**ЗАКАРПАТСЬКИЙ УГОРСЬКИЙ ІНСТИТУТ ІМЕНІ ФЕРЕНЦА РАКОЦІ ІІ**

**II. RÁKÓCZI FERENC KÁRPÁTALJAI MAGYAR FŐISKOLA**

**Кафедра біології та хімії**

**Biológia és Kémia Tanszék**

**МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ / MÓDSZERTANI ÚTMUTATÓ**

до практичних (семінарських) робіт / gyakorlati (szemináriumi) munkákhoz

*Молекулярна мікробіологія та мікробіологія довкілля / Környezeti mikrobiológia*

(назва навчальної дисципліни / a tantárgy neve)

Перший (бакалаврський) / Alapképzés (BSc)
(ступінь вищої освіти / felsőoktatás szintje)

*01 Освіта/Педагогіка* / *01 Oktatás/Pedagógia*
(галузь знань / képzési ág)

*Середня освіта* / *Középiskolai oktatás*
(освітня програма / képzési program)



Берегове / Beregszász
2022р. / 2022

Методичні вказівки розроблені на основі діючого законодавства України та Стандартів вищої освіти за спеціальністю 014 «Середня освіта (Біологія та здоровʹя людини)» для першого (бакалаврського) рівня вищої освіти, з метою забезпечення студентів методичними вказівками до практичних/семінарських занять з курсу «*Молекулярна мікробіологія та мікробіологія довкілля*» для студентів денної та заочної форм навчання. У методичних вказівках розгладається хід практичних/семінарських занять з завданнями та містять загальні теоретичні матеріали курсу.

Затверджено до використання у навчальному процесі
на засіданні кафедри біології та хімії ЗУІ ім. Ф. Ракоці ІІ
(«27» вересня 2021 року, протокол № 2.)

Рекомендовано до видання в електронній формі (PDF)
рішенням Вченої ради Закарпатського угорського інституту ім. Ф.Ракоці ІІ
(протокол № 9 від 30 вересня 2021р.).

Розробники методичних вказівок:

*Аттила* *Молнар* – науковий співробітник кафедри біології та хімії Закарпатського угорського інституту імені Ференца Ракоці ІІ

*Степан* *Коложварі* – доктор філософії, доцент кафедри біології та хімії Закарпатського угорського інституту імені Ференца Ракоці ІІ

*Іллар Леонард* – викладач кафедри біології та хімії Закарпатського угорського інституту імені Ференца Ракоці ІІ

За зміст методичних вказівок відповідальність несуть розробники

Відповідальний за випуск:

*Ержебет Когут* – доктор філософії, доцент кафедри біології та хімії Закарпатського угорського інституту імені Ференца Ракоці ІІ, завідувач кафедри

Видавництво: Закарпатський угорський інститут імені Ференца Ракоці II (адреса: пл. Кошута 6, м. Берегове, 90202. Eлектронна пошта: foiskola@kmf.uz.ua)

**© Розробники методичної казівки, 2022**

**© Кафедра біології та хімії ЗУІ ім. Ф. Ракоці ІІ, 2022**

A módszertani kiadvány a hatályban lévő törvényi háttér és a 014 „Középfokú oktatás (Biológia és az ember egészsége)” szakirányú felsőoktatási standart alapján készült el a bachelor szint számára; annak érdekében, hogy ellássuk a nappali és levelező tagozatos diákokat módszertani útmutatókkal a gyakorlati/szemináriumi órák lebonyolításához környezeti mikrobiológia tárgyból. A módszertani útmutató tartalmazza a gyakorlati/szemináriumi órák menetét feladatokkal, és röviden összefoglalja az elméleti anyagot.

Az oktatási folyamatban történő felhasználáshoz jóváhagyta
a II. Rákóczi Ferenc Kárpátaljai Magyar Főiskola Biológia és Kémia Tanszéke
(2022. augusztus 29., 1. számú jegyzőkönyv).

Elektronikus formában (PDF fájl formátumban) történő kiadásra javasolta
a II. Rákóczi Ferenc Kárpátaljai Magyar Főiskola Tudományos Tanácsa
(2021. szeptember 30., 9. számú jegyzőkönyv).

A módszertani útmutató kidolgozói:

*Molnár Attila* – a II. Rákóczi Ferenc Kárpátaljai Magyar Főiskola Biológia és Kémia Tanszékének tudományos munkatársa

*Kolozsvári István* – Ph.D., a II. Rákóczi Ferenc Kárpátaljai Magyar Főiskola Biológia és Kémia Tanszékének docense

*Illár Lénárd* – a II. Rákóczi Ferenc Kárpátaljai Magyar Főiskola Biológia és Kémia Tanszékének oktatója

A módszertani útmutató tartalmáért kizárólag az útmutató kidolgozói felelnek.

A kiadásért felel:

*Kohut Erzsébet –* Ph.D., a II. Rákóczi Ferenc Kárpátaljai Magyar Főiskola Biológia és Kémia Tanszékének docense, tanszékvezető

Kiadó: a II. Rákóczi Ferenc Kárpátaljai Magyar Főiskola (cím: 90202, Beregszász, Kossuth tér 6. E-mail: foiskola@kmf.uz.ua)

