

Mikrobiológia gyakorlatok

gyakorlati sillabusz

Szőlész-borász mérnök nappali képzés

Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék

2018

I. A MIKROBIOLÓGIAI LABORATÓRIUM RENDJE

A mikrobiológiai gyakorlatokon a laboratóriumokra vonatkozó általános rendszabályokat be kell tartani (elektromos- és gázkészülékek kezelésével, sav, lúg, mérge, robbanásveszélyes vegyszerek kezelésével kapcsolatos előírások). Ezen kívül a fertőzésveszély miatt egyéb óvintézkedéseket is **szigorúan** be kell tartani.

A tenyésztések során az általunk tenyésztani kívánt mikroorganizmusok mellett, pl. a levegőből bekerülhet és feldúsulhat a tenyészetbe jutott ismeretlen kórokozó. A tenyészeteket tehát minden esetben mint kórokozó tenyészeteket kell kezelni.

- Laboratóriumban étkezni, dohányozni, laboratóriumi edényekből inni, laboratóriumi eszközöket egyéb célra felhasználni szigorúan tilos!
- Mikrobiológiai gyakorlatokon védőköpenyt kell használni. Ezt a munkaköpenyt lehetőleg más célra ne használjuk, vagy egyéb gyakorlatokon való használat esetén gyakran tisztítsuk.
- Csak kifogástalan állapotban levő eszközöket és edényeket használjunk!
- Élő tenyészetek kiömlése, tenyészeteket tartalmazó edények törése esetén a fertőzésnek kitett felületeket, a törött edényeket fertőtlenítő folyadékkal (pl. neomagnol) csírátlanjuk! Az esetről a gyakorlatvezetőt informáljuk.
- Oltóeszközök leégetését előírászerűen végezzük; nagy mennyiségű oltóanyag rátapadása esetén a láng közepén szárítsuk, utána égessük, különben szétfröccsenhet a mikrobátömeg.
- Tilos a lefolyóba önteni élő mikrobák tenyészetét vagy szuszpenzióját! Elpusztításuk hővel vagy vegyszerrel történik.
- Ne öntsünk a lefolyóba megolvastott agaros táptalajt, mert a csövek eltömődnek!
- Mosogatás előtt az edényeket autoklávozással, vagy fertőtlenítő szerekben (formalin, neomagnol, sterogenol, flóraszept) történő több órás áztatással kell csírámentesíteni.
- Munka befejeztével a laboratóriumi asztalt fertőtlenítő folyadékkal (flóraszept vagy neomagnol) megnedvesített ruhával le kell törölni!
- A laboratóriumból való távozás előtt (gyakorlat közben is) kezet kell mosni fertőtlenítő folyadékban!

TÁPTALAJOK

A mikrobák vizsgálata tenyésztés közben vagy tenyésztés után történik. A tenyésztésre táptalajokat használunk. A mikroorganizmusok tápanyagszükségletüket a táptalajból fedezik. A különböző mikrobák tápanyagigénye rendkívül változatos lehet, de vannak olyan táptalaj összetevők amelyek alapvetően szükségesek.

A tápközeg komponensei két fő részből állnak:

Esszenciális összetevők

- víz→ oldószer
- energiaforrás→ redukált, nagy energiatartalmú vegyületek
- szén-forrás
- nitrogén-forrás
- ásványi anyagok→ enzimek

Járulékos összetevők:

- prekurzorok
- vitamiok

A táptalajok osztályozása különböző szempontok alapján történhet.

Halmazállapot szerint

1. Folyékony táptalajok: a tápoldat komponensek összemérése során a szilárdító anyagot kihagyjuk (táplevesek, tápoldatok).

2. Szilárd táptalajok: a folyékony táptalajt szilárdító anyaggal egészítjük ki.

Szilárdító anyagok az alábbiak lehetnek:

A) Agar-agar: poliszacharid, 1-3%-ban használatos (1% lágyagar), dermedéspontja koncentrációtól függően 38°C feletti, tengeri moszatokból készítik, csak igen kevés mikroorganizmus hidrolizálja.

B) Zselatin: polipeptid, 10-30%-ban használatos, dermedéspontja a koncentráció függvénye, számos mikroba bontja.

C) Szilikagél: előnye, hogy szerves anyagokat nem tartalmaz. A táptalaj készítése időigényes. Ritkán alkalmazzák, általában kemolitotróf mikroorganizmusok tenyésztésekor.

Felhasznált anyag szerint

1. Természetes táptalajok: szerves eredetű anyagok, melyeknek pontos összetételét nem ismerjük, pl. húsfőzet, élesztő kivonat, maláta, melasz, gyümölcslevek, tej.

2. Szintetikus táptalajok: összetételüket pontosan ismerjük.

3. Félszintetikus táptalajok: természetes és szintetikus összetevők keverékei.

Az alkalmazott tápanyagkomponensek szerint

1. Alaptáptalajok: a növekedéshez szükséges alapanyagokon kívül (esszenciális összetevők) speciális adalékanyagokat nem tartalmaznak, pl. T₁ – univerzális táptalaj

2. **Szelektív táptalajok:** alaptáptalaj + szelektív gátlóanyag (pl. antibiotikum). Egyes mikroba csoportok visszaszorítását célozzák.
3. **Differenciáló vagy indikátor táptalajok:** alaptáptalaj + indikátor anyag, amely speciális anyagcsere reakciókat jelez (pl. laktóz bontás, savképzés).
4. **Speciális táptalajok:** különböző vizsgálatok céljainak megfelelően, vagy különböző speciális igényű mikrobák számára összeállított táptalajok.

Táptalaj készítés: először a szilárd alkotókat mérjük be, majd feloldjuk nem teljes térfogatban. Oldódás után állítjuk be a végleges térfogatot. A pH érték beállítása 5%-os HCl ill. 5→%-os NaOH-dal történik finomskálás indikátor papírral vagy műszerrel történő ellenőrzés mellett, majd autoklávozunk. Autoklávozás után az agar tartalmú táptalajok pH-ja 0,1-0,5 pH értékkel csökken a szilárdító anyag enyhe hidrolízise és változása miatt. Agar tartalmú táptalajok nyomás alatt sterilizálhatók, zselatin tartalmúak csak áramló gőzben (nyomás alatt erős hidrolízis következik be).

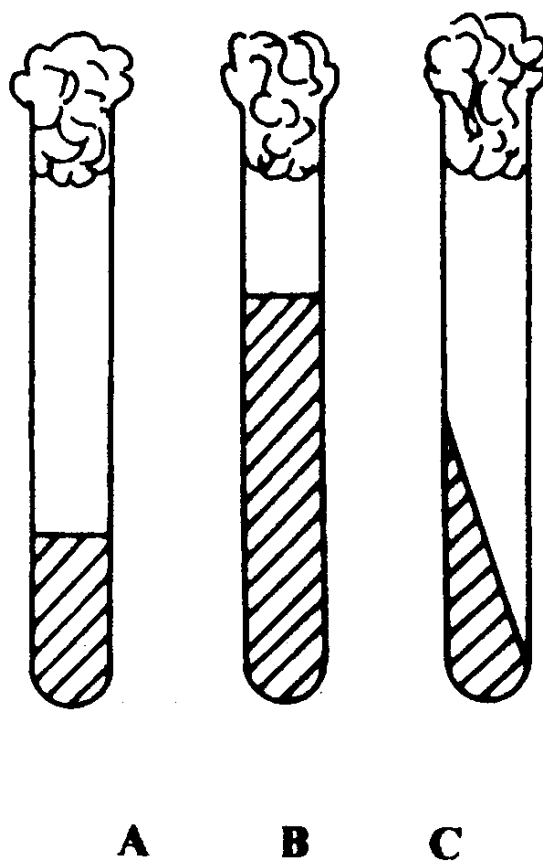
A hőérzékeny táptalaj komponenseket szűréssel való sterilizálás után adjuk az autoklávozott és megfelelően lehűtött alaptáptalajhoz.

TENYÉSZTÉSHEZ HASZNÁLT EDÉNYEK

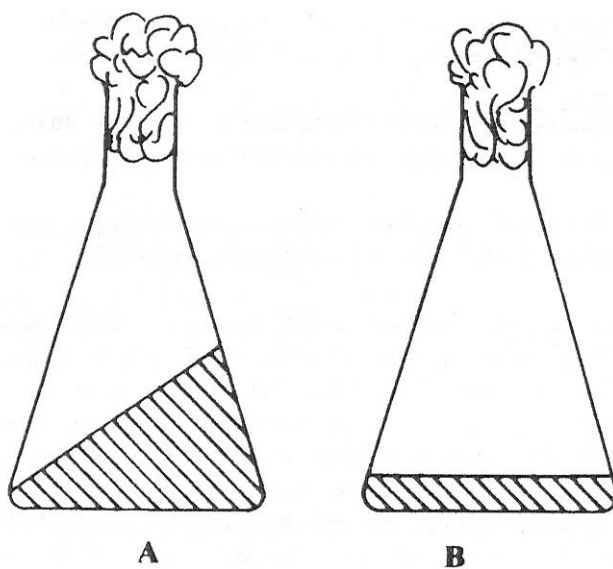
Minden tenyésztéshez használt laboratóriumi edényt a táptalaj kifejtése előtt vattadugóval kell ellátni (gyapot- vagy papírvatta egyaránt használható).

Kémcsövek: folyékony táptalajból 5 ml mérendő be. Szilárd táptalajból magas agar esetén 10 ml, ferde agarhoz 5 ml szükséges. A ferde táptalaj készítésével célunk a nagyobb felület biztosítása.

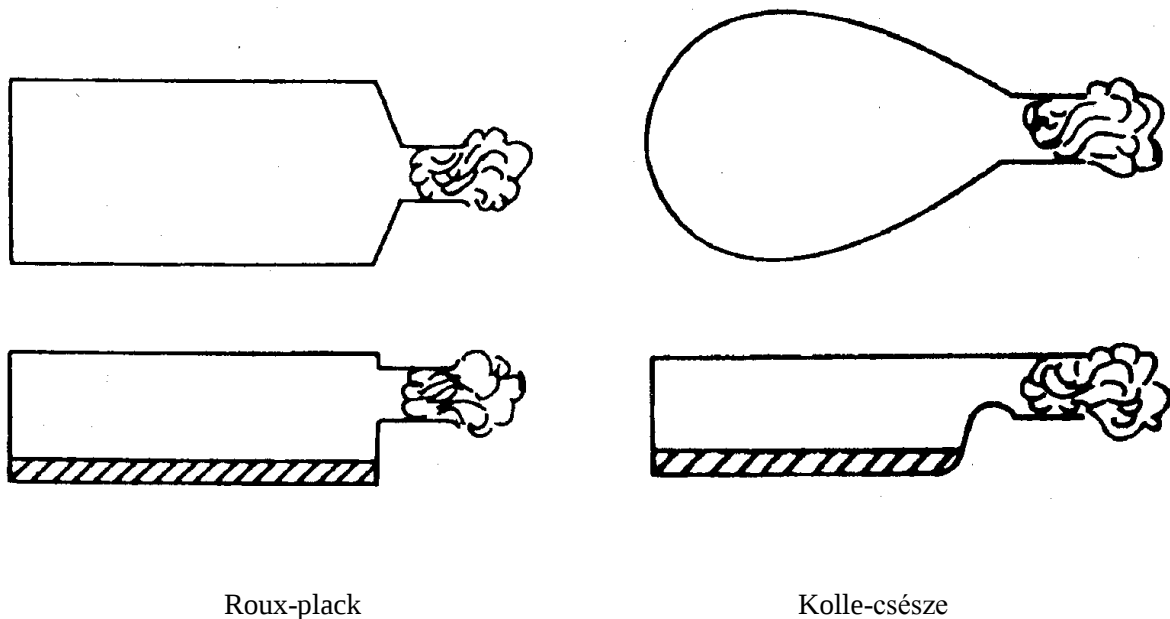
Lombikok: Erlenmeyer-lombikban és talpas gömblombikban létrehozhatunk folyadék-tenyészetet, de önthetünk lemezt és ferde táptalajt is.



1. ábra: A kémcső mint tenyészedény



2. ábra: Erlenmeyer-lombik mint tenyészedény



3. ábra: Speciális tenyészedények: a **Roux-palack** és a **Kolle-csésze**

A fenti edényfélések (beleértve a nem speciális Erlenmeyer-lombikot is) mind szilárd, mind nyugvófelszínes folyadékkultúra nevelésére alkalmasak (a táptalaj rétegvastagsága kicsi, felülete nagy). A tenyészedényeket a táptalaj betöltése után vattadugóval zárjuk, majd autoklávozással sterilezzük. Célszerű az edényeket papír, celofán vagy alufólia "sapkával" ellátni sterilizálás előtt, nehogy az autokláv gőzterében a vattadugók átnedvesedjenek.

