobák változatos tápanyag- és energiaforrás-igényét, valamint biztosítaniuk a kívánt fizikai-kémiai körülményeket.

4.1. A táptalajok összetétele

A táptalajoknak tartalmazniuk kell mindazokat az anyagokat, amelyekre a mikroorganizmusoknak szüksége van, és amelyeket maguk

szintetizálni nem képesek. Feltétlenül szükséges az alábbi táptalaj-komponensek.

- **Víz:** az élő szervezet alapvető komponense, szerepet játszik minden élőlény anyagcsere-folyamataiban. Emellett a táptalajokban a mikroorganizmusok számára, mint környezeti tényező is nélkülözhetetlen. A táptalajok készítéséhez általában egyszer desztillált vizet kell használni.
- **Szén- és energiaforrás:** a táptalajokban a redukált széntartalmú vegyületek kettős célt szolgálnak: egyrészt energiát nyernek belőle, másrészt ezekből építik fel a mikroorganizmusok saját széntartalmú anyagaikat. Az autotróf mikroorganizmusok képesek a levegő szén-dioxid tartalmát is hasznosítani, a mikrobák döntő többsége azonban a kemoheterotróf csoportba tartozik. A számukra hasznosítható szerves szénforrások igen széles skálája mikrobafajonként eltérő. A leggyakrabban használt szén- és energiaforrások az egyszerű cukrok (glükóz, laktóz stb.), a pepton és a húskivonat.
- **Nitrogénforrás:** az élő anyag bioszintéziséhez szükséges, igénytől függően szerves vagy szervetlen nitrogén-vegyületek. A levegő molekuláris nitrogéntartalmát csak néhány baktériumfaj képes hasznosítani (*Rhizobium*, *Azotobacter* fajok). A leggyakrabban használt szervetlen nitrogénforrások az ammónium-, nitrit- és nitrátsók, szervesek pedig a húskivonat, természetes fehérjék, peptonok, triptonok és az aminosavak.
- **Ásványi anyagok:** fontos szerepet játszanak egyrészt a sejt ozmotikus nyomásának kialakításában a sejthártya aktív transzport-folyamatai révén, valamint az enzimaktivitás szabályozásában. A mikroorganizmusok ásványianyag-igényét gyakran a csapvíz is kielégíti, de a szervetlen foszforvegyületeket, a makroerg foszfát-kötések révén a sejt energiaforgalmában betöltött döntő szerepe miatt megfelelő mennyiségben a táptalajhoz kell adni.

Feltételeken szükséges táptalajkomponensek:

- **Vitaminok:** a különböző anyagcsere-folyamatokban igen kis mennyiségben szükséges anyagok, amelyeket a mikroorganizmus nem képes előállítani. Ezek az anyagok elsősorban a koenzimként játszanak szerepet az anyagcserében. A baktériumoknak zsírban oldódó vitaminokra és C-vitaminra nincs szükségük. A legtöbbjük a B-vitaminokat is szintetizálni képes, azonban amelyek nem, azoknak ezeket készen kell kapniuk. A laboratóriumi gyakorlatban legáltalánosabban használt komplex vitaminforrás az élesztőkivonat.
- **Szervetlen és szerves hidrogén-donorok és akceptorok:** baktériumok légzési láncában képződő hidrogén-ionokat felvevő terminális anyagok. Csak akkor szükséges a táptalajhoz adni, ha a táptalajban lévő többi komponens egyike sem képes ezt a funkciót ellátni.

4.2. A táptalajok csoportosítása**4.2.1. A táptalajok csoportosítása összetétel szerint**

Összetétel szerint megkülönböztetünk természetes, félszintetikus és szintetikus táptalajokat. A természetes táptalajok természetes anyagok felhasználásával készülnek, ezért összetételük pontosan nem definiálható. Ebbe a csoportba tartozik a húsleves, a melasz vagy a maláta. Félszintetikus tápközegek összetevőinek egy része olyan természetes anyag, amelynek összetétele nem teljesen ismert, vagy alkotóinak aránya változó. Ebbe a csoportba tartozik minden olyan táptalaj, amely agart tartalmaz. A szintetikus táptalajok minden összetevőjét kvantitatíve és kvalitatíve is ismerjük.

4.2.2. A táptalajok csoportosítása halmazállapot szerint

Halmazállapot szerint beszélhetünk folyékony, félfolyékony és szilárd táptalajokról.