**© A módszertani útmutató kidolgozói, 2022**

**© A II. RF KMF Biológia és Kémia Tanszéke, 2022**

**Тематика до практичне занять**

**з Молекулярна мікробіологія та мікробіологія довкілля**

**для студентів 5-го курсу спеціальності біологія**

**Gyakorlati foglalkozások tematikája Környezeti mikrobiológia tantárgyhoz**

**a V/1 évfolyamos biológia szakos hallgatók részére**

|  |  |
| --- | --- |
| 1 | A gyakorlat követelményei. Munkavédelmi szabályok. |
| 2 | Mikroorganizmusok tenyésztése. A mikroorganizmusok tenyésztéséhez használt tápközegek fő típusai. |
| 3 | Táptalajok beoltása különböző helyekről származó mintákkal. |
| 4 | A táptalajokon kifejlődött telepek morfológiájának vizsgálata. Izolátumok készítése. |
| 5 | Festési eljárások a mikrobiológiában. A Gram festés. |
| 6 | A levegő mikrobiológiája. A víz mikrobiológiája. |
| 7 | A talaj mikrobiológiája. Vinogradszki henger készítése. |
| 8 | A leadandó munkák ellenőrzése. Záró dolgozat. |

**1. A gyakorlat követelményei. Munkavédelmi szabályok.**

**A gyakorlat célja:** Az alapvető és általános mikrobiológiai ismeretek környezettudományokkal való kapcsolatainak feltárása. A gyakorlatok során a hallgatók megismerkednek a mikrobiológiai laboratórium működésének alapelveivel (általános viselkedési és munkavédelmi szabályok). A baktériumok kimutatásának (direkt, indirekt) és vizsgálatának (kenetkészítés, egyszerű és összetett festési eljárások, mikroszkóp-használat, táptalajkészítés, sterilizálási módszerek, baktérium-izolálás, a baktériumok genus és fajszintű azonosítása) módszereivel, amely során baktérium-tenyésztésre és az általános bakteriológiai laboratóriumi munkák elvégzésére is nyílik lehetőség. A gyakorlat során a hallgatók megismerik a természetben leginkább elterjedt mikrobákat.

**A gyakorlat követelményei:** A gyakorlat során a hallgatóknak minden gyakorlati alkalmon részt kell vennie, és a záró dolgozatot sikeresen (60 % fölötti eredmény) kell teljesítenie. Ezen kívül a következő leadandó munkákat kell mindenkinek leadni:

* referátum készítése egy a természetben általánosan elterjedt mikrobáról, mely vagy víz, vagy levegő vagy talaj segítségével terjed.
* gyakorlati jegyzőkönyv leadása;
* kiselőadás megtartása az alább felsorolt témák egyikéből:

|  |
| --- |
| Sterilizálási eljárások a laboratóriumokban |
| A biogeokémiai ciklusokban részt vevő mikrobák |
| Vízben terjedő kórokozók |
| A szennyvíz-tisztítás mikrobiális folyamatai. |
| A bakteriológiai vízminősítés |
| Levegőben terjedő kórokozók |
| Extremofil mikrobák |
| A komposztálás és mikrobiális folyamatai |
| Szimbiózisban élő baktériumok |
| Mikrobák az élelmiszeriparban |

**Munkavédelmi szabályok a mikrobiológiai laboratóriumokban**

Irányelvek a biztonságos laboratóriumi gyakorlathoz:

* Mindig viseljen megfelelő egyéni védőeszközöket. Váltson kesztyűt, és dobja ki a használtat, ha az más laboratóriumi vizsgálatok során szennyezett lett. Csökkentse minimálisra a kontamináció lehetőségét.
* Mosson kezet munka után, és a laboratórium elhagyása előtt is a fertőzésveszély miatt.
* Nem szabad enni, inni, dohányozni, kontaktlencsét és kozmetikumokat viselni, és emberi fogyasztásra szánt élelmiszereket tárolni a laboratóriumban.
* Kövesse az intézményi szabályzatban foglaltakat a vágó, szúró eszközök biztonságos kezelését illetőleg. (tűk, szikék, pipetták és törött üveg).
* Ügyeljen arra, hogy minimálisra csökkentsék az aeroszolok és / vagy fröccsenő anyagok létrehozását a kísérletek alatt, és ha valami kiömlik vagy lecsöppen, azonnal törölje fel, és fertőtlenítse le mivel ezen anyagok a potenciálisan fertőzőnek minősülnek. Rutinszerűen kell tisztítani a laboratóriumi berendezéseket, akkor is, ha nem szennyezettek.
* Fertőtlenítse az összes fertőzésveszélyes anyagot annak ártalmatlanítása előtt.
* Jelentsen a megfelelő gyakorlatvezetőnek minden olyan eseményt, amelyek eredményeként fertőzésveszély következhet be.

***A munkavédelmi szabályokat megértettem és tudomásul vettem, a felelősséget vállalom.***

Aláírás:…….…………………………….

**2. Mikroorganizmusok tenyésztése. A mikroorganizmusok tenyésztéséhez használt tápközegek fő típusai.**

A tenyésztéses módszerek egyrészt lehetőséget teremtenek mikroorganizmusok különböző célra történő fenntartására és elszaporítására, másrészt ezen eljárások segítségével megoldható egyes mikrobacsoportok vagy fajok jelenlétének kimutatása. Ugyancsak ezen módszerek képezik az élősejtszám-meghatározás alapját.

A mikroorganizmusok szaporodásának feltétele a megfelelő tápanyagellátás és környezeti tényezők (hőmérséklet, pH, redoxpotenciál, vízaktivitás) biztosítása. Laboratóriumi körülmények között ezt a célt szolgálják a különböző összetételű tápközegek, amelyekkel a vizsgált mikrobák tápanyag-, pH-, vízaktivitás- és redoxpotenciál-igénye kielégíthető. A szükséges hőmérséklet termosztátokkal állítható be.

**TÁPKÖZEGEK**

**l. A táptalajok összetétele**

A táptalajoknak tartalmazniuk kell mindazokat az anyagokat, amelyekre a mikroorganizmusoknak szüksége van, és amelyeket maguk szintetizálni nem képesek. **Feltétlenül szükséges táptalajkomponensek:**

***Víz:*** A 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 asszimilatív oxidációs folyamataik révén 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 eltér, s ez a tulajdonság vizsgálata a mikroorganizmusok azonosításának igen fontos lépése. A leggyakrabban használt szén- és energiaforrások az egyszerű cukrok (glükóz, laktóz stb.), a pepton és a húskivonat. (E két utóbbi egyben nitrogénforrás is.)