Petri-csésze: a leggyakrabban használt laboratóriumi tenyészedény. A táptalaj kiöntése előtt szárazon sterilezzük. A táptalaj kiöntésekor a fedőt csak a szükséges mértékig emeljük. A 9–10 cm átmérőjű csészébe 20-25 ml táptalaj szükséges.

A tenyészedényeket az alábbiak szerint jelöljük: 1.) a mikroorganizmus neve és laborkódja, 2.) az oltás dátuma, 3.) a táptalaj típusa, 4.) a gyakorlat száma, 5.) a kivitelező neve.



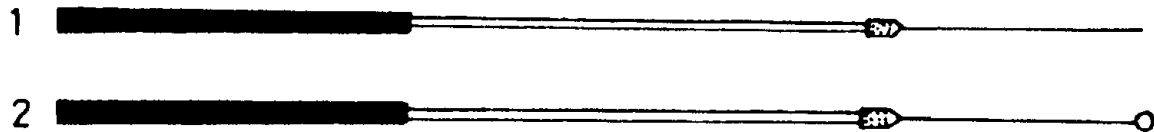
4. ábra: Petri-csésze

A **fermentor** olyan változatos méretű tenyészedény, amely gépi segédletekkel a tenyészetek nevelésére használható, ahol a tenyésztés körülményeit megfelelő ellenőrző rendszerekkel tudjuk biztosítani. A tápoldatban szaporodó mikroorganizmusok homogenitását keveréssel, oxigénnel való egyenletes ellátásukat steril levegőbefúvással érjük el.

OLTÓESZKÖZÖK

Oltótű és az oltókacs: hőszigetelt végű, leégethető fémnyelű (Kolle-nyél) tűzálló fémtűvel vagy hurokkal (kaccsal) ellátott eszköz. Sterilizése lángban, leégetéssel történik.

Mikrotiterkacs: a hurok helyett kalibrált térfogatú fémkosara van, amely ismert térfogatú folyadék (szuszpenzió) átvitelére alkalmas.



5. ábra: Oltótű, oltókacs

Pipetták: Folyadéktenyészetek ismert térfogatának átoltására használhatók az üvegpipetták, amelyeket fémdobozban, vagy alufóliába csomagolva száraz hővel sterilizzük.

Biopipetták: (automata pipetták) különböző térfogat adagolására alkalmas (rögzített, vagy szabályozható méretű) eszközök, cserélhető sterilizálható műanyag pipetta hegygel.

A STERILEZÉS

A tiszta tenyészetekkel végzett munkák előtt az eszközökön, tenészedényekben, tápközegekben lévő mikrobákat el kell pusztítani. **Sterilizés** során minden mikróbát elpusztítunk. A **dezinficiálás** pedig csak a kórokozó mikroorganizmusok elpusztítását jelenti.

A sterilizésnek különböző módjai vannak.

I. Fizikai módszerekkel történő sterilizálás

A) Sterilizálás hővel

- **Leégetés lánggal:** oltótű, oltókacs esetében alkalmazzuk átoltások során.
- **Száraz hővel:** üveg, fémeszközöket, pl. pipettákat, Petri-csészéket sterilizzük így. A hőlégsterilizálók megadott hőmérsékletre állítható önreguláló elektromos berendezések. A sterilizálás időtartama 4 óra 140°C-on vagy 2 óra 160°C-on.
- **Nedves hővel**
 - **Pasteurizálás:** magas hőmérsékleten (60-96°C) a vegetatív sejtek nagy részének elpusztítása, időtartama 1-40 perc, pl. 65°C – 30 perc; 85°C – 5 perc. Hátránya, hogy a *Clostridium* spórák túlélnek.

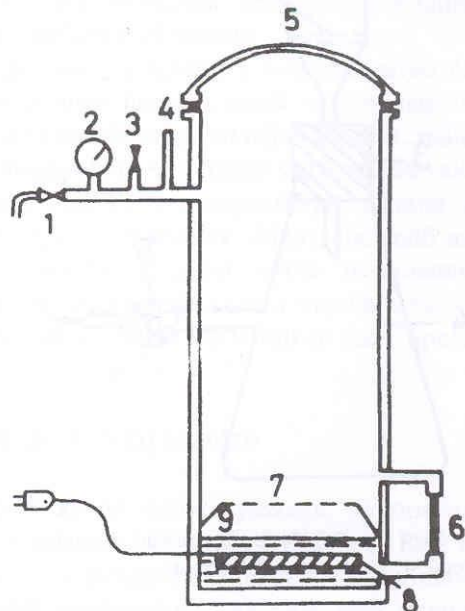
- **Arnoldozás:** sterilizálás áramló gőzben 100°C-on 20-30 percig. Ekkor a vegetatív sejtek elpusztulnak, a spóráknak azonban csak egy része. Kivitelezése le nem zárt autoklávban vagy szelep nélküli kuktafazékban történik.
- **Tyndallozás:** három egymást követő napon arnoldozunk. A kezelések közötti időben a spórák kihajtanak és elpusztíthatók (frakcionált csíramentesítés). Hőérzékeny tápkomponensek esetén (pl. zselatin) alkalmazhatjuk.
- **Autoklávozás:** sterilizálás nyomás alatt (autokláv). A leggyakrabban alkalmazott körülmények: 120°C, 1,0 atmoszféra túlnyomás, 15-30 perc. Egy adott nyomáson elérhető hőmérséklet az autoklávterben a levegő és gőz arányától függ.

túlnyomás (atm)	gőz teljes levegő (°C)	gőz 1/2 levegő (°C)	gőz levegő nélkül (°C)
0,66	90	105	115
1,00	100	112	121
1,66	115	124	130
2,00	121	128	135

A sterilizálásra használt berendezésének megfelelő működését ismert hőtűréssel rendelkező mikroorganizmusokkal ellenőrizetjük, pl. autokláv esetén → *B. stearothermophilus*; hőlég esetén → *Bacillus* speciesek.

Szimplafalú autokláv kezelése:

1. Ellenőrizzük, hogy van-e megfelelő mennyiségű víz az autoklávban.
2. Behelyezzük a sterilizálandó anyagokat (edény, eszköz, tenyészet).
3. Lezárjuk az autokláv fedelét, szorítócsavarokkal egyenletesen leszorítjuk.
4. Ellenőrizzük, hogy a gőz-szelep nyitva van-e.
5. Bekapcsoljuk az autokláv fűtését.
6. Megvárjuk, amíg az autokláv felmelegszik. A gőzszelepet csak az intenzív gőzkiáramlás megindulása után 2-3 perc múlva zárjuk el.
7. Bekapcsolt autoklávot magára hagyni tilos! A nyomás emelkedésekor ellenőrizzük, hogy a biztonsági szelep működik-e.
8. A kívánt nyomásérték elérésekor az autoklávot 20 percen keresztül megfelelő hőmérsékleten tartjuk, majd a fűtést kikapcsoljuk.
9. Megvárjuk amíg a túlnyomás nullára csökken. Nyitjuk a gőz-szelepet, majd az autokláv fedelét. Vigyázzunk! A felszálló gőz éget! A duplafalú és automata autoklávok kezelése a készülékekhez mellékelte használati utasítás szerint történik.



6. ábra: 1. gőz-szelep, 2. nyomásmérő, 3. biztonsági szelep, 4. hőmérő, 5. fedél, 6. vízszintjelző, 7. rakfelület, 8. fűtőtest, 9. vízszint

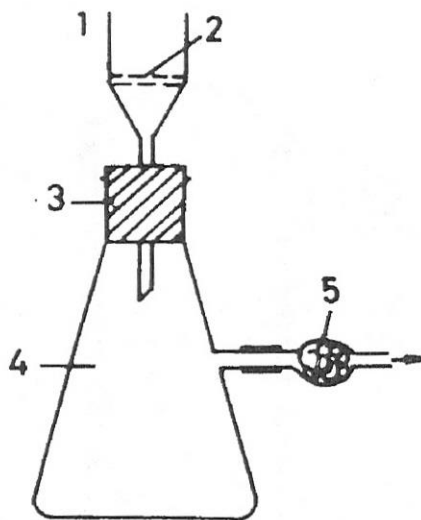
Gyakorlatainkban gyakran alkalmazunk autokláv helyett **kuktafazekat** sterilizésre. Így is teljes csíráatlanítás érhető el. A kuktafazékba desztillált vizet kell tölteni kb. kétujjnyi magasságban, behelyezni az eszközöket, majd lezárjuk és gázlánggal melegítjük a kuktát. A forrástól számítva 20 percig sterilizálunk.

B) Sterilizálás UV-sugárzással: különböző sugárzások (Röntgen-, radioaktív-, UV-sugárzás) csíráölő hatásúak. A gyakorlaton 260-265 nm sugárzási maximumú UV (germicid)-lámpákkal sterilizálunk.

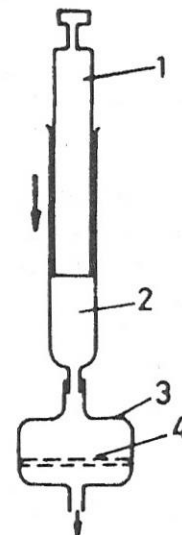
C) Sterilizálás szűrőkkel: folyadék sterilizálására vagy folyadék és szilárd táptalajok hőérzékeny komponenseinek csírámentesítésére szűrőket alkalmazunk.

- **Abszorpciós szűrők:** *Chamberland* (zománc nélküli porcelán), *Berkefeld* (kovaföld), *Seitz* (azbeszt); ezek egy idő után telítődnek.
- **Pórus szűrők:** leggyakrabban a szinterüveg (zsugorított porózus üveglemez) szűrők és a membránszűrők használatosak. A bakteriológiai szinterüveg szűrők között legismertebb a G-5 jelzésű szűrő, 0,1 µm pórusátmérővel. A membránszűrők anyaga különböző szerves polimer lehet: leggyakrabban a 0,22 vagy a 0,45 µm pórusátmérőjű készítményekkel dolgozunk (*Millipore*- vagy *Sartorius* szűrők). A baktériumok eredményes szűréséhez max. 0,3 µm pórusátmérőjű szűrőt használunk.

A szűrés elősegítésére vízlégszivattyút, olajlégszivattyút, vagy fecskendőhöz hasonló nyomópumpát alkalmazunk.



1. szűrőtölcsér, 2. szűrőlap
3. gumidugó, 4. szívópalack
5. vattazár



1. dugattyú, 2. fecskendőház
3. szűrőtartó, 4. szűrőlap,
(membrán)

7. ábra: szűrők

D) Sterilizés ultrahanggal: Ritkán alkalmazott eljárás.

II. Sterilizés kémiai úton

A kemikáliák fehérjékkel és egyéb sejtkomponensekkel való reakciók révén fejtik ki sterilizáló hatásukat. A hatás a koncentráció és az idő függvénye. Alkalmazhatók **nehézfém-sók** (HgCl_2 , AgNO_3), **oxidálószer**ek (KMnO_4 , H_2O_2), **halogének** (klór, jód), **szerves oldószer**ek (pl. 70%-os etanol, dimetilszulfid), a fenol 3%-os vizes oldata (karbol), a formalin 3%-os vizes oldata; gáz (etilénoxid). Felületaktív, zsíremulgeáló kation szappan, membránkárosító, spórákat nem öl. A neomagnol (benzol-szulfonkloramid-nátrium) 0,1%-os vizes oldatában a keletkező NaOCl a fehérjék aminos csoportjait klórozza. Megfelelő koncentrációban sporocid. Hatástalanítja a toxinokat is.

Steril oltófülke

Használata a táptalajoknak steril edényekbe való kifejtésekor, Petri-csészékbe történő lemez készítésekor, ezek leszárításakor, valamint oltási műveletek végzése esetén ajánlatos. Különösen Petri-csészék, illetve folyadéktenyészetek, hosszú tenyészydőre beállított kultúrák inokulálását célszerű a steril fülkében elvégezni.

Az ún. "*biohazard*" típusú oltófülke lényege, hogy a levegő a beépített szívó és nyomóhatást kifejtő elektromotorok hatására a fülke hasznos belső terének tetején elhelyezett szűrőn keresztül csíramentesen kerül a munkatérbe, ott lefelé áramlik, majd a lyuggatott munkalapon keresztül elhagyja a munkatérrel. Az ismételt steril szűrőn való átjutás előtt egy előszűrőn halad át a levegőáram. Ez a mozgásirány, valamint a munkatér és a külvilág határfelületén egyéb segédberendezések (kiküszöbölendő az örvénymozgást) megakadályozzák, hogy a fülkébe a külső térből bármilyen szennyezés, fertőzésforrás bekerülhessen, egyben megakadályozza a munka során a belső térben használt mikroorganizmusok kikerülését is. A steril fülkék ezen típusa alkalmas a patogén mikroorganizmusokkal való munkára is.