- A folyékony táptalajokra jellemző, hogy a különböző tápanyagokat szuszpenzióban, valódi vagy kolloid oldat formájában tartalmazzák.

A folyékony halmazállapotú tápközegek közül a természetes vagy fél-szintetikus táptalajokat leveseknek nevezzük, a szintetikus táptalajokat pedig tápoldatnak.

- A szilárd táptalajok a folyékony táptalajokból származtathatók szilárdító anyagok (agar-agar, zselatin, szilikagél) hozzáadásával. Régebben a zselatin volt a legelterjedtebb szilárdító anyag, ma egyre inkább háttérbe szorul, ami egyrészt igen alacsony olvadáspontjával (35°C) magyarázható, másrészt azzal a ténnyel, hogy a zselatint számos baktériumfaj elfolyósítja zselatináz enzime révén. Éppen ezért ma már inkább csak diagnosztikai céllal használjuk. Az agar kétkomponensű gélképző poliszacharid-keverék, amelyet egyes tengeri vörösalgákból vontak ki. Az agar nagy előnye, hogy 38-40°C-on megdermed, olvadáspontja azonban 98 °C. Mivel az agar természetes anyag, összetétele nem definiálható pontosan, csak természetes és félszintetikus táptalajokhoz használható. A szintetikus táptalajokban szilárdítóanyagként zömmel szilikagél (nátrium-szilikát, vízüveg, Na_2SiO_3) szerepel. A szilárd táptalaj megjelenési formája szerint lehet kémcsőben elkészítve magas- vagy ferdeagar, Petri-csészébe leöntve pedig agarlemez. A félfolyékony táptalajok is tartalmaznak szilárdítóanyagot, de lényegesen kevesebbet, mint a szilárd táptalajok.

4.2.3. A táptalajok csoportosítása a felhasználás célja szerint

- **Alaptáptalajok:** olyan médiumok, amelyek összetételüknél fogva általánosan (de nem univerzálisan) használhatók, a szaporodáshoz szükséges tápanyagokon kívül más speciális anyagot nem tartalmaznak.
- **Dúsító táptalajok:** többnyire olyan folyékony táptalaj, amely összetétele miatt különösen kedvező körülményeket biztosít a mikroorganizmusok szaporodására. A szelektív dúsító táptalajok összetételüknél fogva különösen alkalmasak arra, hogy bizonyos mikrobacsoportokat a többi mikróbával szemben speciális tápanyag-hasznosítási képességük, vagy más egyedi tulajdonságuk alapján (pl. antibiotikum-rezisztencia stb.) a tenyésztés során felszaporítsunk.

- **Elektív táptalajok:** olyan táptalajok, amelyekben összetételüknél fogva csak bizonyos mikrobacsoportok képesek szaporodni, hiszen csak ezen mikrobacsoportok minimális tápanyagigényét elégítik ki, így azok a környezetükben élő kísérő mikrobiótából kiemelhetők.
- **Szelektív táptalajok:** olyan kiegészítő komponenst tartalmaznak, amelyek egyes mikrobacsoportok szaporodását gátolják (pl. antibiotikumok, festékek, szulfonamidok stb.). Természetesen ezek a táptalajok gyakran tartalmaznak olyan alkotókat is, amelyek a keresett, mikrobacsoport szaporodását segítik. A szelektív táptalajok közé tartoznak a módosított pH-jú (erősen savas vagy lúgos) médiumok is.
- **Differenciáló vagy indikátor táptalajok:** a mikroorganizmusok differenciálására, azonosítására szolgáló táptalajok, amelyek kémiai indikátort, vagy egyéb jelzőrendszert (pl. Durham-féle fermentációs cső) tartalmaznak, amely speciális reakciókat (pl. savtermelést) jelez. Jellemzőjük, hogy egyes komponenseik szabad szemmel is látható reakciót adnak a mikroorganizmusok bizonyos anyagcseretermékeivel vagy enzimeivel.
- **Speciális táptalajok:** különböző vizsgálati céllal összeállított, különleges vizsgálatokat szolgáló tápközegek.

5. WINOGRADSKY-OSZLOP KÉSZÍTÉSE

Téma: A környezetünkben élő anaerob baktériumtörzsek vizsgálata Winogradsky-henger segítségével

Cél: a környezetünkben élő anaerob baktériumtörzsek mesterséges kultúrában való tenyésztése

Eszközök és anyagok: üveg henger, záró dugó, fólia, víz, valamilyen vizes közegből gyűjtött iszap, kalcium-szulfát, kalcium-karbonát, cellulóz (papír).