***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 különböző nitrogénforrások eltérő hasznosíthatósága - hasonlóan a szénforrásokhoz - diagnosztikai célokra kihasználható. 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 transzportfolyamatai révén, valamint kofaktorként az enzimaktivitás szabályozásában. A mikroorganizmusok ásványianyag-igényét gyakran a csapvíz is kielégíti, de a szervetlen foszforvegyületeket - a makroerg foszfátkötések révén a sejt energiaforgalmában betöltött döntő szerepe miatt - megfelelő mennyiségben a táptalajhoz kell adni.

**Feltételesen szükséges táptalajkomponensek:**

***Vitaminok, biosz anyagok:*** 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 hidrogénakceptorok:*** 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.

**2. A táptalajok csoportosítása**

***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 kvantintitative és kvalitative is ismerjük. Hátrányuk, hogy igen drágák.

***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 félszintetikus táptalajokat **leves**eknek nevezzük, a szintetikus táptalajokat pedig **tápoldat**nak. A **szilárd táptalaj**ok a folyékony táptalajokból származtathatók szilárdítóanyagok (agar, zselatin, szilikagél) hozzáadásával. Régebben a zselatin volt a legelterjedtebb szilárdítóanyag, 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 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.

***2.3. A táptalajok csoportosítása a felhasználás célja szerint***

**Alaptáptalajok:** Az alaptáptalajok olyan médiumok, amelyek összetételüknél fogva általánosan (de nem univerzálisan) használhatók, a szaporodáshoz szükséges tápanyagokon kívül más speciális anyagot nem tartalmaznak.

**Elektív táptalajok:** olyan táptalajok, amelyekben összetételüknél fogva csak bizonyos mikrobacsoportok képesek szaporodni, így azok a környezetükben élő kísérő mikroflórából kiemelhetők.

**Szelektív táptalajok:** A szelektív táptalajok olyan kiegészítő komponenst tartalmaznak, amelyek egyes mikrobacsoportok szaporodását gátolják (festékek, szulfonamidok, antibiotikumok 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. 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 táptalajok.

**3. A táptalajok és hígítófolyadékok készítése és tárolása**

Táptalajok és hígítófolyadékok készítéséhez csak kifogástalan minőségű és tisztaságú, bakteriológiai célokra alkalmas alapanyagok használhatók fel. A hőkezelés nélkül felhasználásra kerülő alapanyagokat aszeptikusan kell kezelni. Az alapanyagokat tisztán tartott, száraz, rovaroktól és rágcsálóktól mentes helyiségben kell raktározni. A higroszkópos anyagokat légmentesen zárható edényben kell tárolni. A beméréseket tiszta eszközökkel, analitikai körülmények között kell elvégezni.

A táptalajokat és hígítófolyadékokat csak tiszta, hőálló üvegedényben, rozsdamentes acélból készült vagy hibátlan tűzzománcos edényben szabad elkészíteni. A készítés során az alábbi műveleti sorrendet kell betartani:

* az alapanyagok előkészítése, - az alapanyagok bemérése,
* az alapanyagok oldása a receptekben megadott sorrend szerint, állandó keverés közben,
* pH-ellenőrzés, szükség szerint beállítás - kiegészítés végső térfogatra,
* agar táptalajoknál a szilárdsági próba elvégzése, - kiszerelés,
* sterilezés.

A táptalaj ill. hígítófolyadék pH-mérése hőmérsékletkompenzációs pH-mérővel történjen, a pH-beállítását 1 n NaOH-, ill. HCI-oldattal kell végezni.

A táptalajok és hígítófolyadékok többségét telített, túlnyomásos gőzzel, 115-121 °C-on autoklávban kell sterilezni 15 percig. A behatási időt attól az időponttól kell számítani, amikor a munkatér hőmérséklete az adott nyomásnak megfelelő értéket elérte. Csavaros kupakkal záródó palackok sterilezése előtt a zárókupakot meg kell lazítani, majd az autoklávból történő kiszedés után szorosra meg kell húzni. A rakomány felmelegítése minél gyorsabb legyen, ,a sterilezés után a túlnyomás megszüntetését viszont lassan kell végezni. Az autokláv ajtaját csak akkor szabad kinyitni, ha a táptalajok hőmérséklete már 70-80 °C-ra lehűlt.

Bizonyos táptalajokat frakcionált sterilezésnek kell alávetni, tehát három egymás után következő napon 80-85 °C-os hőmérsékleten 1-2 óra hosszat hőkezelni. A hőkezelés közötti idő alatt a táptalajokat a spórák germinációjának elősegítése céljából szobahőmérsékleten kell tartani.

Olyan táptalajokat vagy táptalaj-alapanyagokat, amelyeket még 80-85 °C-on sem lehet hőkezelni, szűréssel (0,2-0,45 μm pórusnagyságú membránszűrő) kell sterilezni.

A nagyobb mennyiségben elkészült táptalajokat általában literes térfogatú, papírvatta-dugóval lezárt üvegekben kell tárolni. Az üvegben tárolt táptalajokat áramló gőzben kell felolvasztani, és a még szükséges összetevők hozzáadása után további hevítés nélkül mielőbb szétmérni. Csak annyi alaptáptalajt szabad felolvasztani, amennyire szükség van; az ismételt felolvasztás a táptalajt károsíthatja!

Az agar táptalajok hőmérséklete a lemezekbe történő kiöntés alatt a kondenzvíz képződés csökkentése érdekében 60 °C-nál nagyobb ne legyen.

