

MIKROBIOLÓGIA

I. ÁLTALÁNOS MIKROBIOLÓGIA

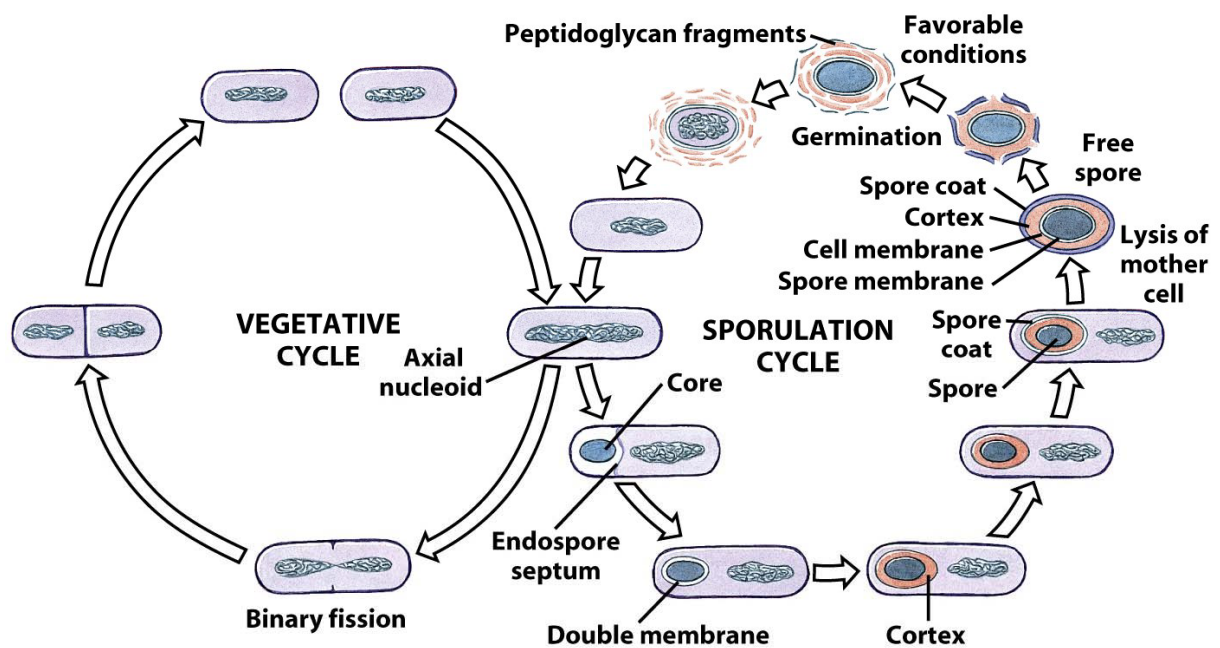


Figure 6-17 Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

Írták: **Réczey Jutka** és **Sipos Bálint** biomérnök hallgatók,
Sveiczter Ákos egyetemi docens előadásai alapján
Átdolgozta: **Sveiczter Ákos**

Műegyetem, 2008

1. A mikrobiológia területe, ágai és „aranykor” előtti története.

Mikrobiológia: A biológiának az az ága, amely a mikroorganizmusokkal foglalkozik.

Mikroorganizmus: Mikrobának nevezünk minden olyan élőlényt, amely nem jutott el a szövetszerű differenciálódásig, és életciklusának jelentős részében szabad szemmel nem látható. (Régebbi definíció: minden olyan élőlény, amely nem látható szabad szemmel.)

A mikrobák szerepe, jelentősége a világban

1.) A bioszféra állandósult állapotának, az egyes kémiai elemek biogeokémiai ciklusainak a fenntartása. Az elhalt állatok és növények szerves anyagainak jelentős részét (pl. cellulóz, lignin, keratin) csak mikrobák (gombák!) tudják lebontani, így a szén körforgását ők tartják fenn. A levegőben levő N_2 növények és állatok számára nem hasznosítható: baktériumok képesek annak fixálására, ill. tágabb értelemben a nitrogén körforgásának biztosítására.

2.) Együttélés magasabb rendű élőlényekkel (növények, állatok, ember egészségét befolyásolják): normál flórával pozitív, kórokozókkal negatív (kb. 1%) kapcsolat; a normál flóra és a kórokozók között pedig kompetíció.

3.) Tudatos gyakorlati felhasználás: élelmiszeripar (kenyér, bor, sör, sajt, szalámi, stb.), gyógyszeripar (antibiotikumok, oltóanyagok), bioremediáció (környezeti szennyeződés eltávolítása mikroorganizmusokkal, biológiai szennyvíztisztítás).

4.) Modell- és tesztorganizmusok tudományos kutatásokban (biokémia, genetika, molekuláris biológia): egyszerűen, gyorsan szaporíthatók, nagy méretű populációk, viszonylag olcsó és jól reprodukálható kísérletek.

A mikroorganizmusok 5 csoportja: baktériumok, algák, gombák, protozoonok, vírusok.

A mikrobiológia ágai

alap (további csoportosítása alább)

alkalmazott: orvosi, ipari és környezeti

Mivel foglalkozik?

virológia: vírus

bakteriológia: baktérium

mikológia: gomba

Mit vizsgál?

örökléstan: mikrobiális genetika

élettan: mikrobiális fiziológia

élőhely: mikrobiális ökológia; stb.

A mikrobiológia korai története

Ókor: nem ismerték a mikroorganizmusokat, de alkalmazták azokat élelmiszerek készítésére; fertőző betegségek járványosan is megjelentek.

Középkor: járványok (pl. pestis, fekete himlő) még nagyobb méreteket öltöttek.

Újkor

- *Hooke*: 17. sz., első mikroszkóp, parafa dugót vizsgált → a „sejt” szó megalkotása.
- *Leeuwenhoek*: 17. sz., első mikrobiológus, többek között a saját nyálát vizsgálta saját mikroszkópjával → az „állatkák” (mikroflóra) megfigyelése.
- *Redi* (17. sz.) húslegyes kísérlete (a spontán nemzés első cáfolata):
 - üvegben hús és nyitva → légylárvák jelentek meg a húson,
 - üvegben hús és lezárva → lárvák nem jelentek meg sehol,
 - üvegben hús és gézzel befedve → lárvák jelentek meg a gézen.
- *Spallanzani*: 18. sz., húslézfőzet leforrasztott üvegedényben steril marad (kritika: levegőtől való elzárás).
- *Schleiden, Schwann*: 19. sz., modern sejtbiológia alapjai, sejtelmélet → csíraelmélet a spontán nemzéssel szemben.

2. A mikrobiológia története az aranykortól napjainkig.

Aranykor

- *Pasteur*: Spallanzani kísérletének megismétlése nyitott rendszerben („hattyúnyakú” lombik); selyemhernyó betegségeket vizsgált; a pasztörözés kidolgozása a borászatban: mustot 56°C-ra melegítette fél órára (a „borbetegségek” kórokozóit elpusztította); a veszettség ellen védőoltást fejlesztett ki.
- *Koch*: szilárd fázisú tenyésztési technikák kidolgozása → szintenyészetek; ún. Koch-féle posztulátumok fertőző betegségek kórokozóinak azonosítására: ha egy ember vagy (laboratóriumi) állat valamilyen betegségben elpusztult, véréből mintát vett, ebből szintenyészeteket izolált, amelyekkel beoltott egészséges (laboratóriumi) állatokat → ha az egyik elpusztult, ennek alapján igazolni tudta a kórokozót → a lépfene, a kolera és a TBC kórokozóját így meghatározta; a TBC ellen vakcinát próbált készíteni.
- *Semmelweis*: Bécsben megfigyelte, hogy a kórházban szülő kismamák túl gyakran haltak meg gyermekágyi lázban → rájött, hogy ezt a betegséget az orvosok terjesztik (pl. kórbonctan → szülőszoba, ugyanis a „vérmérgezés”, a hullamérgezés és a gyermekágyi láz kórokozója azonos). Semmelweis maga is egy ilyen jellegű fertőzésbe halt bele.
- *Lister*: aszeptikus orvosi technikák bevezetése (műszerek, kötözőszerek fertőtlenítése fenollal).

Immunológia

A 20. századi mikrobiológia egyik legperspektivikusabb területe lett, amely fokozatosan külön tudománnyá nőtte ki magát, miközben gyökerei még korábbra nyúlnak vissza.

- *Jenner*: fekete himlő elleni oltás kifejlesztése a 18. sz. végén (kiinduló megfigyelése a tehenek és az ember himlős megbetegedése közötti kapcsolatról).

- *Mecsnyikov*: elsőnek mutatta ki a vér „baktériumölő” képességét az 1890-es években (a fehérvérsejtek között vannak ún. fagocita sejtek, melyek „felfalják” a vérben található kórokozó baktériumokat, majd elpusztítják és megemésztik azokat).

Viroológia

A vírusok megismerését a technika fejlődése tette lehetővé: 19. sz. végén baktériumszűrők, 1930-as évektől elektronmikroszkóp.

- *Ivanovszkij*: dohánynövény mozaikos betegsége átvihető baktériummentes szűrlettel → kórokozója a TMV (dohánymozaik-vírus).

- *Beijerinck*: a baktériumoknál kisebb sejtparazitákat elnevezte vírusoknak.

- *d’Herelle*: a (bakterio)fágokat fedezte fel; ezek olyan vírusok, amelyek baktériumokat fertőznek meg (elképzelése a fágok terápia felhasználásáról) → mérsékelt sikerű alkalmazás.

Kemoterápia

A kórokozó mikrobák célzott elpusztítása humán szervezetben → a 20. sz. mikrobiológia egyik legjelentősebb területe.

- *Ehrlich*: az első szintetikus mikrobaellenes gyógyszerek (pl. Salvarsan) kidolgozása a 19. sz. végén; a kemoterápia lényege a szelekció: a gyógyszer a mikrobasejteket károsítja, de a humán sejteket nem!

- *Fleming*: a penicillin (első ismertté vált antibiotikum) véletlen felfedezése 1928-ban (baktériumtenyésztés szennyeződése ecsetpenészgombákkal), megosztott Nobel-díj (a penicillin újra felfedezését és ipari szintű gyártását követően).

- *Waksman*: sztreptomycin (a második felfedezett antibiotikum) → szélesebb spektrum (Gram-negatív baktériumok ellen is hatásos).

Kapcsolat genetikával és molekuláris biológiával

A 20. sz. közepétől a mikrobák általános modell- és tesztorganizmusai az élettudományoknak (pl. biokémia, genetika) → számos Nobel-díj különböző területeken (ld. alábbi felsorolás).

- *Lederberg*: az ún. replika módszer kifejlesztése mutáns mikroorganizmusok izolálására (elkülönítésük az eredeti törzstől, az ún. vad típustól).

- *Watson* és *Crick*: a DNS szerkezetének megfejtése (bázispárosodás a két szál között; baktérium DNS-t vizsgáltak).

- *Monod*: baktériumok génregulációjának vizsgálata → a gének expressziója milyen tényezőktől függ és hogyan?

- *Rous*: az első daganatvírus felfedezése (1911-ben!) → utána még évtizedeken át vitatott volt, hogy vírusok tumorokat kelthetnek (Nobel-díj 1966-ban!).

- *Nirenberg*: a genetikai kód megfejtése (bázis tripletek → aminosavak).

- *Baltimore*: a reverz transzkriptáz felfedezése az ún. retrovírusokban (kivétel a „centrális dogma” alól, RNS mintán DNS másolat képződik).
- *Köhler*: monoklón ellenanyagok előállítása (nagy tisztaságú oltóanyagok és diagnosztikumok).
- *Prusiner*: a prionok „szaporodásának” és terjedésének kutatása.
- *Nurse*: az eukarióta sejtciklus univerzális genetikai szabályozásának felfedezése (Nobel-díj 2001-ben; vizsgálatait élesztőgombákon kezdte).
- *Warren*: a gyomorfekély fertőző voltának felismerése (Nobel-díj 2005-ben).

3. Az élőlények rendszerezése és annak fejlődése a 18. századtól a 20. század végéig. A mikroorganizmusok helye a rendszertanban.

Taxonómia (rendszertan)

Lényege az élőlények valamilyen hasonlóságok (bélyegek) alapján történő csoportosítása. Carl Linné (svéd, 18. sz.) az élővilágot növények és állatok országára osztotta, az élőlényeket binomiális (latin) névvel illette, hierarchikus szinteket (taxonok) vezetett be (központban a faj fogalma).

faj → nemzetség → család → rend → osztály → törzs/tagozat → ország

faj alatti szintek: alfaj, változat, rassz, törzs!

A binomiális nomenklátúra szerint csak a nemzetség- és fajnevet adjuk meg egy élőlény jellemzésénél, pl. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Saccharomyces cerevisiae*.

Fenetikus rendszer: külső bélyegek alapján csoportosítjuk az élőlényeket



Filogenetikai rendszer: a rokonság, az evolúciós leszármazás képezi a rendszer alapját

A jelenlegi rendszerek még inkább fenetikusak (morfológia, struktúra, biokémia, genetika, immunológia, stb.); filogenetikai rendszer genomikai alapokon (talán?) készíthető.

Az élőlények országainak (királyságainak) kialakulása a taxonómiában

Linné (18. sz.): két ország → Plantae és Animalia, azaz növények és állatok („zöld” vagy „mozog”)

Haeckel (19. sz.): bevezeti a Protista mint harmadik királyság fogalmát (szabad szemmel nem látható véglények)

Margulis (1950-es évek): a negyedik királyság a Monera (valamennyi prokarióta, azaz a baktériumok) → elkülönítésük a protisztáktól

Whittaker (1970-es évek): a gombákat is elkülöníti a protisztáktól → Fungi az ötödik királyság

Eubióta világ: az 5 ország együtt ↔ élettelen világ

Parabióta világ: az élő és élettelen világ határát alkotó sejtparazita szervezetek (3 csoport)

Vírusok: nukleinsav és fehérje alkotja

Viroidok: csak nukleinsav alkotja

Prionok: csak fehérje alkotja

Mikrobák világa

Monera, Protista, Fungi királyságok valamennyi képviselője → definíciójuk: valódi élőlények, amelyek a szövets differenciálódásig nem jutnak el, valamint életük jelentős fázisában szabad szemmel nem láthatóak (a parabiótákat is a mikrobák közé sorolhatjuk, hozzátéve, hogy nem önálló élőlények)

A 3 mikrobaország összehasonlítása

	Monera (= baktérium)	Protista (= alga és protozoon)	Fungi (= gomba)
sejttípus	prokarióta	eukarióta	eukarióta
sejtszerveződés	egysejtű vagy fonalas	egysejtű, ill. az algák jelentős része fonalas/telepes	egy- vagy soksejtű (fonalas/telepes, álszövetes)
sejtfal	fő komponense a murein	algának általában cellulóz; protozoonnak nincs	általában kitin
táplálkozás*	kilotróf vagy autotróf	alga: autotróf; protozoon: fagotróf, esetleg kilotróf	kilotróf
szaporodás	ivartalan ketté osztódás	zömmel ivartalanul (mitózis), de kisebb részben ivarosán is (meiózis megjelenik)	ivarosán vagy ivartalanul

* A heterotróf táplálkozás lehet **kilotróf** (a mikrobasejt enzimeket bocsát ki a külvilágba, részben sejten kívül emészt) vagy pedig **fagotróf** (fagocitózissal jut be a sejtbe a táplálék, csak sejten belül emészt).

Három-domén rendszer

Woese 1990-ben alternatív rendszert alkotott, amely az élőlényeket 3 doménre v. tartományra osztotta: Bacteria, Archaea, Eukarya. Alapja: extrém földi élőhelyeken különleges sejtfelépítésű baktériumok élnek, nevük (helytelenül!) ősbaktériumok (Archaea). Háromféle sejttípus létezik, amelyek egyértelműen meghatározzák a doméneket (valódi baktériumok, ősbaktériumok, eukarióták).

A három domén összehasonlítása (folytatás a 6. o. tetején)

	Ősbaktériumok	Valódi baktériumok	Eukarióták
sejttípus	prokarióta	prokarióta	eukarióta
tipikus sejtméret	1 μm	1 μm	10 μm
sejtfal	pszeudomurein	murein	egyéb v. nincs
sejtmembrán	glicerín-izoprén típusú vegyületek (éterkötés)	foszfolipid kettős réteg (észterek, hidrofób kölcsönhatások)	foszfolipid kettős réteg (észterek, hidrofób kölcsönhatások)

DNS szerkezet	egy cirkuláris kromoszóma, vannak hisztonszerű fehérjéi	egy cirkuláris kromoszóma, nincsenek hisztonjai	több lineáris kromoszóma, vannak hisztonjai
fehérjeszintézis	klóramfenikol nem gátolja	klóramfenikol gátolja	klóramfenikol nem gátolja
élőhely	főleg extrém élőhelyeken található meg	a bioszférában mindenütt gyakori	a bioszférában mindenütt gyakori
típusos élőlények	metanogén baktériumok, halobaktériumok, extrém termofil baktériumok	tejsavbaktériumok, cianobaktériumok, enterális baktériumok	protiszták (algák, protozoonok), gombák, növények, állatok

4. A pro- és eukarióta sejtek összehasonlítása. A prokarióta sejtek általános jellemzése, sejtfaluk szerkezete és annak típusai.

Valódi baktériumok: kisebb méret, egyszerűbb struktúra ↔ eukarióták: nagyobb méret, bonyolultabb struktúra

A pro- és eukarióta sejtek összehasonlítása

	Valódi baktériumok	Eukarióta sejtek
méret	~1 µm → nagy fajlagos felület	~10 µm → kisebb fajlagos felület
sejtmembrán	foszfolipidek, proteinek	foszfolipidek, proteinek, szterinek
belső membránok	általában nincsenek	kiterjedt struktúrák (ER), membrán határolt organelumok (sejtmag, mitokondrium)
genom	osztatlan: 1 cirkuláris DNS a nukleoid régióban, hisztonok nincsenek	osztott genom: lineáris kromoszómák a sejtmagban, hisztonok vannak
egyéb örökítő anyag	plazmidok	mitokondrium és kloroplasztisz DNS-e, primitívebb eukariótáknál plazmidok is
légzési enzimek	sejtmembránban	mitokondriumban
citoszkeleton	nincs (!)	van: mikrotubulusok, mikrofilamentumok
riboszóma	70 S, szabad	80 S, szabad vagy kötött (DER)
sejtfal	murein	ha van, akkor kitin (gombák), cellulóz (növények, algák), illetve egyéb
mozgásszerv	ha van, ostor = csilló (flagellum)	ha van, ostor (flagellum) ≠ csilló (cilium)
pilus	van	nincs
sejtosztódás	hasadás	hasadás vagy sarjadzás (mitózisos ciklus)
szaporodás	csak ivartalanul	ivartalanul vagy ivaroson (meiózis)

Prokarióta sejtek: kis méret (0,5 – 4 µm) → nagy fajlagos felület → gyors tápanyagtranszport → rövid generációs idő (~1 h) ↔ egyszerű struktúra

Alakja (egysejtűek): coccus (gömb), coccobacillus (ovális), bacillus (pálca), vibrio (vessző), spirillum (merev csavart), spirochaeta (flexibilis csavart). Egyes baktériumok alakja a változó külső körülmények hatására meg is változhat (pleomorfizmus).

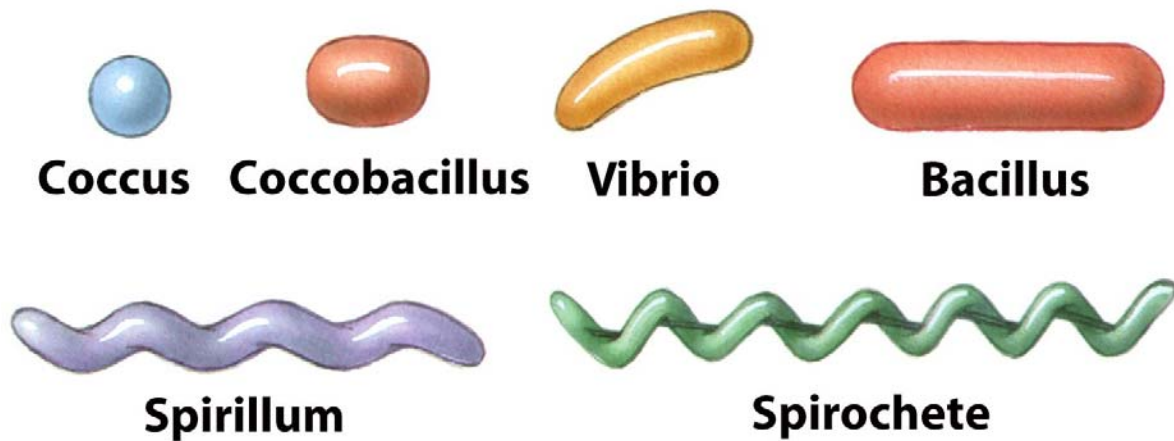


Figure 4-1 Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

Elrendeződése: a coccusoknál gyakoriak a csoportosulások (diplococcus, streptococcus, staphylococcus, tetrad, sarcina), a többi forma többnyire egyesével (kivétel: streptobacillus); különleges formájú, elrendeződésű és fonalas baktériumok is léteznek.