A gyakorlat menete: a Winogradsky-oszlop elkészítése során anaerob baktériumtenyészetet hozunk létre. Az oszlop elkészítésének alapfeltétele, hogy kedvező életkörülményeket teremtsünk a mikroorganizmusoknak.

- Meghatározott mennyiségű finom szemcsés iszaphoz kalcium-karbonátot, kalcium-szulfátot, és cellulózt adunk. A kalcium-szulfát tápanyagul szolgál az üveghenger alján élő szulfátredukáló mikroorganizmusoknak.
- A kalcium-karbonát pufferoló anyagként, a cellulóz a fermentatív szervezetek energiaforrásaként funkcionál a kísérletben.
- A krémszerű állag eléréséig óvatosan hígítjuk vízzel, majd a henger aljába töltjük, úgyhogy a kialakuló rétegben minél kevesebb levegő maradjon. 15 cm magasan feltöltjük lehetőleg szulfidban gazdag iszappal az üveghengereket.
- A kiszáradás megakadályozása érdekében kevés vizet töltünk a hengerekbe rakott iszapra és frissen tartó fóliával fedjük le az oszlopok tetejét.
- Ezt követően nem túl napos, de világos közepesen meleg helyre helyezzük.

Várható eredmények: a kén különböző oxidációs állapotban fordul elő a vegyületekben. A természetben előforduló kén vegyületek közül legjelentősebbek a következők: szulfhidril csoport (R-SH), az elemi kén, és a szulfát-ion. A baktériumok bizonyos csoportja oxigénmentes környezetben a szulfátot és más oxidált kénvegyületeket elektronakceptorként hasznosítja, miközben egyszerű szerves anya-

gokat (pl. tejsav, acetát stb.), vagy H_2 -t oxidál. A felszabaduló hidrogén-szulfid toxikus lehet az élőlényekre, mert könnyen reagál a ferroionokkal.

Anaerob környezetben, ahol fény és szulfid is van, elszaporodnak a zöld és bíbor kénbaktériumok, melyek szulfidoxidációval elemi ként termelnek. Az aerob kénoxidálók pl. a *Beggiatoa*, változatos elektrontranszport rendszere révén könnyen alkalmazkodik a változó életkörülményekhez.

Az oszlopok legalján anaerob környezetben fekete foltok formájában jelenik meg a *Desulfovibrio* baktérium a *Clostridium* nevű baktérium mellett. A teljes körfolyamat a *Clostridium* életműködésével indul, amely folyamatban a cellulóz (a hozzáadott apró szeletekre szabdalt szűrőpapír) bontása közben etanol és szerves savak keletkeznek. Ezeknek a termékeknek a segítségével fog megtörténni a szintén hozzáadott $CaSO_4$ anionjának a *Desulfovibrio* baktérium által való hidrogén-szulfáttá való redukálása. A teljes körfolyamat a *Clostridium* életműködésével indul, amely folyamatban a cellulóz (a hozzáadott apró szeletekre szabdalt szűrőpapír) bontása közben etanol és szerves savak keletkeznek.

A Winogradsky oszlop következő elkülönülő szintjétől kezdve fotoszintetizáló baktériumokkal találkozunk. Az első ilyen élőlény, ami a fény energiáját is felhasználja kémiai folyamatainak lebonyolításához, az a zöldes színezetű *Chlorobium* (zöld kénbaktérium). Tovább haladva újabb szelettel találkozunk, amelyet a *Chromatium* (bíbor kén baktérium) alkot nagy százalékban. Az előbb említett két prokarióta (a zöld és a bíbor kén baktérium) az oszlophoz hozzáadott $CaSO_4$ -ot használja fel CO_2 mellett, és így szerves molekulákat képez, az itt jelenlévő hidrogén-szulfid gázból (elegendő H_2S jelenlétében) elemi kén (S) keletkezik.

Tovább haladva a kissé sárgás színű *Rhodospirillum rubrum* (bíbor nem-kén baktérium) tudjuk azonosítani. Ez az előző két szelet által megtermelt szerves molekulákat és a CO_2 -t használja fel újabb szerves molekulák kialakítására. A legfelső rétegben – ahol már az oszlop tetején lévő vízben találhatók a baktériumok – élnek fotoszintetizálók, melyek szintén CO_2 felhasználásával állítanak elő szerves molekulákat, és hozzá oxigén molekulát.