Az agar táptalajokból a szokványos Petri-csésze aljába kb. 20 ml-t kell önteni.

A táptalajokat általában hűtőszekrényekben, 4-8 °C-on kell tárolni. A Petri-csészébe fejtett szilárd táptalajokat fordított helyzetben, kell a hűtőszekrénybe helyezni. Kiszáradt, elszíneződött, vagy baktériumos szennyeződés jeleit mutató táptalajokat nem szabad felhasználni. A táptalaj készítésének napját a gyűjtőkosáron, ill. az egyedi táptalajedényen fel kell tüntetni. A hűtőszekrényben tárolt táptalajokat beoltás előtt szobahőmérsékletre kell felmelegíteni.

**TENYÉSZTÉSI MÓDSZEREK**

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.

Inokulálásról, beszélünk, ha a vizsgálati anyag egy részével (inokulum) beoltjuk a szaporításra szolgáló táptalajt. Minden olyan esetben, amikor hígítófolyadékból vagy tápközegből viszünk mikroorganizmust a szaporítást szolgáló táptalajra (törzsfenntartás, tiszta tenyészet készítése stb.), átoltásról beszélünk.

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 tenyészteni 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 mikroaerofiléknek nevezzük.

**l. 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. Nagyobb térfogatú folyadéktenyészeteknél a nyugvó folyadék felületén át történő oxigénátadás már nem elegendő, ezeket a tenyészeteket rázatással vagy steril levegővel történő buborékoltatással kell "levegőztetni". Ezt a célt szolgálják a laboratóriumi rázógépek, vagy rázóvízfürdők, illetve a fermentorok, amelyek segítségével az intenzív oxigén-bevitel biztosítható.

**2. Anaerob tenyésztési eljárások**

Az obligát anaerob baktériumok -330 mV-nál magasabb redoxpotenciálú környezetben nem szaporodik. Az atmoszférikus levegővel egyensúlyban lévő vízben a redoxpotenciál +800 mV. Anaerob tenyésztési körülmények eléréséhez tehát a redoxpotenciált csökkenteni, kell. A redoxpotenciál csökkenthető az oxigén kizárásával, vagy redukálóanyagok hozzáadásával. A levegő kiszorításának egyik legegyszerűbb módja a tápközeg fedése paraffindugóval, vagy paraffnolajjal. Ezt az eljárást kémcsőben készített tenyészetek esetén célszerű alkalmazni. Agarlemezek esetében célszerűbb az un. anaerob edények alkalmazása. Az anaerob edények olyan légmentesen zárható edények, amelyekből az oxigént kémiai úton (pl. pirogalluszsav és kálium-hidroxid összekeverésével) vonjuk el. Az edénybe az anaerob körülmények meglétének ellenőrzése céljából redoxindikátorral átitatott szűrőpapírt, kell helyezni.

Nagy mintaszámmal dolgozó laboratóriumok esetében a legcélszerűbb az anaerob termosztát használata. Az anaerob termosztát légmentesítése a levegő kiszivattyúzásával, vagy kémiai úton az oxigén vízzé alakításával hidrogén jelenlétében palládium katalizátor segítségével történik.

A táptalajhoz adott redukaló hatású adalékanyagként leggyakrabban merkapto-, vagy szulfhidril csoportot (-SH) tartalmazó anyagot (marhamáj, darált hús, cisztein, nátrium-tioglikolát) adunk.

**Milyen típusú táptalajok használhatók elsősorban a környezeti mikrobiológiai vizsgálatok során? Kérem indokolja meg válaszát!**

**3. Táptalajok beoltása különböző helyekről származó mintákkal.**

A baktériumok vizsgálata során a steril táptalajokat „megfertőzzük”, beoltjuk valamilyen nem steril anyaggal. Ezt az anyagot a táptalajra juttatva inkubáljuk a tenyészetet, azaz megfelelő körülmények között engedjük őket szaporodni, hogy telepeket képezhessenek, melyek egyértelműen azonosíthatóak. A tapasztalatok alapján a csíraszám a következőképpen szokott alakulni az idő függvényében:



Az inkubációs idő után a táptalajon megjelennek a mintában jelen lévő baktériumok telepei, melyek már vizsgálhatókká válnak. A telepekről tiszta tenyészeteket lehet készíteni, melyek a mikrobiológiai vizsgálatok alapját képezik.

Az elektív, szelektív és differenciáló táptalajok alkalmazásával csak mikroorganizmusok egy-egy szűkebb csoportját tudjuk elkülöníteni, de ezek teljes körű 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 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 legelterjedtebb forma az elektív, szelektív vagy, differenciáló, folyékony, vagy szilárd táptalajból alaptáptalajra történő átoltás ritkító szélesztéssel. A ritkító szélesztés célja olyan "vonáskultúra" készítése, melynek eredményeként az inkubálást követően szoliter telepeket is kapunk. A ritkító szélesztés technikáját az alábbi rajz mutatja:

**Szükséges anyagok és eszközök:**

oltókacs, agarlemezek, fültisztító pálcikák, vatta, Bunsen-égő, tömény alkohol, alkoholos filc.

**A gyakorlat menete:**

A gyakorlat során a steril, korábban elkészített agarlemezekre különböző felületekről származó mintákat oltunk rá, hogy kiderüljön, milyen gazdag mikroflórával rendelkeznek a különböző helyről származó víz, szálló por és talajminták.