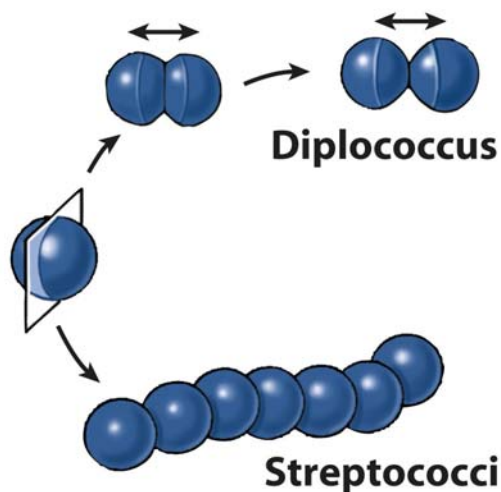


Figure 4-2a part 1 Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

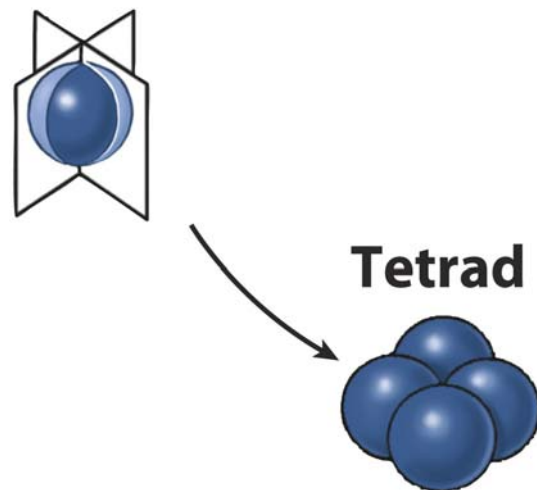


Figure 4-2b part 1 Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

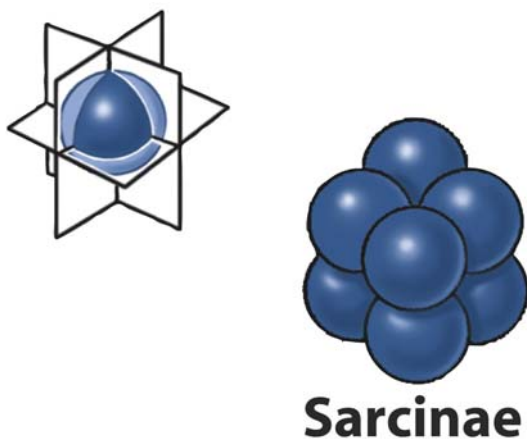


Figure 4-2c part 1 Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

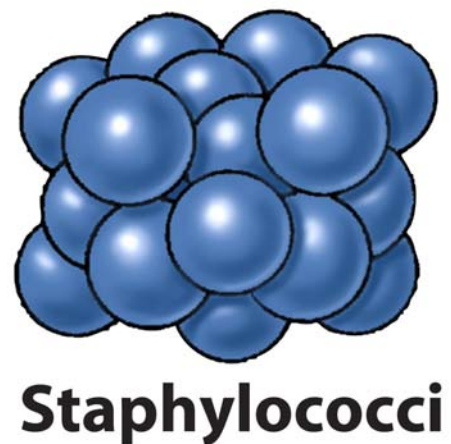


Figure 4-2d part 1 Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

Sejtszerkezet: felszín (sejtfal, sejtmembrán); belső szerkezet (citoplazma, nukleoid, riboszóma, zárvány, plazmid, endospóra); külső szerkezet (tok, pilus, ostor).

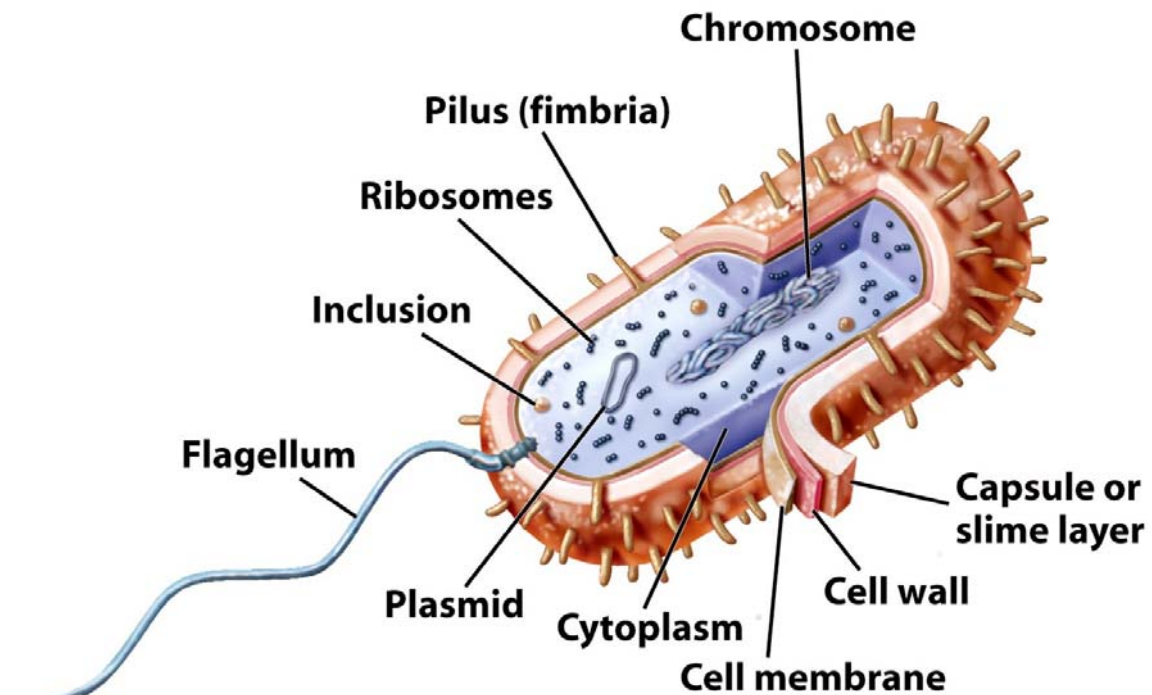


Figure 4-3 Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

Sejtfal

A sejt alakját biztosítja, ozmotikus stressznek ellenáll (nincs sem belső sejtváz (?!), sem szterinek a membránban), viszont nagyon durva szűrő; a sejtmembránon kívül található. Fő komponense a **murein** (vagy peptidoglikán): N-acetil-glükózaminból (NAG) és N-acetil-muraminsavból (NAM) álló lineáris heteropoliszacharid β -1,4 kötéssel; a NAM-okhoz tetrapeptid kapcsolódik (benne D-aminosavak is), köztük keresztkötések a diaminosavon keresztül \rightarrow 2D hálózat, de egymásra több réteg épülhet. A rétegeket teichonsav tartja össze: glicerinnél, ribitbnél és foszforsavból álló polimer.

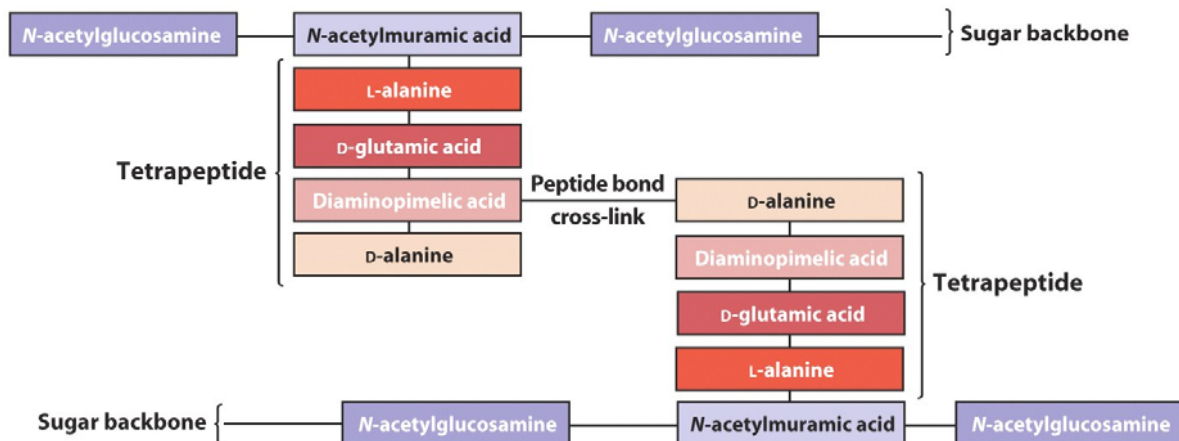


Figure 4-4a Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

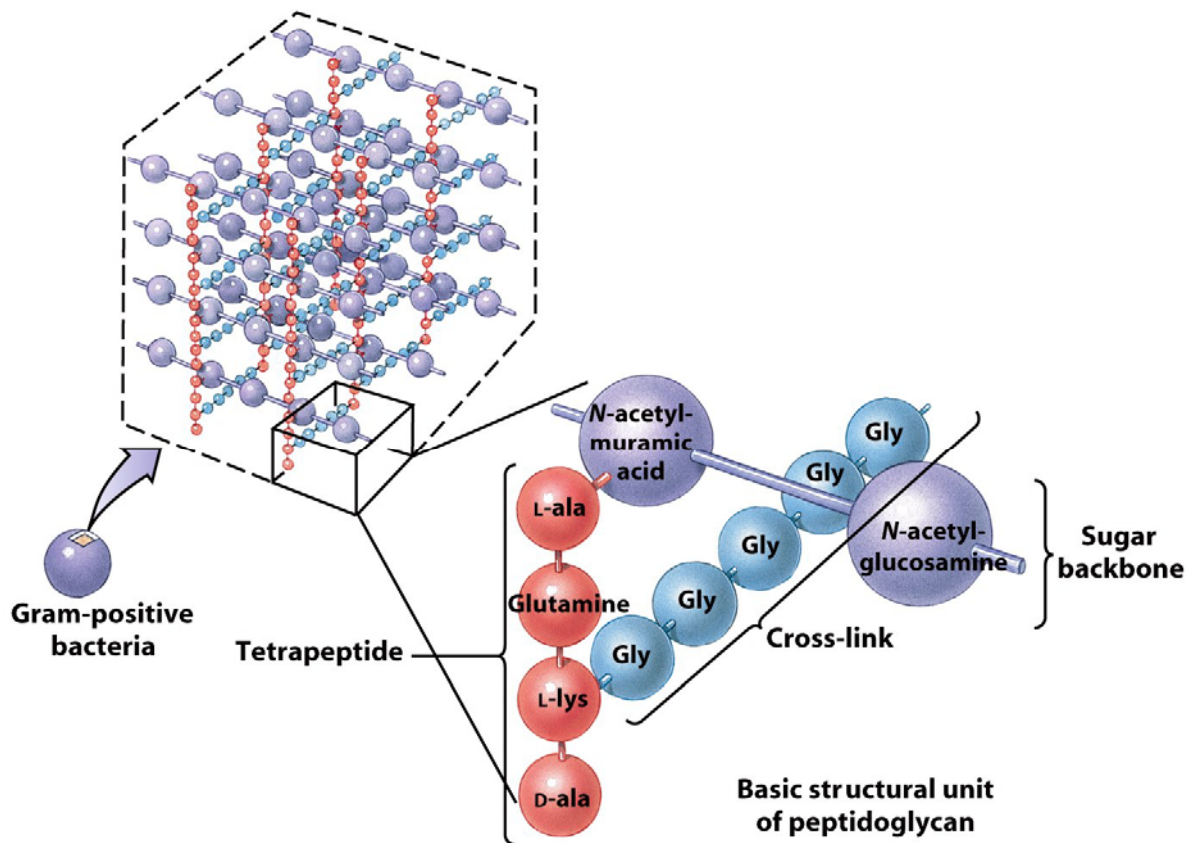


Figure 4-4b Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

Külső membrán: kettős foszfolipid réteg a mureinhálón kívül (!): erősen áteresztő tulajdonságú (benne porinok).

Periplazmás tér: a „belső” és külső membrán közti tér, nagy az enzim- és a táplálékkoncentráció, intenzív anyagcsere (emésztés) folyik benne.

Lipopoliszacharid (LPS) réteg: a külső membrán külső foszfolipid rétegéhez kapcsolódik, poliszacharid része antigén tulajdonságú, a lipid frakciója pedig az ún. endotoxin.

Gram-pozitív és -negatív sejtfal összehasonlítása

Gram-festés: kristályibolyával lilára festjük a rögzített sejteket, majd I₂-oldatot cseppentünk rá, ami erősíti a kristályibolya kötődését a mureinhez (Gram-pozitív és -negatív baktérium egyaránt adja). Alkoholos mosás következik, ami differenciál: a Gram-negatív baktérium elszíntelenedik, -pozitív lila marad (a mureinréteg vastagsága számít!). Végül szafraninnal kontrasztfestést végzünk, ami az elszíntelenedett Gram-negatív baktériumot pirosra festi (míg a -pozitív továbbra is lila marad). Friss tenyészzel célszerű a festést megcsinálni! Bizonyos baktériumokat a kristályibolya nem festi meg, ezek az ún. „saválló” baktériumok (viaszos sejtfaluk fuchsinnal festhető, amit utána savas-alkoholos kezelésre sem ad le a sejtfal). A murein lizozimmal oldató (a könnyű ettől baktericid hatású!) → a Gram-pozitív baktérium sejtfal nélküli protoplaszttá válik (gömb alakú és nagyon érzékeny), a Gram-negatívból pedig ún. szferoplaszt lesz (nem az egész sejtfalát veszíti el, alakja megmarad és kevésbé érzékeny).

A baktériumok sejtfa! típusainak összehasonlítása

	Gram-pozítív	Gram-negatív	Saválló
murein	vastag	vékony	vékony
teichonsav	van	nincs	nincs
lipid	nincs	foszfolipidek a külső membránban, lipopoliszacharid azon kívül	mikolsav és egyéb viaszszerű anyagok
külső membrán	nincs	van	nincs
periplazmás tér	nincs	van	nincs
sejtalkak	merev	flexibilis is lehet	flexibilis is lehet
lizozim hatására	protoplaszt képződik	szferoplaszt képződik	nem történik semmi
antibiotikumokkal szemben	erősen érzékeny	kevésbé érzékeny	erősen ellenálló

5. A prokarióta sejtek plazmamembránja, valamint belső és külső szerkezete.

Sejtmembrán

Szűrőfunkciója van: a belső és külső környezet kémiai elkülönítése, ugyanakkor transzportfolyamatok a membránon keresztül (tápanyagfelvétel, salakanyag ürítés). Foszfolipid kettősréteg az alapja (hidrofil fej, illetve hidrofób fark), szteránvázas vegyületek nem merevítik a prokarióta membránt → sejtfa! szükséges.

Membránfehérjék: transzport (csatornák), szignalizáció (receptorok), anyagcsere (enzimek).

Belső szerkezet

- *citoplazma*: anyagcsere színtere; 80%-ban víz, benne oldott szerves és szervetlen anyagok, illetve diszpergált sejtalkotók.

- *riboszómák*: fehérje szintézis; 70S; szabadon úsznak a citoplazmában (nincs ER → nincs kötött riboszóma).

- *nukleoid régió*: többnyire egyetlen cirkuláris kromoszóma diszpergálva (nincs sejtfa!, a régió határai változóak); nincsenek hisztonok és intronok sem, de fág eredetű DNS lehet a kromoszómában.

- *plazmidok*: extrakromoszómás cirkuláris DNS darabok; gyakoriak, de nem minden baktériumban vannak → horizontális géntranszferrel átadhatóak; antibiotikum-rezisztenciát is kódolhatnak; biotechnológiában expressziós vektorok.

- *zárványok*: tartalék tápanyagok; két típus: membránnal nem határolt ún. granulumok (pl. polifoszfát, poliszacharid vagy kén), vagy membránnal határolt ún. vezikulumok (= vakuólumok, pl. poli-hidroxivajsav, gázok).

- *endospóra*: kitartó képlet; csak a sporuláció folyamata során sejtalkotó (utána a sejt többnyire elpusztul); elhelyezkedése a sejtben (centrális, szubterminális, terminális) taxonómiai és diagnosztikai bélyeg lehet.

Külső szerkezet

- *ostor (csilló, flagellum)*: pálcá és spirillum formánál gyakori (a coccusnak nincs mozgásszerve, a spirochaetának ún. endoflagelluma van); elrendeződése lehet: atrich (nincs), monotrich (1 végen 1 db), amfitrich (2 végen 1-1 db), lofotrich (1 végen több db), lofoamfitrich (2 végen több-több db), peritrich („sok”, nemcsak a sejtpólusokon) → taxonómiai bélyeg; protein struktúra: alapegysége a flagellin, (majdnem!) tömör; részei: alapi test gyűrűkkel, kampó, filamentum.

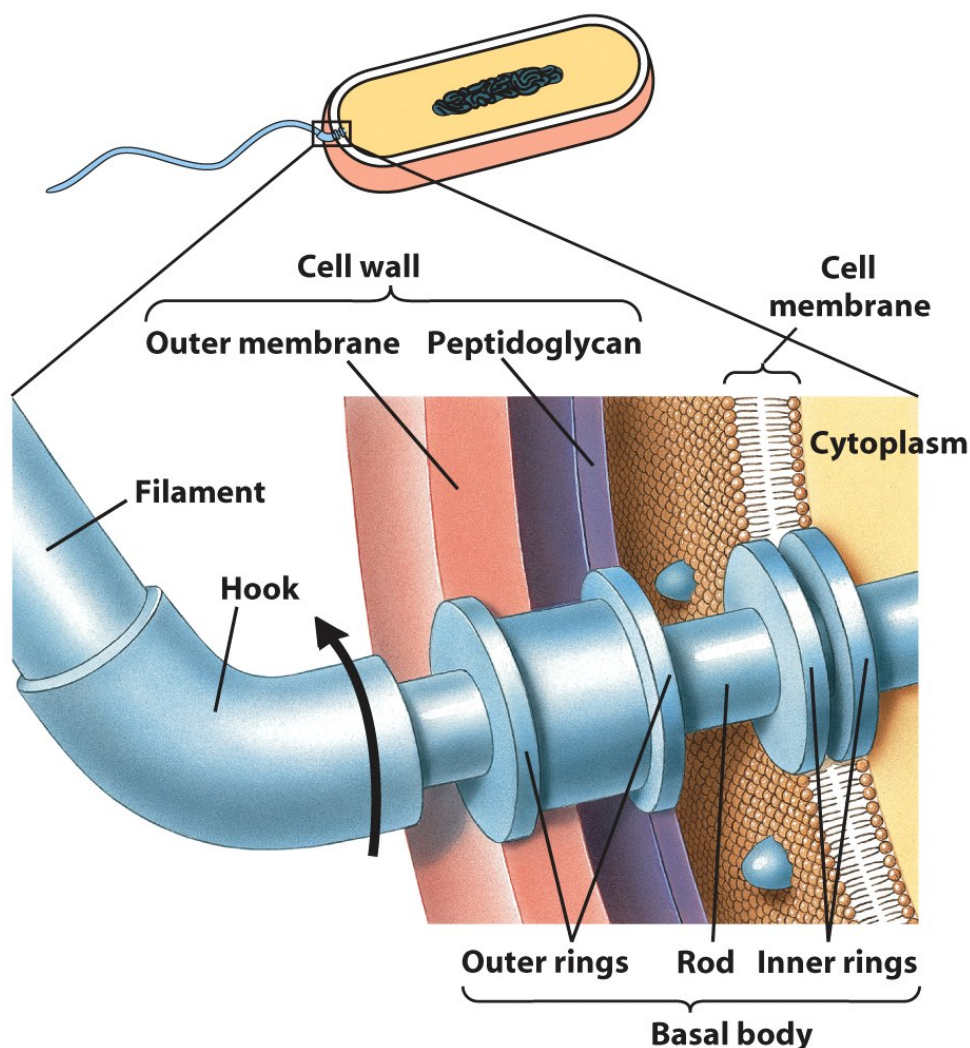


Figure 4-13a part 1 Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

- *pilus*: üreges; alapegysége a pilin nevű fehérje; tapadási ~: sok és rövid, másik baktériumhoz vagy szilárd felszínhez tapad segítségével a baktérium; konjugációs ~: kevés és hosszú, plazmidot adhatnak át ezen keresztül egymásnak a baktériumok.