A MIKROORGANIZMUSOK TENYÉSZTÉSE

A mikrobákat kontrollált körülmények között kell tenyészteni. Fontos az **optimális hőmérsékleten** való tartás a gyors növekedés biztosítása érdekében. Erre a célra termosztátokat használunk (duplafalú, vízköpennyel, önreguláló elektromos fűtéssel ellátott szekrények).

A mikrobák különböző **levegőztetést** igényelnek. Az aerob szervezetek nevelésekor – ha azok nem szilárd táptalaj felületén nőnek – a megfelelő levegőztetésről körkörös rázatással vagy fermentorban való tenyésztéssel gondoskodhatunk. A rázógépek termosztálását vízfürdő segítségével vagy száraz levegő befúvással biztosítjuk. Anaerobok esetén oxigén elvonást, illetve redukzív körülményeket kell a tápközegekben biztosítani.

Az egyes mikroorganizmusok tápanyag szükséglete eltérő, ezért tenyésztéskor a megfelelő **táptalajt** kell alkalmazni.

Végül pedig a **tenyésztési időt** is figyelembe kell venni, mivel ez is más-más az egyes mikrobáknál (baktériumoknál 1-2 nap, élesztőgombáknál 2-3 nap, penész- ill. fonalasgombáknál 1 hét).

1. hét 1. gyakorlat: MIKROORGANIZMUSOK IZOLÁLÁSA A KÖRNYEZETBŐL

A gyakorlat célja annak bemutatása, hogy a környezetünkben sok mikroorganizmus fordul elő, nagy gyakoriságuk veszélyezteti a mikrobiológiai munkák tisztaságát. Ha a táptalajt antibiotikumokkal szelektívvé tesszük, baktériumellenes antibiotikumokkal a gombák kitenyésztését, gombaellenes antibiotikummal a baktériumok izolálását tesszük könnyebbé.

Anyagok és eszközök:

T-1+40 µg/ml *nystatin*-t tartalmazó Petri-csésze (4 db)

T-1+ 60 µg/ml *streptomycin*-t tartalmazó Petri-csésze (4 db)

Elkészítése:

- Kimérjük a megfelelő mennyiségű gátló anyagot.
 - A nystatint oldjuk DMSO-ban, a streptomycint steril desztvízben.
 - Hozzáadjuk a törzsoldatot a lesterilezett táptalajhoz. Kiöntjük Petri-csészébe. 100 ml táptalajhoz 1 ml „gátlóanyag” törzsoldatot pipetázunk. Törzsoldat cc.-ja: nystatin 4mg/ml; streptomycin 6 mg/ml.
- steril vatta
 - talajminta

A gyakorlat menete:

A 40 µg/ml nystatin tartalmú csészéken baktériumokat, a 60 µg/ml tobramycint tartalmazó csészéken gombákat izolálunk. Mindkét sorozattal az alábbi műveleteket végezzük el:

- 1) A csészéket fedetlenül hagyjuk 15 percig a laboratóriumban.
 - 2) A csészéket fedetlenül a nyitott ablakba, huzatos helyre helyezzük 15 percig.
 - 3) Steril vattával bútorfelületről levonatot veszünk és azt rávisszük a steril táptalajra.
 - 4) Ajkunkról steril vattával mintát veszünk és azt a táptalaj felületére visszük.
 - 5) Beosztjuk három részre a csészét, az alján filctollal jelölve, majd részenként **(A)** érintsük mosatlan ujjunkkal a táptalajt; **(B)** érintsük ujjunkkal a táptalajt szappanos kézmosás és levegőn való szárítás után; **(C)** érintsük ujjunkkal a táptalajt néhány perces sterogénos kézmosás és levegőn való szárítás után.
 - 6) Helyezzünk hajszálat a táptalajra.
 - 7) Porított talajmorzsákat hintsünk a táptalajra.
 - 8) Érintetlenül hagyjuk a csészét kontrollnak.
- 30°C-on inkubálunk, megfigyelés 48 óra, illetve 5 nap után.

Feladat:

1. Írjuk le a látottakat, hasonlítsuk össze az azonos módon kezelt, de különböző antibiotikumokat tartalmazó táptalajokon a tenyészeteket.

2. Hasonlítsuk össze a 48 órás, illetve az 5 napos inkubáció után látottakat.

Rajzoljuk le a különböző teleptípusokat sztereomikroszkópos megfigyelések alapján felülnézetben. Írjuk le a telepek morfológiai jellemzőit (alak, szín, konzisztencia, perem, stb.).

1. hét 2. gyakorlat: ÁTOLTÁSOK GYAKORLÁSA

Az elkészített táptalajokat (T-1—T-5a) különböző steril tenyészedényekbe szétosztjuk, majd a táptalajokat hagyjuk lehűlni, illetve megdermedni. A kémcsöveket megdöntve helyezzük el a ferdeagar, és függőlegesen a magas agar készítéséhez. A lehűlt tápoldatba, illetve a megdermedt táptalajra oltunk.

a) Oltás ferde agarra

Mikroorganizmusok:

Escherichia coli, *Serratia marcescens*, *Bacillus cereus* var. *mycoides*, *B. megaterium*, *Micrococcus luteus*, (T-1); *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Rhodotorula rubra*, *Syncephalastrum racemosum*, *Aspergillus niger* 48 órás tenyészetei T-5 ferde agaron (a baktériumok T-1, a gombák T-5 táptalajon növekednek jól).

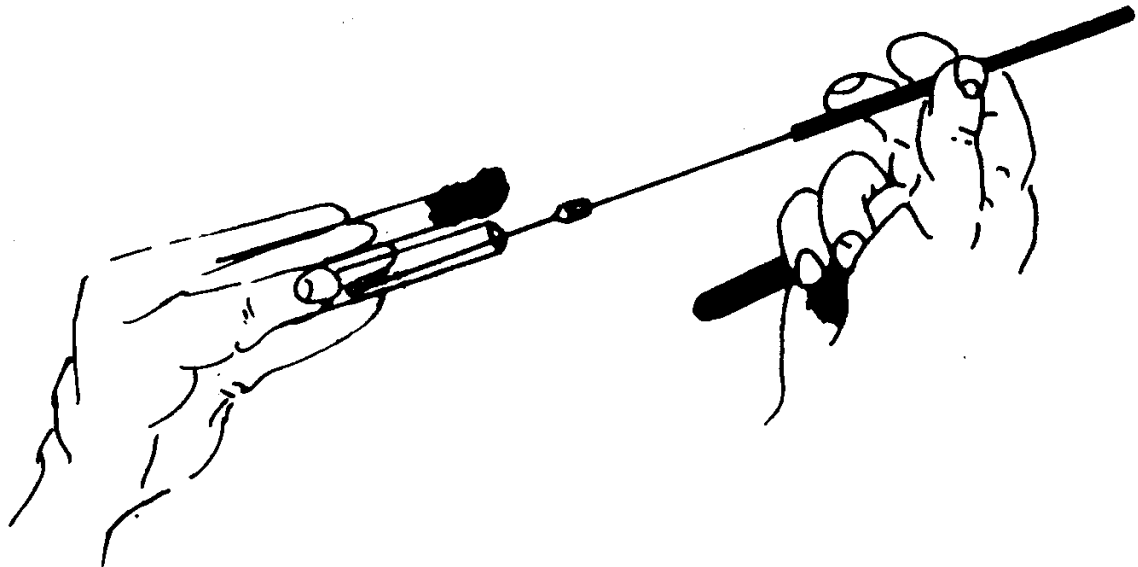
Anyagok és eszközök:

T-1 ferde agar (4 db)

T-5 ferde agar (4 db)

A leoltás menete:

- 1) Bal kézbe fogjuk a leoltandó tenyészetet tartalmazó és az "üres" kémcsövet (8. ábra). A csövek helyzete közel vízszintes legyen. Hüvelykujjunkkal a tenyerünkhöz szorítjuk a csöveket. (Rögzíthetjük a csöveket az ujjak közé szorítással is.) Az agar oltandó felülete mindig felénk legyen fordítva.
- 2) Az üres cső vattadugóját megforgatjuk, hogy könnyen kiemelhető legyen, ha a belefejtett táptalajtól beragadt volna.
- 3) Az oltóeszközt úgy fogjuk jobb kézzel, mintha íróeszközt fognánk. Közel függőleges helyzetben a gázlángba tartva, felizzítjuk az oltókacsot, majd a nyél fém részét lángoljuk le.
- 4) Jobb kezünk gyűrűs- és kisujjával kiemeljük a tenyészetes cső dugóját úgy, hogy a kiemelés után a dugó szabad része ne érintkezzen semmivel. Lángoljuk le a kémcső száját.
- 5) A kaccsal benyúlunk a kémcsőbe, lehűtjük üres agarfelületen. A tenyészetből inokulumot veszünk ki. (Inokulum = az a mikrobamennyiség, amellyel be/le/oltjuk az új táptalajt.) A kacs nem érhet a cső oldalához. Lelángoljuk a kémcső száját, a dugót visszahelyezzük a tenyészetes csőbe.
- 6) A beoltandó kémcső dugóját kivesszük, lelángoljuk a kémcső száját (vigyázzunk, az inokulum ne érjen a lángba!). Beoltjuk a táptalaj felületét zezugos vonal mentén.
- 7) Lelángoljuk a frissen leoltott cső száját, visszahelyezzük a vattadugót. Leégetjük az oltókacsot (először szárítva, majd izzítva), állványba állítjuk, majd állványba helyezzük a kémcsöveket is.



8. ábra: Ferde agarra történő oltás egy lehetséges módja

Figyelem! Az egész műveletet a gázláng közvetlen közelében végezzük, ügyelve arra, hogy a beoltás folyamata kellő ütemű legyen, ugyanakkor nagy levegőmozgást széles mozdulatokkal, kapkodással ne keltsünk. A tenyészedényeket oltás előtt lássuk el jelöléssel.

Átoltunk 4 baktérium, 2 élesztőgomba és 2 fonalgomba törzset.

b) Oltás magas agarba (szúrt tenyészet)

Mikroorganizmusok:

Serratia marcescens, *Bacillus cereus* var. *mycoides*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula rubra* 48 órás tenyészeit T-1 illetve T-5 ferde agaron.

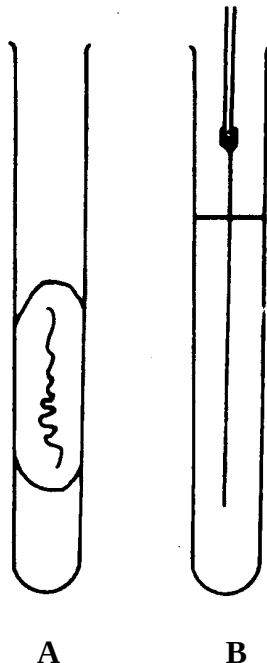
Anyagok és eszközök:

T-1 magas agar (2 db)

T-5 magas agar (2 db)

A gyakorlat menete:

Oltás menete ugyanaz mint előbb, csak tüvel és zezugos vonalhúzás helyett egyetlen szúró mozdulattal oltunk be 2 baktérium és 2 élesztőgomba törzset.



9. ábra: Ferde- illetve magas agar leoltása

c) Oltás kémcsőből folyékony táptalajba

Mikroorganizmusok:

Serratia marcescens, *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus luteus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Syncephalastrum racemosum*, *Aspergillus niger* 48 órás tenyészetei **T-1** illetve **T-5** ferde agaron

Anyagok és eszközök:

15 ml **T-1a** tápoldat kémcsőben (4 db)

A beoltás menete: az **a)** gyakorlatnál leírtak szerint történik. A kémcsöveket egyenként beoltjuk 2 baktérium, 1 élesztőgomba és 1 fonalgomba törzsszel. A mikroorganizmusokat szuszpendáljuk a folyadékban.

Feladat:

1. Ellenőrizzük az átoltás eredményességét.
2. Figyeljük meg az átoltott mikroorganizmusok színét, telep morfológiai (fénye-matt felszín) tulajdonságait. Ábrázoljuk megjelenési formájukat.

3. Rajzoljuk és írjuk le, hogyan szaporodnak a különböző mikrobák a szűrt tenyészetekben (gázterelés, milyen mélyen nő).
4. Rögzítsük hogy folyadéktenyészetben milyen a különböző mikrobák tenészete (egyformán zavarosít, felületen úszik, kiülekszik, milyen a színük)?

1. hét 3. gyakorlat: TISZTATENYÉSZETEK KÉSZÍTÉSE

Kevert tenyészetek, a természetben található többféle fajból álló úgynevezett nyers tenyészetek, ezek tisztítása, egyes fajok tiszta (ún. egysejt) tenyészetének kinyerése szilárd táptalaj alkalmazásával szélesztés, illetve lemezöntés módszerével történhet.