6. A GRAM-FESTÉS MÓDSZERTANA

Téma: A Gram-festés módszere

Cél: Megismerkedni a Gram-festés eljárásmenetével

Eszközök és anyagok: baktériumtenyészet, oltókacs, mikroszkóp tárgylemez, cseppentő, víz, kristályibolya-oldat, Lugol-oldat, 96%-os alkohol, safranin festékoldat, fénymikroszkóp.

A gyakorlat menete:

- Tárgylemez zsírtalanítása (alkohollal való áttörlése).
- A tárgylemez feliratozása.
- Kenetkészítés (a tárgylemezre egy csepp vizet viszünk fel, amelybe a baktériumtenyészetből az oltókacs segítségével felvett baktériumokból híg szuszpenziót készítünk, a szuszpenziót az oltókacs segítségével a tárgylemez középső, kb. 2/3 részén filmmé húzzuk szét és rövid ideig szárítjuk szabad levegőn).
- Rögzítés (hővel történő rögzítés során a preparátumot tartalmazó tárgylemezt 4-5-ször áthúzzuk a Bunsen-égő lángja felett, közben folyamatosan ellenőrizzük, hogy ne égjen a tárgylemez, ne forrjon a kenet).
- A rögzített kenet festése kristályibolya festékoldattal (1 perc).
- Öblítés csapvízzel (a felesleges festék eltávolítása végett a preparátumot, cseppentő segítségével, csapvízzel kimossuk addig, amíg a lecsepegő folyadék színtelen lesz).
- A rögzített kenet kezelése Lugol-oldattal (1 perc).
- Öblítés csapvízzel.
- Színtelenítés 96%-os alkohollal (a felesleges festék eltávolítása végett a preparátumot cseppentő segítségével, alkohollal mossuk addig, amíg a lecsepegő folyadék színtelen lesz).
- Öblítés csapvízzel.
- Kontrasztfestés safranin festékoldattal (1 perc).
- Öblítés csapvízzel.
- szárítás (a szűrőpapír ráhajtásával a felesleges víz felitatása /nem dörzsölés!).
- Mikroszkópos megfigyelés.

Várható eredmények: a baktériumok változatos alakú, kb. 0,5-5 μm nagyságú mikroorganizmusok. Általában gömb (coccus), pálcika (bacillus) vagy görbült pálca alakúak, azonban számtalan nem szabályos formájú baktérium is ismert. Morfológiai típusuk megállapításához a baktérium sejteket valamilyen módon megfestjük és mikroszkópban vizsgáljuk. Egy speciális festési eljárással, a Gram-festéssel azonban nemcsak a sejtek alakja vizsgálható, hanem sejt-falszerkezetükről is információt kaphatunk. Ugyanis ezzel a festési módszerrel két csoportra különíthetők el a baktériumok: az egyszerűbb sejt-falszerkezetű Gram-pozitívak kékre/lilára színeződnek, az összetettebb sejt-fal felépítésű Gram-negatívak pedig piros/rózsaszín színre.

7. A MIKROORGANIZMUSOK MINDENNAPI FELHASZNÁLÁSA

Téma: A mikroorganizmusok mindennapi felhasználása

Cél: Megismerkedni az élesztő alkalmazásának és a tej mikrobiológiai feldolgozásának mikrobiológiai háttérismereteivel

7.1. Élesztősejtek alkalmazása

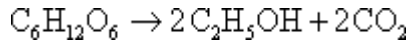
Eszközök és anyagok: sütőélesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) glükóz, desztillált víz, 1 db üveg főzőpohár (1000 cm^3), 5 db üveg lombik (200 cm^3), 5 db léggömb, analitikai hőmérő, Petri-csésze, fénymikroszkóp.

A gyakorlat menete: a főzőpohárban 500 cm^3 desztillált vízben oldjunk fel 14 g sütőélesztőt. A feloldás után az elegyet töltsük szét az 5 előkészített üveglombikba, mindegyikbe 100 cm^3 -t töltve. A lombikokat számozzuk meg!