- *glikokálix*: poliszacharid (pl. dextrán), esetleg polipeptid; lehet szilárd tok (kórokozónál a falósejtek általi bekebelezés ellen véd), vagy tapadós nyálkaburok (tapadást segíti elő és véd a kiszáradás ellen).

6. Az eukarióta sejtek általános jellemzése, belső és külső szerkezetük. Az endoszimbiózis jelentősége.

Az eukarióta sejtek nagyobb mérete bonyolultabb struktúrát tesz lehetővé (pl. belső membránnal határolt organellek), illetve differenciáltabb működést ↔ a nagyobb méret miatt viszont lassabb a szaporodás. Nincs feltétlenül sejtfaluk, mert van citoszkeletonjuk, továbbá a sejtmembránt szteránvázis vegyületek (állatok, protozoonok: koleszterin; növények, algák: fitoszterin; gombák: ergoszterin) merevítik. A plazmamembránban kevesebb anyagcsere-folyamat játszódik le, mint a prokariótákéban → kevesebb enzim ↔ bonyolultabb szignalizáció → több receptor fehérje.

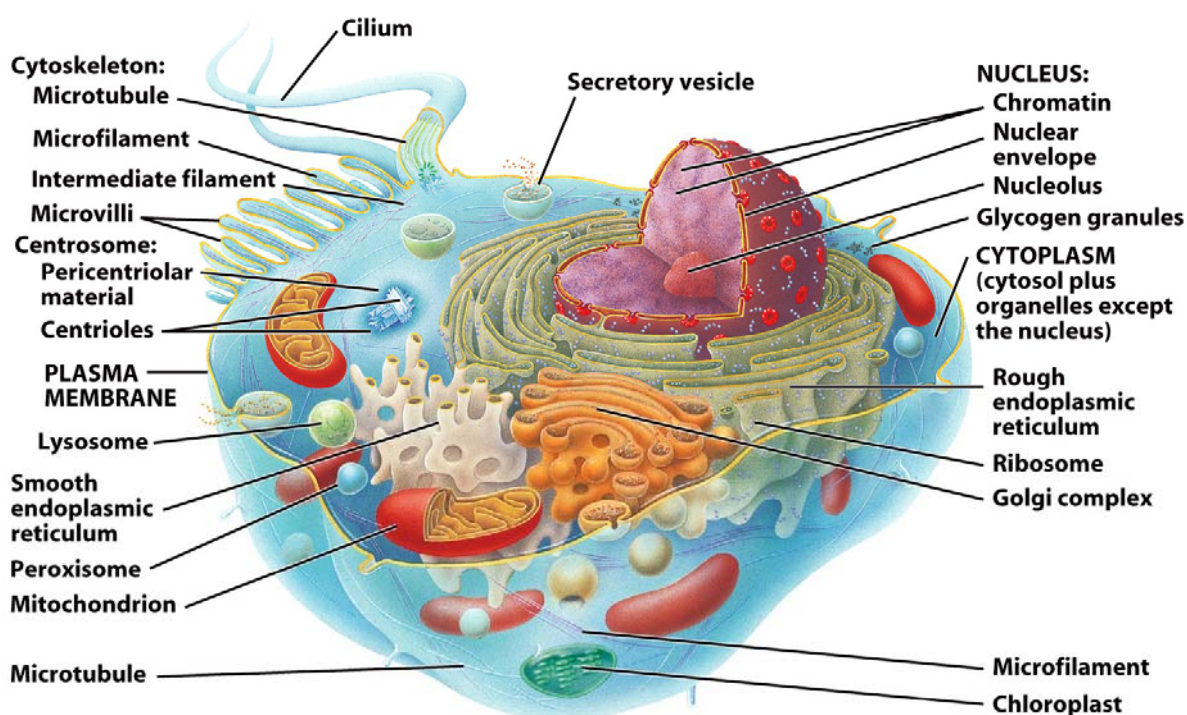


Figure 4-18 Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

Belső szerkezet

- *citoplazma*: nagy viszkozitású vizes közeg, ami kitölti a sejt belső terét, benne oldott szerves és szervetlen anyagok, diszpergált sejtszervecskék; itt játszódik le az intermedier anyagcsere zöme.

- *nukleusz*: sejtmag, itt található a sejt teljes kromoszómaállománya (lineáris, hisztonok); két sejtmembránnal körülhatárolt, jól elkülönülő sejtorganellum, pórusokon keresztül kommunikál a citoplazmával; funkciója a DNS védelme, valamint a transzkripció és a transláció elkülönítése.

- *ER*: endoplazmás retikulum, kiterjedt membránhálózat, a nukleusz membránjának a folytatása; van sima felületű (SER), ezen szintetizálódnak a lipidek, és durva felületű (DER), ezen kötött riboszómák vannak (fehérjék szintézise).

- *riboszómák*: 80S; vannak kötöttek a DER-en, illetve a citoplazmában úszó szabad riboszómák, felépítésük és fehérjeszintetizáló képességük azonos.

- *Golgi-készülék*: lapos membránszakokból áll; fehérjéket fogad az ER-től, azokat kémiaiailag módosítja, vezikulumokba csomagolja és rendeltetési helyére irányítja.

- *vezikulumok (vakuólumok)*: membránnal körülhatárolt raktározó egységek (pl. tartalék tápanyagok lehetnek bennük).

- *lizoszómák*: vezikulum tele emésztőenzimokkal → fagotrófoknál (pl. protozoonok, fagocita fehérvérsejtek) a sejtben belüli emésztés színhelye; öreg sejtalkotók eliminálása.

- *peroxiszómák*: vezikulumféle, melyben oxidatív folyamatok (pl. lipidek, aminosavak oxidációja) zajlanak.

- *plazmidok*: kis cirkuláris DNS darabok (eukarióták körében csak gombáknál).

- *sejtváz*: fehérjehálózat, a sejt belső váza; mikrofilamentum (tömör) és mikrotubulus (üreges); funkciói: belső tartószerkezet (megtartja a sejt alakját), szállítófunkció, mozgás.

- *mitokondrium*: két membránnal határolt organel minden eukarióta sejtben; belső tere a mátrix (itt játszódik le a citromsav-ciklus); belső membránja lemezesen betüremkedik (kriszták) → itt helyezkednek el az ATP-szintetázok (légzés); saját cirkuláris (!) DNS-e van, 70S riboszómái, továbbá autonóm szaporodási ciklusa (osztódás).

- *kloroplasztisz*: a mitokondriumhoz sok szempontból hasonlít, de csak növényi és algasejtekben található; van egy belső leszakadt (harmadik) membránja, az ún. tilakoid → az ezekből képződött oszlopok a gránumok: itt játszódik le a fotoszintézis fényszakasza.

Külső szerkezet

- *ostor*: protiszták és primitív gombák membránhatárolt mozgásszerve tubulinból (jellegzetes elrendeződés); kevés és hosszú, számuk és elhelyezkedésük taxonómiai bélyeg.

- *csilló*: rokon szerkezetű az ostorral, de sok és rövid; kizárólag az ún. csillós protozoonok mozgásszerve; a fagotróf táplálkozást is segíti.

- *álláb*: amőbák (és fagocita fehérvérsejtek) citoplazma áramlással képződő mozgásszerve, ami a fagocitózishoz is szükséges; aktin polimerizáció okozza a kitüremkedést illetve sűrűségkülönbség az áramlást.

- *sejtfal*: állati sejteknek ill. a protozoonok zömének nincs sejtfala; gombáknál kitin, glükán és mannán a sejtfal fő komponensei, algáknál pedig cellulóz mellett egyéb poliszacharidok (pl. agar), CaCO₃ és szilikátok alkotják.

Endoszimbiózis

A sejtorganellek eredetéről szóló elmélet: egy ősi (elő)eukarióta sejt baktériumokat kebelezett be, melyek rögzültek benne → közvetett bizonyítékai az alábbi tények, melyek arra utalnak, hogy a mitokondrium és a kloroplasztisz túlságosan „baktériumszerűek”.

- méretük a baktériumok méretéhez hasonló;

- saját DNS-ük van a mátrixban ill. a sztrómában, amely cirkuláris és hisztonok nem kötődnek hozzá;

- 70S méretű riboszómák találhatók a mátrixban (sztrómában) → saját fehérjeszintetizáló apparátussal rendelkeznek (antibiotikummal gátolható; néhány eltérés a genetikai kódszótártól);

- két membrán határolja, melyek közül a belső prokarióta típusú, tele légzési enzimekkel, a külső viszont eukarióta típusú;

- autonóm osztódási ciklusaik vannak (*de novo* szintézis nincs).

Evolúciós kövület a modern bioszférában: pl. a *Giardia intestinalis* nevű ostoros bélp parazita protozoon (nincs mitokondrium, 70S riboszóma).

SET hipotézis (sorozatos endoszimbiózisok teóriája; Margulis) → pl. az eukarióta ostor/csilló őse egy bekebelezett spirochaeta lehetett (?)

Endoszimbiózis napjainkban is létrejön → pl. rovarok tápcsatornájában élő protozoonok baktériumokat kebeleznek be, és tartósan „mitokondriumként” hasznosítják őket.

7. A metabolizmus általános jellemzése, anyagcseretípusok. A mikroorganizmusok anaerob kemoheterotróf anyagcseréje.

Metabolizmus = katabolizmus + anabolizmus

A metabolizmus (anyagcsere) a sejtben lejátszódó biokémiai folyamatok összessége. Az anabolizmus a felépítő folyamatok, a katabolizmus pedig a lebontó folyamatok összefoglaló neve.

Katabolizmus: polimerek hidrolízise monomerekké, illetve utóbbiak oxidációja (ATP termelés) ↔ anabolizmus: monomerek szintézise, illetve azok kondenzációja polimerekké (ATP felhasználás, esetleg redukció).

A biokémiai utak enzimmatalizált elemi lépésekből állnak; minden enzim átalakítja a szubsztrátját a megfelelő termékké, ami egyben a következő enzim szubsztrátja lesz. Intermedierek: a biokémiai út köztes termékei (egyben köztes szubsztrátjai).

Az élőlények anyagcseréjét a szén- és energiaforrás iránti igényük szerint lehet csoportosítani.

szénforrás igény: heterotróf (= organotróf): kész szerves anyagot kell felvennie ↔ autotróf (= litotróf): szerves anyagból (légköri CO₂) szerves anyag előállítására képes

energiaforrás igény: kemotróf: kémiai energia átalakításával állít elő ATP-t ↔ fototróf: fényenergia átalakításával állít elő ATP-t

C- és E-igény alapján négyféle anyagcseretípust különböztetünk meg: fotoautotróf, kemoautotróf, ftoheterotróf, kemoheterotróf.

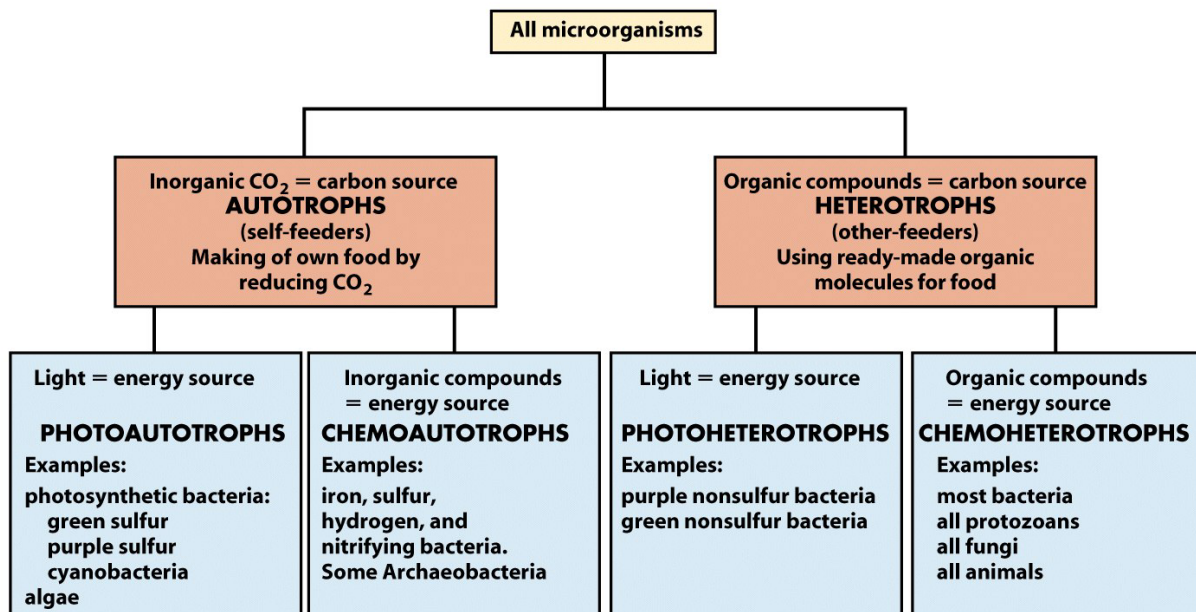


Figure 5-2 Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

Kemoheterotróf anyagcsere

Táplálkozás szerves anyagokkal (pl. szénhidrát), amely egyszerre C- és E-forrásként is szolgál. A szénhidrátlebontás központi útvonala a glükolízis, melynek során egy molekula glükózból két piroszőlősav képződik, két NAD redukálódik és nettó két ATP termelődik (szubsztrát szintű foszforiláció; v.ö.: oxidatív foszforiláció). A piroszőlősav ezután oxidatív vagy fermentatív úton alakul tovább a sejt anyagcseretípusa és a külső körülmények (aerob, anaerob) függvényében. A pentóz-foszfát út egy alternatív lehetőség a glükóz lebontására, melynek bizonyos intermedierjei (pl. ribóz, ribulóz, trehalóz) anabolikus utakhoz fontos építőköveket szolgáltatnak.

Fermentatív anyagcsere

A piroszőlősav oxigén nélkül (anaerob úton, de nem feltétlenül (!) anaerob körülmények között) alakul tovább. További ATP itt már nem képződik, a fermentáció hajtóereje a NADH koenzimek regenerációjának kényszere. A fermentációnak az alábbi lehetséges útjai vannak.

- *tejsavas erjedés*: a koenzimek egy lépésben tejsavvá redukálják a piroszőlősavat; homofermentatív a folyamat, ha >90%-ban tejsav keletkezik, ekkor nincs gázképződés; heterofermentatív, ha tejsav csak <90%-ban keletkezik (mellette egyéb termékek, köztük gázok); tejsavbaktériumok → tejipar, tartósítóipar, normál humán mikroflóra.

- *alkoholos erjedés*: a piroszőlősav dekarboxileződése (CO₂ vesztes) után képződő acetaldehidből redukcióval etanol képződik; élesztőgombák → sör-, szesz-, boripar.

- *propionsavas erjedés*: a piroszőlősav koenzimes oxidációja és dekarboxileződése után ecetsav és CO₂ keletkezik, miközben egy másik piroszőlősav molekula propionsavvá redukálódik; propionsav-baktériumok → sajtgyártás (aroma!).

- *butándiolos erjedés*: két piroszőlősav kondenzációja, majd dekarboxileződése és redukciója eredményezi a négyszénatomos diolt; intermedierje, az acetoin könnyen kimutatható → bizonyos tüdőgyulladást okozó baktériumok diagnosztikájában fontos.

- *vajsavas-butanolos erjedés*: szintén kondenzáció és dekarboxileződés eredményez négyszénatomos termékeket: vajsav, butanol, de emellett izopropil-alkohol, acetoin, CO₂ is keletkezik; bizonyos anaerob baktériumok → oldószergyártás.

- *kevert savas erjedés*: bonyolult reakciók hálózata során borostyánkősav, ecetsav, etanol, hangyasav képződik, utóbbi esetleges bomlása H₂ és CO₂ gázokat eredményez; főleg az ún. bélbaktériumokra jellemző.

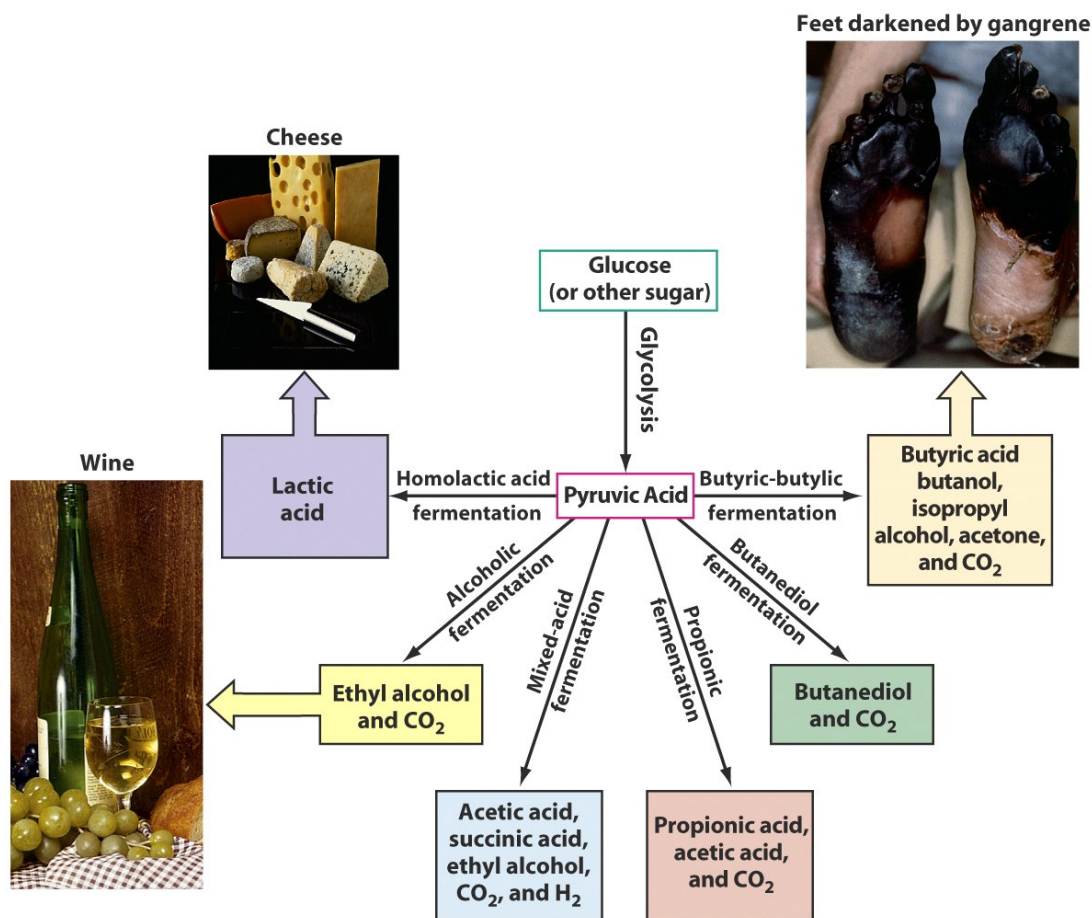


Figure 5-12 Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

8. A mikroorganizmusok aerob kemoheterotróf anyagcséréje és összehasonlítása az anaerob anyagcsérével. „Anaerob respiráció”, „aerob erjedés”, Pasteur- és Crabtree-effektusok.

Oxidatív anyagcsere

Ha a sejt lélegzik (respiráció), akkor tipikusan a légköri oxigén segítségével (azaz aerob környezetben) bontja le a cukrot. Először a glükolízis során keletkező piroszőlősav oxidatív dekarboxilezése során AcCoA keletkezik (a citrát-ciklus kapureakciója).