A) Szélesztés

Mikroorganizmusok:

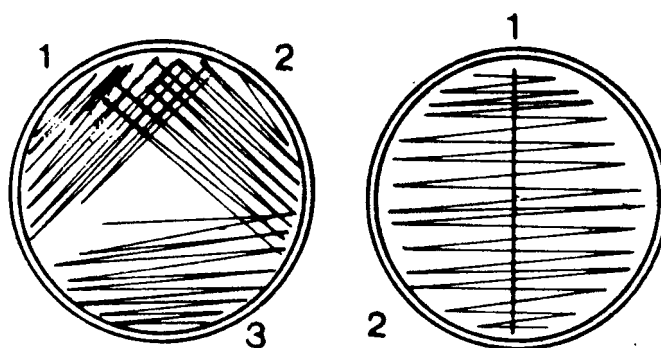
Escherichia coli, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus* 48 órás tenyésze T-1 ferde agaron.

Anyagok és eszközök:

- T-1 Petri csésze (2 db)
- 4 ml steril fiz.só félkémcsőben (1 db)

A gyakorlat menete:

A táptalaj kiöntése után kevert szuszpenziót készítünk steril fiziológiás sóoldatban a három baktérium fajjal. (*Micrococcus luteus*-ból nagy oltókacsnyi, *Escherichia coli*-ból kis oltókacsnyi, *Serratia marcescens*-ből pedig csak oltótűnyi mennyiséget vigyünk a sóoldatba!) Ezután a szuszpenziót kémcsőkeverővel homogenizáljuk. Petri-csészére egy-egy kacsnyit kiviszünk a felületre és a 10. bal oldali ábra szerint szélesztjük: (1) zezugos vonalat húzunk, a kacsot leégetjük (2) innen újabb csíkozást végzünk, ismét leégetünk, majd (3) harmadszor is így szélesztünk. A másik csészét a 10. job oldali ábra szerint szélesztjük: (1) csíkot húzunk a csésze közepére, hagyjuk a csíkot beszáradni, majd a száradás után (2) zezugos vonal mentén szétkenjük a beszáradt szuszpenziót.



10. ábra: A szélesztés különböző módjai

A csíkhúzás során a baktériumok száma egyre fogy, végül különálló telepeket kapunk. 48 órás inkubáció után a szín alapján elkülönítjük a telepeket (természetesen kevert szuszpenzióknál egymás után többször szélesztünk a már különálló telepekből, így győződünk meg arról, hogy hasad-e tovább több fajra az izolált telep).

Eredmények és értékelés

I. Rajzoljuk le, milyen eloszlásban jelennek meg a telepek szélesztésnél.

2. hét 1. gyakorlat: MIKROORGANIZMUSOK SZAPORODÁSA KÜLÖNBÖZŐ TÁPTALAJOKON

Jelen gyakorlat a címben megjelölt célkitűzés mellett a **kémcsőből Petri-csészére** történő oltás technikájának elsajátításának célját is szolgálja.

A mikroorganizmusok szaporodás intenzitása függ a törzs jellegétől és a tenyésztési körülményektől. Ugyanazon mikroorganizmus különböző táptalajokon különböző gyorsasággal szaporodhat és eltérő morfológiai sajátosságokat mutathat. Ez a jelenség a mikroszervezetek gyors adaptív tulajdonságával magyarázható, nem örökletes, ún. modifikatív sajátosság.

Mikroorganizmusok:

Escherichia coli, *Serratia marcescens*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus* var. *mycoides*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula rubra*, *Trichoderma viridae*, *Aspergillus niger* (vad típusú, prototrof), *Aspergillus niger* 341 *ade⁻* (adenin auxotrof mutáns törzse) és 48 órás tenyészei **T-1**, illetve **T-5** ferde agaron.

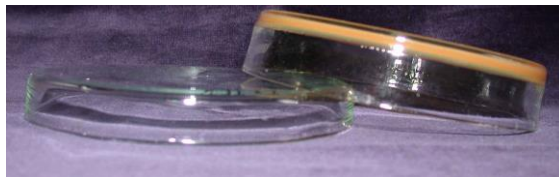
Anyagok és eszközök:

- **T-1, T-2, T-3, T-4 és T-5** táptalajt tartalmazó Petri-csésze (1-1 db)
- félkémcső 2 ml steril fiziológiás sóoldattal (3 db)

A gyakorlat menete:

Az egyes táptalajokból 3-3 Petri-csészét öntünk ki. A táptalajok megdermedése után a táplemezeket le kell szárítani! Amennyiben steril fülke nem áll rendelkezésre, a csészéket óvatosan nyitjuk, a fedelet kézben lefelé tartva steril vattával páramentesítjük, ezután a 1. ábra szerint az asztallapra helyezzük, majd a táplemezt tartalmazó csésze felet tetőcserépszerűen rátesszük. (E művelet előtt célszerű az asztallapot fertőtlenítőszeres ruhával letörölni.) Steril fülkében a csészék normál helyzetben nyitott fedővel száríthatók.

A leoltani kívánt mikrobákból a steril fiziológiás sóoldatban szuszpenziót készítünk (úgy mintha kémcsőből folyadék tápoldatba oltanánk). Fonalasgombok esetében célszerű a konidium szuszpenziót sterilvizes lemosással készíteni. Az agar dermedése, majd a csészék szárítása után a szuszpenziókból oltókaccsal 3-3 mikrobát oltunk le Petri-csészénként egymástól 2-2,5 cm távolságra, egyenes vagy zezugos vonal mentén. A leoltás menete: leégetett oltókaccsal inokulumot veszünk ki a szuszpenziót tartalmazó félkémcsőből, majd azt állványba helyezzük, ezután a Petri-csésze fedőt felemeljük annyira, hogy az oltóeszköz alá férjen. A Petri-csészéket termosztátba helyezzük, 48 órán át 30°C-on inkubálunk.



11. ábra: Táptalajjal frissen kiöntött Petri-csészék szárítása

Eredmények és értékelés

1. Táblázatban tüntessük fel az egyes fajok szaporodáserősségét a különböző táptalajokon.

Mikroorganizmus	Táptalajok				
	T-1	T-2	T-3	T-4	T-5

+++ erős, ++ közepes, + gyenge szaporulat, – nem szaporodik

2. Írjuk le a morfológiai jellegzetességeket, eltéréseket a különböző táptalajokon.

2. hét 2. gyakorlat: BAKTÉRIUMOK ÉS ÉLESZTŐK SEJTSZÁM MEGHATÁROZÁSI MÓDSZEREI

A legtöbb baktérium és az élesztőgombák esetében a sejtek szaporodása során az utódsejtek elválnak egymástól. Ezeknél az élőlényeknél a sejtek szaporodása jól nyomomonkövethető mind közvetlen, mind közvetett módszerekkel. A közvetlen sejtszám meghatározás módszerei közül a mikroszkópos számolást, és a turbidimetriát alkalmazzuk leggyakrabban, de pl. a nedvestömeg meghatározás is ilyen módszer.

I. Közvetlen sejtszámlálási módszerek:

1. Bürker-kamrás sejtszámlálás: Nagyobb méretű sejteknél közvetlen sejtszámlálás valósítható meg Bürker-kamrával. Ez a módszer az összsejtszám megállapítására ad lehetőséget. Gyakran alkalmazott, gyors és egyszerű sejtszámlálási módszer.

2. Turbidimetria: A meghatározás folyadéktenyészetek "zavarosságának" mérésén alapszik. A turbidimetriás mérésnél a műszeren mért "sűrűség"-értékeket kalibrálnunk kell. Ez közvetlen sejtszámlálással vagy közvetve, élőcsíraszám megállapítással történik. Gyakorlatunkon a közvetlen sejtszámlálás módszerét alkalmazzuk. Kalibrációs görbét veszünk fel, ahol egy-egy turbiditás értéknek meghatározott sejtszám felel meg. A vizsgálandó szuszpenzióból egyrészt felező hígítást készítünk és műszeresen megmérjük az egyes fokozatok zavarosságát, optikai denzitását (OD), másrészt Bürker-kamrás számolással meghatározzuk az eredeti sejtszámot.

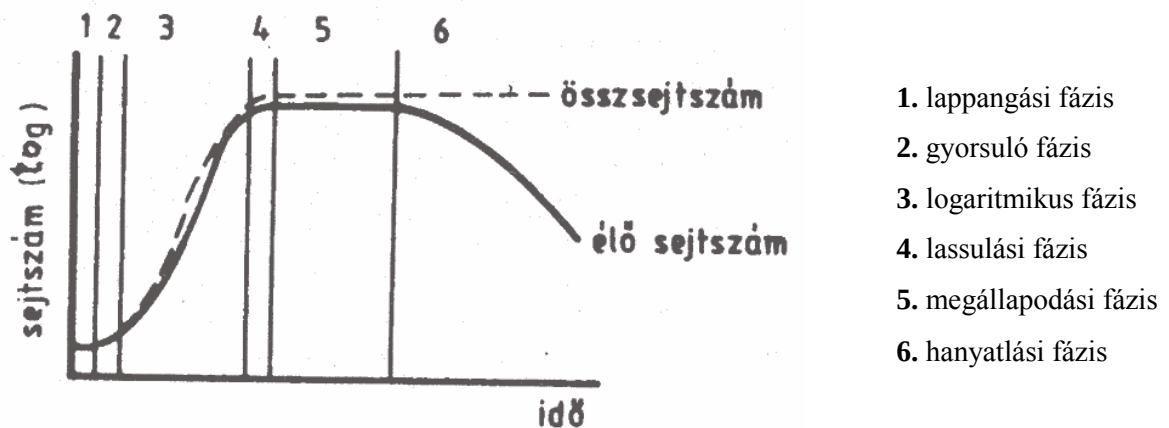
Az összsejtszámméréssel történő kalibrálás különböző tenyészeteknél alkalmazható, az élőcsíraszám meghatározással történő kalibrálás csak a logaritmikus szaporodási fázisban (ahol az összsejtszám és az élőcsíraszám gyakorlatilag azonos) ad pontos eredményt. A kalibrálást minden mikroorganizmus törzzsel külön kell elvégezni a mikroorganizmusok eltérő nagysága miatt, s a kalibrációs görbe mindig csak egy meghatározott korú tenyészetre vonatkoztatható.

Megjegyzés: Mivel a mérés fotométerrel történik, az eredményeket befolyásolhatja a táptalaj színe vagy színes mikrobáknál a mikroorganizmus pigmentáltsága. Sárga színű tápoldatok esetén célszerű a zöld tartomány (500-520 nm) helyett vörösben (630-700 nm) elvégezni a méréseket. Ha spektrofotométerrel dolgozunk, az intervallumokon belül ott mérjük, ahol maximális az elnyelés.

II. Közvetett sejtszámlálási módszerek:

A közvetett sejtszámlálási eljárások esetében nem a tényleges sejtszámot kapjuk meg, hanem az "élőcsíraszámot", azaz a vizsgált tenyészetek azon sejteinek (egységeinek) számát, amelyek különálló telepeket képesek létrehozni. Bürker-kamrás méréssel összehasonlítva különösen idősebb tenyészetek esetében jelentős sejtszámkülönbséget kaphatunk a közvetlen számolás és a tenyésztési próba eredménye

között. A jelenség magyarázatát a 12. ábra adja meg. A két mérés között a legkisebb eltérés a logaritmusikus fázisban (3) van.



12. ábra: Élő- és összsejtszám változása a tenyészetben

3. Lemezöntés: A mikrobákat a táptalajban elszuszpendáljuk, és megfelelő hőmérsékleten tenyésztjük. A mikrobák egymástól jól elváló tepeket képeznek. Fontos, hogy a mikrobákat megfelelően oszlassuk el a táptalajban, mivel egy sejt, illetve egy sejtaggregátum is egyetlen telepet fog képezni.

4. Szélesztés: A felületre felvitt sejtsuszpenziót egyenletesen eloszlatjuk, "szélesztünk", majd beszárítjuk a lemez felületét, így a mikroorganizmusok különálló sejtjei a táptalaj egy adott pontjához rögzülnek. Ez az előfeltétele annak, hogy a belőlük kifejlődő telepek száma alapján a felvitt élőcsírák számát megadhatassuk.

Más módszerek is ismertek a mikrobaszuszpenziók élősejtszámának mérésére. Ilyenek pl. a mikróbatenyészet metabolikus aktivitását (széndioxid kibocsátás, oxigénfelhasználás), enzimaktivitását mérő procedúrák.

Mikroorganizmusok:

Saccharomyces cerevisiae 5 napos rázatott tenyészet T-5a tápoldatban.