1. lombik: 100 cm^3 élesztőelegy (szobahőmérsékleten tartva)
2. lombik: 100 cm^3 élesztőelegy+5 g glükóz (szobahőmérsékleten tartva)
3. lombik: 100 cm^3 élesztőelegy+5 g glükóz+(+)35°C-ra történő felmelegítés
4. lombik: 100 cm^3 élesztőelegy+5 g glükóz+(+)50°C-ra történő felmelegítés
5. lombik: 200 cm^3 élesztőelegy+5 g glükóz+ (+)10°C-ra történő hűtés

- Mindegyik lombik nyakára húzzunk gumi léggömböt, amely meggátolja a CO_2 gáz távozását. 30 perc inkubációs idő után írjuk le tapasztalatainkat az öt lombikban zajló mikrobiológiai folyamatok vonatkozásában a gázfejlődés intenzitását figyelembe véve. Korábbi elméleti ismereteinkre támaszkodva próbáljuk magyarázni a tapasztalatainkat.
- Petri-csészébe vegyünk ki a 2. lombikból élesztőelegyet, majd fénymikroszkóp segítségével vizsgáljuk meg az élesztősejtek makrostruktúráját. A laboratóriumi gyakorlati füzetbe rajzoljuk le a látottakat.

Várható eredmények: Az élesztősejtek zimáz enzime felelős az erjedésért. Szőlőcukorból szén-dioxid és alkohol keletkezik.



A sejtek életműködéséhez az ideális hőmérséklet kb. 35°C, 45°C felett már elpusztulhatnak. A kísérlet alapján a glükóz alkalmas tápanyag az élesztő számára.

7.2. Tej feldolgozása joghurtta

Eszközök és anyagok: joghurtkészítéshez használatos mikrobiológiai oltóanyag (*Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*), pasztörözött tej, 1 db üveg főzőpohár (1500 cm³), analitikai hőmérő.

A gyakorlat menete: 1000 cm³ pasztörözött tejet töltsünk a főzőpohárba, melegítsük 40°C-hőmérsékletűre, majd adjuk hozzá az előkészített mikrobiológiai oltóanyagot. Az elegyet keverjük össze és helyezzük 35°C hőmérsékletű inkubációs kamrába 18 óra időtartamra.

- Az inkubációs idő elmúltával vizsgáljuk meg az elegy textúráját. Írjuk le az elegy kapcsán látott állapotváltozással kapcsolatos tapasztalatainkat! Korábbi elméleti ismereteinkre támaszkodva próbáljuk magyarázni a lezajlott mikrobiológiai folyamatokat.
- Petri-csészébe vegyünk ki az elegyből, majd fénymikroszkóp segítségével vizsgáljuk meg a sejtek makrostruktúráját. A laboratóriumi gyakorlati füzetbe rajzoljuk le a látottakat.

Várható eredmények: lásd Mikrobiológia I. kötet 18. fejezetében!

8. A VÉDŐOLTÁSOK TÍPUSAI

8.1. Általános tudnivalók

A vírusok nagy része hőhatásra elveszíti fertőzőképességét, a felület fehérjei denaturálódnak. Más részük, pl. a parvovírusok magasabb hőmérsékletet tartósan elviselnek.

A vírusok elleni védekezésben a legtöbb eredményt a vakcinák kidolgozásával érték el. A vakcinák kétfélék lehetnek, inaktivált, vagy élővírusos vakcinák. Első esetben olyan oltóanyagokról van szó, amelyeket fizikai vagy kémiai úton inaktiváltak, fertőzésre már nem képesek.

Az inaktivált vírusok a szervezetbe kerülve nem okoznak megbetegedést, de külső immunogén komponenseik antigénként viselkednek, és kiváltják a szervezet védekezési reakcióit. Az újabb vakcinák már csak a virion tisztított, antigén hatású fehérjeit tartalmazzák.

Az élővírusos vakcinák csökkent megbetegítőképességű, ún. attenuált kórokozók. A szervezetben gyenge megbetegedést okoznak, de felszaporodásuk révén aktiválják a szervezet immunrendszerét. A csökkentett virulencia nem fogékony állatokon történő sorozatos passzálassal (átoltással), vagy szövettényészetekben való átoltással is kialakítható.

Az immunizáció, mint tudjuk, lehet **természetes** és **mesterséges** – ez utóbbi csoportba tartoznak a védőoltások – mindkét típus lehet *aktív* és *passzív*.