Első lépésként vegyünk ki a hűtőből annyi agarlemezt, amennyit használni szeretnénk. Az agarlemez összeállításánál a következő receptet használták:

* …. g Agar
* …. g pepton vagy kazein
* …. g NaCl
* …. g szacharóz
* ………………………………
* ………………………………

Ezeket rakjuk ki a lamináris box munkafelületére. Ezek után a frissen kinyitott fültisztító pálcikák segítségével vegyünk kenetet különböző felületekről, illetve a szálló por begyűjtésére helyezzünk el egy-egy felnyitott Petri-csészét az ablakon kívül és belül is. A keneteket egyenként dörzsöljük rá az agarlemezekre, és alkoholos filc segítségével jelöljük meg azokat, hogy a későbbiekben ne keverjük össze őket. A bedörzsölés során a korábban bemutatott mintázatot kövessük:

A beoltott mintákat kb 37 °C-on inkubáljuk 2 napig.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Ssz** | **A minta kódja** | **Mintavétel helye** |
| **1** |  |  |
| **2** |  |  |
| **3** |  |  |
| **4** |  |  |
| **5** |  |  |
| **6** |  |  |
| **7** |  |  |
| **8** |  |  |
| **9** |  |  |
| **10** |  |  |

**Megfigyelések:**

**4. A táptalajokon kifejlődött telepek morfológiájának vizsgálata. Izolátumok készítése.**

A makroszkopikus jellemzők alatt a mikroorganizmusok tenyészetének alaki jellemzőit értjük. Kiterjedhetnek a szilárd táptalajok felületén kifejlődött telepek (kolóniák) jellemzőire, valamint a folyékony, esetleg félfolyékony vagy gélszerű tápközegekben kialakuló tenyészetek jellemzőire.

Jellemző teleptulajdonságok:

- A telep mérete: egyes baktériumok (pl.: *Thiobacillusok*) igen apró telepeket képeznek, ellenben a csillókkal rendelkező mozgékony baktériumok (pl.: *Bacillus subtilis*) a lemez egész felületét beboríthatják. Nagy telepszám esetén a telepek mérete kisebb a táplemezbe jutó anyagcseretermékek gátló hatása miatt. Azonos tenyésztési körülmények és telepszám esetén a telepek mérete jellemző az adott mikroorganizmusra.

- A telep szélének és belső szerkezetének alakulása: egy telepen belül eltérő korú sejtek találhatók. Idősebb telepeknél a középső rész kráterszerű horpadást mutathat az elöregedett sejtek autolízise folytán. Gyűrűs felszínű telepek kialakulása valamelyik környezeti tényező periodikus változására vezethető vissza. Több mikroorganizmus fajnál különböző variánsok, azonos körülmények között, eltérő felületű és szerkezetű telepeket képeznek. Így megkülönböztethetünk "S" (smooth) sima telepeket és "R" (rough) érdes telepeket, valamint "M" (mucous) nyálkás telepeket. A telepképzési eltérések a tokképzésben, mozgékonyságban és virulenciában fennálló különbségeket tükrözik.

- A telepek színe: a mikrobák gyakran termelnek pigmentanyagokat, melyek vagy csak a telepet színezik el, vagy a táptalajba diffundálva a telep környezetét is elszínezik. Leggyakrabban sárga, piros és barna szín fordul elő.

- A telepek mozgása: néhány baktériumnál a telepek mozgása figyelhető meg. Pl. a *Bacillus alvei*és *Bacillus helixoides* esetében 14 mm/óra sebességű mozgást észleltek. A mozgó telepek után gyakran árok marad vissza a táptalaj felületén.

- Fonalas gombák telepei: eltérnek a baktériumok és élesztők telepeitől. A gombatelepek a folyadékba, illetve táptalajba merülő micéliumból és a felület fölé növő légmicéliumból állnak. A kezdetben színtelen, vagy fehér sugaras felépítésű, györsan növekvő micéliumok később megsötétednek és gyakram színes sporangium vagy konídium gyep jelenik meg rajtuk.

- Sugárgombák telepei: lassan fejlődő, gyakran gyűrűs szerkezetű telepei átmenetet képeznek a baktériumok a baktériumok és fonalas gombák telepei közt.

- Zselatin elfolyósítása: zselatinnal szilárdított mély táptalajba készített szúrt kultúrák jellegzetes tenyésztési képet adhatnak. A mikroorganizmusok egy része teljesen elfolyósítja a táptalajt, de gyakran csak részleges oldás lép fel. Az utóbbi esetben kialakuló zselatinoldási idomok helye és alakja jellemző.

- Vonáskultúrák tápagaron: jellemző a növekedés erőssége, a vonáskultúra körvonala, szegélye, a kolónia konzisztenciája, a tenyészet színe, illetve pigmentképzése.

- Tápoldatokban fejlődő tenyészetek vizsgálata: a felületi rétegben aerob, alul anaerob körülmények uralkodnak, jellemző a tenyészetnek a tápoldatban való vertikális elhelyezkedése.



**A gyakorlat menete**

**Szükséges anyagok és eszközök:**

beoltott agarlemezek, oltókacs, mikroszkóp.

**A gyakorlat menete:**

Vizsgáljuk meg az előzőleg inkubált tenyészeteket. Figyeljük meg a leírás szempontjai szerint, hogy milyen morfológiával bírnak a kifejlődött telepek. Próbáljuk a kapott eredmények, és a https://www.microbiologyinpictures.com/index.php weboldal segítségével meghatározni, hogy milyen taxonokkal van dolgunk. A telepekből mintát vehetünk, és preparátumokat készíthetünk, hogy mikroszkóp alatt is megfigyelhessük a sejtek morfológiáját.

Azokból a telepekből, amelyek határozásához nem érezzük elégnek a telepmorfológiát, készítsünk átoltást új agarlemezekre oltókacs segítségével.