Anyagok és eszközök:

1. Bürker-kamrás sejtszámolás: Bürker-kamra, mikroszkóp

2. Turbidimetria:

- 5 ml T-5a tápoldat kémcsőben (6db)
- biopipetta (5 ml, 1 ml), Spektromom-401 fotométer, Bürker-kamra, mikroszkóp.
-

3. Lemezöntés:

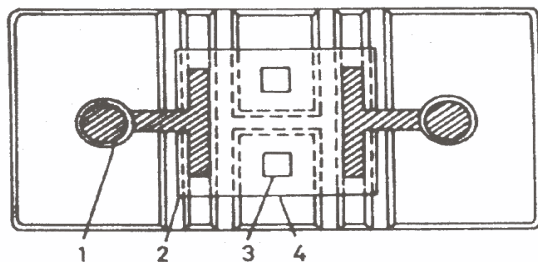
- 4,5 ml fiz.só félkémcsőben (7 db)
- 3x25 ml T-5 1% agarral (*frissen készítendő!*)
- 1 ml automata pipetta
- 2x 100 ml-es főzőpohár
- steril Petri csésze (3 db)

4. Szélesztés:

- T-5 Petri csésze (3 db)
- 50 µl automata pipetta
- szélesztőbot, alcohol
-

A gyakorlat menete:

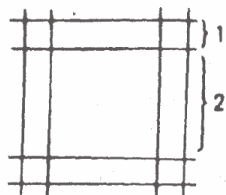
1. A **Bürker-kamrát** detergenssel zsírtalanítjuk, desztillált vízzel való alapos öblítés után törítés nélkül szárítjuk. Rászorítjuk a kamra fedőlemezét a "Newton-gyűrűk" megjelenéséig. Az élesztő tenyészetből 10x-es és 100x-os hígítást készítünk. A szuszpenziókból üvegbottal egy cseppet rácseppentünk a Bürker-kamrára a fedőlemez mellé (13. ábra). Ha az üveg zsírmentes, a szuszpenzió egyenletesen "szívódik" a fedőlemez alá. 16x-os vagy 40x-es nagyítású objektívvel megnézzük, melyik szuszpenzió számolható könnyen és megbízhatóan (kamra alapegységként 5-10 sejt legyen).



1. szorító fémből,
2. fedőlemez,
3. négyzetrácsos karcolat,
4. felcseppentés helye

13. ábra: Bürker-kamra felülnézetben

A számolást elvégezhetjük a nagy négyzet alapú egységben (14. ábra) $1/5 \times 1/5 = 1/25 \text{ mm}^2$, vagy a téglalapalapú egységben $1/5 \times 1/20 = 1/100 \text{ mm}^2$. A kamra magassága $1/10 \text{ mm}$, így a nagy négyzet alapú kamra $1/250 \text{ mm}^3$, a téglalap alapú kamra $1/1000 \text{ mm}^3$ térfogatú.



1. 1/20 mm-es karcolattávolság

2. 1/5 mm-es karcolattávolság

14. ábra: Bürker-kamra cellaméretei

Tíz egységet leszámolunk, kiszámoljuk az egy egységre jutó átlagsejtszámot, kiszámoljuk 1 mm^3 szuszpenzió sejtszámát (az egy kamraegységre jutó átlagértéket szorozzuk a kamratérfogat nevezőjével), majd kiszámítjuk a ml-kénti sejtszámot. Amennyiben nem az eredeti tenyészetet számoltuk, a hígítási értékkel beszorozva megkapjuk az 5 napos tenyészet ml-kénti sejtszámát. A sejtkoncentráció megjelölésének módja pl. $3,6 \times 10^7$ sejt/ml.

2. Turbidimetria: A *Saccharomyces cerevisiae* tenyészetből felező hígítási sorozatokat készítünk 6 lépcsőben, ahol az első koncentráció maga az eredeti szuszpenzió: a felező hígításokhoz 5-5 ml szuszpenziót 5-5 ml **T-5a** tápoldattal sorozatban hígítunk. Az összehasonlító oldat a **T-5a** tápoldat. A hígítási sorozatok fényelnyelését 520 nm-nél és 620 nm-nél mérjük. A mérés 1 cm-es szögletes küvettában történik.

3. Lemezöntés: 7 tagból álló, 10-es léptékű hígítási sorozatot készítünk a *Saccharomyces cerevisiae* tenyészetből. Felolvasztjuk az 1% agartartalmú steril **T-5** táptalajt, majd felhasználásig 40°C -os vízfürdőben tartjuk. A táptalaj hőmérsékletének 40°C -ra történő beállítása után a hígítási sorozat megfelelő 3 tagjából (sejtszámolás alapjakiválasztott hígítások) 1-1 ml szuszpenzióval beoltunk 3 db steril Petri-csészét. A beoltás után a Petri-csészébe beleöntjük a 25ml meleg 1%-os **T-5** táptalajt és óvatosan ∞ alakban mozgatva keverjük a csészéket. Dermedés után 48 órán át 30°C -on inkubálunk.

A számolandó szuszpenzió hígításakor, a táptalajba vitelekor ügyelnünk kell az egyenletes eloszlásra és arra, hogy a mikroorganizmusok sejtjei egymástól elváljanak (ne legyenek aggregátumok), mivel egy sejt vagy 5-10 sejtől álló "egység" is egyaránt egyetlen telepet hoz létre.

4. Szélesztés: 3 db steril **T-5** táptalajt tartalmazó Petri-csészébe *Saccharomyces cerevisiae* hígítási sorozatainak megfelelő hígítási fokozataiból 3-at kiválasztunk és a lemezek felületére oltjuk. A hígítási lépcsőkből biopipettával csészénként 0,05 ml-nyi mennyiségeket oltunk. A felületre vitt szuszpenziót üvegbotból hajlított oltóeszközzel egyenletesen szétszélesztjük. Steril oltófülkében szárítjuk le a lemezeket. 30°C -on 48 órán keresztül inkubáljuk a csészéket.

Eredmények és értékelés

1. Bürker-kamrás sejtszámolás: Számoljuk ki a Bürker-kamrás mérés alapján az eredeti szuszpenziók sejtszámát.

Tíz Bürker-kamra egység átlagsejtszámából kiszámoljuk 1 mm³ szuszpenzió sejtszámát (egy kamraegységre jutó átlagértéket szorozzuk a kamratérfogat nevezőjével), majd kiszámítjuk a ml-enkénti sejtszámot.

2. Turbidimetria: Táblázatban tüntessük fel a turbidimetriás mérés két különböző hullámhosszon mért elnyelési (OD) értékeit. Számoljuk ki a Bürker-kamrás mérés alapján az eredeti szuszpenziók sejtszámát.

Sejtkoncentráció	Sejtszám (db/ml)	OD (extinkció)	
		520 nm	620 nm
X			
X/2			
X/4			
X/8			
X/16			
X/32			
X/64			

Ábrázoljuk grafikonokon az egyes turbiditásokhoz tartozó sejtszám értékeket. Normál skálájú grafikonokon rajzoljuk meg a kalibrációs egyenest (táblázatkezelő szoftver alkalmazásával).

3. Lemezötés és szélesztés: Értékeléskor kiválasztjuk azt a hígítást, amely jól számolható telepennyiséget ad. Megszámoljuk a telepeket a megfelelő hígításhoz tartozó 3 párhuzamos leoltásban, majd átlagot számolunk. Hasonlítsuk össze a közvetlen sejtszámolás adatait az élőcsíraszám értékekkel!

	Összsejtszám					Élőcsíraszám					% különbség
	Hígítás foka	Sejtszám (db/ml)			Sejtszám átlag (db/ml)	Hígítás foka	Sejtszám (db/ml)			Sejtszám átlag (db/ml)	
Lemezötés											
Lemezötés											
Lemezötés											
Szélesztés											
Szélesztés											
Szélesztés											

2. hét 3. gyakorlat: MIKROORGANIZMUSOK NAGYSÁGÁNAK MÉRÉSE

Különböző vizsgálatoknál gyakran szükséges a szervezetek méreteinek megállapítása. A méreteket az okulár- és az objektívmikrométer segítségével határozzuk meg. Az okulármikrométer az okulárba helyezhető kerek üveglemez, általában 0-100 beosztású skálával. Ez az okulárral forgatható, a tárgy pedig a tárgyasztallal mozgatható, így a skálát rá tudjuk állítani a látómezőben található bármely objektumra. Leolvashatjuk, hogy a vizsgált mikroba méretei hány okulár beosztásnak felelnek meg. Az okulármikrométer kalibrálása az objektívmikrométerrel történik. Az objektívmikrométer egy speciális tárgylemez, amelynek közepén 1 mm-nyi távolság 100 egységre van osztva. Az objektívmikrométer osztásközeinek mérete 10 μm .

Mikroorganizmusok:

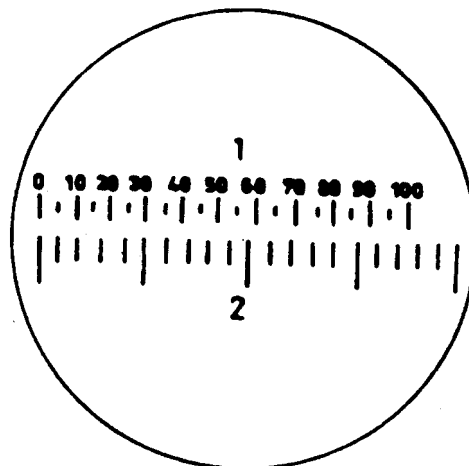
Schizosaccharomyces pombe, 24 órás 30°C-on rázatott tenyésze **T-5a** tápoldatban.

Anyagok és eszközök:

okulár- és objektívmikrométer, tárgylemezek, fedőlemezek, mikroszkóp.

A gyakorlat menete:

Az objektívmikrométert tárgyként használjuk, élesre állítjuk a skáláját. Az okulár skálát párhuzamos állásba állítjuk, a kezdő pontokat fedésbe hozzuk (15. ábra).



15. ábra: 1. okulármikrométer skála, 2. objektívmikrométer skála

- 1) Olvassuk le, hogy a 16x-os és a 40x-es nagyítású lencse alkalmazásakor hány objektívmikrométer beosztásnak felel meg az okulár 0-100 beosztása!

- 2) Számítsuk ki a 16x-os és a 40x-es nagyítású objektíveknél az okulár mikrométer egy osztásközének értékét μm -ben! A leolvasott objektívmikrométer osztások számát osztjuk az okulárosztások számával (jelen esetben ez 100) és szorozzuk 10-zel (az objektívmikrométer egy osztásközének nagysága μm -ben).

$$\text{Okulármikrométer köz} = \frac{\text{leolvasott objektívmikrométer osztások száma} \times 10}{\text{okulárosztások száma (100)}}$$

- 3) A gombatenyészetekből készítsünk kenetet.
4) Mérjük le 10-10 vegetatív sejt hosszát, szélességét és adjuk meg az átlagértéket μm -ben!
-

5. gyakorlat: Eredmények és értékelés

1. Számítsuk ki a 16x-os és a 40x-es nagyítású objektívek esetében az okulármikrométer egy osztásközének értékét μm -ben.
2. Mérjük meg tíz *Schizosaccharomyces pombe* sejt hosszát és szélességét.
3. Számoljuk ki az átlagméreteket.

3. hét 1. gyakorlat: TEJ CSÍRASZÁM MEGHATÁROZÁSA REDUKCIÓS PRÓBÁKKAL

A tej egyike a legfontosabb emberi tápanyagoknak, egyúttal azonban igen jó baktérium táptalaj is. A tejtermelés, -tárolás és –szállítás során számtalan alkalom nyílik arra, hogy a tej különböző –köztük kórokozó – mikroorganizmusokkal fertőződjön, amelyek a tejben nagyon gyorsan képesek szaporodni. Fejéskor a tej a kültakarón található mikrobákkal szennyeződik, ezek elsősorban a bőr és szőr normál mikroflóráját alkotó micrococcusok és streptococcusok. Bekerülnek még baktériumok az állatok környezetéből, takarmányról, alomról stb., ezek főleg lactobacillusok. A jó minőségű frissen fejt nyerstej 10^3 - 10^4 /ml élőcsírárt tartalmaz, amelyben nem fordulnak elő enterális eredetű és patogén baktériumok.

A nyers tejek mikrobás szennyezettségének mérésére gyors és egyszerű lehetőséget kínálnak az ún. redukciós próbák. Ezek elvi alapja, hogy a tejben jelen levő, túlnyomórészt tejsavképző mikrobák megváltoztatják a közeg redox-potenciálját és ez a változás redox-indikátorok segítségével nyomon követhető. A tej szennyező mikroflóráját alkotó tejsavbaktériumok mikroaerofil tulajdonságúak, fermentatív fiziológiai sajátossággal rendelkeznek, ezért tevékenységük során csökkentik a közeg redox-potenciál értékét.

- a) metilénkék redukciós próba: kék oxidált(metilénkék) formából, redukált szintelen (leukometilénkék) forma keletkezik, majd a vizsgálandó mintával való összemérés után az elszíntelenedés idejét mérik percben melyhez egy adott mikroorganizmus számot is rendelnek (lásd lent a táblázat).

