EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi Kar

Szakdolgozat

A homológ rekombináció hatékonyságának szerepe a mikobakteriális antibiotikum rezisztencia kialakulásában

Témavezetők:
Dr. Tóth Judit
tudományos főmunkatárs
Molnár Dániel
PhD hallgató

Készítette:
Félegyházi Cintia
angol nyelv és kultúra tanára – biológiatanár
osztatlan tanári mesterszak

2021

Eredetiségi nyilatkozat

Alulírott .....FÉLEGYHÁZI.....CINTIA.....(név) .....IM7571.....(Neptun-kód) ezennel kijelentem és aláírásommal megerősítem, hogy az ELTE ..ANGOL.....NYELV.....ÉS.....KULTÚRA - BIOLÓGIA..... osztatlan tanári mesterszakján írt jelen diplomamunkám saját szellemi termékem, melyet korábban más szakon még nem nyújtottam be szakdolgozatként és amelybe mások munkáját (könyv, tanulmány, kézirat, internetes forrás, személyes közlés stb.) idézőjel és pontos hivatkozások nélkül nem építettem be.

Budapest, ..2021..04..20.....

Félegyházi Cintia
.....
a hallgató aláírása

TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék 3

Köszönetnyilvánítás 6

Rövidítések jegyzéke 7

1. Bevezetés 9

2. Irodalmi áttekintés 11

2.1. Antibiotikumok 11

2.1.1. Általános jellemzők 11

2.1.2. Az antibiotikumok hatásmechanizmusa 11

2.2. Antibiotikum rezisztencia 17

2.2.1. Az antibiotikum rezisztencia csoportosítása annak eredete szerint 19

2.2.2. Az antibiotikum rezisztencia fő mechanizmusai 19

2.2.3. Az antibiotikum rezisztencia kivédése 24

2.3. A mikobakteriális antibiotikum rezisztencia jellegzetességei 25

2.3.1. A mikobaktérium és a tuberkulózis 25

2.3.2. A mikobakteriális antibiotikum rezisztencia mechanizmusai 26

2.3.3. A ciprofloxacin rezisztencia 29

2.3.4. A mikobakteriális dUTPázok és a genomi integritás 29

3. Célkitűzések 31

4. Anyagok és módszerek 32

4.1. A kísérlet során használt baktérium törzsek és tápoldatok 32

4.2. A kísérlet során használt antibiotikum 33

4.3. A kísérlet menete 33

4.4. Az eredmények kiértékelésénél használt statisztikai próbák 35

5. Eredmények 37

5.1. A vizsgált tényezők 37

5.1.1. Generációs idő 37

5.1.2. Tolerancia ráta 38

5.2. Az eredmények bemutatása 39
5.2.1. A vad típusú *Mycobacterium smegmatis* generációs ideje és tolerancia rátája 39
5.2.2. A Δ-loop mutáns *Mycobacterium smegmatis* generációs ideje és tolerancia rátája 41
5.2.3. A dut(-) mutáns *Mycobacterium smegmatis* generációs ideje és tolerancia rátája 44
5.3. Az eredmények összegzése 47
6. Biológia szakmódszertani feldolgozás 50
6.1. Bevezetés 50
6.1.1. A biológia oktatáshoz kapcsolódó célkitűzések, fejlesztendő területek 50
6.1.2. A témakörök megjelenése a gimnáziumi biológia oktatásban 51
6.2. A 9. és 10. évfolyamos diákok ismerete a témában 52
6.2.1. A kitöltő diákok általános jellemzése 52
6.2.2. A diákok tudása a baktériumok témakörében 54
6.2.3. A diákok tudása az antibiotikumok témakörében 57
6.2.4. A diákok tudása az antibiotikum rezisztencia témakörében 59
6.2.5. A diákok tudása a tuberkulózis témakörében 60
6.3. A gimnáziumi biológia szakkör tervezete 61
6.3.1. Az elméleti tudás átismétlése és esetleges kibővítése 65
6.3.2. A laboratóriumi szabályok megismerése, a laboratóriumi eszközök használatának gyakorlása, hígítási sor készítése 67
6.3.3. A táptalajok készítésének módja, a lemezek öntésének a technikája, a környezetünkben élő baktériumok demonstrálása és a kézmosás hatékonyságának megismerése 70
6.3.4. A baktériumok szélesztési technikájának a megismerése; az antibiotikumok, a természetes antimikrobiális vegyületek és nehézfémek baktériumokra való hatásának a vizsgálata 72
6.3.5. Telepmorfológiai megfigyelések, előre elkészített CFU lemezek elemzése, a sejtszámolási módszer megismerése 76
6.3.6. A CFU, mint sejtszámolási módszer készítésének a megtanulása és gyakorlása 78

6.3.7. A szakkör során szerzett tudás összegzése 80

6.4. A szakkör értékelése, kitekintés a jövőbe 82

7. Mellékletek 83

7.1. A diákok előzetes tudásának a felmérésére készített kérdőív [85] 83

7.2. Az első szakköri óra óraterve 86

7.3. Az első gyakorlati óra powerpoint bemutatója 88

7.4. A második szakköri óra óraterve 92

7.5. A második szakköri órához tartozó gyakorlati munkalap 94

7.6. A harmadik szakköri óra óraterve 97

7.7. A harmadik szakköri órához tartozó gyakorlati munkalap 99

7.8. A negyedik szakköri óra óraterve 103

7.9. A negyedik órához tartozó gyakorlati munkalap 105

7.10. Az ötödik szakköri óra óraterve 111

7.11. Az ötödik órához tartozó gyakorlati munkalap 113

7.12. A hatodik szakköri óra óraterve 116

7.13. A hatodik órához tartozó gyakorlati munkalap 118

7.14. A hetedik szakköri óra óraterve 121

7.15. A hetedik órán Kahoot alkalmazás formájában játszott kvíz kérdései 123

Irodalomjegyzék 125

Jegyzékek 132

Ábrák 132

Táblázatok 134

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Tóth Juditnak és Molnár Dánielnek, akik mérhetetlen mennyiségű szaktudásukkal, hozzáértésükkel és folyamatos segítségükkel nagyban hozzájárultak szakdolgozatom elkészültéhez.

Szeretnék köszönetet mondani a Genom Metabolizmus Kutatócsoport minden munkatársának, akik munkám során támogattak, és bármilyen felmerülő kérdés esetén bizalommal fordulhattam hozzájuk.

Továbbá szeretném megköszönni a Budapesti Fazekas Mihály Gyakorló Általános Iskola és Gimnázium igazgatóságának, Nagy Péter mentor és Laczkó Ágnes konzulens tanáraimnak, valamint a 9. és 10. évfolyamos diákoknak és osztályfőnökeiknek, hogy segítették a szakdolgozatom módszertani részének megalkotását.

Végül szeretnék köszönetet mondani a családomnak és a barátaimnak, akik felsőoktatási tanulmányaim során mindvégig mellettem álltak, szeretetükkel és segítségükkel minden helyzetben támogattak.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABC	ATP-binding casette superfamily (angol szakirodalom alapján)
AMP	ampicillin
ATP	adenozin-trifoszfát
CA	kloramfenikol
CFU	telep képző egység (az angol szakirodalomban colony-forming unit)
CIP	ciprofloxacin
DHFR	dihidrofolát-reduktáz
DHPS	dihidropteorát-szintáz
DNS	dezoxiribonukleinsav
dUMP	dezoxiuridin-monofoszfát
dUTP	dezoxiuridin-trifoszfát
dUTPáz	dezoxiuridin-trifoszfát pirofoszfatáz
INH	izoniazid
InhA	enoyl acyl carrier protein reductase (angol szakirodalom alapján)
KANA	kanamicin
KatG	kataláz-peroxidáz
LPS	lipopoliszacharid
MATE	multidrog and toxic compound extrusion family (angol szakirodalom alapján)
MDR	multidrog-rezisztens
MDR-TB	multidrog-rezisztens tuberkulózis
MFS	major facilitator superfamily (angol szakirodalom alapján)
mRNS	messenger RNS, hírvivő RNS
MRSA	meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus*
NAD	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-hidrát
NAT	Nemzeti Alaptanterv
OD_{600}	600 nm-es hullámhosszon mért optikai denzitás
PBP	penicillin-kötő fehérje