Előbbi esetében akkor beszélünk *aktív* immunizálásról, ha a betegség átvészélése megtörténik. *Passzívról* pedig azokban az esetekben, ha az ellenanyagok az anyatejjel jutnak be a szervezetbe.

A mesterséges immunizálás során akkor beszélünk a *passzív* változatról, amikor a védőoltással már kész ellenanyagokat juttatnak be a szervezetbe. Az *aktív* változat esetén a védőoltással az élő, de legyengített kórokozót, vagy előlt/inaktivált kórokozót, vagy nem az egész kórokozót, hanem csak egy részét (alegység vakcina), vagy a baktérium által termelt toxoidot juttatják a szervezetbe stb.

8.2. Védőoltások típusai

a) Élő, de legyengített kórokozót tartalmazó védőoltások (a szervezetbe jutva szaporodnak és a természetes fertőzéshez hasonló folyamatot utánozva váltják ki hosszantartó hatásukat):

- BCG (tuberkulózis), kanyaró-mumpsz-rózsahimlő (MMR), bárányhimlő (*varicella*), rotavírus elleni védőoltások,
- Sárgaláz (csak kijelölt oltóhelyek adhatják).

b) Nem élő kórokozót tartalmazó védőoltások (az oltással bevitt aktív összetevő a szervezetben nem szaporodik, és jellemzően ismételt oltásokkal (alapimmunizálás és emlékeztető oltás) váltható ki a megfelelő védelem).

Aktív összetevőjük szerint lehetnek:

- teljesen elölt / inaktivált kórokozót tartalmazó vakcinák (pertusszisz, kolera, hepatitis A-vírus, gyermekbénulás – IPV), veszettség, kullancs encephalitis, influenza);
- a kórokozók részleteit tartalmazó vakcinák (acelluláris pertusszisz);
- géntechnológiával előállított kórokozórészletet tartalmazó vakcinák (hepatitis B-vírus, Humán Papillomavírus – HPV);
- a baktériumok tokjának részletét tartalmazó vakcina (*Pneumococcus*, *hastífusz*);
- a baktériumok tokjának részletét tartalmazó, kapcsolt fehérjével javított hatású vakcina (*Pneumococcus*, *Meningococcus*);
- gyengített, hatástalanított méreganyagot (toxoidot/anatoxint) tartalmazó vakcinák (diftéria, tetanusz, kolera);
- a kórokozók fehérjéit kódoló genetikai részletet (ún. mRNS-t) tartalmazó vakcinák (egyes koronavírus-vakcinák);
- ún. vírusvektort tartalmazó vakcinák, amelyekben a kórokozó genetikai részleteit egy másik vírus külső burka segítségével juttatják a sejtbe (egyes koronavírus-vakcinák).

8.3. Ukrajnában kötelező/ajánlott védőoltások

Az Ukrán Egészségügyi Minisztérium által előírt oltási naptár szerint:

- **Hepatitis B:** a születéstől számított 24 órán belül, utána a 2 és a 6 hónaposan. A **hepatitis B** fertőző májgyulladás (sárgaság). A kórokozó egy parányi vírus, mely főként vér útján és kisebb-nagyobb hámsérüléseken keresztül jut be a szervezetbe. Fontos, hogy a vírus képes beépíteni örökítőanyagát a gazdasejteként használt májsejtek DNS-ébe. Ennél fogva a vírus már nem tüntethető el a szervezetből. Az immunrendszer gyengülésekor újból aktiválódni tud.
- **TBC:** egy oltás a 3. és az 5. életnap között. A **TBC** okozója a *Mycobacterium tuberculosis*, mely cseppfertőzés útján terjed. A betegség jellemzően a tüdőben specifikus gyulladással kezdődik (gümő), de lényegében az egész szervezetre kiterjedhet.
- **Kanyaró, mumpsz, rubeola:** 12 hónapos és 6 éves korban. A **kanyaró** ragályos fertőző betegség, amelyre lázas, hurutos bevezető szakasz és az azt követő kiütéses fázis jellemző. Kórokozója a *Paramyxovirusok* családjába tartozó vírus. Elsősorban cseppfertőzéssel terjed. A vírus a légutakon, esetleg a szem kötőhártyáján keresztül kerül a szervezetbe, majd a hámsejtekben és a környező nyirokcsomókban szaporodik. Több fázisban egyre nagyobb mennyiségű kanyaróvírus kerül a véráramba, a kórokozók elárasztják az egész szervezetet. A **mumpsz** egy gyermekkori fertőző betegség, amely a fültőmirigy és a többi nyálmirigy egy- vagy kétoldali fájdalmas duzzanatával jár. Kórokozója a *Paramyxovirus parotitidis* vírus, mely cseppfertőzéssel terjed. A **rubeola** vagy **rózsahimlő** egy enyhe, gyermekkori kiütéses betegség, amelyet a rubeolavírus okoz. Cseppfertőzéssel, közvetlen érintkezéssel, ritkábban a beteg váladékával frissen szennyezett tárgyak révén terjed. A vírus a felső légutak nyálkahártyáján és a nyaki nyirokcsomókban szaporodik. A vírus különleges képessége, hogy átjut a méhlepényen, így a magzatra is veszélyes a várandósság 20-ik hete előtt.