A tej minősége	Metilénkék elszíntelenedési idő (percben)	Csíraszám db/ml
I. jó	> 330	$< 5 \times 10^5$
II. közepes	330-120	5×10^5 - 4×10^6
III. rossz	120- 20	2×10^7 -ig
IV. igen rossz	< 20	$> 2 \times 10^7$

- b) TTC (trifenil-tetrazólium-klorid) redukciós próba erős mikrobiális szennyezettség esetén: a szintelen oxidált formából (trifenil-tetrazólium-klorid) néhány perc alatt sötétvörös redukált formává alakul (*trifenil-formazán*).

Anyagok és eszközök: nyers tej, pasztörizált tej, kémcsőállvány, 4 darab félkémcső, TTC (trifenil-tetrazólium-klorid), metilénkék.

A vizsgálat menete:

Kimérünk két-két félkémcsőbe 5-5 ml nyers tejet és 5-5 ml pasztörizált tejet. Az egyik nyers tejet és egyik pasztörizált tejet tartalmazó félkémcsőbe bemérünk 0,5 ml metilénkéket, majd összekeverjük és a tetejét 0,5 ml parafin olajjal felülrétegezzük. A másik nyers tejet és pasztörizált tejet tartalmazó félkémcsőbe bemérünk 0,5 ml trifenil-tetrazólium-kloridot (TTC) és összekeverjük. A mintákat 37 °C-on, 20 percig, 1, és 48 óráig inkubáljuk, majd megvizsgáljuk, hogy milyen mértékű színváltozást tapasztalunk.

Eredmények és értékelés

1. Tüntessük fel a táblázatban a megfigyelt színváltozásokat!

	20 perc	1 óra	48 óra
metilénkék nyers tej 37 °C			
metilénkék pasztörizált tej 37 °C			
TTC (trifenil-tetrazólium-klorid) nyers tej 37 °C			
TTC (trifenil-tetrazólium-klorid) pasztörizált tej 37 °C			

3. hét 2. gyakorlat: TEJ CSÍRASZÁM MEGHATÁROZÁSA LEMEZÖNTÉSEL

A tej baktériumszáma következtetéseket enged levonni a tej kezelésére vonatkozóan is. Magas baktériumszám gondatlan kezelést, szennyezettséget és ezzel patogén mikroorganizmusok jelenlétének lehetőségét jelenti. A baktériumszám meghatározást lemezöntéssel is végezhetjük.

Anyagok és eszközök: nyers tej, pasztörizált tej, 3x3 kémcső 9 ml steril desztillált vízzel, 2x8 db üres steril Petri-csésze, glükóz-élesztőkivonat agar, magas CaCO_3 -tal (élesztőkivonat 10g, glükóz 20g, kalcium-karbonát 20g, agar 15g 1000 ml-re desztillált vízzel kiegészítve).

A vizsgálat menete:

Készítsünk tízes léptékű hígítást 4 tagig a nyers és a pasztörizált tejből. Vigyünk 10 ml tejet az 1. félkémcsőbe, vigyünk át 1ml-t a 2. félkémcsőbe és így tovább a 4. tagig. Vegyünk ki a nyers és a pasztörizált tej mindegyik hígításából 1 ml-t és tegyük egy-egy Petri csészébe. Így két sorozat Petri- csészét kapunk. Olvasszuk fel a glükóz-élesztőkivonat tápagart, majd hűtsük le 45-48 °C-ra. Öntsük ki a tejet tartalmazó Petri-csészékbe a tápagart. Inkubáljuk a Petri-csészéket 48 óráig 35 °C-on.

A kalcium-karbonátot tartalmazó agaron a tejsavbaktériumok telepei körül világos, oldott zónát láthatunk, amelyet a képződő savak hoznak létre a CaCO_3 feloldásával.

Eredmények és értékelés

1. Számoljuk meg a csészéken a kinőtt telepeket, és határozzuk meg a minták eredeti csíraszámát!
2. Figyeljük meg, hány telep esetében tapasztalunk világos oldott zónát.

3. hét 3. gyakorlat: *SALMONELLA* VIZSGÁLAT TOJÁSON

A különböző ételekben, élelmiszerekben a helytelen vagy hosszabb tárolás közben számos korokozó kerülhet be, majd gyorsan elszaporodva nem kívánatos betegségeket okozhatnak. Az egyik ilyen gyakori korokozók a salmonellák. Élelmiszereinkbe, ételeinkbe a következő módokon juthatnak be: a kórokozót tartalmazó nyersanyagokból, az előkészítés, főzés, mosogatás stb. során használt, előzőleg Salmonellával szennyeződött eszközökből, berendezésekből az ételkészítéssel foglalkozó személy kórokozóval szennyezett kezéről, munkaruhájáról az üzemi helyiségekben megtűrt rácsálókból, rovarokból, stb. A szalmonellózis előidézéséhez általában 10^7 - 10^9 sejt/g baktérium jelenléte szükséges.

Az orvosi diagnosztikában ezen baktériumok kimutatása fontos szerepet tölt be. Szelektív kimutatásukra használják a brillant zöld és bizmutszulfit táptalajokat. A brillant zöld táptalajon a salmonellák telepei színtelenek lesznek. A bizmutszulfit táptalaj bizmut-szulfitot és nátrium-szulfitot tartalmaz. A Salmonellák H_2S képződése következtében a bizmut-sót bizmut-szulfiddá redukálják és fekete színű telepeket képeznek.

Anyagok és eszközök: Brillant-zöld táptalaj, Bizmut-szulfit táptalaj, tyúk tojás, kacska tojás, csipesz.

Eredmények és értékelés

1. Számoljuk meg a különböző táptalajokon kinőtt telepeket. Hasonlítsuk össze a kapott eredményeket!

3. hét 4. gyakorlat: A PIGMENTKÉPZÉS VIZSGÁLATA

A mikroorganizmusok nagy része különböző pigmenteket tartalmaz, amelyeknek a mikroorganizmusokból álló telep is a színét köszönheti. A pigmentek kémiai összetétele igen változatos, gyakorlati szempontból azonban csak két nagy csoportot különböztetünk meg, amelyek a határozás során is szerepet játszanak. Ez a két csoport a vízben oldódó és a vízben oldhatatlan pigmentek csoportja. Előbbire jellemző, hogy a pigment a táptalajba is szétdiffundál, és jól észlelhető színes udvart hoz létre a telep körül. A pigmentek vizsgálatát viszonylag fiatal telepeken kell végezni, mert az idősebb telepekben autolízist szenvedő sejtekből felszabaduló, vízben oldhatatlan pigment megszínezi a telep körül a táptalajt.

A pigmentek egzakt funkcióját nem ismerjük. Egyes pigmentek redoxi-rendszerek tagjai, és részt vesznek a sejten belül egy adott funkcionális hely redoxi-potenciáljának a kialakításában. A pigmentek egy része fényvédő szerepet is játszik, növeli a mikroorganizmusok ellenállóképességét a különböző hullámhosszúságú fénysugarakkal szemben. A *Serratia marcescens* prodigiosint, a *Pseudomonas aeruginosa* pioceanint és pioverdint, a *Micrococcus luteus* sarcina-xantint, a *Rhodotorula rubra* β -karotint és egyéb karotinoidokat termel.

A pigmentképzés vizsgálatának hagyományos eszköze a burgonyatáptalaj. A burgonyatáptalaj szénhidrátokat tartalmaz, amelyek energiát szolgáltathatnak a pigmentek bioszintéziséhez, ezenkívül tartalmazza azokat a prekursorokat amelyeket a mikroorganizmusok esetleg saját maguk nem tudnak szintetizálni. Hasonló kedvező eredménnyel használható a pigmentképzés típusának vizsgálatához a glükóz-élesztőkivonat agar.

.

Anyagok és eszközök: *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Rhodotorula rubra* 48 órás tenyésze tápagaron (T1), 4 kémcső tápagar ferde (T1), 4 kémcső ferde, burgonya.

A vizsgálat menete: Oltsuk rá a baktériumokat a burgonyára és a tápagarra. Inkubáljuk a tenyészeteket 72 óráig 30 °C-on.

Eredmények és értékelés:

1. Vizsgáljuk meg a pigmentképződést és a pigment esetleges diffúzióját a táptalajba. Határozzuk meg, mely mikroorganizmusok állítottak elő vízben oldódó pigmenteket!

4. hét 1. gyakorlat: PENÉSZGOMBÁK VEGETATÍV ÉS IVAROS SZAPORÍTÓKÉPLETEINEK MIKROSZKÓPOS VIZSGÁLATA

A paránytenyészetekben általában csak a fiatal teleprészek vizsgálhatók jól mikroszkóposan. Fajmeghatározás szempontjából fontos a vegetatív és ivaros szaporító képletek morfológiai vizsgálata. A penészgombák jellegzetes konídiumtartói illetve sporangiumai kifejlett állapotban törékenyek, ez megelőzhető celluxlevonat készítésével.

Mikroorganizmusok:

Penicillium frequentans és *Aspergillus niger* 48 órás, *Syncephalastrum racemosum* és *Thamnostylum piriforme* 72 órás tenyésztése T-33 táptalajon, *Neurospora crassa* 48 órás tenyésztése 5% DMSO tartalmú T-33 táptalajon Petri-csészében, *Sordaria fimicola* és *Aspergillus violaceus* 10 napos tenyésztése T-5 táptalajon, *Aspergillus albertensis*, *Penicillium claviforme*, valamint *Mucor genevensis* 10 napos tenyésztése T-33 táptalajon (az utóbbi 25°C-on tenyésztendő) Petri-csészében.

Anyagok és eszközök:

R-8 festékoldat, tárgylemezek, fedőlemezek, cellux szalag, mikroszkóp, sztereomikroszkóp, bonctű.

A) Ivartalan szaporítóképletek vizsgálata

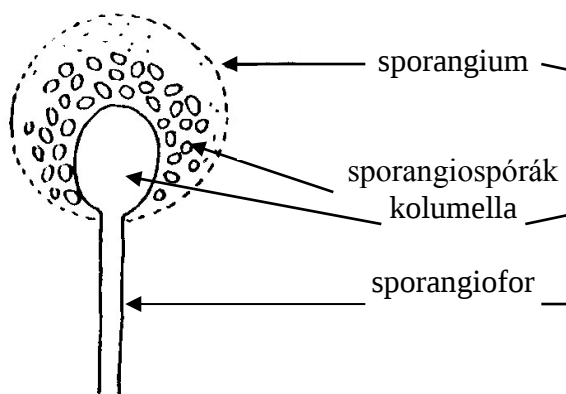
Rövid jellemzés:

Mucorales:

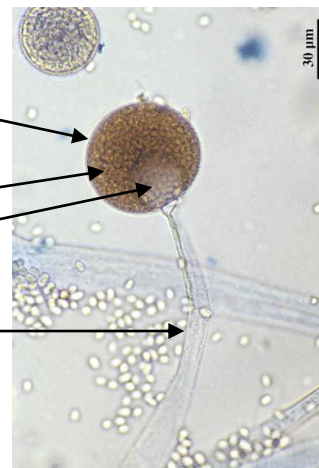
A rend tagjai ivartalanul ún. *sporangiospórákkal* szaporodnak, amelyek a sporangiofórumokon kinövő sporangiumokban keletkeznek (15/a ábra). Ezeknek sokféle formája lehet.

Pl.: *Mucor genevensis*, *Syncephalastrum racemosum*

Mucor sporangium felépítése



Mucor sporangium felépítése, mikroszkópi fotó



15/a. ábra

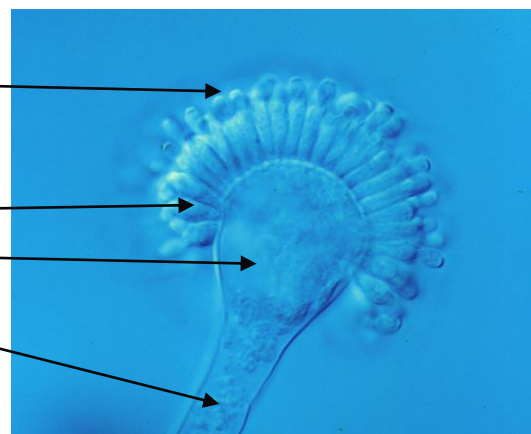
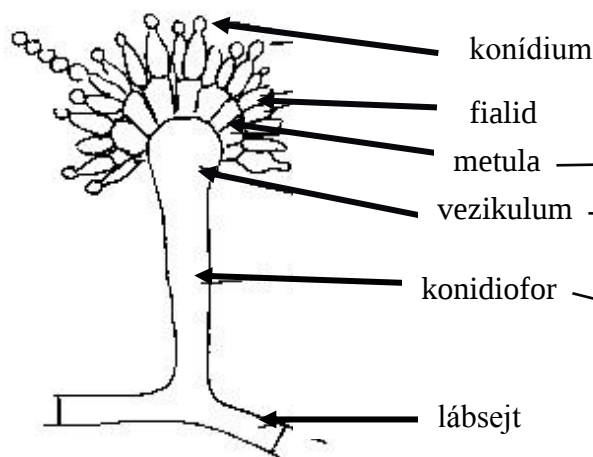
Penészgombák:

Az *Aspergillus* és *Penicillium* törzsek a szubsztratumon szabad micéliumot hoznak létre. Az ivartalan szaporítóképletet *konidiumnak* hívjuk, amely a micéliumból vagy a konidium képző sejtől jön létre. A konidiumok láncokban vagy csomagszerű csoportokban képződnek a fialid végén. A *Penicillium* törzsekre jellemző a konidioforum ecetszerű felépítése, melyek elrendeződése a gomba rendszertani besorolását segíti. Az *Aspergillus* fajoknál megfigyelehető, hogy a vesiculum egész felületén egy vagy két sorban fialidok helyezkednek el, ezeken ülnek a konidiumok. A penészgombák ivartalan szaporítóképleteit a 15/b és c ábra mutatja be.