**Következtetések és a megfigyelt taxonok:**

**5. Festési eljárások a mikrobiológiában. A Gram festés.**

A mikroszkópos gyakorlatban a sejtek színe általában gyenge és mikroszkóppal vizsgálva nem feltűnő. A sejt plazmája és egyes struktúrái azonban a festéket felveszik, magukba sűrítik, ami egyrészt lehetővé teszi a jobb megfigyelést, másrészt speciális festékeket alkalmazva különböző citokémiai reakciók elvégzésére is alkalmas.

A mikroszkópos gyakorlatban a mikroorganizmusok színezésére használt festékanyagok kémiai szempontból három fő csoportba sorolhatók. A **bázikus színezőanyagok** színes, un. kromofor csoportja kation jellegű, ezáltal a sejtek savas karakterű alkotórészeihez, főként a nukleotidokhoz kötődnek. Ebbe a csoportba tartoznak a legelterjedtebben használt festékek, mint a metilénkék, a fukszin, a malachitzöld, a kristályibolya és a neutrálvörös A **savas** karakterű festékek kromofor csoportja anion jellegű, tehát a sejt bázikus karakterű anyagaihoz képes kötődni. Ebbe a csoportba tartozik pl. az eozin. A **semleges** karakterű festékek jellemző tulajdonsága, hogy disszociációra nem hajlamosak, minden pH-tartományban azonos mértékben festenek (pl. rhodamin B),

A mikroorganizmusok sejtszerkezete elpusztulásuk után megváltozik, ezért törekedni kell arra, hogy úgy öljük el a sejteket, hogy minél kevesebb strukturális elváltozás történjen. Ezt a célt szolgálja a preparátum **rögzítése**, ami egyúttal biztosítja a sejtek megtapadását is a tárgylemezen. A rögzítési eljárások igen széles skálája áll a mikrobiológiai laboratóriumok rendelkezésére. Ezek közül a legegyszerűbb és leggyorsabb a hővel való rögzítés, ami viszont durva változásokat idéz elő a sejtek ultrastruktúrájában, ezért finom ultracelluláris részletek vizsgálatakor alkalmazása nem célszerű. A teljes sejt vizsgálatához azonban kiválóan alkalmas.

Minden mikrobiológiai morfológiai vizsgálat előtt a tárgylemezt tisztítani kell. E célból először 96 %-os alkohollal zsírtalanítjuk, majd száradás után a tárgylemezt Bunsen- égő lángja felett néhányszor áthúzzuk. Ezt követően készítjük el a preparátumot (kenet, szuszpenzió), majd fixáljuk oly módon, hogy a tárgylemez alját néhányszor láng fölött óvatosan. áthúzzuk. Fixáláskor a tárgylemez ne melegedjen 60-70 °C-nál magasabb hőmérsékletre, mert a sejtek összezsugorodnak, és a preparátum értékelhetetlen lesz.

A festéses módszerek között megkülönböztetünk **egyszerű és összetett festéseket.** Az egyszerű festések során egyetlen festékoldattal kezeljük a készítményt. A festés **lehet pozitív vagy negatív** attól függően, hogy a sejtek, vagy a háttér festődik. Az egyszerű festés speciális formái a polikróm festés, a mikroanalitikai festések és az indikáló festések. A **polikróm** **festés** során is egy festéket használunk, a készítményben azonban az egyes alkotórészek más-más színűek lesznek. Ide sorolható pl. a Bacillus anthracis (a lépfene kórokozója) festése karbolvizes toluidinkékkel, aminek hatására a baktérium burka rózsaszínre, a többi része pedig kékre festődik. A **mikroanalitikai festések** a preparátum meghatározott részeinek illetve anyagainak kimutatására szolgálnak a festésre használt anyaggal történő színreakció révén (pl. keményítőszemcsék kimutatása). Az **indikáló** **festések** a készítmény vagy a készítmény egyes részleteinek redoxpotenciál, vagy pH- viszonyairól, ad a kialakuló, színreakció alapján felvilágosítást.

Az összetett festések során a preparátumot többféle festékoldattal kezeljük. Az összetett festés eredményeként a preparátum más-más részei eltérő festődést mutatnak (Gram-festés, Ziehl-Neelsen-féle festés). Az összetett festések között kell megemlíteni a **differenciáló festéseket,** amelynek lényege, hogy egy adott mikroorganizmus egyes sejtalkotói más-más színűre festődnek (Bacillus cereus differenciáló spórafestése).

**Gram-festés**

A Christian Gram dán orvos által 1884-ben kifejlesztett eljárás a mikrobiológiai gyakorlatban a legjelentősebb festésnek tekinthető. Segítségével a baktériumok két fő csoportra, a Gram szerint festődő (Gram-pozitív) és a Gram szerint nem festődő (Gram-negatív) baktériumok csoportjára oszthatók. A Gram pozitív baktériumok a festés során megtartják az elsődleges festés színét, míg a Gram-negatívak elvesztik azt. A különbség oka mind a mai napig nem tisztázódott egyértelműen, de valószínűleg a baktériumok sejtfalának eltérő kémiai szerkezetével magyarázható.

A Gram-festésnek számos változata alakult ki, de az alapelv valamennyiben azonos:

A baktériumokat először trifenil-metán típusú festékkel kristályibolya v. genciánibolya) kell kezelni, aminek során minden baktérium ibolya színűre festődik. Jód hatására jód-para-rozanilin komplex képződik, ami 96 %-os alkohollal a Gram-negatív baktériumokból kivonható, a Gram-pozitívakból viszont nem. Az elszíntelenedett Gram-negatív baktériumokat az eredeti festéktől eltérő színű kontrasztfestéssel (pl. fukszin, szafranin) kell láthatóvá tenni.

**Szükséges anyagok és eszközök:**

Mikroszkóp immerziós objektívvel, tárgylemez, oltókacs, 96-os alkohol, kristályibolya, vagy genciánibolya-oldat, Lugol-oldat, szafranin- vagy fukszin-oldat, festőtál, immerziós olaj.