RIF	rifampicin
RND	resistance-nodulation-cell division superfamily (angol szakirodalom alapján)
RNS	ribonukleinsav
rRNS	riboszomális RNS
SARS-COVID-19	súlyos akut légzőszervi szindróma-koronavírus-2 által okozott világjárvány
SMR	small multidrog resistance family (angol szakirodalom alapján)
TB, TBC	tuberkulózis, tüdőgümőkór
TC	tetraciklin
TDR	teljesen gyógyszerrezisztens
TDR-TB	teljesen gyógyszerrezisztens tuberkulózis
tRNS	transzfer RNS, szállító RNS
UDP	uridin-difoszfát
XDR	extrém/kiterjedten drog rezisztens
XDR-TB	extrém/kiterjedten drog rezisztens tuberkulózis

1. BEVEZETÉS

Több ezer éven keresztül az embereknek számos fertőző betegséggel kellett szembenézniük, mint például a kolera, diftéria és a pestis. Ezeknek a betegségeknek a gyógyítása a múltban elképzelhetetlen volt, így a fertőzések következtében rengetegen meghaltak és a várható élettartam is a ma jellemzőhöz képest igen alacsony volt. Az áttörést Sir Alexander Fleming hozta, aki 1928-ban felfedezte az első baktériumellenes szert (antibiotikumot), a penicillint. Ezt követően az 1940-es évek elején Ernst Chain és Howard Florey állították elő tisztán a penicillin G-t [1], amelyet az elkövetkezendő években széleskörűen kezdtek el használni, így elkezdődött az antibiotikumok térhódítása. Az 1950-es és 1970-es évek közötti korszakot sokan az antibiotikumok fénykorának nevezik, mivel ebben az időszakban fedezték fel a ma is használt antibiotikumunk döntő hányadát.

Az antibiotikumok széleskörű használatával azonban szelektáló környezetet biztosítottunk, melyhez a baktériumok élőlények révén sok esetben képesek voltak evolúciósan alkalmazkodni. Egyre jelentősebb problémává vált, hogy megjelentek a gyakran használt szereknek ellenálló (rezisztens) baktériumtörzsek. Emellett, az „alacsonyan lógó gyümölcsök", tehát azok az antibakteriális hatású molekulacsaládok, amelyek a legkézenfekvőbbek voltak fejlesztési szempontból, az 1990-es évek végére már nagyrészt ismertek voltak. Ekkorra pedig az elsők közt használt szerek a legtöbb kórokozóval szemben már hatástalannak bizonyultak. Az új antibiotikumok fejlesztése tehát versenyfutássá vált az idővel.

A felelőtlen antibiotikumhasználattal nagyban meggyorsítottuk a korábban az orvoslás ékkövének számító gyógyszerek hatástalanná válását. A nagyipari állattartásban napjainkban is általános jelenség a folyamatos, megelőzési céllal alkalmazott antibiotikumkúra. Emellett a betegellátásban is nagyon gyakori, hogy indokolatlanul használnak antibiotikumot, a betegek pedig sokszor nem az előírtaknak megfelelően szedik be a gyógyszereket. Emiatt korunk egyik kiemelkedő egészségügyi problémájává vált az antibiotikum rezisztencia, mely megelőzésével sok kutatás foglalkozik. A kutatások mellett azonban nagyon fontos a megfelelő tudományos ismeretterjesztés is a témában. Tanítási tapasztalataim alapján a diákok eltérő mennyiségű tudással rendelkeznek a témakörben, így szükségesnek tartom a minél tudatosabb antibiotikum használatra történő nevelést a diákok körében.

Az antibiotikum rezisztencia által jelentett veszélyt jól példázza a mikobaktériumok által okozott tuberkulózis, közhasználatú nevén TBC. Ez a betegség ma már kevésbé van reflektorfényben, azonban a SARS-COVID-19 pandémiát megelőzően a legtöbb évben a TBC bizonyult a legpusztítóbb fertőző betegségnek. Ennek egyik elsődleges oka pedig a mikobaktériumoknál extrém gyakran előforduló rezisztencia. Diplomamunkám során irodalmi áttekintést készítettem az antibiotikumok és a rezisztencia témájában, emellett pedig kísérletesen vizsgáltam a mikobaktériumok adaptációs stratégiáit. Eredményeim amellett, hogy hozzájárulnak a TBC-vel kapcsolatos tudástár bővítéséhez, középiskolás tanulók számára is jól interpretálhatók az iskolai nevelő-oktató tevékenység során.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Antibiotikumok

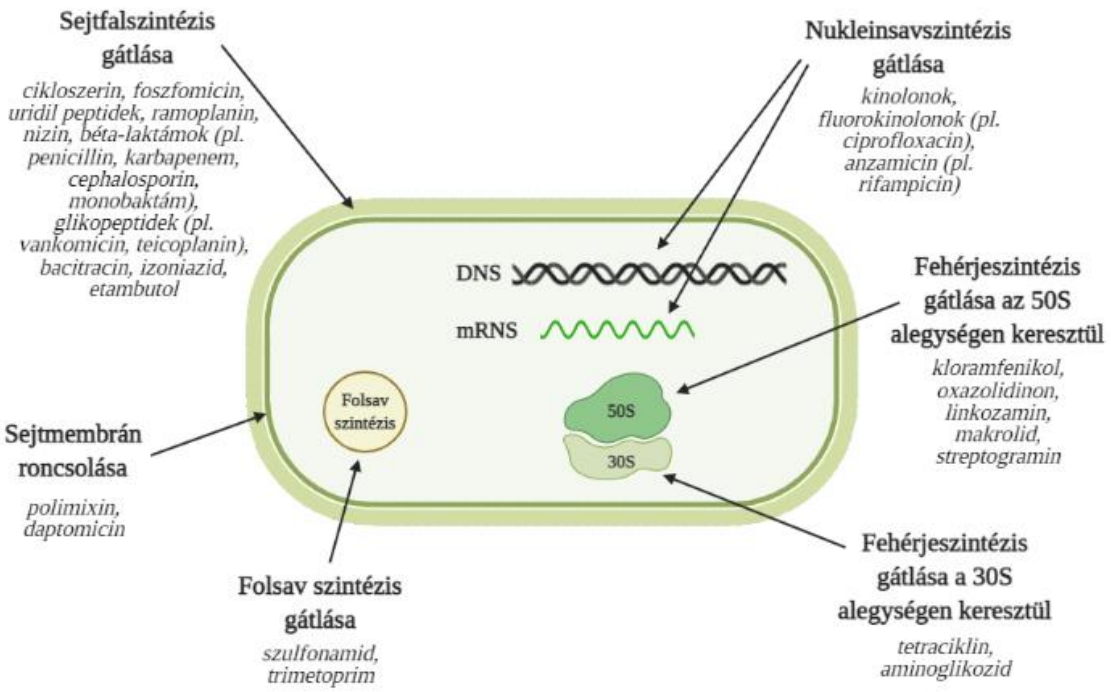
2.1.1. Általános jellemzők

Az antibiotikumok megjelenése az akkori orvoslás legjelentősebb vívmánya volt, amely segítségével számos korábban gyógyíthatatlannak hitt fertőző betegség is gyógyíthatóvá vált. Az antibiotikumok mikroorganizmusok által, vagy szintetikusan előállított vegyületek, amelyek korlátozzák a baktériumok növekedését vagy megölik azokat egy bizonyos koncentrációban [2,3]. Ennek köszönhetően, az antibiotikumokat napjainkban is széleskörűen használják az orvoslásban számos betegség kezelésére.