Az ivartalan szaporodás egy másik lehetséges módja az *artrokonidiumokkal* való szaporodás. Ezek a képletek úgy jönnek létre, hogy a fonalak végei egysejtű szakaszokra esnek szét.

Asperillus szaporítóképlet

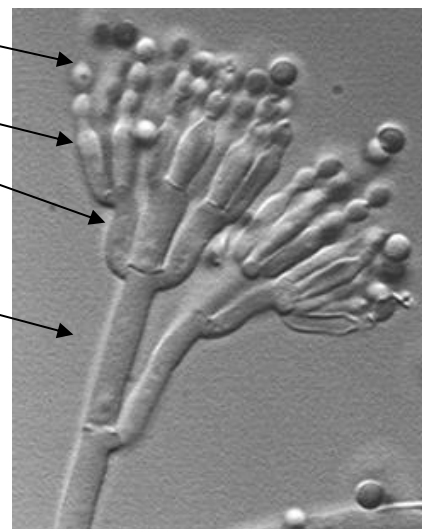
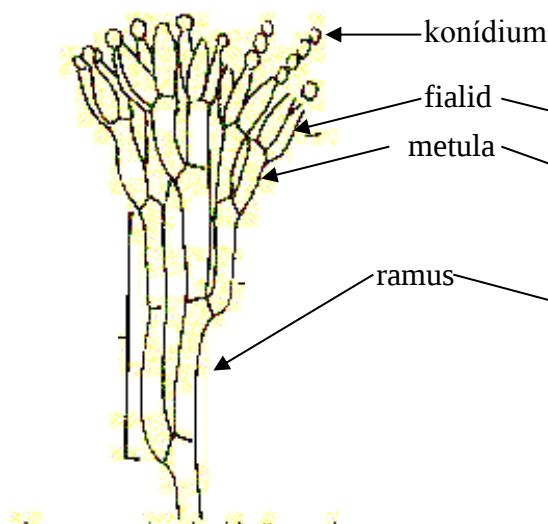
Asperillus szaporítóképlet mikroszkópi fotó



15/b. ábra

Penicillium szaporítóképlet

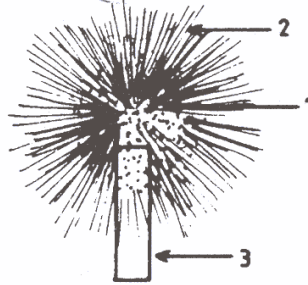
Penicillium szaporítóképlet mikroszkópos fotó



15/c. ábra

A gyakorlat menete:

Tárgylemezre laktofenolgyapotkétet (**R-8**) cseppentünk. *Penicillium frequentans*, *Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Syncephalastrum racemosum*, *Thamnostylum piriforme* telepekről cellux szalaggal mintát veszünk úgy, hogy a szalag ragasztós felét enyhén rányomjuk a fonalgomba telep peremére a 15/d. ábra szerint. Ezután a cellux szalagot a tárgylemezre helyezzük, laktofenolgyapotkétet cseppentünk rá, fedőlemezzel lefedjük és 16x-os és 40x-es nagyítású objektívvel vizsgálunk. Az *Aspergillus albertensis* szkleróciumokat (specifikus módosult hifák együttese) és a *Penicillium claviforme* korémiumokat sztereomikroszkóp alatt vizsgáljuk.



15/d. ábra: 1. érett konídiumok, 2. fiatalabb teleprész, 3. cellux szalag

5.A gyakorlat: Eredmények és értékelés

2. Rajzoljuk le a különböző gombafajok konídiumtartóit és konídiumait.
3. Fiatalabb és érettebb konídiumtartók összehasonlítása alapján rekonstruáljuk a képlet kialakulásának folyamatát.

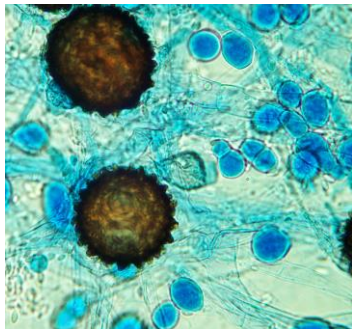
B) Ivaros szaporítóképletek vizsgálata

Rövid áttekintés:

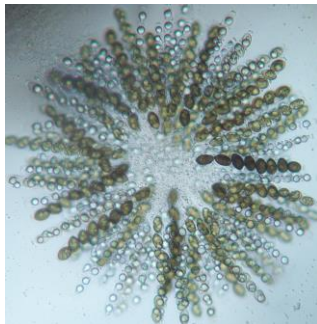
Két fonalvég összeolvadásakor ivaros szaporodásról beszélünk. Ha ugyanabból a micéliumból jön létre az összeolvadás, akkor homotallikus a faj, ha két különböző micéliumból jön létre, akkor heterotallikus.

Érintkező fonalvégek sejtfala feloldódik → plazma és sejtmagok összeolvadása → zigóta → redukciós osztódás → zigótából kinő a haploid fonal.

Mucor zygospora



Sordaria peritéciumban
elhelyezkedő aszkuszkok



Aspergillus violaceus
kleisztotécium



15/e. ábra

A gyakorlat menete:

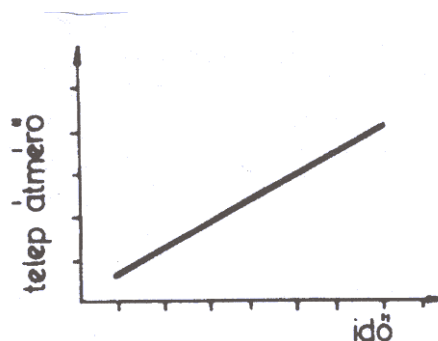
- 1. Zigosporák vizsgálata:** *Mucor genevensis* zigosporákat sztereomikroszkóp alatt, kis nagyításnál vizsgáljuk.
- 2. Aszkuszos termőtestek vizsgálata:** *Aspergillus violaceus* és *Sordaria fimicola* tenyészeteket először citoplaszt alatt vizsgáljuk meg, majd kis fekete gömbalakú kleisztotéciumok és peritéciumok közül bonctűvel egyet kiemelünk. Ezután tárgylemezen egy csepp vízben szétnyomjuk, lefedjük, majd különböző nagyításokkal vizsgáljuk (15/e. ábra).

Eredmények és értékelés

Rajzoljuk le a mikroszkópban látottakat!

4. hét 2. gyakorlat: FONALASGOMBÁK NÖVEKEDÉSÉNEK MÉRÉSE

A fonalaszgombák táptalaj felületén való növekedését egyszerű lineáris összefüggéssel jellemezhetjük: egységnyi idő alatt egységnyi a telep átmérőjének növekedése (16. ábra). E sajátság a micéliális sejtek egyirányú, ún. polarizált növekedésének következménye.



16. ábra: A fonalaszgombák telepátmérőjének változása az idő függvényében

A fonalaszgombák növekedését telepátmérő méréssel tudjuk nyomon követni. A környezeti feltételek megváltoztatásával az azonos ideig tenyésztett fonalaszgombák telepátmérőjében lényeges eltérések mutatkoznak. A fonalaszgombák e tulajdonságuk alapján tesztorganizmusokként alkalmazhatók különböző mérési eljárásokhoz, analitikai mikrobiológiai módszerek során.

A) Telepátmérő változása különböző hőmérsékleten:

Mikroorganizmus:

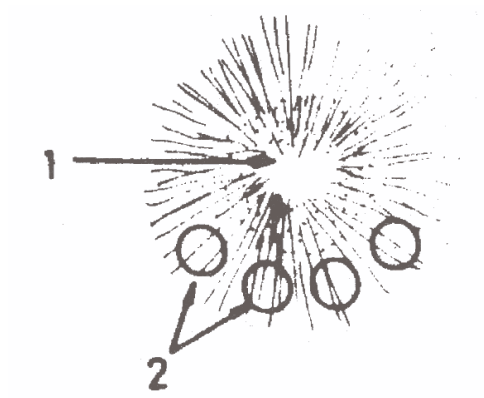
Aspergillus niger 48 órás tenyésztete T-5 táptalajon Petri-csészében, kis átmérőjű foltba oltva, (célszerű a leoltást steril vizes szuszpenzióból biopipettával végezni 10-10 µl felvitelével).

Anyagok és eszközök:

- T-5 Petri-csésze (6 db)
- 5 mm átmérőjű steril dugófűrő, lándzsatű.

A gyakorlat menete:

Az *Aspergillus niger* tenyésztet konídiummentes pereméből dugófűrővel micélium korongokat vágunk ki (17. ábra).



1. konídiumos érett teleprész

2. konídiummentes telepperemből kivágott korongok

17. ábra: telekorongok kivágásának módja

A korongokat "átültetjük" a kiöntött lemezekre úgy, hogy a micélium a lemezre kerüljön (18. ábra). Minden csészébe 1 korongot ültetünk.



1. táplemez

2. micélium korong,

3. agar oszlop

18. ábra: telekorongok elhelyezésének módja a lemezen

A beoltott csészéket 5, 20, 25, 30, 35 és 40°C -on 48 órán keresztül inkubáljuk.

B) Telepátmérő változása különböző pH-jú táptalajokon

Mikroorganizmus:

Ugyanaz mint az (A) gyakorlatnál.

Anvagok és eszközök:

- 2,2 ; 4 ; 6 ; 8 pH-jú T-5 Petri-csésze (1-1 db)

Különböző pH-jú táptalajok elkészítése:

- sterilizzuk a kétszeres töménységű T-5 táptalajt
- sterilizzuk külön a két McIlvain-puffert (R-14)
- a pH-nak megfelelően összekeverjük a McIlvain-puffer törzsoldatokat
- bemérünk 100 ml 2x T-5 táptalajba 100 ml pufferkeveréket, kiöntjük csészébe
- 5 mm átmérőjű steril dugófúró, lándzsatű.

A gyakorlat menete:

Az A gyakorlatnál leírtak szerint leoltjuk a micélium korongokat a különböző pH-jú táptalajokra. 48 órán át 30°C-on inkubáljuk a Petri-csészéket.

Eredmények és értékelés

1. Mérjük le a különböző csészékben a telepátmérőket.
2. Táblázatban tüntessük fel az egyes hőfokokhoz tartozó 6 telep átmérőjét mm-ben, majd átlagoljunk.

Hőmérséklet (°C)	Telepátmérő(mm)						Átlag
	I	II	III	IV	V	VI	
5							
20							
25							
30							
35							
40							

3. A táblázatban tüntessük fel az egyes pH értékekhez tartozó telepátmérőket mm-ben, majd számítsuk ki az átlagértékeket.

pH	Telepátmérő(mm)						Átlag
	I	II	III	IV	V	VI	
2,2							
4							
6							
8							

4. Az átlagértékeket mindkét esetben ábrázoljuk oszlopdiagrammon! (Táblázatkezelő szoftver segítségével)

4. hét 3. gyakorlat: ÉLESZTŐGOMBÁK CUKORASSZIMILÁCIÓJÁNAK ÉS ERJESZTÉSÉNEK VIZSGÁLATA

Élesztőgombák esetében az asszimiláció oxidatív körülmények közötti cukorfelhasználást, az erjesztés anaerob körülmények közötti, gázfejlődéssel járó cukorhasznosítást jelent. Az asszimilációs és erjesztési próbák során különböző cukrok hasznosítását vizsgáljuk és így jellemezzük a fajokat és törzseket. Az asszimilációt auxonográfiás módszerrel határozzuk meg (szénforrásmentes táptalajba lemezöntéssel rögzített sejtek a táptalaj felületére vitt cukrok körül szaporodni kezdenek, a pozitív próbát "opálosodás" jelzi), az erjesztési képességet a közeg pH-jának jelentős csökkenésével (indikátor színváltozása jelzi) és gázképződéssel bizonyítjuk. Az élesztőgombáknál redukált morfológiai bélyegeik miatt a rendszertani besorolást a biokémiai jelek meghatározása nélkül nem tudjuk elvégezni.

Mikroorganizmusok:

Saccharomyces cerevisiae ("pékélesztő" jelzésű törzse), és *Candida utilis* 48 órás tenyészet T-5 ferde agaron.