- **Diftéria (torokgyík), tetanusz:** 2, 4, 6 és 18 hónaposan, továbbá 6 és 16 évesen. A naptár szerint beoltott felnőttek diftéria és tetanusz elleni újraoltásra szorulnak 10 évente: 26, 36, 46, 56 stb. korban. A **diftéria** vagy **torokgyík** kórokozója a *Corynebacterium diphtheriae* leggyakrabban a torokban, ritkábban az orrban, a gégén, a köthártyán, a nemi szervek nyálkahártyáján telepszik meg és ott helyi fertőzést okoz. A behatolás helyén a hámsejtek elhalnak és ún. álhártya-képződéssel járó gyulladás alakul ki. Súlyos szövödmény, ha a kórokozó toxint termel – a toxin súlyos szívizom-károsodást és perifériás ideggyulladást (neuritis) okoz – illetve, ha az álhártya a gégeben jelenik meg, ez fulladáshoz vezethet. A **tetanusz** egy a *Clostridium tetani* baktérium okozta fertőzés, amely sérülések, balesetek során jut be a keringésbe. A tetanuszt és az azzal járó merevgörcsöt a baktérium toxinja, a tetanospazmin okozza. Ez az acetilkolin lebomlását gátolja, mely vegyület azért felelős, hogy a mozgatóideg az izomban összehúzódást váltson ki.
- **Szamárköhögés:** 2, 4, 6, 18 hónaposan. A **szamárköhögés** vagy **pertussis** tágabban értelmezve különböző kórokozók által okozott tünetegyüttes (szindróma), amelyet rohamokban jelentkező jellegzetes köhögés, hetekig elhúzódó kórlefolyás jellemez. A pertussis létrehozásában a *Bordetella* nevű baktériumcsoportba tartozó alfajok: a *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* és *B. holmesii* játszanak szerepet.
- **Gyermekbénulás:** inaktivált vakcina – 2 és 4 hónapos korban, orális vakcina – 6 és 18 hónapos korban, majd 6 és 14 éves korban. A **gyermekbénulás** vagy **poliomyelitis-szindróma** jellegzetes, vírusok által okozott tünetegyüttes, amelynek lényege, hogy a gerincvelőben elhelyezkedő mozgató idegsejtek elpusztulnak. Kórokozói a *poliovírus* 1-es, 2-es és 3-as típusai, melyek főként a széklet útján, kisebb mértékben cseppfertőzéssel terjednek, közvetlen érintkezéssel, fertőzött élelmiszerek, tárgyak és szennyvíz közvetítésével.

- **Haemophilus-fertőzés:** 2, 4 és 12 hónapos korban. A **Haemophilus-fertőzés** kiváltó oka a *Haemophilus influenzae* baktérium. A kórokozó főként cseppfertőzés útján terjed emberről emberre, az orr- és torokváladékban hetekig, akár hónapokig is jelen lehet anélkül, hogy tüneteket okozna. Gondot főképp akkor okoz, ha bejut a véráramba vagy az agyhártyákra, a tüdőbe, esetleg egyéb szervekbe. A krónikus hörghurutoknak 30-40 százalékát okozza ez a kórokozó.