2.1.2. Az antibiotikumok hatásmechanizmusa

Az antibiotikumok hatásmechanizmus alapján két fő csoportra oszthatók: a baktericid hatásúak elpusztítják a mikroorganizmusokat, míg a bakteriosztatikus hatásúak csupán akadályozzák azok növekedését. Emellett a hatás lehet kevert is, tehát egyes antibiotikumok a koncentrációjuk függvényében egyaránt lehetnek baktericid és bakteriosztatikus hatásúak. Léteznek széles és szűk spektrumú antibiotikumok, annak függvényében, hogy az adott vegyület a baktériumok nagy része ellen, vagy pedig csak néhány mikroorganizmus ellen hatékony [2,4].

Az antibiotikumok csoportosítása leggyakrabban a molekuláris szerkezetük és a hatásmechanizmusuk alapján történik. Az antibiotikumok hatásmechanizmusa [5] többféle lehet (1. ábra): a sejtmembrán strukturális és funkcionális károsítása, a sejtfalszintézis gátlása, a fehérjeszintézis gátlása, a nukleinsavszintézis gátlása, illetve egyéb metabolikus folyamatok – például folsav szintézis – gátlása [2].



1. ábra
Az antibiotikumok egyes típusai hatásmechanizmusuk alapján [2].
(Etebu & Arikepar, 2016 ábrája alapján készült)

2.1.2.1. A sejtmembránra ható antibiotikumok

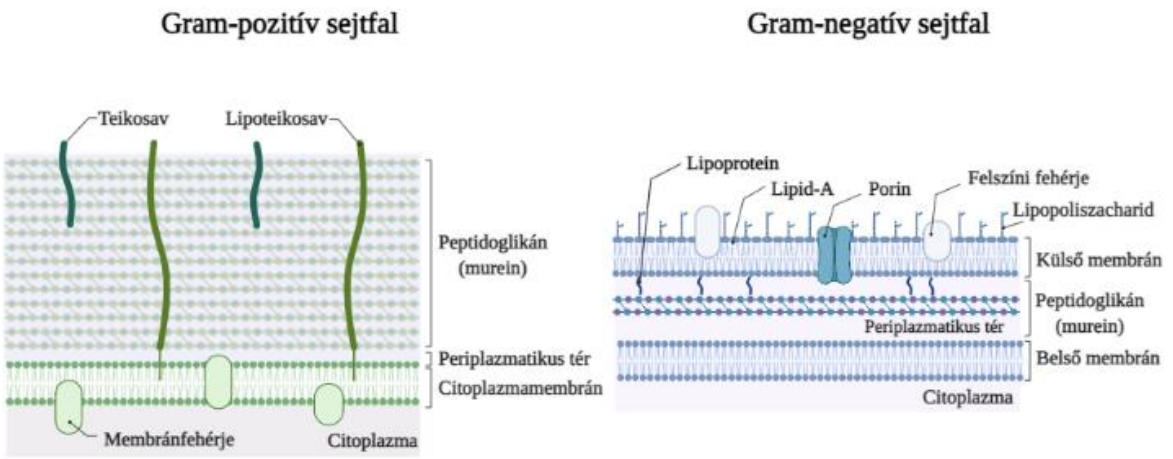
Az egyik hatásmechanizmus során az antibiotikumok a baktériumok sejtmembránját károsítják. Ezek használatát az teszi lehetővé, hogy a baktériumok és emlősök sejtmembránja eltérő felépítésű [6]. A legfőbb különbség az anionos lipidek elhelyezkedésében rejlik; a baktériumok esetében ezen lipidek a felszínen találhatók, míg az emlős membránokban a sejt belseje felé néznek. Ennek következtében a sejtmembránt célzó antibiotikumok többsége pozitív töltéssel rendelkezik, így nagyobb szelektivitásuk van a baktérium sejtmembránjára nézve [7].

A sejtmembrán károsításának módja többféle lehet a baktérium sejtmembránjának jellemzői alapján. Alapvetően a baktériumoknak két csoportját különböztetjük meg [8], ezek a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok (1. táblázat).

Gram-pozitív baktériumok	Gram-negatív baktériumok
Bacillus cereus, *Enterococcus* fajok, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumonia*	*Escherichia coli*, *Klebsiella* fajok, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*

1. táblázat
Néhány közismert Gram-pozitív és Gram-negatív baktérium [8,9].

A csoportosítás alapja az, hogy a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok membránjának komponensei és felépítése is különböző (2. ábra). A Gram-negatív baktériumok két membránnal rendelkeznek – egy külső membránnal és egy citoplazmamembránnal. A külső membránban egy csak ezen típusú baktériumokra jellemző lipid komponens, lipopoliszacharid található. A Gram-pozitív baktériumoknak nincsen külső membránja, viszont a sejtfala teikosavat tartalmaz [7]. Mindkét típusú sejtfal tartalmaz mureint (peptidoglikánt), azonban fontos különbség, hogy ez a murein réteg a Gram-pozitív baktériumok esetén vastag, míg a Gram-negatívoknál csupán egy vékony réteg. A két sejtfal típust a Christian Gram által leírt Gram-festés tárta fel. Ennek lényege az, hogy a kristályibolya festéket a vastagabb murein fallal rendelkező Gram-pozitív sejtek megkötik, míg a Gram-negatív sejtekből a festék alkohollal könnyen kimosható [10].



2. ábra
A Gram-pozitív és Gram-negatív sejtfal felépítése [11].
(Rohde, 2019 ábrája alapján készült)

A sejtmembrán felépítésének sajátosságai alapján így más mechanizmuson keresztül károsodik a Gram-pozitív és -negatív baktériumok membránja. A Gram-negatív baktériumokkal szemben hatásos polimixinek baktericid hatásukat azáltal fejtik ki, hogy a

külső membránban található lipopoliszacharid lipid-A komponenséhez kötődve destabilizálják és szétroncsolják a külső és belső membránt egyaránt [12]. Egy másik sejtmembránt károsító antibiotikum a daptomicin [2], amely a Gram-pozitív baktériumok esetében a sejtmembránhoz kötődve kalcium-függő depolarizációt indukál. Ez a membrán roncsolódásához vezet, tehát a daptomicin baktericid hatást fejt ki a baktériumra [13].

2.1.2.2. A sejtfalszintézist gátló antibiotikumok

Az antibiotikumok számos csoportja a sejtfalszintézis valamelyik lépésének megakadályozásával fejti ki hatását [5]. A sejtfalszintézis bioszintetikus útvonala alapvetően három szakaszra osztható. Az első szakaszban a sejtfal felépítéséhez szükséges monomerek jönnek létre a citoplazmában. A második lépés a membrán asszociált szakasz, amely során a lipid prekurzorok a citoplazmamembrán külső felszínére kerülnek. Itt zajlik a harmadik szakasz, amely során az újonnan létrejött peptidoglikán egység a sejtfalhoz kapcsolódik. A folyamatot gátló antibiotikumok tehát a három szakasz egyikében fejtik ki hatásukat [14].

A szintézis első citoplazmatikus szakaszát korlátozza például a cikloszerin és a foszfomicin. A cikloszerin működése során a szintézishez szükséges enzimek (D-alanin ligáz és D-alanin racemáz) működését gátolja, illetve megakadályozza a D-alanil-D-alanin dipeptid kialakulását. Napjainkban fontos antibiotikum a tuberkulózis kezelésében [14]. A foszfomicin az első szakaszban fontos, a legtöbb baktérium fajban megtalálható Mur enzimek működését akadályozza meg [15], így akadályozva a peptidoglikán szintézist.

A második, membrán asszociált szakaszt is számos antibiotikum képes gátolni. Az uridil peptidek egy enzim, az MraY, működésének akadályozásával fejtik ki hatásukat. Más antibiotikumok, például a ramoplanin és nizin, egy fontos komponenst, a lipid II-t támadják működésük során [14], így gátolva a sejtfalszintézis második szakaszát.