**A munka menete:**

**Kenetkészítés**

1. A tárgylemez zsírtalanítása: általában Bunsen-égő lángja felett néhányszori áthúzással.
2. A minta felvitele a tárgylemezre. Ha a minta folyékony, egyszerűen rácseppentik. Ha nem folyékony, akkor fiziológiás sóoldatot vagy csapvizet cseppentenek a tárgylemezre, s abban elszuszpendálják a mintát.
3. Hagyják, hogy a kenet megszáradjon a levegőn.
4. Fixálás: miután a minta megszáradt, a tárgylemezt néhányszor áthúzzák a Bunsen-láng felett. Így az élő sejtek elpusztulnak, fehérjéik pedig kicsapódnak és az üveglemezhez tapadnak.

**Festés**

1. A Gram festés kivitelezésénél a rögzített készítményt 1 percig ammónium-oxalátot tartalmazó kristályibolya oldattal kezeljük.
2. Desztillált vizes öblítés után 1 percig Lügol oldattal kezeljük
3. Újabb öblítés után fél percig alkohollal kezeljük
4. Egy újabb öblítés után 1 percig szafraninnal vagy fukszinnal kontraszt színezést végeztünk el.
5. A színezés után a Gram-pozitív sejtek sötét kékes-ibolya színűek, a Gram-negatív sejtek rózsaszín-piros színűek lesznek.

**Megfigyelések:**

**6. A levegő mikrobiológiája. A víz mikrobiológiája.**

A levegő és a víz két nagyon fontos tényező az élőlények túléléséhez. A mikroorganizmusok szabad formában vagy más anyagok mellett jelen lehetnek a levegőben. Mivel a levegő mindenütt jelen van, a levegőben lévő mikrobiális szennyeződés könnyen eljut az élelmiszerekhez és az emberekhez annak közvetítésével, így egészségügyi kockázatot jelent a fogyasztók számára. Ezért fontos, hogy a levegő mikrobiológiája szempontjából a környezeti levegőt ellenőrizzék, különösen az élelmiszeripar termelési, csomagolási és tárolási területein.

A mikrobiális szennyeződések a levegőben olyan élőlények, mint a baktériumok, gombák, vírusok és atkák. Ezek közül a leggyakoribbak a gombák és a baktériumok. Az élesztők és a penész spórák különösen fontosak a levegő mikrobiológiája szempontjából. Nagyon kényelmes lakóteret találnak, különösen nedves környezetben. A nedves környezet biztosíthatja a szaporodásukhoz szükséges pH és víz aktivitást. A baktériumok spórái hosszabb ideig fennmaradhatnak, és egészségügyi kockázatot jelentenek. Az olyan tényezők, mint a környezeti páratartalom, a légáramlás, az elhelyezkedés, a tevékenységi terület, a szerkezeti jellemzők is befolyásolják a levegő mikrobiális terhelését.

A baktériumok, egyéb mikroorganizmusokkal együtt természetes és mesterséges úton juthatnak az ivóvízbe.

* Természetes úton a csapadék kimossa a levegőből a mikroorganizmusokat. A talaj felső rétegével - mely baktériumokban rendkívül gazdag - érintkezve a csapadékvíz bakteriálisan tovább szennyeződik, a talaj szerkezetétől függően hosszabb-rövidebb idő alatt a mélybe szivárog és az első vízzáró réteget elérve, összegyűlik. Közben a talaj öntisztuló képességének hatására a mikroorganizmusok kiszűrődnek, ellenálló képességük függvényében, megfelelő tápanyag hiányában elpusztulnak. Így, ha a talajszerkezet megfelelő, öntisztuló képessége mesterséges szennyezés útján nem sérült, az első vízadó rétegből (6-7 m mélységből) akár már bakteriológiai szempontból kifogástalan vizet hozhatunk a felszínre. Sajnos ennek valószínősége a szennyvízcsatorna hálózat elégtelensége miatt az országban minimálisra csökkent. Az alsóbb vízadó rétegek csak mélyfúrású kutakkal érhetők el. A vezetékes ivóvíz többnyire ilyen kutakból származik. A mélyfúrású kutak vize bakteriológiai szempontból kifogástalan, mivel abban a mélységben már kórokozó baktériumok nem élnek meg. Ezeknek a kutaknak az elszennyeződése csak műszaki hiba, felsőbb rétegekből történő rászennyeződés miatt következhet be.
* A víz mesterséges szennyezése egyértelműen az emberi tevékenység eredménye. Ide sorolhatók a szennyvízelhelyezés különböző formái a felszíni vizekben, a fekália deponálása talajban, a szennyvíz kiengedése a talajba vagy használaton kívüli ásott kútba, továbbá ide tartoznak az állattartásból eredő szennyvizek, hulladékvizek is.

Az eukarióták közé tartozó ostoros egysejtűek és a csillósok már valódi sejtmaggal rendelkeznek. Az ostorosmoszatok az édesvizekben elterjedt egysejtűek. Egyik legismertebb képviselőjük a zöldszemes ostoros, melynek testfelépítésében növényi és állati sajátságok is megfigyelhetők. Sejtjét csak sejthártya határolja, sejtfala nincs. Ostora tövében szemfolt látható, amelynek a fény érzékelésében van szerepe. Az ostor közelében helyezkedik el a sejtszáj, amely szerves táplálék felvételére szolgál. A sejtplazmában zöld színtestek is vannak. Sejtfelépítésüknek köszönhetően az ostorosmoszatok a körülményektől függően autotróf vagy heterotróf anyagcserét is folytathatnak, mixotróf táplálkozásúak. Fényben fotoszintetizálnak, sötétben pedig szerves anyagokkal táplálkoznak. Az édesvizekben nagyon elszaporodhatnak, de szerepük lehet a természetes vizek öntisztulásában is.