FELHASZNÁLT ÉS AJÁNLOTT SZAKIRODALOM

- BIRÓ S. – HORNOK L. – KEVEI F. – KUCSERA J. – MARÁZ A. – PESTI M. – SZÜCS GY. – VÁGVÖLGYI CS. (2001): Általános mikrobiológia. Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs, 308 p.
- FEKETE M. (2004): Mikrobiológia I. (Általános mikrobiológia) távoktatási jegyzet, Hódmezővásárhely, 57 p.
- POSTA K. – LAKINÉ SASVÁRI Z. – PETHŐNÉ RÉTHÁTI B. – MAYER Z. (2017): Mikrobiológia gyakorlati jegyzet a Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar hallgatói részére. Szent István Egyetem, Gödöllő, 62 p.
- SZABÓ I.M. (1998): A bioszféra mikrobiológiája I, II, III. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- АБРАТ, О.Б. (2016): Методичні вказівки до лабораторних робіт з навчальної дисципліни Мікробіологія. ДВНЗ Прикарпатський Національний Університет Імені Василя Стефаника, Івано-Франківськ, 70 с.
- ВЕКІРЧИК, К. (2002): Мікробіологія з основами вірусології: Навчальний посібник. ЦУЛ, 312с.
- ВЕКІРЧИК, К. (2002): Практикум з мікробіології: Навчальний посібник, ЦУЛ, 144 с.
- КЛИМНЮК, С.І. – СИТНИК, І.О. – ШИРОБОВ, В.П. – ТВОРКО, М.С. – ТКАЧУК, Н.І. – РОМАНЮК, Л.Б. – ПОКРИШКО, О.В. – ПОНЯТОВСЬКИЙ, В.А. (2018): Мікробіологія. Навчальний посібник до практичних занять для студентів закладів вищої освіти МОЗ України, Нова Книга, Вінниця, 27 с.
- ЛЮТА, В.А. (2001): Мікробіологія з основами вірусології та імунології: Підручник. ЦУЛ, 2001. 280с.
- ПРОТЧЕНКО, П. (2002): 3. Загальна мікробіологія, вірусологія, імунологія: Навчальний посібник. ЦУЛ, 298с.
- СИТНИК, І.О. (2000): Загальна мікробіологія, вірусологія, імунологія: Підручник. ЦУЛ, 392 с.

К 19 Степан Коложварі– Ласло Широкаї-Кудрон– Леонард Іллар: Практичний посібник для мікробіології.

Науково-методичне видання Науково-дослідного центру ім. Іштвана Фодора і Кафедри біології та хімії при Закарпатському угорському інституті ім. Ференца Ракоці II / Редактори: Степан Коложварі, Ласло Широкаї-Кудрон та Леонард Іллар – Берегове: ЗУІ ім. Ф.Ракоці II 2024. – 0 с. (угорською мовою)

Видання допомоги студентам біологічних та природничих спеціальностей (Закарпатського угорського інституту ім. Ференца Ракоці II) у вивченні мікробіології.

Науково-методичне видання
Науково-дослідного центру ім. Іштвана Фодора і Кафедри біології та хімії
Закарпатського угорського інституту ім. Ференца Ракоці II

Мікробіологія II
(методичні вказівки до практичних робіт)
2024 р.

Рекомендовано до друку Вченою радою Закарпатського угорського інституту
ім. Ф.Ракоці II (протокол № 22 від 26. серпня 2024 р.)

Підготовлено Видавничим відділом спільно з кафедрою біології та хімії, і Науково-
дослідним центром ім. Іштвана Фодора Закарпатського угорського інституту ім.
Ференца Ракоці II

Редактори:
Степан Коложварі, Ласло Шірокаї-Кудрон та Леонард Іллар

Рецензенти:
Ержебет Козут - Закарпатський угорський інститут імені Ференца Ракоці
II, Кафедра біології та хімії, завідувач кафедри, доцент
Єва Андрик - Закарпатський угорський інститут імені Ференца Ракоці II,
Кафедри біології та хімії, завідувач кафедри, доцент / Науково-дослідний
центр імені Іштвана Фодора, науковий співробітник

Технічне редагування та верстка: *Ласло Шірокаї-Кудрон, Степан Коложварі*
Обкладинка: Степан Коложварі

Видавництво: Закарпатський угорський інститут ім. Ференца Ракоці II
(адреса: пл. Кошута 6, м. Берегове, 90202. Електронна пошта: foiskola@kmf.uz.ua)
*Статут «Закарпатського угорського інституту ім. Ференца Ракоці II» (Прийнято
Загальними зборами ЗУІ ім. Ф.Ракоці II, протокол №2 від 11.11.2019 р.,
зарєєстровано в реєстрі за №6179 приватним нотаріусом І.В. Мацолюю).*