Az utolsó extracitoplazmatikus szakasz gátlására szintén számos antibiotikum képes, mint például a béta-laktámok, glikopeptidek és a bacitracin. A béta-laktámok antimikrobiális hatásukat a harmadik szakaszban fejtik ki úgy, hogy a D-alanil-D-alanin terminális aminosav analógjai. Így az aminosav helyett az antibiotikum irreverzibilisen kapcsolódik a penicillin-kötő fehérjék (PBP) aktív centrumához, amelynek következtében a traszpeptidáció egyik utolsó lépése akadályozva van [14]. Ebbe a csoportba tartozik az Alexander Fleming által elsőként felfedezett antibiotikum, a penicillin, amely gátolja a peptidoglikán egységek közötti keresztkötések kialakulását [16]. A Fleming által felfedezett penicillin G szűk spektrumú, főként Gram-pozitív baktériumok ellen hatásos. Azonban számos félszintetikus

penicillin – mint például a meticillin, ampicillin és amoxicillin – széles spektrumú, így ezek számos Gram-negatív patogén ellen is hatásosak. Az amoxicillin a hatóanyaga jó néhány gyakran alkalmazott gyógyszernek, például az Augmentinnek, Aktil Duo-nak és Curam Duo-nak is. A béta-laktám antibiotikumok közé tartoznak még a karbapenemek és cephalosporinok, amelyek a penicillinhez hasonlóan a keresztkötések kialakulását gátolják meg [2]. Továbbá, ide tartozik még a monobaktám, amely szintén hasonló elven működik és szűk spektrumú antibiotikumként a Gram-negatív baktériumok ellen hatásos.

Az utolsó szakaszt akadályozzák még a Gram-pozitív baktériumok ellen hatásos glikopeptidek is, amelyek közé tartoznak például az igen elterjedt vankomicin és teicoplanin [17]. A glikopeptidek a peptidoglikán szintézis késői szakaszát gátolják a transzglikoziláció és/vagy transzpeptidáció megakadályozásával úgy, hogy a kötésben résztvevő D-alanil-D-alanin aminosavakhoz, lipid II-höz és az éretlen peptidoglikánhoz kapcsolódnak [14]. Végül, a bacitracin egy olyan széles spektrumú Gram-pozitív patogének ellen hatásos antibiotikum, amely működése során hozzákapcsolódik a lipid-pirofoszfát szállító molekulához, amely az épülő sejtfalhoz szállít különféle molekulákat [3].

Egyes tuberkulózis ellen használt antibiotikumok is a sejtmembránt károsítják. Ilyen mechanizmus alapján működik az izoniazid és az etambutol [18]. Ezek az elsővonalbeli antituberkulotikumok működésük során a mikobaktérium sejtfalfelépítését gátolják úgy, hogy egy enzim gátlásán keresztül a mikolsav szintézisét akadályozzák [19].

2.1.2.3. A fehérjeszintézist gátló antibiotikumok

A fehérjeszintézist gátló antibiotikumok működésében alapvető fontosságú az, hogy a prokarióta és az eukarióta sejtek riboszómái különbözők, ezáltal specifikusan a prokarióta sejtek riboszómáira való hatást lehet elérni [20]. A prokarióta riboszómáknak két alegysége van, a 30S és 50S alegység. A 30S alegység egy RNS láncot (16S) és 21 különféle fehérjét tartalmaz, míg az 50S alegység két RNS láncból (23S és 5S) és 34 fehérjéből épül fel. A fehérjeszintézis folyamatában a kis alegység biztosítja a dekódoló centert, míg a nagy alegység tartalmazza a katalitikus helyet (peptidil-transzferáz center) és a fehérje exit csatornát. A két alegység együttesen alakítja ki az A (aminoacil), P (peptidil) és E (exit) kötőhelyeket. A folyamatban fontos szerepet játszik még az mRNS, amely a genetikai kódot hozza a riboszómához, illetve a tRNS, amely az aminosavakat szállítja [21].

A fehérjeszintézist akadályozó antibiotikumok a 30S vagy 50S alegységre kifejtett hatásukkal fejtik ki antibakteriális működésüket, így befolyásolva az mRNS fehérjévé való

átírását a különböző szakaszokban [2]. Az antibiotikumok célpontja főként a dekódoló és peptidil-transzferáz center, illetve a fehérje exit csatorna és a fehérjeszintézis számos további mobilis tagja [21].

A riboszóma 30S alegységére ható antibiotikumok közé tartozik többek között a tetraciklinek és az aminoglikozidok [2]. A tetraciklinek olyan széles spektrumú antibiotikumok, amelyek működésük során bekötődésükkel gátolják az aminoacil-tRNS kötődését a riboszóma A kötőhelyére [3,22]. Az aminoglikozidok fő célpontja szintén az rRNS aminoacil-tRNS kötőhelye, így csökkentve a transzláció pontosságát és megakadályozva a riboszómára való transzlokációt [20,21,23].

A riboszóma 50S alegységére is számos antibiotikum hat, ezáltal akadályozva a fehérjeszintézist [2]. Ide tartoznak többek között a kloramfenikol, oxazolidinonok, linkozaminok, makrolidok és streptograminok. A kloramfenikol olyan széles spektrumú antibiotikum, amely működése során gátolja az aminosavak közötti peptidkötések kialakításáért felelős peptidil-transzferáz működését [20]. Egy másik, az 50S alegységre ható antibiotikum az oxazolidinon, amely az iniciációs komplex kialakulását gátolja, így a fehérjeszintézist már a kezdeti iniciációs szakaszban leállítja [3]. A linkozamidok, makrolidok és streptograminok szintén olyan hatású antibiotikumok, melyek az 50S alegységhez kapcsolódva gátolják a fehérjeszintézis elongációs fázisát úgy, hogy a tRNS riboszómáról való disszociációját idézik elő [24]. Egy napjainkban gyakran használt gyógyszer az Azi Sandoz és a Sumamed, amelyek hatóanyaga a makrolid antibiotikum.

2.1.2.4. A nukleinsavszintézist gátló antibiotikumok

A nukleinsavszintézist gátló antibiotikumok blokkolják a replikációt vagy leállítják a transzkripciót [2]. Ezen folyamatot befolyásolják a kinolonok és fluorokinolonok, melyek baktericid hatásuk révén akadályozzák a DNS replikációt és a szuperhelikális szerkezet kialakulását a DNS giráz és topoizomeráz IV működésének gátlásán keresztül. Mindkét enzim a topoizomeráz II családba tartozik, amelyek működésük során elhasítják a DNS két szálát, így kettős szálú DNS-törést kialakítva, majd végül a két elhasított szál újból összekapcsolódik az enzimeknek köszönhetően [25]. A DNS giráz és a topoizomeráz IV működésének jelentősége az, hogy a DNS kettős láncban negatív szuperhélixet alakít ki, melynek köszönhetően a DNS szál hozzáférhetőbbé válik a replikáció és a transzkripció számára [26].

Az antibakteriális működésük során a fluorokinolon antibiotikumok az enzim-DNS komplexhez kötődnek és megakadályozzák a kettős szálú DNS-törés utáni összekapcsolódást, amely a baktérium sejt halálát okozza [27]. A kísérleteim során használt ciprofloxacin is a fluorokinolonok családjába tartozik. A fluorokinolon antibiotikumokat a gyógyászatban is használják, ilyen antibiotikumok például az Avatac és a Cifloxin.

Az RNS szintézist blokkolják az anzamicinek. Ebbe a családba tartozik a tuberkulózis kezelése során is alkalmazott rifampicin [3], amelynek antibakteriális hatása az RNS-polimeráz gátlásán keresztül valósul meg, így akadályozva az RNS lánc elongációját [9].