A citrát-ciklus (helyszíne: baktériumok citoplazmája, eukarióták mitokondriumának mátrixa) első lépésében oxálecetsav (4C) veszi fel a CoA által szállított acetilsoportot (2C) és citromsav (6C) képződik. Átrendeződések után kétszer egymás után oxidatív dekarboxileződés történik → a piroszőlősav C-atomjai „elégnek”, a keletkező borostyánkősav (4C) pedig többszöri oxidatív lépésekben oxálecetsavvá alakul, és ezzel a ciklus záródik. A folyamat mindössze egy molekula GTP-t szolgáltat (egy piroszőlősavra vetítve), az oxidatív lépéseket pedig koenzimek végzik (oxigén nem szerepel szubsztrátként → anaerob folyamat!). A citrát-ciklus nagy mennyiségben gyárt redukált koenzimeket (NADH, FADH₂), amivel a sejtnak valamit kezdenie kell.

A redukált koenzimek a terminális oxidáció során oxidálódnak a baktériumok plazmamembránjában, illetve eukariótáknál a mitokondrium belső membránjában. A membránban légzési elektrontranszportlánc működik (e⁻ szállítására képes fehérjék és kis molekulák), melyek végül az elektronokat a légzési O₂ molekuláknak (terminális elektronakceptor; ez a folyamat már tényleg aerob) adják át. A folyamat során a koenzimek regenerálódnak, az oxigén pedig vízzé alakul. Az ATP-szintézist a kemiozmózis mechanizmus szerint az a protongradiens hajtja, ami az elektron „vándorlása” során képződik a membrán két oldala között → a protonkülönbség a membránban található ATP szintetázokon átáramolva kiegyenlítődik, ekkor képződik az ATP (oxidatív foszforiláció; v.ö. szubsztrát szintű foszforiláció). Az aerob anyagcsere közel 20x annyi energiát „termel”, mint az anaerob, viszont tudni kell „kezelni” az oxigént, ami egyébként sejtmeleg (!).

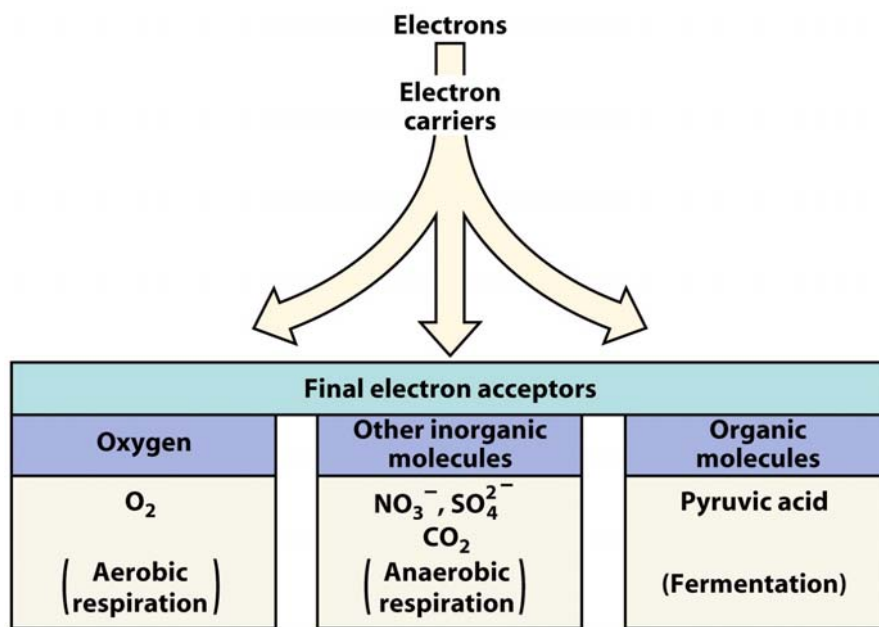


Figure 5-21 Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

Oxidatív anyagcsere számos baktérium esetében működhet oxigén (O₂!) nélkül, anaerob módon is → anaerob respiráció. A terminális elektronakceptor ezekben az esetekben NO₃⁻, SO₄²⁻, CO₂ lehet → ennek megfelelően beszélünk nitrátlégzésről, szulfátlégzésről,

széndioxid-légzésről. A kemoorganotróf katabolizmus során mindig képződnek redukált koenzimek, amelyek regenerálása a sejt számára alapvető fontosságú → ez történhet fermentatív (mindig anaerob) vagy oxidatív úton, utóbbi esetben pedig megkülönböztetünk aerob és anaerob légzést attól függően, hogy az elektronokat végül O_2 veszi-e fel vagy pedig más. Anaerob anyagcsere számos baktérium mellett néhány gombánál és protisztánál még előfordul, de a magasabb rendű eukarióták szigorúan aerobok.

„Aerob erjedés”

Hiányos oxidáció; a citrát-ciklus defektje miatt a szerves tápanyag C-atomjai nem tudnak széndioxiddá oxidálódni, de a koenzimek regenerációja elektrontranszportláncon játszódik le (oxidatív anyagcsere, amely oxigént használ!) → pl. ecetsav-baktériumok (etanol → ecetsav).

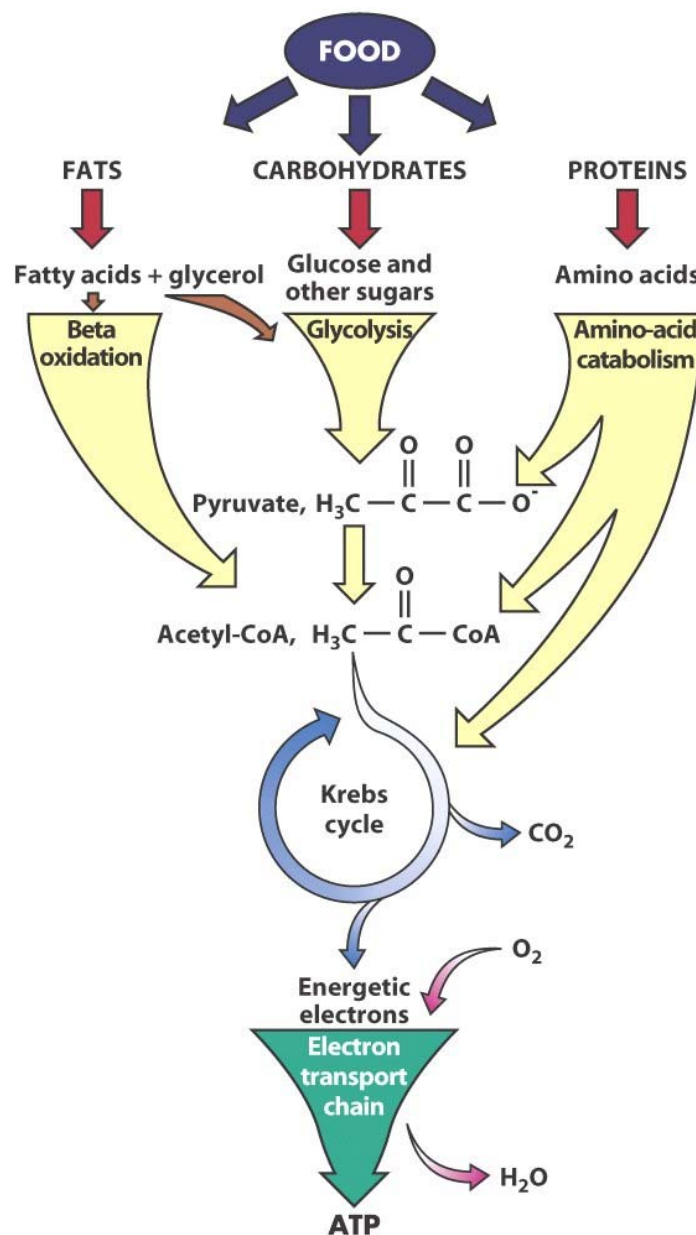


Figure 5-24 Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

Pasteur-effektus

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).

Crabtree-effektus (reverz Pasteur-effektus)

Szintén élesztőkben oxigén-dús körülmények között is végbemehet az alkoholos erjedés, ha túl nagy a cukorkoncentráció → a glükolízis fluxusa nagyobb, mint az oxidatív anyagcsere fluxusa → sok piroszőlősav és redukált koenzim keletkezik, amit az oxidatív anyagcsere nem tud „feldolgozni” → beindul a fermentáció is. A Pasteur- és Crabtree-effektusoknak komoly ipari jelentőségük van (élesztőgyártás, szeszgyártás).

Katabolizmus nem szénhidrát alapon

zsírok: a trigliceridek hidrolízise glicerint és zsírsavakat eredményez → a glicerint a glükolízisben bontja le a sejt (dihidroxiacetonná lehet oxidálni koenzimokkal); a zsírsavak pedig kétszénatomos egységeként lehasadva AcCoA-vá oxidálódnak (β -oxidáció) → citrát-ciklusban hasznosulnak.

fehérjék: hidrolízis aminosavakra → azok oxidatív dezaminálódása α -ketosavakat eredményez, amelyeket a citrát-ciklusba be lehet vezetni.

9. A mikroorganizmusok fotoautotróf, fotoheterotróf és kemoautotróf anyagcseréje. Az energia felhasználásának módjai mikroorganizmusoknál.

Fotoautotróf anyagcsere

C-forrás: légköri CO_2 , E-forrás: napfény → fotoszintetizáló baktériumok és algák tartoznak ide (utóbbiak anyagcseréje a növényekével lényegében azonos).

A legősibb fotoszintetizálók a zöld és bíbor kénbaktériumok; egyetlen fotocentrumukban a bakterioklorofillt (a növényekhez képest) nagyobb hullámhosszú (kisebb energiájú) fény gerjeszti; elektrononorként kénhidrogént fotolizálnak → elemi kén keletkezik a sejt belsejében zárványként (ami utána tovább oxidálódhat szulfáttá), vagy pedig kiválasztódik a sejten kívülre. A bíbor kénbaktériumban karotenoid típusú pigment is van a klorofill mellett. A cianobaktériumok már a vizet képesek fotolizálni, őseik kezdtek el először O_2 -t termelni a Földön évmilliárdokkal ezelőtt. Ez akkoriban súlyos „légszennyezés” volt, hiszen egészen addig a Föld légköre redukív (vagy semleges?) volt. Ugyanakkor ennek hatására lassan átalakult az élővilág, hiszen alkalmazkodni kellett a megváltozott viszonyokhoz (az oxigén tolerancia, majd az oxigén hasznosítás képessége fejlődött ki). A növényvilág későbbi létrejötté ellenére a cianobaktériumok O_2 -termelése ma is jelentős.

Fényszakasz és sötét szakasz

A fotoszintézis fényszakasza során a fény hatására gerjesztett klorofill által leadott elektron egy elektrontranszportláncon vándorol végig (prokariótáknál is gyakran belső membránokban, algáknál a szintest tilakoid membránjában), és kemiozmóztikus mechanizmussal ATP termelődik. A terminális elektronakceptor vagy maga a klorofill (ciklikus fotofoszfóráció) vagy NADP (nem-ciklikus fotoredukció) → utóbbi esetben redukált koenzimek is keletkeznek, amelyekre a sötét szakaszban van szükség.

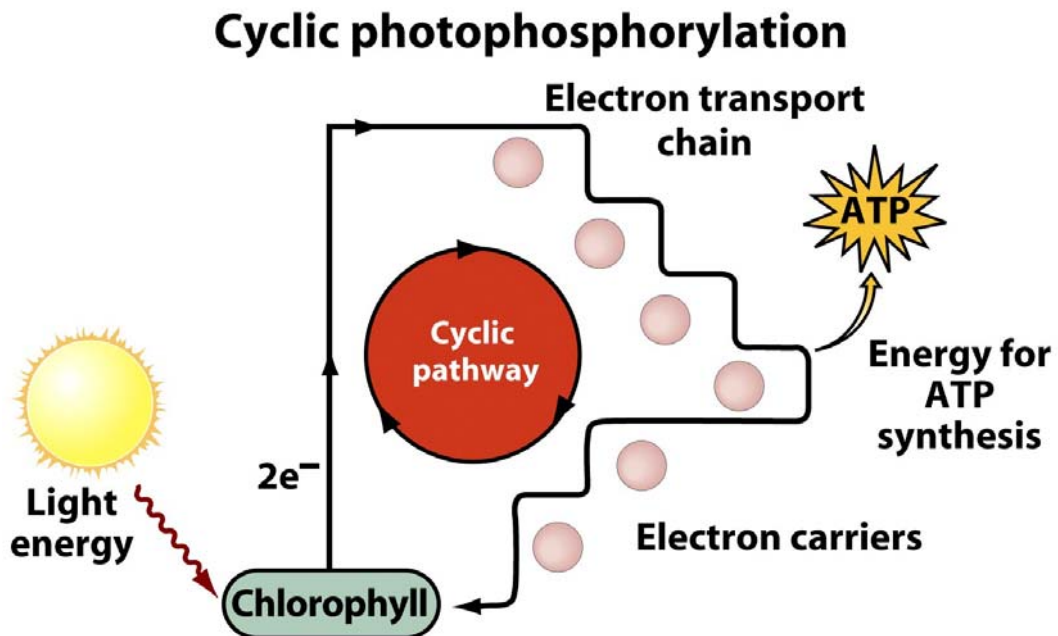


Figure 5-25a Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

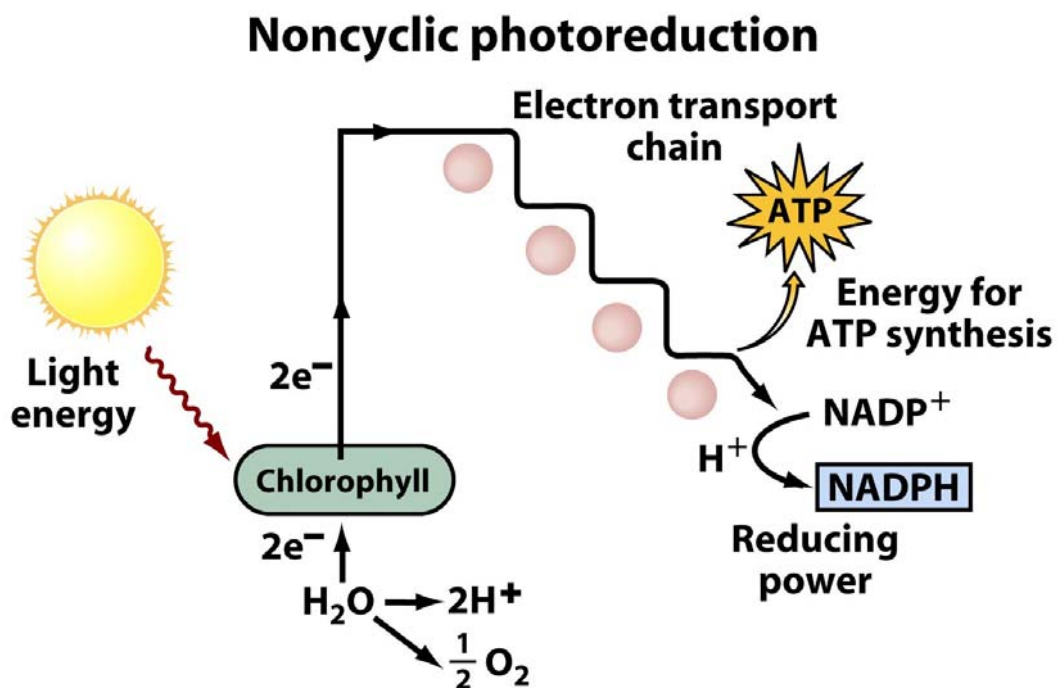


Figure 5-25b Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

A sötét szakasz fényt nem igényel, de a fényszakaszban képződött ATP-t és NADPH-t igen, azok segítségével fixálódik a CO₂. A Calvin-ciklus első és legfontosabb lépése a ribulóz-1,5-difoszfát (5C) karboxilációja, amely két molekula foszfoglicerinsavat (2*3C) eredményez.

Fotoheterotróf anyagcsere

Az ilyen anyagcserejű baktériumok is fotoszintetizálnak (fény- és sötétszakasz is van!), de semmilyen szervetlen vegyületet nem tudnak fotolizálni, hanem kis molekulájú szerves vegyületeket oxidálnak a nem-ciklikus folyamatban. Pl. alkohol és aldehidek lehetnek elektrondonorok a fényszakaszban, melyeket a sejt készen vesz fel a külvilágból, ezért heterotrófok (!). Éppúgy lehetnek pigmentáltak (zöld és bíbor), mint a kénbaktériumok, de nem képződik bennük elemi kén → nevük zöld (bíbor) nemkénbaktériumok.

Az ún. halobaktériumok csak részlegesen fototrófok: a citoplazmamembránban van az ATP szintézisük, ahol rodopszin gerjesztődik; nem tudnak a fényenergiából redukálóerőt előállítani, csak ATP-t → szerves anyagokkal is táplálkoznak (mixotrófok, de mindenképp heterotrófok).

Kemoautotróf anyagcsere

Ezek a baktériumok szervetlen anyagok oxidálásával termelnek ATP-t és NADPH-t, ezért kemotrófok. Ugyanakkor képesek széndioxidot fixálni, Calvin-ciklusuk van, tehát autotrófok (kemoszintetizálók). A redukált koenzimek egy részét elektrontranszportláncon oxidálják → így képződik az ATP.

Nagy szubsztrátigény, sok melléktermék jellemző anyagcserejükre → a környezet jelentős megváltoztatása (fontos szerep biogeokémiai ciklusokban).

Ide tartoznak a talajlakó nitrifikáló baktériumok, melyek két csoportja az ammóniaoxidálók (NH₃ → NO₂⁻) és a nitritoxidálók (NO₂⁻ → NO₃⁻). Szintén talajokban élnek, azt elsavanyítják a szintelen kénbaktériumok (H₂S → S → H₂SO₄). A fém baktériumok Fe²⁺ és Mn²⁺, a hidrogénbaktériumok pedig a hidrogén oxidációjából „élnek”. Az eddigi példák valamennyien aerob kemoautotrófok voltak, de léteznek anaerob kemoautotrófok is. A hidrogén ugyanis nemcsak oxigénnel „égethető el”, hanem nitráttal (denitrifikáló baktériumok), vagy széndioxiddal is (metanogén ősbaktériumok).

Energia felhasználás

Mire fordítódik a mikrobacejtékben a sok megtermelt ATP?

- *anabolizmus*: a monomerek (pl. aminosavak) ill. azokból a makromolekulák (pl. fehérjék, murein) bioszintézise; foto- ill. kemoszintézis sötét szakasza

- *membrán transzport*: sok esetben koncentrációgradienssel szembeni szállítás (aktív transzport)

- *mozgás*: pl. a csilló vagy ostor mozgatása, az álláb növesztése

- *szignalizáció*: a külvilág ingereinek felfogása receptorokkal, a jel továbbítása a membránon át a sejtbe, eukariótáknál sok esetben a sejtmagba (pl. kináz-kaszádok)
- *sejtosztódási ciklus*: makromolekulák bioszintézise → térbeli növekedés → sejtosztódás (sok komplex folyamat végrehajtása és azok regulációja)
- *biolumineszcencia*: tengeri baktériumok fényemittálása luciferáz enzim segítségével → szimbiózis állatokkal (tájékozódás); két szubsztrátos oxidáció oxigénnel → korai evolúciós jelentőség (oxigén eltávolítása?)

10. Az egysejtű mikroorganizmusok ivartalan szaporodásának formái. A mikrobapopulációk szaporodásának fázisai. Szaporító- és kitartóképletek, endospóráképzés.

Mikrobák szaporodási formái (egysejtűek ivartalan, vegetatív szaporodása)

hasadás: ha a növekvő sejt eléri születéskori méretének kb. a kétszeresét, a megduplázódott örökítőanyag kettéválik, köztük szeptum képződik centripetális irányban, majd annak részleges hidrolízise révén a két utódsejt elválik → szimmetrikus osztódás: az anyasejt két majdnem azonos leánysejtté osztódik szét, melyek a következő ciklusban majdnem azonosan viselkedve kezdik előlről az „anyasejt életét”; baktériumok, protozoonok, egysejtű algák jellegzetes osztódási módja.

sarjadzás: aszimmetrikus osztódás: az anyasejtről lefűződik a nála jóval kisebb leánysejt (más néven sarjsejt), és az utódok a következő ciklusban eltérően viselkednek (pl. az anyasejt hamar újabb sarjadzásba kezdhet, a sarjsejtnak növekednie kell); az anyasejt öregedését ún. sarjadzási hegek jelzik; élesztőgombák jellegzetes osztódási módja.