A csillósok törzsébe tartozó papucsállatkák tengerekben és édesvizekben is elterjedtek. A sejtet bőrke borítja, melyen sejtszáj és a folytatásaként sejtgarat található. Csillókkal mozognak. A salakanyagot a sejtalrésen üríti ki. Kétféle sejtmaggal rendelkezik. (kicsi az ivaros szaporodást irányítja, a nagy sejtmag az összes többi életfolyamatot szabályozza) Kedvezőtlen körülmények között védőburkot, tokot képeznek.

**Különböző vízminták mikroszkópos vizsgálata**

**Szükséges anyagok és eszközök:** különböző forrásból származó vízminták (akvárium, folyó, tó), pipetta, tárgylemezek, fedőlemezek, főzőpohár, mikroszkóp, metszetgyűjtemény.

**A gyakorlat menete:**

A különböző helyről származó vízmintákból cseppentsen egy-egy cseppet a tárgylemezekre, majd fedje le őket fedőlemezzel. A mikroszkóp alatt keressen élőlényeket a mintákban, majd vesse össze a látottakat az előre elkészített metszetekkel. Rajzolja le, hogy milyen élőlényeket látott a vízmintákban, és határozza meg azokat.

A levegő vizsgálatának legegyszerűbb módja, ha egy agarlemezt a fedelét eltávolítva bizonyos ideig (10–30 min) szabaddá teszünk a levegőből ráhulló mikrobasejtek, spórák, konídiumok számára. Pontosabb eljárás, ha alkalmas berendezéssel ismert mennyiségű levegőt átszívatva a mikrobás szennyeződést membránon szűrjük ki vagy agarlemez felszínével ütköztetve fogjuk fel. A levegő elfogadható tisztaságú, ha mikrobaszáma köbméterenként 100–300 körüli, és szennyezett, ha 300–500-nál nagyobb.

Vizsgálja meg a korábban a levegőre kirakott agarlemezeket, és mikroszkóp alatt nézze meg a kiválasztott telepekről származó, megfestett mintákat.

1. …………………………….. 2. ……………………………..

1. …………………………….. 4. ……………………………..

Következtetések:

**7. A talaj mikrobiológiája. Vinogradszki henger készítése.**

A Winogradszky oszlop nevét egy orosz származású biológusról kapta, aki a mikrobák világának kutatására szentelte életét és erre egy különleges oszlopos kísérletet alkotott meg, amit ma Winogradszky oszlopnak hívunk.

A kísérlet a prokarióták anaerob anyagkörforgalmi rendszerét modellezi. Az oszlop elkészítésének alapfeltétele, hogy kedvező életkörülményeket teremtsünk a mikroorganizmusoknak.

**Szükséges anyagok:**

Főtt tojássárgája, cellulóz (újságpapír), talaj- vagy iszapminták, víz.

**Szükséges eszközök**:

Üveghenger, mérőpohár, mérőkanál, olló, gumikesztyűk.

**A munka menete:**

1. A begyűjtött talajokból kiszedünk minden olyan tényezőt, ami zavarna a kísérlet elvégzésében, mint például kavicsokat, gilisztát, leveleket és gyökereket.
2. Ezután csapvízzel összekeverjük a talajt, a pépes állag eléréséig.
3. Ezután hozzáadjuk a tojások sárgáját apró darabkákra morzsolva (2 db tojás sárgája).
4. Ezt követően hozzáadjuk a cellulózt (apróra vágott újságpapírok formájában)
5. Miután minden hozzávalót beletettünk, kellőképen átdolgoztuk, 1 literes üveghengerbe töltjük.
6. A kísérlet elvégzése után az ablakban helyezzük el az oszlopokat, ahol fény éri.
7. 6-8 hét eltelte után szabad szemmel láthatóvá válik majd a különböző baktériumok és mikroorganizmusok megléte, amelyek kialakítják majd a rétegzettséget.

**Következtetések:**

**8. A leadandó munkák ellenőrzése. Záró dolgozat.**

A záró dolgozat a gyakorlati füzetben szereplő információk, a prezentációk és a kiselőadások anyagai alapján kerül összeállításra. A következő kérdéstípusok fordulhatnak elő a dolgozatban:

* egyszerű választás
* többszörös választás
* kakukktojás
* négyféle asszociáció
* esszé
* ábrafelismerés
* párosítás
* fogalomkifejtés

A záró dolgozat eredménye, a leadandó feladatok és a kiselőadás teljesítése összesítve adja a gyakorlat eredményét.

A dolgozat maximum egyszer javítható!

**Рекомендована література / Ajánlott szakirodalom**

1. Általános mikrobiológia. Szerkesztette: Pesti Miklós, Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs, 2001, 310 old.
2. Векірчик К. *Мікробіологія з основами вірусології:* Навчальний посібник.- ЦУЛ, 2002.-312с.
3. Векірчик К. *Практикум з мікробіології:* Навчальний посібник,- ЦУЛ, 2002.- 144 с.
4. Протченко П. 3. *Загальна мікробіологія, вірусологія, імунологія:* Навчальний посібник.-ЦУЛ, 2002.-298с.
5. Люта В. А. *Мікробіологія* з *основами вірусології та імунології:* Підручник.- ЦУЛ, 2001. 280с.
6. Ситник І. О. *Загальна мікробіологія, вірусологія, імунологія:* Підручник.- ЦУЛ, 2000.- 392 с.
7. Гусев М. В., Минеева Л. А. *Микробиология:* Підручник, 2-ге видання.- М., 1985.-376с.
8. Бекерм. Е. *Введение в биотехнологию.-М.,* 1978.-231 с.
9. Брода П. *Плазмидьі.-* М., 1982.- 220с.