2.1.2.5. Egyéb metabolikus folyamatokat gátló antibiotikumok

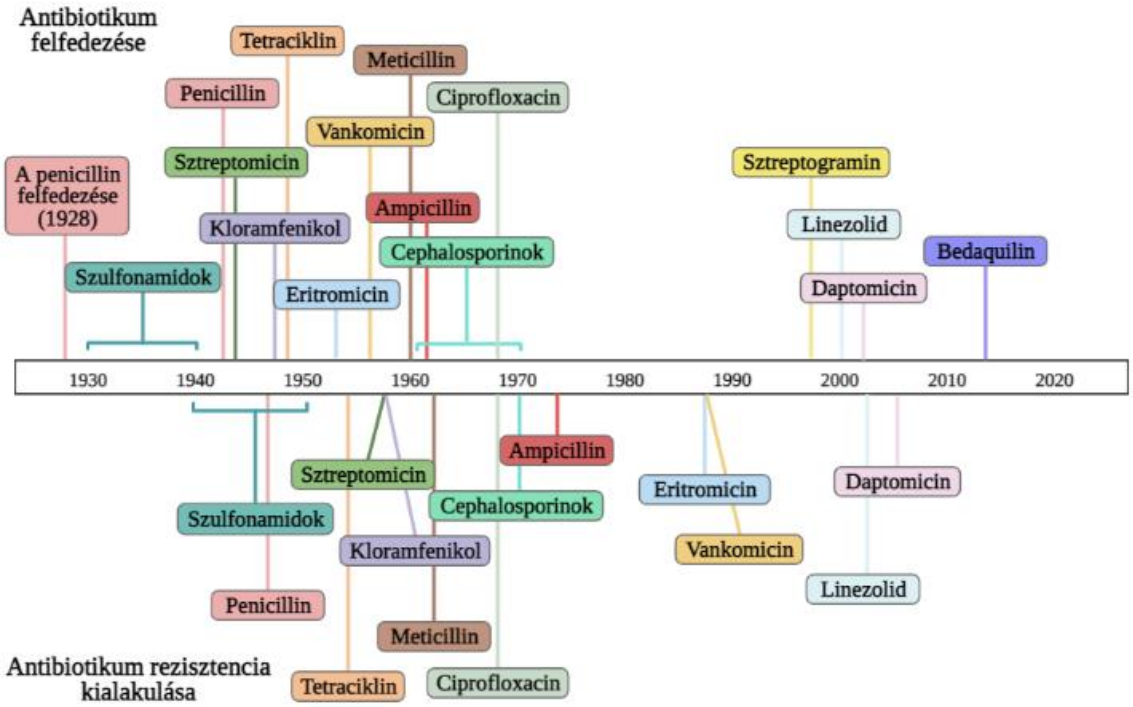
Számos olyan antibiotikum létezik, amely a baktériumok egyes metabolikus folyamataihoz szükséges szubsztrátra hasonlítanak, így az enzim a szubsztrát helyett az antibiotikumhoz kapcsolódik [2]. A folsav szintézis egyes lépéseit gátolják ilyen módon a szulfonamid és a trimetoprim. A szulfonamidok működésük során a dihidropteorát-szintáz (DHPS) enzim működését gátolják számos Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumban egyaránt [3]. A trimetoprim pedig a folsav szintézis egy másik lépésében a dihidrofolát-reduktáz (DHFR) enzim működését akadályozza, így baktericid hatást kifejtve a baktérium sejtre [28].

2.2. Antibiotikum rezisztencia

Az antibiotikumok használatának széleskörű elterjedése az orvostudomány egyik nagyon fontos eseménye volt, hiszen ezek segítségével a halálozások csökkentek és a várható élettartam pedig növekedett. Az antibiotikumokat számos, korábban halálosnak hitt betegség kezelésére használták sikeresen, így számos bakteriális fertőzés, mint például a kolera és a szifilisz könnyen kezelhetővé váltak.

Azonban az antibiotikumok használatának kezdete után nem sokkal kiderült, hogy számos baktérium eleve ellenálló bizonyos vegyületekkel szemben, vagy képes rezisztenssé válni ezekre az idő múlásával is (3. ábra). Ennek következtében a bakteriális megbetegedések effektív kezelése veszélybe került, mivel az addig esetlegesen hatásos antibiotikumok sok esetben már nem voltak képesek kifejteni baktericid vagy bakteriosztatikus hatásukat. Számos olyan baktérium törzs ismerhető napjainkban, amely

több gyakran használt antibiotikumra nézve is rezisztens. Ezeket a baktériumok által okozott betegségeket így nehéz kezelni, nagyobb mennyiségű vagy más alternatív antibiotikumokkal kezelhetők, melyeknek a használata a szervezetre nézve toxikusabb, illetve ezek drágábbak is [29–31].



3. ábra
Az egyes antibiotikumok felfedezése és az ezekre történő antibiotikum rezisztencia kialakulása a 20. és 21. században [32,33].
(Thakare és mtsai, 2020 ábrái és Palumbi, 2001 ábrája alapján készült)

Napjainkban az antibiotikum rezisztencia és az új antibiotikumok felfedezésének hiánya miatt tehát számos olyan betegség alakult ki, amelynek gyógyítása nehezebb, vagy olykor lehetetlen [29]. Az antibiotikum rezisztencia krízisének első ilyen kórokozó baktériuma a meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) megjelenése volt, amely a kórházi fertőzések egyik elsőszámú okozója. A MRSA a meticillinen túl napjainkban már számos másik antibiotikumra is rezisztens [34]. A Gram-pozitív baktériumok közül nagy gondot okoznak még az *Enterococcus* fajok, amelyek között szintén előfordulnak multidrog-rezisztens (MDR) patogének. A Gram-negatív baktérium törzsek körében azonban még súlyosabb az antibiotikum rezisztencia, mivel közöttük a multidrog-rezisztens törzsek mellett igen gyakoriak az extrém/kiterjedten drog rezisztens (XDR) és teljesen gyógyszerrezisztens (TDR) baktériumok is. Ez miatt tehát egyre nagyobb gondot okoz

például a *Pseudomonas aeruginosa*, a *Klebsiella pneumoniae* és a különböző *Acinetobacter* fajok által okozott betegségek kezelése [35].

2.2.1. Az antibiotikum rezisztencia csoportosítása annak eredete szerint

Az antibiotikum rezisztenciának két fő típusa van; az intrinzik és a szerzett rezisztencia [29]. Az intrinzik rezisztencia egy olyan természetes jelenség, amely a vad típusú baktérium fajra jellemző bizonyos vegyületekkel szemben [36]. Ez az ellenállóképesség a sejtek alapvető strukturális vagy funkcionális sajátosságainak köszönhető [30]. Ilyen strukturális sajátosságra vezethető vissza az, hogy számos Gram-pozitív baktériummal szemben hatásos antibiotikum hatástalan a Gram-negatívakkal szemben. Ez abból adódik, hogy alapvetően különbözik a citoplazmamembrán felépítése és sok esetben az antibiotikum nem képes átjutni az ezekre a fajokra jellemző külső membránon, így nem tudja elérni célpontját. Erre a jelenségre jó példa, hogy a béta-laktámok azért nem hatásosak a mikobaktériumok ellen, mert nem képesek átjutni a mikolsavban gazdag apoláris sejtfalon, így képtelenek elérni célpontjukat [37]. Egy másik, igen gyakori formája az intrinzik rezisztenciának a genetikailag kódolt efflux pumpák megléte, amelynek működési mechanizmusáról a későbbiekben lesz szó [38].

Az eredet szerinti csoportosítás másik fő típusa a szerzett rezisztencia [29]. Ennek során a baktérium fajok kétféle módon válhatnak ellenállóvá az antibiotikummal szemben. Az egyik lehetséges út a baktérium saját genomjában történő mutáció, a másik pedig a más baktériumokból géntranszferrel kapott gének által okozott rezisztencia, illetve megjelenhet ennek a kettőnek a kombinációja is [36]. Ennek az ellenállásnak az a sajátossága, hogy nem feltétlenül jelenik meg az egész fajon belül, csak bizonyos egyedeknél, de később lehet ez az elterjedt fenotípus.