Mikrobaszaporodás szakaszai (folyékony kevert közeg)

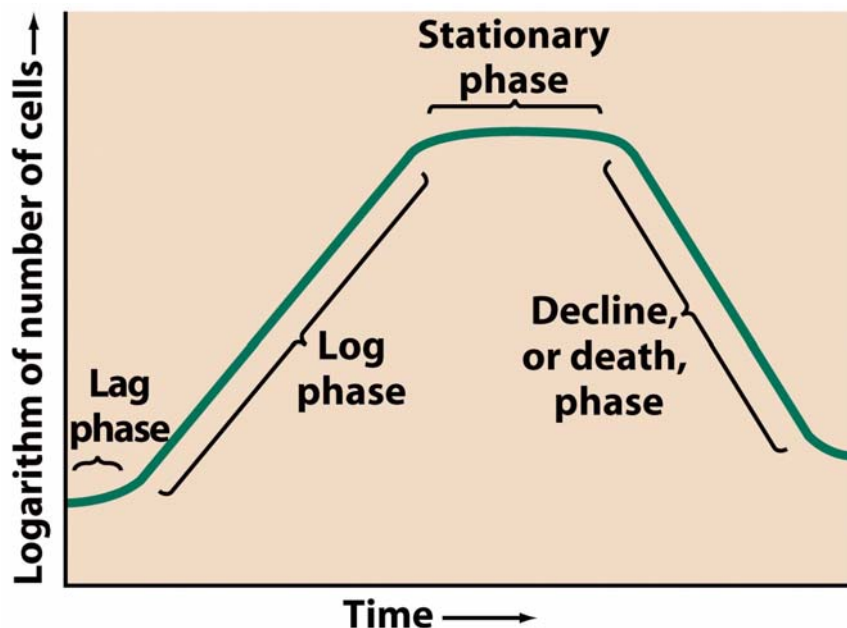


Figure 6-3 Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

1.) lag fázis: nyugvó sejteket steril tápközegbe oltva egy ideig nincs szaporodás.

2.) exponenciális fázis: a sejtszám az időben exponenciálisan nő.

$N(t) = N(0) \cdot \exp(\mu \cdot t)$, ahol μ az ún. fajlagos növekedési sebesség (a mikroba és a környezet minősége határozza meg értékét; fordítottan arányos a tenyészet generációs idejével)

aszinkron tenyészet: a tenyészet sejtjei különböző időpillanatokban, egymástól függetlenül osztódnak, a függvény exponenciális \leftrightarrow szinkron tenyészet: a sejtek nagyjából egyszerre szaporodnak, lépcsős mintázat

3.) nyugvó fázis: a sejtszám már gyakorlatilag nem változik, a szaporodás leáll (tipikusan valamelyik tápanyag elfogyása vagy metabolitok feldúsulása miatt).

4.) pusztulási fázis: a sejtek öregednek, és számuk exponenciális kinetika szerint csökken.

Szilárd tápközegek: telep képződik a táptalaj felszínén (esetleg belsejében); fáziseltérés \rightarrow a telep közepe öreg, a széle fiatalabb sejtekből áll.

Szaporító- és kitartóképletek

Bizonyos baktériumok kitartó képlete az *endospóra* \rightarrow kedvezőtlen körülmények között a baktérium endospórát képez (sporulációs ciklus), amely kedvező körülmények között kicsírázva visszaalakulhat vegetatív sejté.

Endospóra képződése: a sejtben a megduplázódott genom szeparálódik, két membrán képződik, amely körülveszi az egyik kromozómát. A két membrán közötti térbe murein szintetizálódik, e réteg neve kortex. Így egy ún. előspóra képződik, ami elveszti nedvességtartalmát, dipikolinsav és kalciumionok halmozódnak fel benne. Utána a kortextet egy fehérjetartalmú spóraköpeny veszi körbe, azt pedig esetleg egy ún. exosporium. A sejt elpusztul, az endospóra kiszabadul és kriptobiotikus állapotba kerül, amely évszázadokon keresztül is megőrizheti csírázóképeségét. Az endospóra ellenáll hőnek, mechanikai hatásoknak, ionizáló sugárzásoknak, fertőtlenítőszernek egyaránt.

Exospóra, más néven *konídium*: gombák és fonalas baktériumok ivartalan szaporítóképlete \rightarrow a fonal végéről lefüződő fiatal sejtek, melyek vízzel, széllel sodródhatnak.

Ciszta: a protoozonokra jellemző kitartó képlet.

11. A mikrobaszaporodás (koncentráció) mérésének lehetőségei és megvalósításuk.

feladat: folyadék mintákban sejtkoncentráció (sejt/cm³) meghatározása

hígítási sor: 10-es alapú \rightarrow egymás utáni lépésekben mindig 1 cm³ minta + 9 cm³ steril víz

Telepszámlálás agarlemezen

kitenyésztéses módszer \rightarrow CFU (colony forming unit): telepképző egység (csak élő sejtek)

kétféle technika: szélesztés ill. lemezöntés

szélesztés: ráöntjük a hígított mintát az előre elkészített agaros tápközeg tetejére, steril üvegbottal (szélesztőbot) szélesztjük, megfelelő inkubálás után a képződött telepeket megszámloljuk.

lemezöntés: a hígított mintát belekeverjük a folyékony agaros tápközegbe, együtt öntjük ki azzal a Petri csészére → megdermed, majd innen kezdve nagyjából ugyanaz az eljárás.

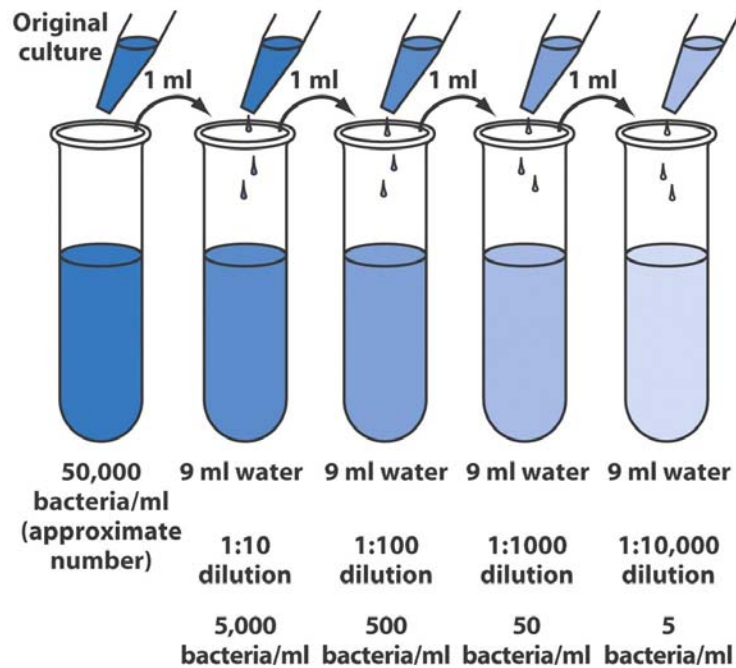


Figure 6-6 Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

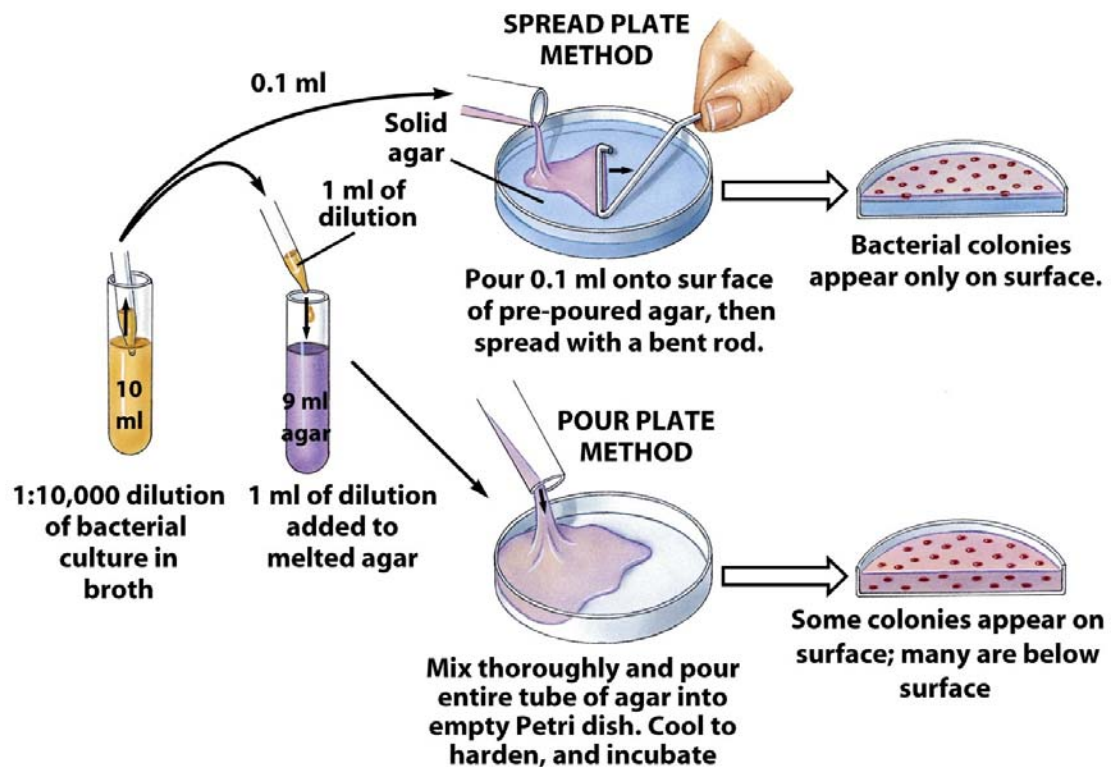


Figure 6-7a Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

Mikroszkópos számlálás

Bürker kamra: ismert geometriájú kamrában megszámloljuk az általában hígítatlan mintában a (nem feltétlenül élő!) mikrobacejteket.

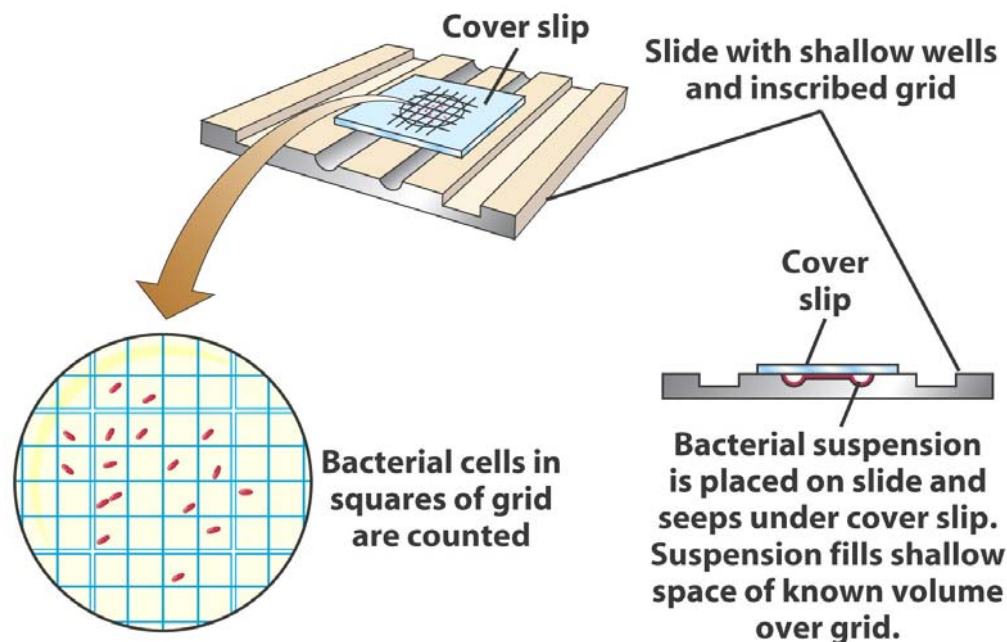


Figure 6-9 Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

Egyéb módszerek

- *legvalószínűbb csíraszám (MPN)*: táptalajon nem tenyészthető baktériumok esetén; hígítási sort készítünk → 5 párhuzamos kémcső beoltása szintenként → +/- kiértékelés: van/nincs gázképződés/zavarosodás/színváltozás → eredmény táblázatból

- *membránszűrés*: a folyadék vagy gáz halmazállapotú mintát átszűrjük membránszűrőn, majd lenyomatot készítünk a membránszűrőről agarlemezre → inkubáljuk és megszámloljuk a képződő telepeket (kis sejtszám esetén!)

- *szárazanyag-tartalom mérés*: eleje u.a. mint az előző módszernél (de csak nagy sejtszám esetén!); a membránszűrőt kiszárítjuk, lemérjük, a tömegnövekedés (az „üres” membránhoz képest) arányos a sejtek számával

- *turbiditás mérés*: folyékony minta fényáteresztő képességének mérése spektrofotométerrel → a mintán áthaladó fény intenzitását méri adott hullámhosszon, ami csökken a sejtkoncentráció növekedésével (indirekt mérés, kalibráció)

- *anyagcsere-mérés*: pl. gáztermelés, pH változás, O₂ fogyasztás sebességének, stb. mérése (arányos a sejtek számával)

- *elektronikus sejtszámlálás*: az elektrolit vezetőképessége csökken, ha benne sejtek vannak; egy mikrofuraton keresztül a mintát tartalmazó elektrolit két elektród között áramlik át → minden sejt egy feszültségimpulzust kelt, ezeket a műszer megszámlálja (nem szelektív a módszer!)

12. Fizikai és biokémiai (táplálkozási) tényezők hatása a mikroorganizmusok szaporodására.

A környezet tápanyagokkal ellátja a mikrobát, és felveszi anyagcseretermékeit → ezen funkcióját különböző mértékben töltheti be: elpusztító, indifferens, mérsékelt támogató, ill. megtartó környezetek léteznek. A környezet ún. ökológiai faktorai befolyásolják a mikroba szaporodását, ezek részben abiotikusak (pl. hőmérséklet), részben biotikusak (más élőlények jelenléte és kölcsönhatásaik). Egy adott abiotikus ökológiai faktor mennyiségi szintjének függvényében a mikrobapopuláció fajlagos növekedési sebességét ábrázolva, általában egy szimmetrikus maximumos görbét kapunk → jellemzői: minimumpont, maximumpont, a kettő közötti szakasz a túrési tartomány, amelynek kb. a közepénél van az optimumpont (ha szimmetrikus!). A szaporodást befolyásoló abiotikus környezeti tényezők lehetnek fizikai (fizikai kémiai) vagy biokémiai (táplálkozási) faktorok.

Fizikai tényezők

pH

optimum < 6	Acidofil	gombák, tejsavbaktériumok
6 < optimum < 8	Neutrofil	baktériumok zöme
optimum > 8	Alkalofil	néhány talajbaktérium

A pH túrési tartomány általában viszonylag szűk: az optimum körül +/- 1-2 pH egység. Bizonyos mikrobák szélesebb tartományt tolerálnak, ezek acidotoleránsak vagy alkalotoleránsak lehetnek.

Hőmérséklet

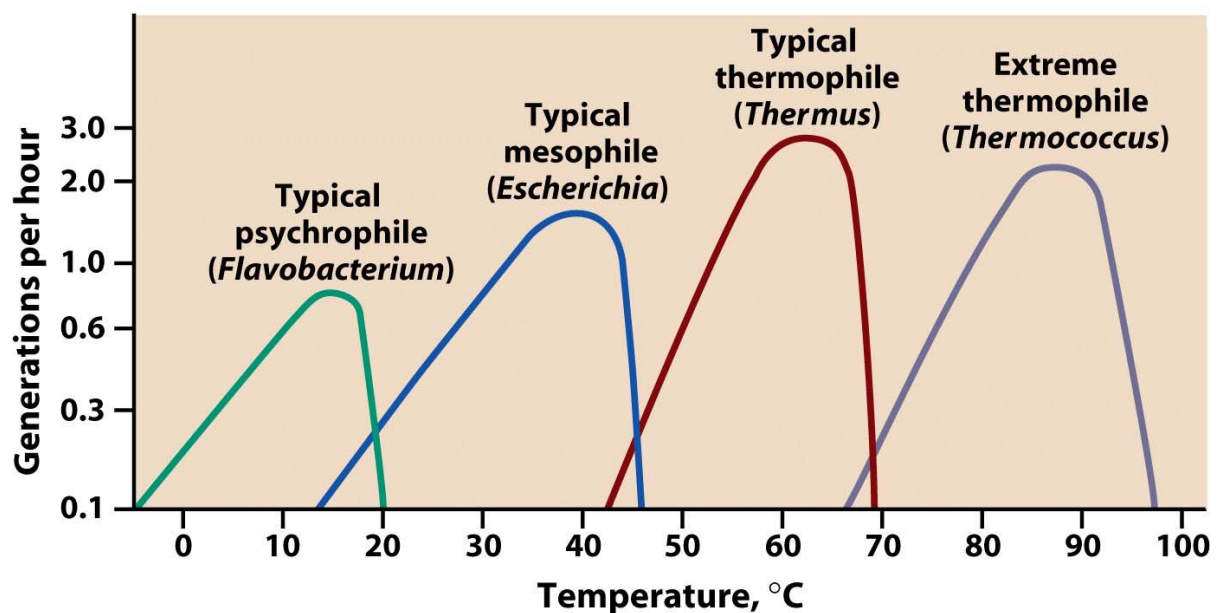


Figure 6-14 Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

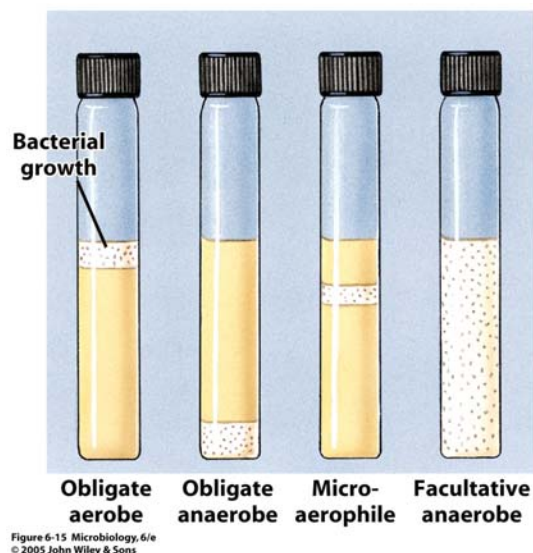
Aszimmetrikusan hat a szaporodási sebességre a hőmérséklet, mert a hőmérséklet emelkedésével nő ugyan a biokémiai reakciók sebessége, de ugyanakkor annak katalizátora (a megfelelő enzim) egyre nagyobb méretékben denaturálódik.

$T_{opt} < 20^{\circ}\text{C}$	Pszikrofil
$20^{\circ}\text{C} < T_{opt} < 40^{\circ}\text{C}$	Mezofil
$40^{\circ}\text{C} < T_{opt}$	Termofil
$60^{\circ}\text{C} < T_{opt}$	Extrém termofil

A tűrés tartomány szélessége általában $20\text{-}30^{\circ}\text{C}$. Ennél szélesebb tartomány esetén többnyire pszikrotoleranciáról beszélünk (a termotolerancia kevésbé jellemző).