Anyagok és eszközök:

- 2 ml fiz.só félkémcsőben (2 db)
- szemcseppentő
- automata pipetta

A) Asszimiláció:

- T-17 táptalaj (*frissen készítendő!*) (2 db)
- diagnosztikus cukrok → glükóz (**D**), galaktóz (**G**), szacharóz (**S**), maltóz (**M**), laktóz (**L**), raffinóz (**R**), 1-arabinóz (**Ar**) és d-xilóz (**X**)

B) Erjesztés:

- 2,5ml steril T-17a tápoldat + cukrok Wassermann-csőben → 0,5% glükóz (**D**), galaktóz (**G**), szacharóz (**S**), maltóz (**M**), laktóz (**L**), raffinóz (**R**), 1-arabinóz (**Ar**) és d-xilóz (**X**)
- vaspar

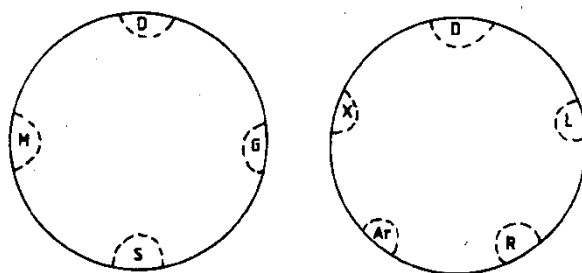
A gyakorlat menete:

A.) Asszimiláció: Az asszimilációs táptalajt (T-17) felolvasztjuk, majd 40°C-on vízfürdőzzük. A két élesztőgombából steril vízben szuszpenziót készítünk (1 kacs/2 ml), ebből steril pipettával 1-1 ml-t oltunk Petri-csészébe, majd a 40°C-os táptalajt ráöntjük és óvatosan jól elkeverjük. A táptalaj megdermedése után a lemezre 1-2 mg-nyi cukrot szórunk a 17. ábra szerint sorrendben a csésze széléhez közel. A glükózt mind a két csészébe bevisszük kontrollként. Az asszimilációs vizsgálatot a diagnosztikus cukrokon kívül 1-arabinóz és d-xilóz pentózokkal is elvégezzük.

B) Erjesztési próba: Az egyes diagnosztikus cukrot tartalmazó steril **T-17a** tápoldatból 2,5 ml-t pipetázunk a steril Wassermann-csövekbe. Biopipettával az előző tesztnél használt 25-25 µl-nyi szuszpenziókkal beoltjuk az egyes csöveket. Minden csőbe steril vazpart öntünk kb. 1 cm magasan. Az asszimilációs próbát 48 óra múlva, az erjesztési próbát 48 óra illetve 5 nap után (második leolvasás) értékeljük. Az inkubációs hőmérséklet 30°C.

Asszimilációnál pozitív esetben a cukrok körül a táptalaj opálosodik (a telepek növekedésének következménye).

Erjesztésnél az indikátor savanyodást jelez, intenzív gázképzés esetén a vazpardugó megemelkedik.



19. ábra: A vizsgált szénhidrátok elhelyezése az asszimilációs táptalajon

Eredmények és értékelés

1. Rajzoljuk le az asszimilációs csészéket a pozitív zónákkal!

2. Rögzítsük táblázatba a két faj **asszimilációs** spektrumát!

Mikroorganizmus	D	G	S	M	L	R	Ar	X
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>								
<i>Candida utilis</i>								

3. Táblázatban adjuk meg az **erjesztés**nél a párhuzamos oltások pozitív illetve negatív adatait!

Mikroorganizmus	D		G		S		M		L		R		Ar		X	
	2n	5n	2n	5n	2n	5n	2n	5n	2n	5n	2n	5n	2n	5n	2n	5n
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>																
<i>Candida utilis</i>																

4. Hasonlítsuk össze a két élesztőfaj asszimilációs és erjesztési spektrumát!

4. hét 4. gyakorlat: Az “alkoholos” erjedés

Az alkoholképzés „tisztán” az élesztőkre jellemző. Az EMP (fruktóz-1,6-difoszfát út (Embden-Meyerhof-Parnas) séma során képződött piroszőlősav dekarboxileződése (CO₂ vesztes) után képződő acetaldehidből redukcióval etanol képződik. A baktériumok közül a *Zymomonas lindneri*-nél találtak „tisztá” etanolképzést, az erjesztés skémája azonban az élesztőtől eltér. Segítségével állítják elő Mexikóban a pulque nevű szeszesitalt. Fontos még megemlítenünk a **Pasteur-effektust**: mely az élesztőgombáknál Pasteur által megfigyelt jelenség: „a légzés elnyomja az erjedést”; anaerob körülmények között alkoholos erjedés → oxigén adagolás hatására gyorsan átállnak oxidatív anyagcserére a sejtek (az alkohol képződése leáll), ezért fontos, hogy az alkoholos erjedés vizsgálatánál biztosítsuk az oxigén mentes körülményeket.

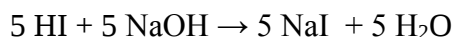
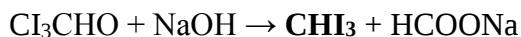
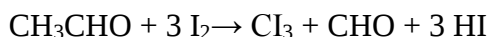
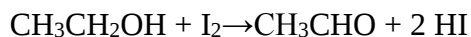
Mikroorganizmusok: *Saccharomyces cerevisiae*

Anyagok és eszközök: 100 ml szacharóz-aszparagin leves egy lombikban, 100 ml természetes gyümölcsle, 10%-os NaOH oldat, Lugol-oldat, kotyogó, 1 db üres kémcső, 1db félkémcső.

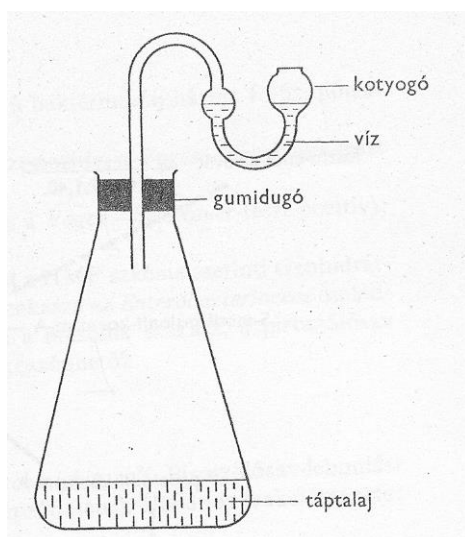
A vizsgálat menete: 1. Készítsünk félkémcsőben 6 ml fiziológiás sóoldatban *Saccharomyces cerevisiae* tenyészetekből szuszpenziót. 2. Oltsunk be 100 ml szacharóz-aszparagin levest tartalmazó lombikot és 100 ml természetes gyümölcslevet tartalmazó lombikot 3-3 ml *Saccharomyces cerevisiae* szuszpenzióval. 3. Tegyük a lombikba kotyogót (1. ábra). 4. Inkubáljuk az edényeket két napig 37 °C-on.

Az alkohol minőségi kimutatása: 1. Vegyünk ki 5 ml-t a lombikból egy üres kémcsőbe, és adjunk hozzá 4 ml NaOH-ot. 2. Majd adjunk hozzá cseppenként Lugol- oldatot addig, amíg enyhén sárgás színt kapunk (amennyiben a Lugol-oldatot túladagoljuk NaOH-dal visszaállíthatjuk a sárgás színt). 3. Hagyjuk állni két percig szobahőmérsékleten. 4. Rázzuk meg a kémcsövet. Ha csapadékkiválást nem észlelünk, melegítsük 1 percig 60 °C-on. (Ha melegítés közben elszíntelenedik, Lugol-oldattal állítsuk vissza a sárgás színt). 5. Vegyünk ki egy cseppet tárgylemezre, hagyjuk beszáradni és vizsgáljuk meg mikroszkópban kis nagyítással. A többit hagyjuk állni két percig, vizsgáljuk meg a csapadékot, szagoljuk meg.

Az alkoholos erjedés végbemegy mindkét lombikban, mert a természetes gyümölcslevet tartalmazó lombikban is vannak „vad élesztők”. A minőségi reakció folyamán jodoformkristályok válnak ki.



A mikroszkópban is megfigyelhetők a jellegzetes jodoformkristályok. A kotyogó az anaerob viszonyokat biztosítja, mert a vízzár lehetővé teszi, hogy a fejlődő CO_2 kiszorítsa a levegőt, de megakadályozza a levegő visszatérését.



20. ábra: Az alkoholos (etanolos) erjedés vizsgálatára alkalmas kotyogóval ellátott edény. A kotyogó légmentesen lezárja az edényt, de nem akadályozza a képződő szén-dioxid eltávozását. Az edényben anaerob viszonyok vannak mert a szén-dioxid kiszorítja a levegőt.

Eredmények és értékelés

1, Figyeljük meg, hogy a szacharóz-aszparagin leves és a természetes gyümölcsleves esetében is tapasztaltunk-e etanolos erjedést?

III. TÁPTALAJOK

T-1 : Kiegészített hústáptalaj 1000 ml-re

- 4 g húskivonat (beef extract)
- 4 g pepton
- g glükóz
- 1 g élesztőkivonat (yeast extract)
- 20 g agar (2%)

→illetve más koncentrációknál az agar megfelelő %-ban (az agartartalom az agar minőségének függvénye, a jegyzetben megadott viszonylag magas értékek (3%) szálas agarra vonatkoznak).

T-1a : Kiegészített hústápleves

Mint T-1, agar nélkül.

T-2 : Hústáptalaj 1000 ml-re

- 4 g húskivonat
- 4 g pepton
- 1 g élesztőkivonat
- 3 % agar

T-3 : Czapek-Dox minimál táptalaj 1000 ml-re

- 2 g NaNO_3
- 0,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
- 0,5 g KCl
- 0,5 g K_2HPO_4
- 30 g szacharóz
- 10 mg $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
- 10 mg $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
- 3 mg CuSO_4
- 3% agar

T-4 : Vitaminos szintetikus táptalaj 1000 ml-re

- 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 1 g KH_2PO_4
- 0,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
- 10 g glükóz
- 3 % agar
- kiegészítve 1 ml Wickerham-féle vitaminoldattal.

Wickerham-féle vitaminkeverék: 100 ml desztillált vízre

0,2 mg folsav	20,0 mg p-aminobenzoésav
0,2 mg biotin	20,0 mg riboflavin
40,0 mg Ca-pantotenát	40,0 mg aneurin.HCl (tiamin)
200,0 mg inozitol	40,0 mg piridoxin.HCl
40,0 mg niacin	

T-4a : Vitaminos szintetikus tápoldat

Mint a T-4, agar nélkül.

T-5 : Élesztőkivonat táptalaj 1000 ml desztillált vízre

- 5 g élesztőkivonat
- 10 g glükóz
- 3 % agar

T-5a : Élesztőkivonat tápoldat

Mint T-5, agar nélkül.

T-33 : Malátás komplett táptalaj

- 0,5% maláta kivonat
- 0,5% élesztő kivonat
- 0,5% glükóz
- 3,0% agar

IV. REAGENSEK, FESTÉKEK

R-8 : Laktofenol-gyapotkék (-anilinkék) oldat

- 10 ml glicerín
- 20 ml víz (Keverés után megszűrjük az oldatot, majd 100 mg gyapotkét 20 g fenol oldunk benne.)
- 20 ml tejsav

V. A GYAKORLATOKON ALKALMAZOTT MIKROORGANIZMUSOK JEGYZÉKE

Gram-negatív baktériumok:

Pseudomonas aeruginosa
Escherichia coli
Serratia marcescens
Proteus vulgaris

Gram-pozitív baktériumok:

Micrococcus luteus
Staphylococcus aureus
Streptococcus faecalis
Streptococcus pyogenes
Bacillus cereus var. *mycoides*
Bacillus megaterium
Bacillus subtilis
Clostridium sp.
Lactobacillus sp.
Streptomyces griseus
Streptomyces albus
Streptomyces aureus

Élesztőgombák:

Schizosaccharomyces pombe
Saccharomyces cerevisiae
Saccharomyces kluyveri
Saccharomyces diastaticus
Saccharomycodes ludwigii
Geotrichum candidum
Candida utilis
Rhodotorula rubra
Hansenula anomala

Fonalasgombák:

Aspergillus nidulans
Aspergillus niger 65
Aspergillus niger ade⁻ 341
Aspergillus violaceus
Aspergillus albertensis
Neurospora crassa
Penicillium chrysogenum
Penicillium claviforme
Penicillium frequentans
Penicillium purpurogenum
Penicillium ramigena
Sordaria fimicola
Trichoderma viridae
Actinomucor repens
Mucor hiemalis
Mucor genevensis
Mucor rouxii
Mycotypha pyriphaera
Syncephalastrum racemosum
Thamnostylum piriforme