2.2.2. Az antibiotikum rezisztencia fő mechanizmusai

Az antibiotikum rezisztenciát kialakító mechanizmusoknak három nagy csoportját különböztetjük meg. Az első nagy kategóriába azok a folyamatok tartoznak, amelyek az antibiotikum hatásos koncentrációjának az elérését akadályozzák meg a baktérium sejten belül. Ez történhet az antibiotikum felvételének akadályozásával és az antibiotikum sejtből való eltávolításával. Egy másik csoportba sorolhatók azok az folyamatok, amelyek a már sejtbe bejutott hatóanyagot hatástalanítják vagy lebontják. Végül, a baktériumok körében

még jellemző stratégia az antibiotikum támadáspontjának a módosítása különféle mutációkon keresztül, vagy a bioszintetikus útvonalak újra programozása a baktérium sejtben [29,38]. A korábban említett kétféle rezisztencia esetében más mechanizmusok jellemzők. Az intrinzik rezisztencia a felvétel limitálásán, inaktiváción és az antibiotikum eltávolításán (efflux) alapul. A szerzett rezisztencia esetében az antibiotikum támadáspontjának módosítása jellemző a sejt genomjában megjelenő mutációkon keresztül. Elképzelhetők továbbá olyan mutációk, melyek transzkripciós faktorokat érintve nagyban befolyásolhatják a transzkriptomot, ezáltal sok sejtfolyamatba szólhatnak bele. Szintén jelentős a szerzett rezisztencia körében úgynevezett rezisztencia-gének horizontális géntranszferrel történő felvétele. Az ezekről termelődő fehérjék általában a hatóanyagot inaktiválják.

2.2.2.1. Az antibiotikum hatásos koncentrációját való elérés megakadályozása

Az antibiotikumoknak ahhoz, hogy hatásukat megfelelően kifejtsék, el kell jutniuk a sejten belüli célpontjukhoz és ott bizonyos koncentrációban fel kell halmozódniuk, amelyben már képesek antimikrobiális hatásukat kifejteni [39]. Számos baktérium emiatt olyan típusú rezisztenciát fejlesztett ki, amellyel vagy a sejtbe való bejutást gátolja, vagy a sejten belüli antibiotikum koncentrációt csökkenti. Ennek egyik lehetséges módja a membrán átjárhatóságának a csökkentése, amelynek következtében az antibiotikum sejtbe való jutása akadályozva van. Egy másik lehetséges út a már bejutott antibiotikumok eltávolítása a sejtből efflux pumpák által [29].

2.2.2.1.1. Az antibiotikum felvételének megakadályozása

Az antibiotikumokat oldhatóságuk szempontjából két nagy csoportra oszthatjuk: hidrofil és hidrofób antibiotikumok, amelynek megfelelően a sejtbe való bejutás is kétféle módon lehetséges. A hidrofób hatóanyagok, mint például a makrolidek és az aminoglikozidok képesek átdiffundálni a citoplazmamembránon, ha annak tulajdonságai ezt megengedik. Ezzel szemben a hidrofil antibiotikumok erre nem képesek, így ezek úgynevezett porin csatornákon keresztül juthatnak be a baktérium sejtbe [30,40].

Az antibiotikum felvételének akadályozásával kapcsolatos rezisztencia többféle mechanizmuson alapulhat. Mint már korábban említettem, az egyes típusú baktériumok között a sejtek alapvető strukturális vagy funkcionális sajátosságainak köszönhetően különbség van. A Gram-negatív baktériumok természetes rezisztenciája is egy strukturális sajátságnak köszönhető, hiszen ezen baktériumok citoplazmamembránjában

lipopoliszacharid (LPS) is található [29]. A lipopoliszacharid tartalmaz egy lipid A részt, egy központi poliszacharidot és O-antigént [31]. Ez a LPS egyfajta barriert képez, így a hidrofób antibiotikumokkal szemben természetes védelem alakul ki, mert nem képesek átdiffundálni a membránon [41].

Az antibiotikumok sejtbe való bejutása a diffúzión túl történhet porin csatornákon keresztül is. Ezek olyan transzmembrán csatornák a Gram-negatív baktériumok membránjában, amelyeken keresztül képesek a hidrofil anyagok bejutni az intercelluláris térbe [41]. Ezeknek száma és szelektivitása is változó az egyes baktériumok esetén. A porin csatornákon alapuló antibiotikum rezisztenciának két fő módja van. Az egyik során az antibiotikumok bejutása azáltal van megakadályozva, hogy ezeknek a porin csatornáknak a mennyisége lecsökken a membránban, így nem tud elegendő mennyiségű hatóanyag a sejten belülre kerülni [30]. Egy másik lehetséges út a porin csatornák szelektivitásának megváltoztatása, amely pedig mutációkkal érhető el [29].

2.2.2.1.2. Az antibiotikum eltávolítása a sejtből

A sejten belüli antibiotikum koncentráció csökkentésének módja az antibiotikum eltávolítása efflux pumpák segítségével [29]. Ezt a jelenséget az 1970-es években fedezték fel a tetraciklin esetében, azonban azóta sok más antibakteriális anyagnál is azonosították [31]. Az efflux pumpák transzport fehérjék a citoplazmamembránban, amelyek energia felhasználásával képesek a sejt számára felesleges vagy mérgező anyagokat, mint például antibiotikumokat, eltávolítani a sejtből az extracelluláris térbe. Az efflux pumpák lehetnek egy adott szubsztrátra nézve specifikusak vagy széles spektrumúak, tehát vagy kizárólag egy vagy több anyag eltávolítására specializálódtak.

Az efflux pumpák öt nagy csoportba oszthatók: MFS (major facilitator superfamily), ABC (ATP-binding casette superfamily), SMR (small multidrog resistance family), RND (resistance-nodulation-cell division superfamily) és MATE (multidrog and toxic compound extrusion family) [42]. A Gram-negatív baktériumok membránjában mind az öt család efflux pumpái megtalálhatók, de az RND családba tartozók a legelterjedtebbek. A Gram-pozitív baktériumoknál főként a fluorokinolonok effluxában jelentős szerepet vállaló MATE és MFS családba tartozó transzporterek a jellemzők. Összefoglalva tehát, az efflux pumpák feladata az, hogy a baktérium sejtbe már bekerült anyagokat, így például az antibiotikumot, eltávolítsa. Ennek köszönhetően a sejten belüli antibiotikum koncentráció csökkeni fog egy

olyan szintre, amely már annyira alacsony, hogy hatástalan a sejtre nézve, így a baktérium életműködéseit nem befolyásolja [39].

2.2.2.2. A hatóanyag inaktiválása, lebontása

A baktériumok az antibiotikumok ellen a hatásos koncentráció kialakulásának megakadályozásán túl képesek úgy is védekezni, hogy olyan enzimeket szintetizálnak, melyek szelektíven inaktiválják vagy lebontják az antibiotikum hatóanyagát, így az nem tudja kifejteni hatását a mikroorganizmusra [43]. Ezek a bakteriális enzimek képesek módosítani az egyes molekulák szerkezetét. Az ilyen típusú mechanizmusoknak két fő útja van; egyrészt, az inaktiválás történhet magának a hatóanyagnak a lebontásával, másrészt pedig számos enzim képes egy-egy funkciós csoportot helyezni a molekulára, így módosítva a molekuláris szerkezetet [29,44].

Az antibiotikumok inaktiválásának egyik útja tehát a hatóanyag lebontása, amely hidrolízissel történik. Ez azért lehetséges, mert számos antibiotikum rendelkezik hidrolitikusan érzékeny kémia kötésekkel, amelyek a biológiai aktivitásukban központi szerepet játszanak [29]. Ennek következtében tehát számos olyan enzim alakult ki az evolúció során, amely ezeket a sebezhető kémiai kötéseket célozza meg, így elpusztítva a hatóanyagot [43]. A hidrolitikus deaktiválás egyik klasszikus és igen elterjedt esete a béta-laktamázok működése, amely az első szakirodalomban is leírt rezisztencia mechanizmus. A béta-laktamázok penicillinek és cephalosporinok elleni hatásukat tehát úgy fejtik ki, hogy hidrolitikusan hasítják a béta-laktám gyűrűt [44]. Mivel ez a négytagú laktám gyűrű a béta-laktám antibiotikumok kémiailag aktív része, ezért az antibiotikum nem fogja tudni megakadályozni a peptidoglikán egységek közötti keresztkötések létrejöttét, így hatástalanná válik a baktériummal szemben [39]. Mivel egyetlen béta-laktamáz molekula képes másodpercenként 10^3 molekula hasítására, így ez a mechanizmus valóban egy igen hatékony módszer ezekkel az antibiotikumokkal szemben. A béta-laktamázokon túl jellemző enzimek még az makrolid antibiotikumok ellen hatásos eszterázok és a foszfomicin gyűrűit hasító epoxidázok is.