Levegő (oxigén)

Az oxigén egyszerre lételem aerob oxidatív anyagcsere esetén, de sejtmeleg is (roncsolja a szerves anyagokat gyökös reakciók révén, amit a sejtekben könnyen képződő szuperoxid és peroxid anionok okoznak). Ezek elhárítására a sejtekben védőenzimek vannak: szuperoxid diszmutáz (SOD, szuperoxid hatástalanítása), kataláz (peroxid hatástalanítása).



obligát anaerob: O_2 -re nincs szüksége és azt nem is tűri (fermentatív anyagcsere, nincsenek védőenzimek)

obligát aerob: O_2 kell neki légzési elektronakceptorként (aerob oxidatív anyagcsere, vannak védőenzimek)

fakultatív anaerob: aerob körülmények között hasznosítja az oxigént elektronakceptorként (vannak védőenzimek), anaerob körülmények között áttér anaerob anyagcserére (pl. nitrátlégzés, fermentáció)

aerotoleráns anaerob: kizárólag fermentatív anyagcserével rendelkezik, de képes tolerálni az O_2 jelenlétét (vannak védőenzimek)

mikroaerofil: aerob oxidatív anyagcsere, de a védőenzimek nem elég hatékonyak → az O_2 -t nem viseli el a normál légköri koncentrációnál, csak csökkentett tenziónál

Nedvességtartalom, ozmózisnyomás

A mikroorganizmusok vízkedvelőek (higrofilek) → vízkaktivitás optimumuk a 0,9 - 0,95 tartományban található és meglehetősen szűk a tűrésük. Léteznek xerotoleráns (xerofil) baktériumok, melyek a kiszáradt állapotot elviselik (kedvelik). A legkisebb még tolerálható vízkaktivitás azonban számukra is 0,6 - 0,7 körüli érték. A sóknak vízelvonó hatásuk van, ezért a mikrobák számára optimális közeg sótartalma alacsony. Elsősorban az ősbaktériumok között találunk néhány extrém halofil (ill. halotoleráns) szervezetet. A szerves anyagok nagy koncentrációja ozmózisnyomást fejt ki a plazmamembránra, ami kipréseli a vizet a sejtől (plazmolízis); ezzel szemben desztillált vízben a sejtek „kipukkanhatnak” (plazmoptízis). Az élesztő- és penészgombák között találunk ozmofil (ill. ozmotoleráns) fajokat.

Hidrosztatikai nyomás

A legtöbb élőlény érthetően a normál légköri nyomáshoz adaptálódott, sejtjeik nem viselik el a nagy nyomást. Ezzel szemben a mélytengeri baktériumok barofil jellegűek, sejtfaluk kibírja a nagy nyomást, sőt enzimeik is csak nagy nyomáson működnek.

Sugárzások

A fototróf mikrobák igényelik a látható fényt klorofilljuk gerjesztéséhez. Az ultraibolya (UV), röntgen (X), és a γ -sugárzások viszont genetikai károsodásokat, mutációkat okoznak.

Táplálkozási tényezők

C-forrás: az élőlények valamennyi szerves anyagában van C; az autotrófok C-forrása a CO₂; a heterotrófok C-forrása elsősorban különböző szénhidrátok, fehérjék, lipidek és/vagy kismolekulájú szerves anyagok, de bizonyos baktériumok képesek pl. szénhidrogének, sőt egyes műanyagok hasznosítására is.

N-forrás: a fehérjék és a nukleinsavak tartalmaznak nagy mennyiségben szerves nitrogént a sejtekben; heterotróf táplálkozással részben felvehetőek ebben a formában; a légköri N₂ fixálására csak bizonyos baktériumok képesek (N₂ + 3H₂ → NH₃, nitrogenáz enzim komplex által katalizálva) → a fixálás történhet szabadon vagy növényi gyökerekkel szimbiózisban; az ammónia α -ketosavakkal reagálva aminosavakat eredményez; a nitrátok redukcióval ammóniává alakíthatók, és úgy hasznosulnak (asszimilatív nitrátredukció).

S-forrás: szükséges a Met, Cys aminosavakhoz, Fe-S proteinekhez, AcCoA-hoz, stb.; sokféle szerves formában felvehető és hasznosítható.

P-forrás: szükséges a nukleinsavakhoz és a foszfolipidekhez; a szerves foszfátok felvehetőek és hasznosíthatóak.

Ásványi anyagok: K⁺, Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Se²⁻, I⁻ stb.; fiziológiás körülmények beállításához kellenek, enzimek mellett ko-faktorokként, szignál- és ingerületátvivőként szerepelhetnek, stb.

Vitaminok: kismolekulájú szerves anyagok, koenzimek vagy azok prekursorai, amelyek az élőlény anyagcseréjéhez esszenciálisak, de nem tudja őket előállítani (fajfüggetlen!).

Táplálkozási formák

A táplálék tápanyagokká történő emésztése történhet a sejten belül endoenzimekkel (vakuólumokban, fagotróf táplálkozás) vagy a sejten kívül exoenzimekkel (kilotróf táplálkozás). Az exoenzimek többnyire extracellulárisak, kivételt képeznek a Gram-negatív baktériumok periplazmás enzimeit, amelyek a periplazmás térben emésztnek.

Adaptáció

Ha romlanak a körülmények, a mikrobák ehhez megpróbálnak alkalmazkodni, melynek fokozatai az alábbiak:

- enzimtermelésük mennyiségi fokozása,
- enzimtermelésük minőségi változtatása,
- szaporodási sebességük csökkentése.

13. A mikroorganizmusok laboratóriumi tenyésztése: szintenyészet előállítása, tápközegek típusai, diagnosztikai tesztek. Törzsek fenntartása, konzerválása.

A mikroorganizmusok természetes élőhelyeiken vegyesen fordulnak elő, ezért laboratóriumi kitenyésztésük kevert tenyészeteket eredményez → egy adott mikroba faj (vagy -törzs) vizsgálatához azt tisztán kell előállítani → feladat: a kevert tenyészetből szintenyészet előállítása. Történetileg az akkor valósult meg először, amikor Koch laborjában kidolgozták a szilárd fázison történő szaporítást (a folyékony tápoldat agarral szilárdítható meg). Az alkalmazott technika szélesztés vagy lemezöntés lehet, előbbinek szilárd fázisú, mikroorganizmusokban dús minta esetén egy olyan speciális technikája ismeretes, ami eltér a telepszámlálás során alkalmazott azonos nevű megoldástól.

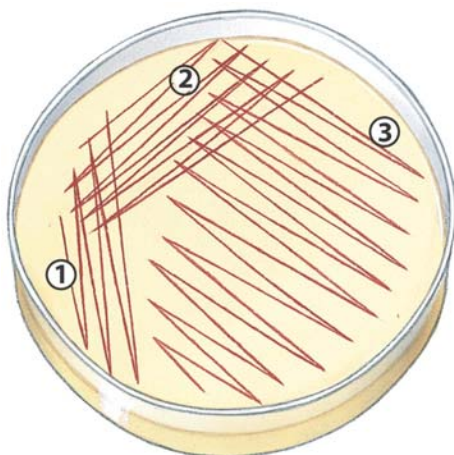


Figure 6-19a Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

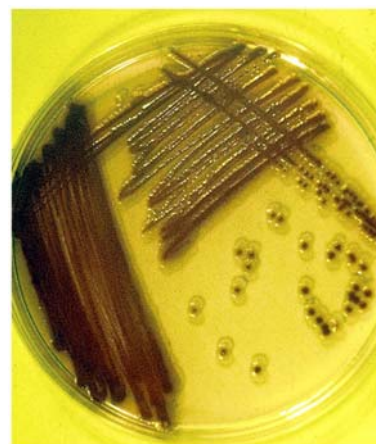


Figure 6-19b Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

Tápközegek típusai

halmazállapot: tápoldat (folyékony), táptalaj (szilárd)

összetétel: szintetikus (kizárólag kémiailag jól meghatározott, ismert szintetikus anyagokból áll); komplex (tartalmaz olyan természetes anyagokat is, amelyek kémiai összetétele pontosan nem definiált, pl. pepton, kazein hidrolizátum, élesztő kivonat, vér). Az a szintetikus tápközeg, amely egy adott mikroba(faj) igényeihez képest szükséges valamennyi komponenst megfelelő mennyiségben tartalmazza, de mást nem, az ún. minimál tápközeg.

felhasználás: szelektív tápközeg (bizonyos mikrobák szaporodnak rajta, mások nem, pl. Gram-pozitív baktériumok igen, -negatívok nem); differenciáló tápközeg (rajta egyaránt telepet képező rokon mikrobák között biokémiailag (pl. színreakció) különbséget tesz); dúsító tápközeg (kevert tenyésztésben bizonyos mikroba a többiek rovására feldúsul benne).

Anaerob technikák

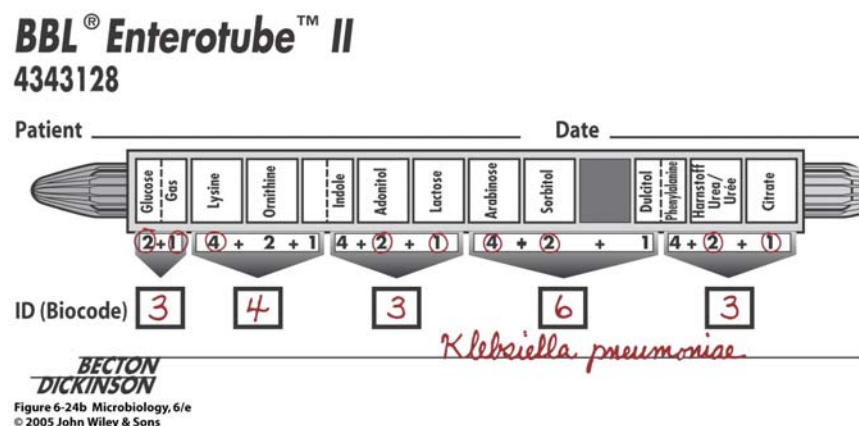
anaerob baktériumok tenyésztése során fontos az oxigéntől való elzárásuk a Petri csészében vagy kémcsőben szaporodó mikrobáknak → alkalmazott technikák: lezárt üvegben „égő” gyertya, „szűrt” kultúra, agar- vagy olajréteg alatti szaporítás, anaerob edény, anaerob kamra.

Törzsek fenntartása, konzerválása

mikrobatörzsek fenntarthatók folyamatos átváltással (törzsgyűjtemények, pl. ATCC: American Type Culture Collection hagyományos módszere) → problémák: munkaigényes, szennyeződésveszély, mutáció/szelekció → megoldás: konzerválás mélyhűtéssel v. liofilezéssel (más néven fagyasztva szárítás: gyors lehűtés -80°C -ra, majd a képződő apró jégkristályok elszublimáltatása vákuumban → kriobiotikus állapotba kerülnek a sejtek).

Diagnosztikai tesztek

cél: egy valahonnan izolált mikroba faji (esetleg törzsi) szinten történő azonosítása (identifikálása) → ehhez felhasználunk szelektív és differenciáló tápközégeket, amelyekben a mikroba szaporodása, színreakciói, stb. tesztként szolgálnak; valamint egy adatbázist, amely a tesztek kiértékelése után megadja az eredményt, azaz a kérdéses taxonómiai szinten (pl. faj, nemzetség) meghatározza a mikrobát.



Enterotube rendszer: enterobaktériumok azonosítására kifejlesztett diagnosztikai tesztrendszer.

14. Sterilizés és fertőtlenítés fogalma, jellemzői. A sterilizés ill. fertőtlenítés fizikai módszerei.

A pozitív mikrobiológia feladata a mikrobák szaporítása ↔ a negatív mikrobiológia feladata a mikroorganizmusok tevékenységének gátlása → utóbbi lehetséges *in vitro* vagy *in vivo* (fertőző betegségekben szenvedők gyógyszeres kezelése); a mikrobák *in vitro* korlátozásának eszközei a sterilizési és a fertőtlenítési eljárások.

Sterilizés: valamennyi mikroorganizmus elpusztítása v. eltávolítása → elvi (és gyakorlati!) probléma: tökéletes sterilizés pusztítással nem lehetséges → a sterilizésre exponenciális pusztulási görbe jellemző, amelynek sebessége a mikrobák minősége és mennyisége, továbbá az alkalmazott kezelés függvénye, de az abszolút zérus csíraszám nem érhető el.

Fertőtlenítés: más néven dezinficiálás; a mikroorganizmusok számának lecsökkentése olyan szintre, ahol az esetlegesen még jelenlévő kórokozók nem jelenthetnek fertőzési veszélyt.

A mikrobákat gátló hatás lehet mikrobicid, azaz elpusztítja azokat (pl. baktericid, fungicid, virucid, germicid) vagy pedig mikrobisztatikus, azaz gátolja azok szaporodását (pl. bakteriosztatikus, fungisztatikus).

Fizikai módszerek

Hő

decimális redukciós idő, D → mennyi ideig kell kezelni a mintát, hogy a tenyészet 90%-a elpusztuljon (1/10-e maradjon életben)

hőpusztulási állandó, k (mikroba- és hőmérsékletfüggő) → a hő hatása az idő függvényében az alábbi összefüggéssel írható le: $N(t) = N(0) \cdot \exp(-k \cdot t)$

száraz hő: kevésbé hatékony; ilyen eljárás a hőlégmentalizálás (szárítószekrény 160°C, 2 h) és a flammálás (kiizzítás); alkalmas pl. fém- és üvegtárgyak, porok sterilizésére; alacsony hőmérsékletű szárítással is tartósíthatóak az élelmiszerek.

nedves hő: hatékonyabb, mert a nedves levegőnek jobb a hővezetése; alacsonyabb hőfokon v. rövidebb ideig tarthat a sterilizés

- kifőzés: a vegetatív sejteket elpusztítja, de az endospóráknak nem árt; 100°C, 30 min
- tindalozás: 80°C, 30 min, majd 24 h szobahőmérsékleten, mindezt 3x ismételjük meg → az endospórák is elpusztulnak, de hosszú és körülményes eljárás (hőérzékeny anyagoknál mégis célszerű!)

- pasztörözés: csak fertőtlenítés; 63°C, 30 min; eredetileg borászat, aztán tejipar

- ultraszűrés: 140°C, 5 s (UHT, ultra high temperature treatment); gőzbeívással áramló rendszerben nyomás alatt, rövid idejű kezelés miatt kevésbé roncsolja az élelmiszer szerves anyagait

- autoklavozás: 121°C, 20 min; gőzzel fűtött autoklávban 1 atm túlnyomás alatt → „teljes” sterilizálás (endospórák is elpusztulnak, de prionok esetén 135°C, 20 min kell!)

- sterilizálás vizsgálata: leforrasztott, zárt üvegampulla puha műanyag csőben, tápközeg van benne, mellette papírcsík endospórákkal → autokláv működésének ellenőrzése

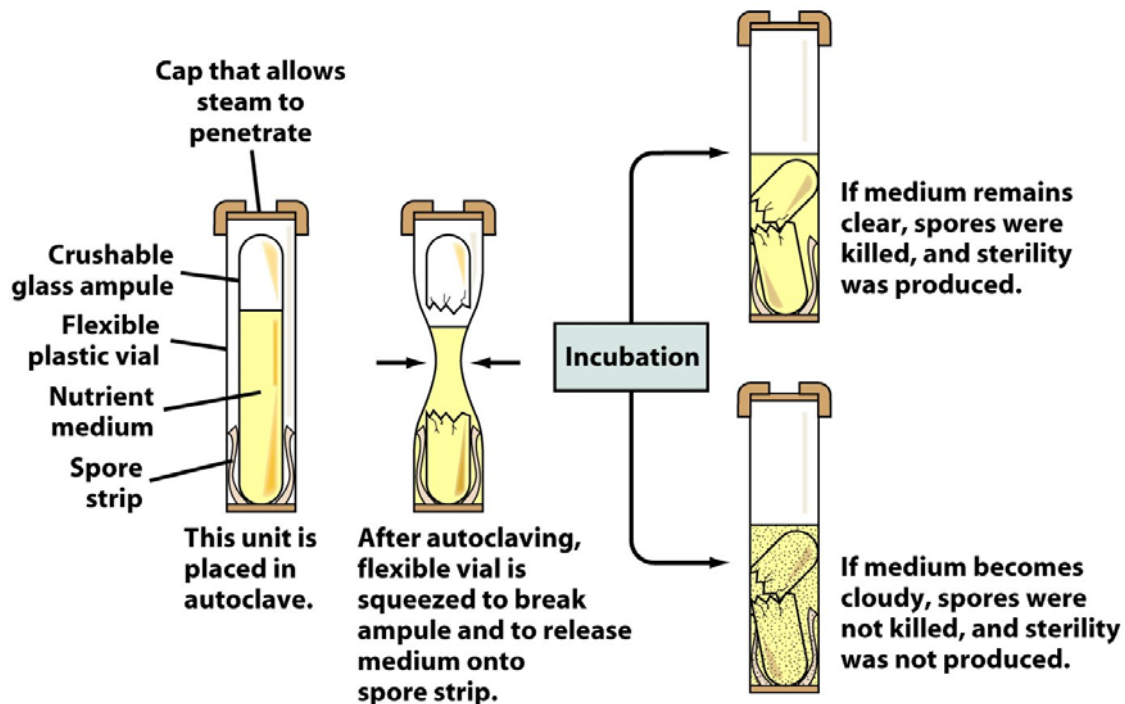


Figure 12-11 Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

Hideg

hűtés: az enzimes folyamatok sebessége csökken, ezért a szaporodás csökken/leáll, de nincs mikrobicid (csak mikrobisztatikus) hatása → pszikrotoleráns mikrobák hűtőszekrényben (kb. 5°C) is szaporodhatnak.

fagyasztás: -10°C alatti hőmérséklet; mikrobisztaézis, konzerválás; kivéve: lassú hűtés során nagy jégkristályok keletkeznek, melyek mechanikailag károsítják a sejtmembránt → fagyasztva tárolt élelmiszerek többszöri felengedése és visszafagyasztása tilos!

liofilizálás: fagyasztva szárítás; nincs mikrobicid hatása, de élelmiszerek tartósítására éppúgy használható (pl. instant kávé), mint mikrobatörzsek fenntartására.

Elektromágneses sugárzás

UV sugárzás: a légtérben és felületeken lévő vegetatív mikrobákat erős mutagén hatása révén megöli, de az emberi sejteket is károsítja (pl. bőrrák!); áthatolóképessége szilárd és folyékony anyagokban nagyon rossz → germicid lámpa oltófülkékben.

ionizáló sugárzás: a γ -sugárzás mutagenitása annyira erős, hogy sporocid hatása is van → száraz élelmiszerek (pl. fűszerek) sterilizálására használható; nagy áthatolóképesség.

mikrohullámú sugárzás: ún. mikrokláv; a sterilizálás alapja a mikrohullámok hőhatása nedves közegekben.

Szonikálás

ultrahang hatására nedves közeg belsejében kis nyomású buborékok képződnek, majd össze is roppannak (a jelenség neve: kavitáció) → sejtek roncsolása, feltárása.

Plazmolízis

cukrozással és sózással egyaránt tartósíthatóak élelmiszerek, ami az ozmózisnyomás ill. vízelvonás jelenségén alapul (pl. lekvárok ill. húsok).

Szűrés

nincs sem mikrobisztatikus, sem mikrobicid hatás, hanem a folyadékok vagy gázok mikrobamentesítése elválasztással történik → a XIX. században már voltak baktériumszűrők porcelánból, kovaföldből; később a mikroszűrők azbesztből, üvegből készültek; napjainkban főleg membránszűrőket használunk (nitrocellulóz) → pórusméret jól szabályozható: vírusszűrő, sőt molekulaszűrő is készül belőle.

15. A sterilizálás ill. fertőtlenítés kémiai módszerei: hatékonyság, hatásmechanizmus, dezinficiensek típusai.

Dezinficiáláson elsősorban élettelen tárgyak, közegek vegyszeres fertőtlenítését értjük. Élőlények testfelületének hasonló célú kezelését is ide soroljuk (pl. sebfertőtlenítés), ezek az eljárások ugyanis csak külsőleg alkalmazhatóak. Hatékonyság: általában arányosan nő a fertőtlenítőszer koncentrációjával, de kivételek is vannak (pl. etilalkohol hatása 70%-os vizes oldatban maximális). Különböző kezelések kombinációi fokozhatják a hatékonyságot → pl. jód + alkohol = jódtinktúra sebek fertőtlenítésére; lúg + autoklavozás prionok inaktiválására.

A hatékonyság mérése

Fenol koefficiens: történetileg az első fertőtlenítőszer a fenol volt (Lister, „karbolsav”), de már nem alkalmazható toxikussága miatt; viszont a fenolra vonatkoztatott hatékonyságát a dezinficienseknek használjuk jellemzőként (mikrobafüggő is).

Szűrőpapírkorong módszer: agaros tápközegre felvisszük a tesztmikrobát, szűrőpapírkorongot helyezünk a Petri csészére, amelyet a vizsgálandó fertőtlenítőszerrel előtte átitattunk → gátlási zóna képződik a korong körül, melynek átmérője arányos a dezinficiens hatékonyságával.

Hatásmechanizmus

Fehérje denaturálása: a legtöbb dezinficiens (de pl. a hőhatás is) a mikroba fehérjéinek inaktiválását eredményezi; a hatás mértéke lehet reverzibilis vagy irreverzibilis (utóbbit koagulációnak is nevezzük).