Azonban vannak olyan antibiotikumok, amelyek nem tartalmaznak hidrolitikusan hasítható csoportot, így ezekben az esetekben más mechanizmusok alakultak ki az antibiotikumok hatásának csökkentésére [29]. Ezek során a baktériumok rezisztencia enzimjei kovalensen módosítják az antibiotikumot úgy, hogy különféle kémiai csoportokat – például foszfát-, acetil-, adenil-, nukleotid-csoportokat – helyeznek az antibiotikumra, melynek

eredményeképpen annak szerkezete, és így működése is módosul [25]. Ezek a módosító mechanizmusok minden esetben valamilyen szubsztrátot igényelnek működésükhöz, amely lehet ATP, acetil-CoA, NAD^+, UDP glükóz vagy esetleg glutation [43]. Ezekre a mechanizmusokra egy látványos példa az aminoglikozidok esete, amelyeknél a rezisztencia háromféle enzimatikus módosítással is kialakulhat: acetiláció, foszforiláció és adeniláció [39]. Ezeknek a kémiai folyamatoknak köszönhetően az aminoglikozid antibiotikumoknak kisebb lesz az affinitásuk az RNS-hez, amelynek következtében nem lesznek képesek a fehérjeszintézis gátlására.

2.2.2.3. Az antibiotikum támadáspontjának a módosítása

Számos olyan napjainkban használt antibiotikum létezik, amely hatását úgy fejti ki, hogy specifikusan, nagy affinitással kapcsolódik a baktérium sejt valamelyik részéhez, ezáltal megakadályozva annak normális működését [30]. Ennek következményeként a baktériumok képesek ezeknek a támadáspontoknak a megváltoztatására, így az antibiotikum nem tud ahhoz kötődni, tehát rezisztencia alakul ki az adott hatóanyag ellen, ugyanakkor a sejten belüli normális működését el tudja látni [39].

A támadáspont módosítása történhet a kódoló géneken történő pontmutációkkal, enzimatikus módosításokkal, illetve a támadáspont lecserélésével is [42]. A pontmutáció egyik elterjedt példája a fluorokinolon rezisztencia. A fluorokinolonok a DNS replikáció folyamatát állítják le a DNS giráz és topoizomeráz IV enzimek gátlásán keresztül. Ennek akadályozását a baktérium úgy érte el, hogy az ezen enzimeket kódoló géneken pontmutáció történt, így nagymértékű rezisztencia alakult ki, hiszen az antibiotikum így nem képes gátolni a folyamatban fontos enzimeket [29]. Egy másik hasonló elven működő rezisztencia a béta-laktámok ellen figyelhető meg. Ez esetben a penicillin-kötő transzpeptidázok mutációjával elérhető, hogy ezen antibiotikumok ne legyenek képesek a sejtfalszintézis gátlására [39]. Az enzimatikus módosítások egy látványos példája a riboszómális alegységek metilációja az *erm* gén által kódolt enzimen keresztül, amelynek következtében az antibiotikumok egy csoportja nem tud kötődni a riboszómához. Végül, de nem utolsósorban a folsav szintézist gátló antibiotikumok ellen is kialakult egyfajta rezisztencia. A folsav szintézisben két fontos enzim játszik szerepet, a dihidrofolát-reduktáz (DHFR) és a dihidropteorát-szintáz (DHPS). Ebben az esetben a rezisztencia elérhető a korábban is említett mutációval, illetve a baktérium képes felvenni olyan géneket a környezetből vagy

más baktériumoktól, amelyek által kódolt enzimek kevésbé érzékenyek az antibiotikumok jelenlétére.

2.2.3. Az antibiotikum rezisztencia kivédése

Az antibiotikum rezisztencia az egyik legaggasztóbb egészségügyet érintő probléma, hiszen az új antibiotikumok felfedezésének hiánya a rezisztencia mechanizmusok még széleskörűbb elterjedéséhez vezetett [45]. A rezisztens baktériumok kezelésére azonban olyan módszereket, stratégiákat fejlesztettek ki, amelyek segítségével új antibiotikumok hiányában kezelhetők az akár multidrog-rezisztens (MDR) törzsek is [46]. Ilyen stratégia többféle antibiotikum együttes használata, illetve az antibiotikumok és különféle adjuvánsok kombinációjának az alkalmazása [47].

A többféle antibiotikum együttes használatának oka lehet a minél szélesebb spektrum lefedése, több baktérium által okozott betegség együttes kezelése, illetve a rezisztens mikroorganizmusok megjelenésének megakadályozása [48]. Ezeken túl fontos szempont az is, hogy így nagyobb mértékű baktericid hatás érhető el az antibiotikumok szinergista hatásának köszönhetően [47]. Ennek köszönhetően sok esetben kezelhetők olyan betegségek is, amelyek gyógyítása egyféle antibiotikum használatával nem volna lehetséges. Ilyen szinergista hatású antibiotikum kombináció a penicillin és a sztreptomicin együttes használata például *Enterococcus*-sal való fertőződés esetén. Egy másik gyakran használt kombináció a trimetoprim és a szulfametoxazol együttes használata például a Sumetrolim és a Cotripharm gyógyszerek esetén. A két hatóanyag „együttes erővel” a baktérium sejt egyik bioszintetikus útvonalát, a folsav szintézist gátolja meg [49]. Továbbá, gyakran használják a szinergista hatású rifampicin, izoniazid és pirazinamid együttesét a tuberkulózis kezelése során is.

Egy másik jellemző stratégia a különféle adjuvánsok használata. Ezek olyan alacsony mértékben vagy egyáltalán nem antibiotikus aktivitású vegyületek, amelyek fokozzák az antibiotikumok hatásosságát a rezisztencia mechanizmus gátlásán keresztül [47]. A legelterjedtebb és legsikeresebb példa az amoxicillin és a klavulánsav kombinációja, amely egy napjainkban is igen elterjedt gyógyszernek, az Augmentinnek az alapját képezi. A baktériumok rezisztencia mechanizmusának köszönhetően a béta-laktám antibiotikumok, így az amoxicillin is könnyedén inaktiválható béta-laktamázok által. Emiatt az antibiotikum hatékony működése érdekében a terápiás alkalmazás során klavulánsavval együtt alkalmazzák az amoxicillint [45]. A klavulánsav gyenge antibiotikus hatással rendelkezik,

azonban rendkívül fontos szerepe van abban, hogy inaktiválja a béta-laktamáz enzimeket, melynek köszönhetően a baktérium rezisztencia mechanizmusa nem működőképes, az antibiotikum viszont hatékonyan működik. Ezzel megegyező hatás érhető el az ampicillin antibiotikum és a szulbaktám adjuváns kombinációjával is. A béta-laktamáz inhibitorokon kívül a különféle adjuvánsok, mint például a rezerpin, az efflux pumpák működésének gátlásán keresztül akadályozzák meg a rezisztencia mechanizmus működését.

2.3. A mikobakteriális antibiotikum rezisztencia jellegzetességei

2.3.1. A mikobaktérium és a tuberkulózis

A tuberkulózis (TBC, angol nómenklatúra szerint TB) az egyik legpusztítóbb fertőző betegség, amely főként a fejlődő világ országait sújtja, a szegényebb, gazdaságilag lemaradt helyeken jellemző. Globálisan évente 10 millió új aktív TBC-s esetet regisztrálnak, amelyből 1,5 millió eset halállal végződik [50]. Azonban ennél sokkal több a látens fertőzött, akik száma körülbelül 2 milliárdra tehető [51]. A látens fertőzöttek szervezetében megtalálható a baktérium, azonban az immunrendszer egyensúlyának köszönhetően nem jelennek meg a betegség tünetei, illetve a látens fertőzöttek csupán kis százalékában alakul ki később a tuberkulózis betegsége.