Membránok dezintegrálása: nem annyira gyakori → amfipatikus anyagok (detergensek) oldhatják a membránt, illetve az hő hatására is ronszolódhat.

DNS károsítása: mutagén hatású dezinficiensek pl. pontmutációkat okozva fejthetik ki mikrobicid hatásukat.

Dezinficiensek típusai

Detergensek

közvetlenül a membránt támadják meg hidrofób és hidrofil tulajdonságú részeik révén; a szappanok (hatóanyaga pl. a Na-sztearát) anionos detergenseket tartalmaznak, amelyek azért nem elég hatékonyak, mert a baktériumok felszíne is negatív töltésű → az ún. inverz szappanok v. kationos detergensek (pl. benzalkónium-klorid) jobbak, de hatásukat anionos detergensek még nyomokban is erősen leronthatják

Savak, sók

a savas közeg a mikroba fehérjéinek denaturálódását eredményezi → pl. tejsav, benzoésav, szorbinsav használható élelmiszerek tartósítására; az egyszerű sók (pl. konyhasó) vízelvonó hatása a fehérjékre is hatást gyakorol, de plazmolízist is okozhat

Nehéz fémek vegyületei

irreverzibilis fehérje denaturálódást okoznak a nehéz fémek a Cys oldalláncokhoz kötődve

- AgNO₃ (vagy -acetát): csecsemő szemébe 1 csepp 1%-os oldat (gonorrhoea ellen)
- higany: szerves vegyületei toxikusságuk miatt nem használhatóak; egy szerves vegyülete, a mertiolát viszont használható tinktúrában baktériumok ellen
- CuSO₄: mezőgazdasági kártevő gombák ellen hatásos; vizek algásodását meggátolja
- szelén-szulfid: bizonyos bőrgombásodások ellen hatásos (kenőcsben vagy samponban)

Halogének

különböző sejtkomponensek elleni agresszív (pl. oxidatív) hatás

- klór: hipoklórossav, sósav vizek fertőtlenítésére használatos (ivóvíz, fürdővíz); neomagnollal pl. labor munkafelületeket, klórmésszel pöcegödröket dezinficiálnak
- jód: az elemi I₂ tinktúrában használatos, de ma már inkább az ún. betadin használatos

Alkoholok

fehérje denaturáló hatása vizet is igényel (70%-os koncentrációban a legjobb); labor munkafelületek, bőr fertőtlenítésére alkalmas az etil- és az izopropil-alkohol (utóbbi előnyösebb, mert kevésbé párolog)

Fenolok

- fenol: használata toxikussága miatt tiltott

- krezolok: lakban használhatóak pl. kerítés, csónak, stb. kezelésére → gombásodás ellen
- hexaklorofén: gombák ellen is hatásos bőrfertőtlenítőszer

Oxidálószer

fehérjék koagulációját okozzák a cisztinhidak oxidációja révén

- H₂O₂: anaerob baktériumok ellen hatásos bőrfertőtlenítő
- O₃: ivóvíz fertőtlenítése szermaradvány nélkül
- KMnO₄: híg vizes oldatát régebben bőr, nyálkahártyák kezelésére használták

Alkilezőszerek

fehérjéket és nukleinsavakat alkilez (koagulációt ill. pontmutációt okoz)

- formaldehid: kórházi, boncolási maradványok tárolására is alkalmas erős mikrobicid hatása miatt (de a prionokat nem inaktiválja)
- etilén-oxid: gázsterilizációra alkalmas (kórházi helyiségek, úrhajók) → nagyon gyúlékony, ezért CO₂-os hígítás (9:1); nagyon toxikus, ezért használata után intenzív szellőztetés kell

Festékek

- kristályjóbolya: Gram-pozitív baktériumok ellen hatásos bőrfertőtlenítő
- akridin: kereteltolódási mutációt okoz, mindenféle mikroba ellen hatásos bőrfertőtlenítő

Egyéb

- SO₂: borászatban fertőtlenítés; szulfitok: élelmiszerek tartósítása
- nitritek: élelmiszerek pácolásos tartósítása (erősen mutagén!)

16. A biológiai információáramlás centrális dogmája. A mutációk típusai és hatásuk a fenotípusra. Spontán és indukált mutációk; fizikai és kémiai mutagének.

Információáramlás centrális dogmája: DNS → DNS → RNS → fehérje (replikáció, transzkripció, transláció); viszont RNS-vírussal fertőzött sejtben ettől eltérő folyamatok is végbemennek!

Mutáció: spontán v. külső hatásra megváltozik a DNS bázissorrendje (v.ö. rekombináció)

Mutációk típusai

pontmutáció: tipikusan egyetlen bázis kicserélődése. Következése a fenotípus változatlanságától a letális mutációig sok minden lehetséges. (Lehet, hogy nem is okoz információváltozást a pontmutáció; míg ha egy haploid sejtben egy esszenciális gén „kritikus” pontján következik az be, akkor akár életképtelenné is válhat a sejt.)

frame-shift (kereteltolódási) mutáció: néhány új bázis beépül v. kiesik → eltolódik a leolvasási keret és teljesen más polipeptid fog szintetizálódni a DNS-ről.

kromoszóma-mutáció: a sejt egyik kromoszómájáról letörik egy darab; többnyire letális.

genom-mutáció: zavar a mitózis v. meiózis során a kromoszómák szegregálásában → ún. aneuploid sejtek keletkeznek; többnyire letális (de kivétel pl. a Down-kór!).

genotípus: a sejt teljes genetikai információtartalma által biztosított lehetőségek összessége
↔ fenotípus: adott körülmények között ténylegesen megnyilvánuló tulajdonságok

auxotróf mutáns ↔ prototróf (vad típusú) törzs: a normális táplálkozási igényű (prototróf) mikrobának pl. egy pontmutáció hatására megnövekedhet a tápanyagigénye, minimál táptalajon ezért nem tud szaporodni, hanem csak ún. komplett táptalajon (ami ki lett egészítve a számára szükséges komponenssel); az auxotróf mutáns visszaalakulhat prototróffá egy újabb mutáció révén (ezt a „visszautalódást” reverzióknak nevezzük)

kondicionális (feltételes) mutáns: környezeti tényezőkre (pl. hőmérséklet) lesz érzékeny; a fehérje térszerkezete pontmutáció következtében kicsit megváltozik, és alacsonyabb hőmérsékleten kezd el denaturálódni (ezáltal szűkül a hőmérséklet-tűrési tartománya a mikrobának); feltételesen letálisok is lehetnek ezek az ún. hőmérsékletérzékeny (ts) mutánsok

Spontán és indukált mutációk

spontán mutáció: a DNS replikációja során hibás bázispárosodás történik (a bázisok tautomerizációja okozhatja) ↔ indukált mutáció: környezeti (fizikai v. kémiai) hatásra létrejövő mutációk

Kémiai mutagének

bázisanalógok: az analóg beépül a DNS-be valamelyik bázis helyett, majd hibás bázispárosodás révén mutációt okoz → pl. T helyett beépül az 5-brómuracil nevű mutagén a replikáció során, de az a következő replikációnál A helyett G-vel párosodik; a koffein is egy mutagén bázisanalóg (bár annak elég gyenge hatása).

alkilezőszerek: ide tartozik pl. az etilénoxid, a formaldehid, az etil-metánszulfonát (EMS), a metil-metánszulfonát (MMS), stb.; a metilálódott (v. etilálódott) G bázis a következő replikáció során C helyett T-vel párosodik, ami pontmutációt okoz.

nitritek: a nitrition a bázisok szabad aminocsoportjával képes reagálni → ennek révén A-ból hipoxantin, C-ből pedig U keletkezik → U gyorsan kivágódik a DNS-ből (fontos hibajavítási mechanizmus!), nem kelt mutációt, viszont a hipoxantin rögzül, és a következő replikációnál T helyett C-vel párosodik.

akridin: DNS festék, egy polikondenzált gyűrűs vegyület, ami a komplementer bázisok közé épül be → megnöveli a két lánc távolságát és így mechanikai feszültséget eredményez a DNS-ben → a javítás kettősszalú hasítást igényel, onnan néhány bázis kivágódik, majd be is épül, de utóbbi folyamat hibás lehet → kereteltolódási mutációt okozhat.

Fizikai mutagének

a látható fénynél nagyobb energiájú elektromágneses sugárzások: a röntgen- (X) és a γ -sugárzás DNS töredeztet (kromoszóma-mutációt) okozhat, az UV-sugárzás hatására ún. timindimerek képződhetnek, amelyeknél megszűnik a H-híd a komplementer „adenindimerekkel”, leáll a transzkripció, sőt a replikáció is hézagos lesz (pontmutáció). Veszélyességi sorrend: γ -sugárzás > UV > X.

Reparációs mechanizmusok

light repair: látható fény hatására aktiválódik egy fotoliáz nevű enzim, amely egy lépésben megszünteti a T-dimerek abnormalis kötését.

dark repair: egy endonukleáz enzim vág bele a DNS-be a timindimer közelében → a DNS-polimeráz befoltozza a hiányzó bázisokat → egy exonukleáz kihalítja a hibás részt → a ligáz enzim végül összeköti a cukorfoszfat vázat.

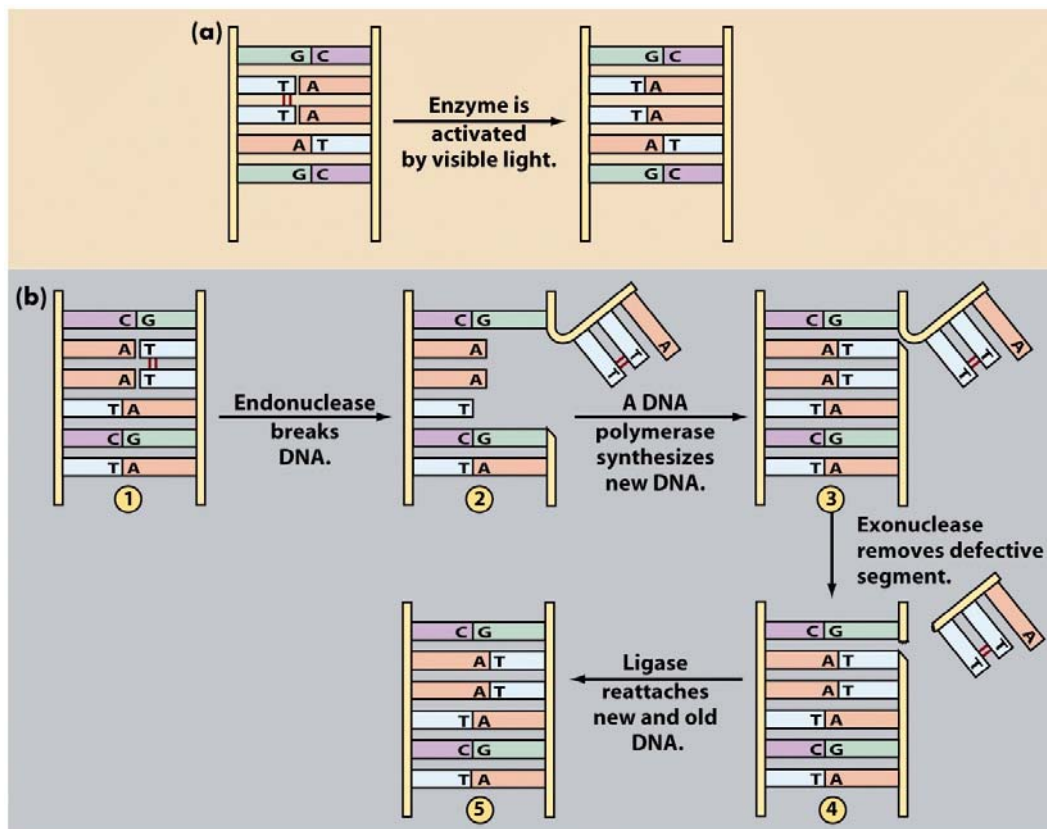


Figure 7-21 Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

17. A fluktuációs teszt, a replika módszer és az Ames-teszt. A baktériumok plazmidjainak típusai. Transzpozíció.

Fluktuációs teszt

A módszer arra alkalmas, hogy meghatározzuk: egy adott mutáció indukált-e vagy spontán. Például egy tenyészetéről meg akarjuk állapítani, hogy egyes sejtjeinél spontán vagy indukált

mutációval jelenik-e meg a sztreptomycin elleni rezisztencia. A sztreptomycinre érzékeny tenyészetet lombikban szaporítjuk sztreptomycin nélküli tápközegben → keverés után kis mennyiségek szélesztése sztreptomycin tartalmazó agaros táptalajra több párhuzamosban → ha megjelenik a rezisztencia, akkor telepek fejlődnek ki, méghozzá az egyes Petri csészékben egyenletes elosztásban → ha a telepek hamar megjelennek a szélesztés után, a rezisztencia valószínűleg spontán, mivel a lombikos szaporítás során a sejtek nem találkoztak az antibiotikummal. Egyértelmű bizonyítékot a spontán mutációra az alábbi kísérlet ad: az előszaporítást kis térfogatban (kémcsövekben) végezzük, és mindegyikből külön-külön veszünk ki mintát, amit agarlemezre szélesztünk → rezisztens telepek hamar kifejlődnek, de a „párhuzamos” Petri csészékben a telepszám nagy fluktuációt mutat.

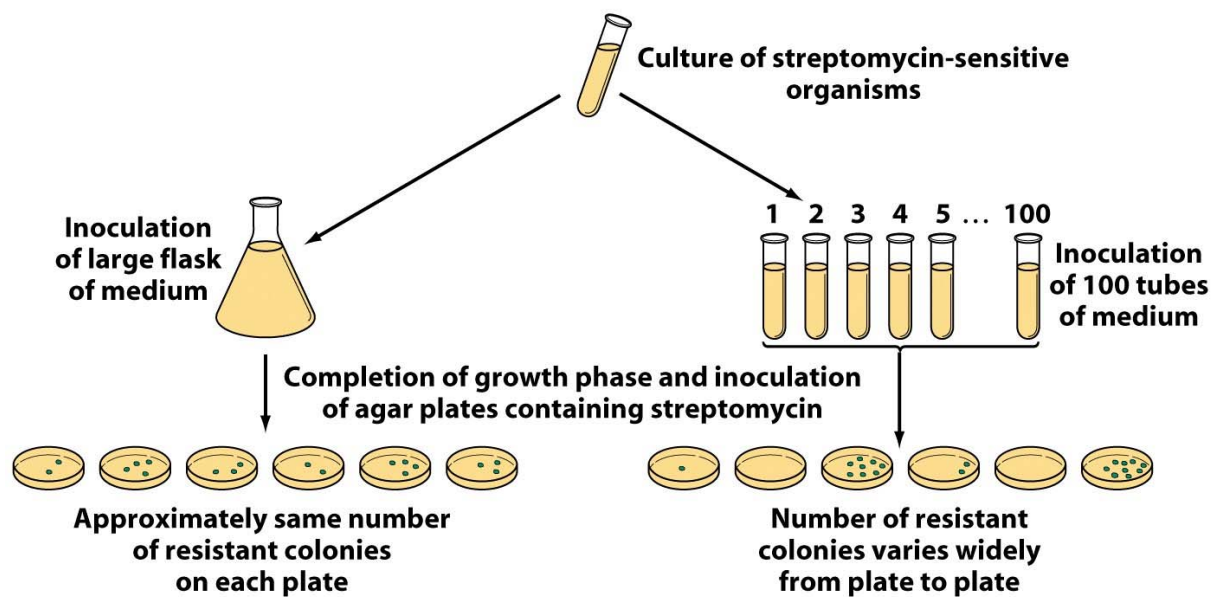


Figure 7-23 Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

Lederberg-féle (bársony) replika módszer

Az eljárás lényege: mutánsok izolálása egy mikrobatenyészetből, amelyek valamilyen tulajdonságukban eltérnek a vad típusú sejtektől (pl. rezisztensek egy antibiotikumra, auxotrófok, kondicionális mutánsok, stb.). Egy tenyészetből sejteket szélesztünk egy megfelelő agarlemezre → néhány generációnyi inkubálás után egy steril bársonylemezzel áttöltjük a lemezen fejlődésben levő telepeket egy második agarlemezre (lenyomat v. replika készítés) → megfelelő orientációban egymás mellé helyezve őket, néhány napig inkubáljuk a két agarlemezt → a kifejlődő telepeket párosával értékeljük: általában a keresett mutáns telepet képez az első (azaz az eredeti) agarlemezén, de nem képez telepet a másodikon (a replika lemezen). A szelektivitást többnyire a két agarlemez tápközegének összetételében levő különbség adja, esetleg az eltérő inkubálási körülmények. Pl. antibiotikum rezisztens mutáns izolálása céljából az első lemez egy megfelelő táptalajt tartalmaz antibiotikum nélkül, a második pedig ugyanezt a táptalajt a kérdéses antibiotikummal „kiegészítve”.

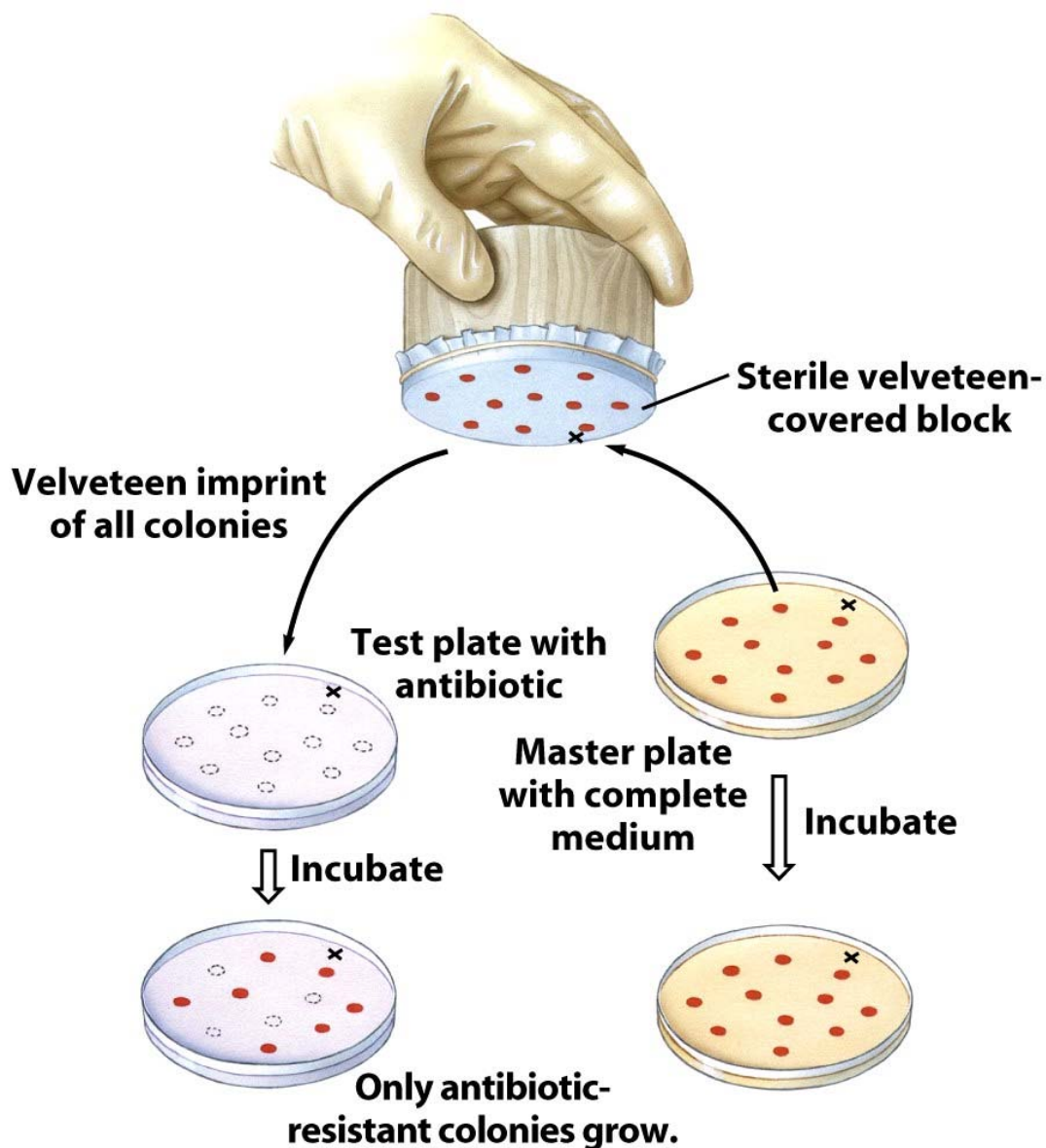


Figure 7-24 Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

Ames-teszt

Feladat: annak tesztelése, hogy egy adott kémiai anyag mutagén-e. Egy speciális His-auxotróf szalmonellatörzs szuszpenzióját minimál táptalajos agarlemezre szélesztjük, ezért alapvetően telepképződés nem várható. Az agarréteg közepébe egy lyukat fúrunk, amibe a tesztelendő kémiai anyagot helyezük. Az anyag diffundál a tápközegbe, ahol „találkozik” a baktériumokkal. Ha mutagén a tesztelt anyag, akkor a szalmonellatörzs egyes sejtjeiben mutációk történnek. A használt His-auxotróf törzs specialitása, hogy mutagén hatásra gyakran visszaalakul prototróffá, más szóval revertál → a revertánsok már természetesen telepet képezhetnek a minimál táptalajon. Azaz minél több telep képződik az inkubáció során, annál erősebb az anyag mutagenitása; míg ha nem képződik egyetlen telep sem, az azt jelenti, hogy az anyag nem mutagén. Jelentősége: a mutagén anyagok általában egyben karcinogének is (daganatot okozhatnak) → munka- és egészségvédelmi szempontból jelentős teszt.

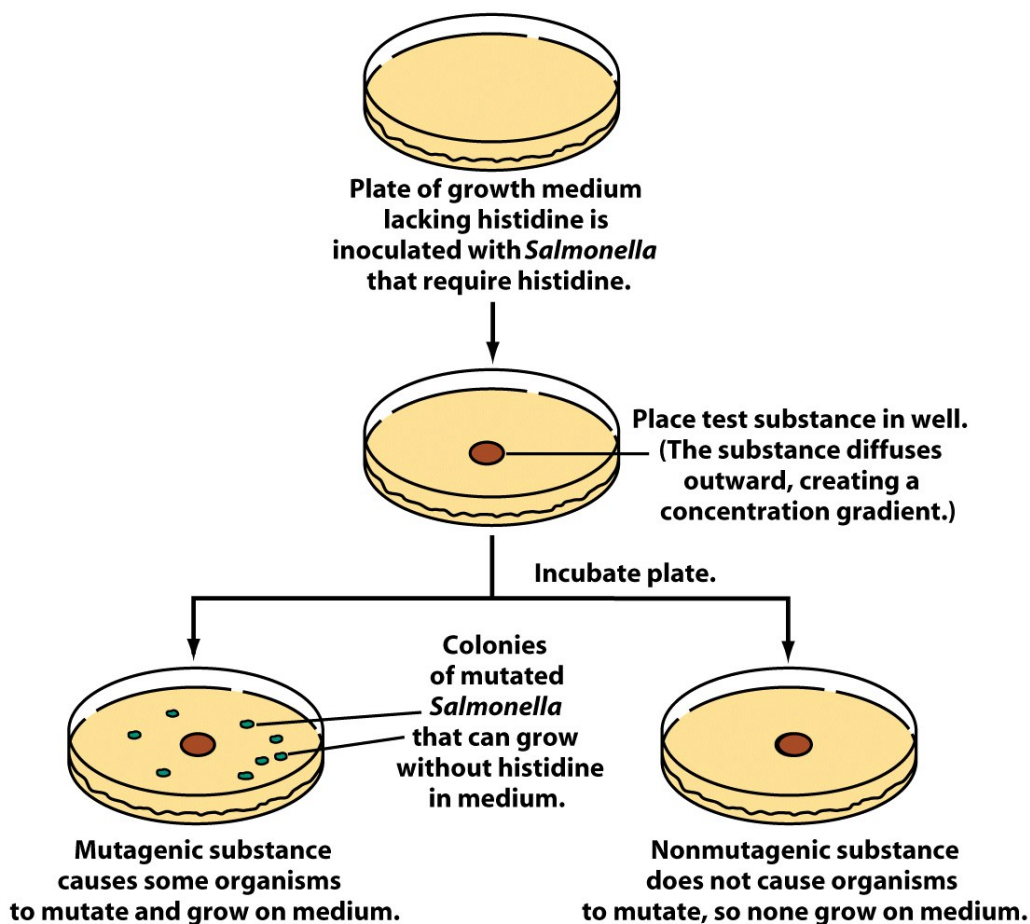


Figure 7-25b Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

Plazmidok típusai

F-plazmid: két baktériumsejt konjugációjánál van szerepe; az egyik csak donorként, a másik pedig csak befogadóként (recipiensként) szerepel. Az F-plazmid („fertilitás”), vagy más néven „szexfaktor” jelenléte v. hiánya határozza meg, hogy melyik lesz a donor (F^+) és melyik a recipiens (F^-). Az F-plazmid replikatív és konjugatív: extrakromoszómás, kis cirkuláris DNS molekula, amely tartalmazza azokat a géneket, amelyek a konjugációs híd kialakításához szükségesek (ezért lesz donor az F^+ sejt). Integratív plazmid is az F: a kromoszómába is képes integrálódni (Hfr törzs, ld. később).

R-plazmid: tartalmaz ún. RTF-faktort, ami azt kódolja, hogy a konjugációs piluson átjuthasson az R(rezisztencia)-plazmid (konjugatív). Ezen kívül egyéb génjei kódolnak olyan enzimeket, amelyek antibiotikumok elleni rezisztenciát, esetleg egyes nehézfémekkel szembeni fokozott toleranciát eredményeznek.

virulencia plazmidok: olyan tényezőket (ún. virulenciafaktorokat) kódolnak, amelyek a baktériumok patogénitása szempontjából fontosak.

Transzpozíció (génátrendezés)

Az ún. transzpozáz enzim képes felismerni bizonyos DNS-szakaszokat (ún. inzerációs szekvenciákat), azokat felhasítja, majd a genom egy másik részébe (pl. plazmid →

kromoszóma, plazmid → másik plazmid) beilleszti a köztük levő régiót. Konzervatív transzpozíció: csak az új pozícióban található meg az átrendeződő DNS-darab ↔ replikatív: mindkét helyen megtalálható. Transzpozon: két inzerációs szekvencia között transzpozáz és egyéb (pl. antibiotikum rezisztencia) gének vannak → önmagát áthelyezi → megváltozhat az átrendeződő gének aktivitása (expressziójának mértéke), így alakulhat ki a „spontán mutáció” baktériumokban antibiotikumokkal szemben.

18. A prokarióta gén transzfer (rekombináció) formái: transzformáció, transzdukción, konjugáció (jellemzésük, mechanizmusaik, típusaik).

Rekombináció: sejtek közötti génátvitel (gén transzfer) → a donor sejt DNS-t juttat a recipiens sejtbe, ahol az tartósan rögzül, ezáltal megváltozik a genomja (v.ö. mutáció). A génátvitel lehet horizontális (laterális, „oldalirányú”) vagy vertikális (szülőről utódra történő, „függőleges”). Eukarióták ivaros szaporodása: rekombináció a meiózis I. profázisa során, majd vertikális gén transzfer a megtermékenyítéskor ↔ prokariótáknál a génátvitel horizontális és annak három módja ismert.

Transzformáció

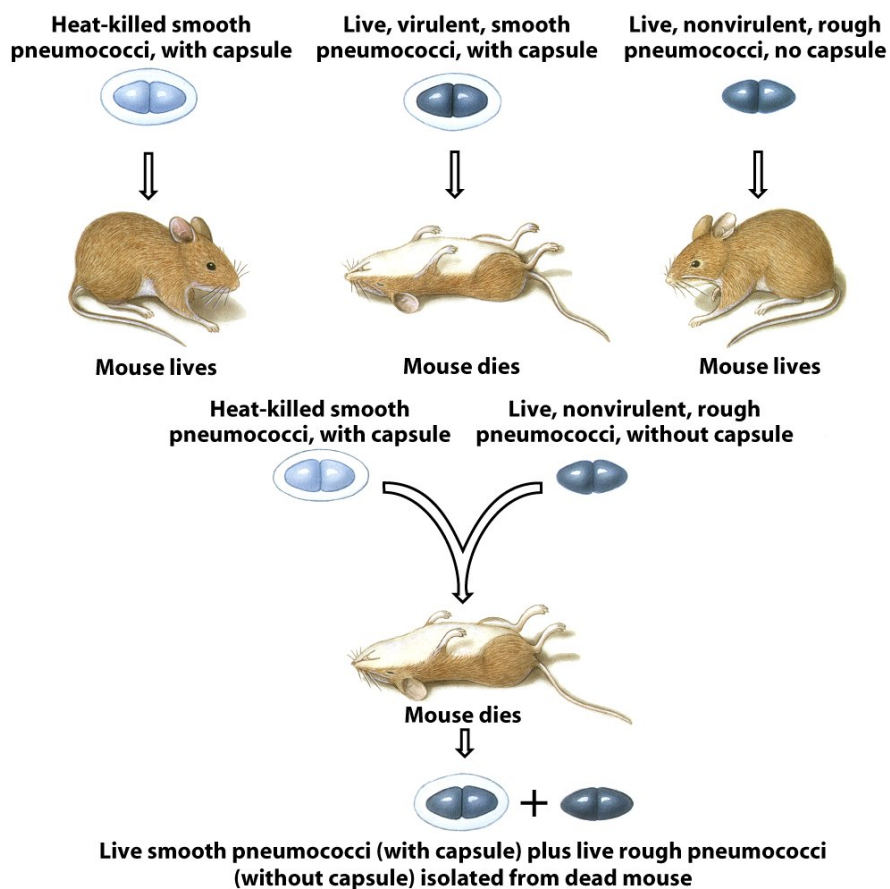


Figure 8-1 Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

Griffith kísérlete: a *Streptococcus pneumoniae* tokos (sima felületű, S) változata elpusztította a vele beoltott egereket; a tok nélküli (rücskös felületű, R) nem okozott betegséget. A hővel előlt S-típus sem okozott betegséget, viszont ha a hővel előlt tokos és az élő tok nélküli együtt lett beoltva az egérbe, az elpusztult → a tetem véréből élő tokos baktériumokat lehetett kimutatni → a transzformáció az előlt és az élő baktérium között jöhetett létre.

Mechanizmusa: a transzformáció más sejtől kiszabadult DNS darab felvétele. A „csupasz” DNS bejut a baktérium belsejébe, és ott rekombinálódva rögzülhet. A genom max. 1%-a cserélődik így ki, és csak közeli rokonok között megy könnyen végbe. A DNS befogadására képes állapotot egy fehérje aktiválja (az ún. kompetencia-faktor). Ilyen csupasz DNS lehet az elpusztult baktériumokból kijutó DNS is, amit a tenyészet élő sejtjei felvehetnek. Így juthat be a tokképzéshez szükséges genetikai információ az elpusztult S-sejtekből az élő R-sejtekbé.

Transzdukción

Bakteriofágok közvetítésével jut hozzá a recipiens sejt a donor baktérium DNS-éhez. Mechanizmusának alapját a bakteriofágok lítikus és lizogén ciklusa, ill. a kettő váltakozása adja. Lítikus ciklus: a fág elszaporítja magát a baktériummal, majd az elpusztuló gazdából kiszabadulnak a fágok. Lizogén ciklus: a fág DNS-e beépül a baktérium genomjába, és együtt szaporodik vele (azaz a fág genomja is másolódik szaporodás közben). A beépült profág spontán v. mutagén hatásra egyszer csak kihatadhat (fágindukció), és a lizogén ciklus így átmehet lítikusba.

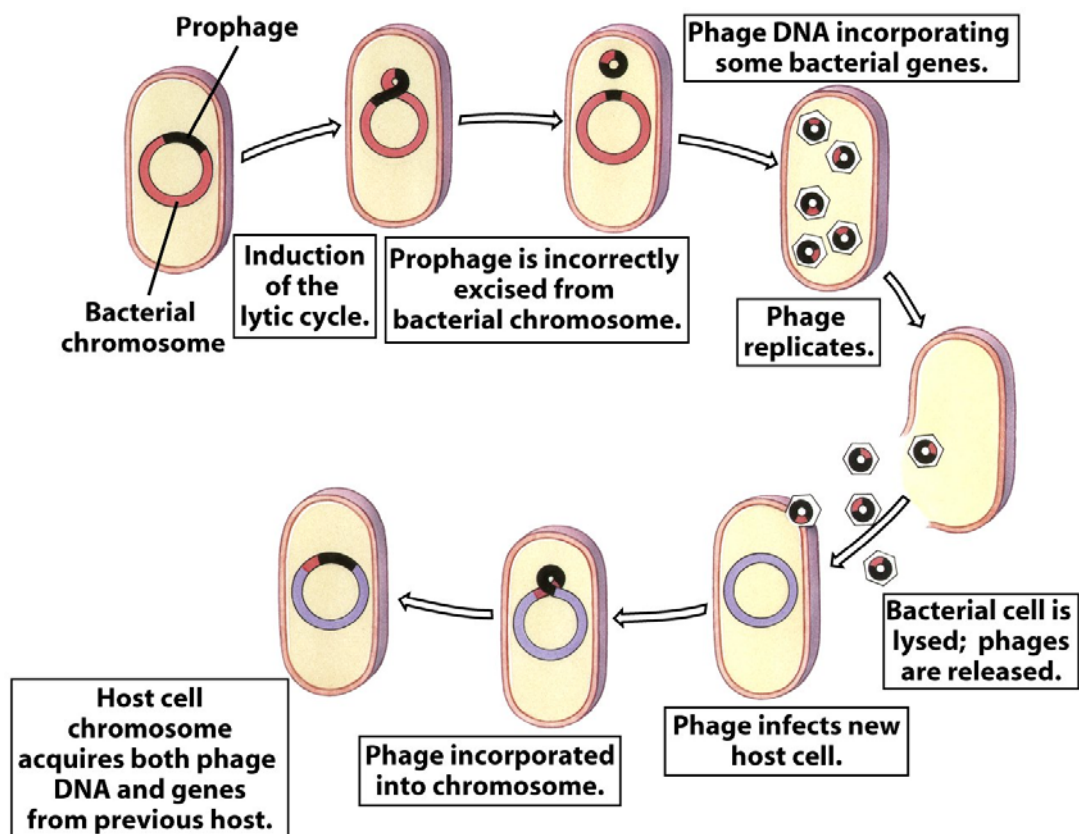


Figure 8-4 Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

speciális transzdukció: a fágindukció során a profág szabálytalanul hasad ki, azaz magával ragadja a donor baktérium DNS-ének egy darabját → beindul a lítikus ciklus, sok rekombináns fág képződik, majd szabadul ki → ha ezután egy ilyen fág lizogén módon megfertőz egy másik (recipiens) baktériumot, beépíti annak genomjába a donortól elragadott géneket is. Csak a normál beépülési hely közvetlen szomszédságában levő gének vihetők át, ezért nevezzük speciálisnak.

általános transzdukció: ebben az esetben a fág a donor genomjának elvileg bármely darabját át tudja vinni a recipiens baktériumba. Lítikus ciklussal indul a folyamat, ahol a fág genom véletlenszerűen rekombinálódhat a donor feldarabolódó genomjának valamely részével (ettől lesz általános transzdukció), majd innen fogva minden ugyanaz, mint a speciális esetben.

A transzdukcióval átvihető genetikai információ „távolsága” az egyes fágok specifikusságától függ. További jelentősége: baktériumok genomjának térképezése; illetve modell az emlős (humán) daganatvírusok működésének megértésében.

Konjugáció

Lederberg végezte el azt a kísérletet, hogy két, külön-külön háromszorosan auxotróf (de nem ugyanazokra az anyagokra!) *E. coli* törzs kevert szuszpenzióját próbálta meg minimál tápközegen szaporítani, és néhány nap elteltével telepek képződtek → az auxotróf törzsek közötti gén transzfer prototróf sejteket eredményezett. A konjugáció a prokarióta rekombináció legfejlettebb formája, ami egy kicsit már emlékeztet az ivaros szaporodásra. A két baktérium fizikai kapcsolatba kerül egymással, az F-pilus és az azt kitöltő citoplazmahíd köti össze őket. Itt mehet végbe az információcsere: a donor az F-plazmiddal rendelkező (F^+) sejt, amely a pilust is növeszti (az ehhez szükséges információ az F-plazmidon kódolt); a recipiens pedig az F-plazmiddal nem rendelkező (F^-) sejt.

Az átadódó genetikai információ alapesetben ($F^+ \times F^-$ párosodás) maga az F-plazmid. További érdekesség, hogy a plazmid DNS-e felnyílik és egyszálú, linearizált formában jut át → a donorban és a recipiensben is DNS-polimerázok szintetizálják meg a kiegészítő szálakat → a konjugáció eredményeképp mindkét sejt F^+ típusú lesz!

Az F-plazmid integrálódhat is a baktérium kromoszómájába → az így képződő sejt is F^+ típusú (konjugáció során donorként viselkedik), de nagyságrendekkel megnő az általa kezdeményezett rekombináció gyakorisága (neve Hfr típusú sejt, high frequency of recombination). A másik különbség, hogy a Hfr $\times F^-$ párosodás során nem az F-plazmid, hanem a teljes kromoszóma átadása indul meg a recipiensbe, bár az általában nem tud befejeződni, mert érzékeny a konjugáció pl. mechanikai hatásokra.

A Hfr sejtben pedig az integrálódott plazmid ismét ki is hasadhat a kromoszómából: ha ez szabályosan történik, ismét F^+ sejt keletkezik ↔ ha szabálytalan a kihasadás, akkor ún. F' sejt képződik. Utóbbi is képes konjugációra és donorként viselkedik → az $F' \times F^-$ párosodás során a recipiens megkapja az F' plazmidot, amely tehát tartalmaz valamennyi genetikai

információt a donor kromoszómájából is. A Hfr törzsek jelentősége az is, hogy kromoszóma térképezésben használhatóak fel.

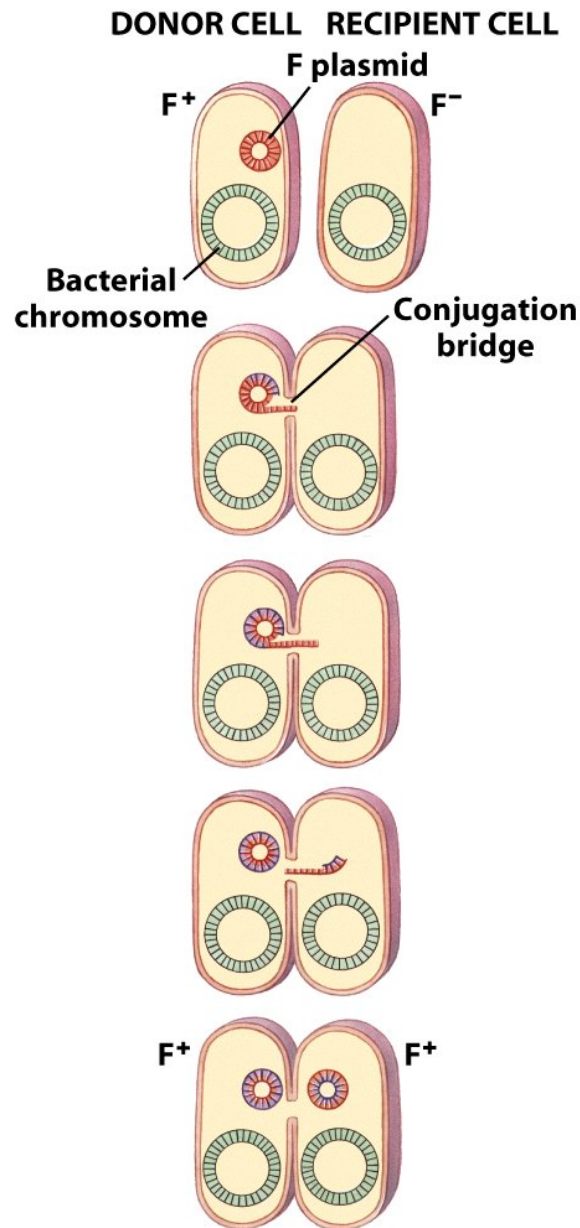


Figure 8-8 Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

Felhasznált irodalom

Pesti Miklós (szerk.): Általános mikrobiológia. Dialóg Campus, Budapest-Pécs, 2001

Jacquelyn G. Black: Microbiology. Principles and Explorations. 6th Ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, 2005