A TBC-t a *Mycobacterium tuberculosis* okozza, amely cseppfertőzés útján terjed [52]. Az aeroszolok formájában belélegzett baktériumok a tüdőbe kerülnek, ahol az alveoláris makrofágok fagocitózissal felveszik a mikobaktériumokat, azonban a makrofágok nem ölik meg azokat [51]. A megfertőzött makrofágok általában a tüdőben maradnak, így a betegség elsődlegesen a tüdő károsodásával jár. A makrofágok azonban más szervekbe is eljuthatnak, így az esetek körülbelül tíz százalékában jellemző lehet az extrapulmonális, tehát nem a tüdőt érintő tuberkulózis is [53].

Annak ellenére, hogy a tuberkulózis egy kezelhető betegség, a kezelések sikeressége mégis csak 82-85% között van [50]. Ennek oka az, hogy az antibiotikumokkal történő kezelés csak részben hatékony, mert a *Mycobacterium tuberculosis* sejtfala nagyon kis mértékben átjárható, illetve az antibiotikum rezisztencia kialakulására való hajlam is igen magas [52]. A TBC kezelése során a rezisztens törzsek kialakulása ellen a megfelelő terápiás stratégia alkalmazásával próbálnak védekezni. Emiatt a tuberkulózis kezelése egy igen hosszú és

összetett folyamat, a betegség kezelésére sokféle antimikrobiális gyógyszert használnak, melyeket antituberkulotikumoknak hívunk [54]. A kezelést mindig az úgynevezett első vonalbeli szerekkel kezdik meg, melyek közé tartozik az izoniazid, a rifampicin, az etambutol és a pirazinamid [19]. Azonban ezeknek az antibiotikumoknak a használata során kialakulhatnak úgynevezett multidrog-rezisztens baktérium törzsek (MDR-TB), amelyek az első vonalbeli antituberkulotikumok közül rezisztenssé váltak legalább a két leghatásosabbnak tartott izoniazidra és rifampicinre [55]. Ennek következtében szükségessé vált a második vonalbeli szerek kifejlesztése és használata is, amelyek azonban kevésbé hatékonyak és az egészségre nézve ártalmasabbak is. Ezek közé sorolhatók többek között a fluorokinolonok és számos injekcióval beadható antituberkulotikum – kanamicin, amikacin, kapreomicin. Azonban ezekkel szemben is kialakult az extrém/kiterjedten drog rezisztens baktérium (XDR-TB) [37], amely az izoniazidon és rifampicinen túl rezisztens a fluorokinolonokra és legalább még egy második vonalbeli szerre [56]. Sajnos megjelentek teljesen gyógyszerrezisztens baktériumok is (TDR-TB), melyek az összes elérhető antituberkulotikumra nézve rezisztensek, de valószínűleg eltérő mértékben [57].

A rezisztencia leküzdése érdekében számos kutatás folyik új antituberkulotikumok fejlesztésére [58]. Ilyen újonnan kifejlesztett szer a bedaquilin, amely egy diarilkinolon-származék és célzottan a mikobaktérium ATP-szintázát gátolja, így akadályozva a sejt működését. Összességében tehát, a kombinált antibiotikum használatnak és esetleges új, hatásos antibiotikumoknak a fejlesztésével a multirezisztens törzsek sokkal inkább visszaszoríthatók, így sikeresebb kezelést eredményezve.

2.3.2. A mikobakteriális antibiotikum rezisztencia mechanizmusai

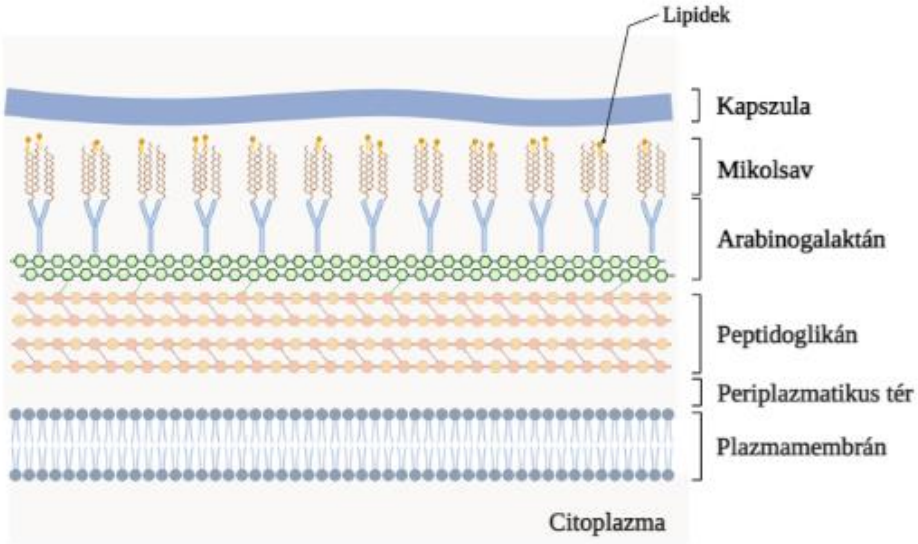
A korábban említett antibiotikumokkal történő kezelések során is sokszor előfordul, hogy a kezelés nem sikeres, melyben szerepe van annak, hogy a *Mycobacterium tuberculosis* populációk képesek túlélni az antibiotikumok által okozott stresszt [19]. A stresszhez történő adaptáció pontos folyamata nem ismert. A betegekből vett mintákban a biológiai diverzitás azonban igen nagy [59]. Sokszor előfordul, hogy a rezisztencia több, egymástól független biokémiai útvonalra ható antibiotikum-családdal szemben is megjelenik.

Figyelemreméltó, hogy a gyakori rezisztens esetek dacára a mikobakteriális genom nem kódolja a horizontális géntranszferhez szükséges enzimeket [60]. Így a mutáció az egyetlen módja a hosszú távú adaptációnak, a mikobaktériumok mutációs rátája *in vitro*

környezetben azonban igen alacsony (10^{-10} bp/generáció) [61]. Emellett az antibiotikumok ellen egy genetikailag nem kódolt, fenotípusos válasz is kialakulhat, így a hatóanyag eltávolítása után a folyamatok gyakran reverzibilisek [57].

2.3.2.1. Az intrinzik rezisztencia jellemzői

Az antibiotikum toleráns fenotípus kialakulását eredményezhetik különféle intrinzik mechanizmusok, amelyek a baktérium sejt egyes strukturális vagy funkcionális jellemzőinek köszönhetők [30]. A mikobaktériumok esetében ilyen strukturális jellemző a sejtfal sajátos felépítése (4. ábra), amely igen vastag és többrétegű [37,62]. A sejtmembránon kívül egy periplazmatikus tér található, amelyet egy sajátos sejtburok követ. Ez a sejtburok peptidoglikán, arabinogalaktán rétegekből és mikolsavból épül fel. A peptidoglikán és az arabinogalaktán hidrofil tulajdonságúak, így akadályozva a hidrofób molekulák bejutását a sejtbe. A külső arabinogalaktán réteg utána mikolsavakhoz kapcsolódik, melyek hosszúláncú zsírsavakként egy átjárhatatlan réteget hoznak létre, ezzel akadályozva a hidrofób és hidrofil molekulák bejutását is [63]. Ennek a sejtfalfelépítésnek köszönhető a már korábban említett béta-laktám elleni tolerancia, mivel az antibiotikum bejutása a sejtbe sokkal lassabb.



4. ábra
A Mycobacterium tuberculosis sejtfalának a felépítése [64].
(Kalscheuer és mtsai, 2019 ábrája alapján készült)

Egy másik jellemző intrinzik mechanizmus az efflux pumpák aktivitásának megnövelése, melynek következtében a már sejtbe került antibiotikum nagyobb mértékben kerül

eltávolításra a sejtből [37]. A *Mycobacterium* fajok képesek különféle kémiai módosításokra is. Ilyen kémiai módosítás eredményeként alakult ki többek között az aminoglikozidok elleni tolerancia acetiláció következtében. Emellett, jellemző folyamat lehet a már sejtbe került antibiotikumok lebontása különféle enzimek segítségével. Erre egy mikobaktériumra jellemző példa a béta-laktamáz enzim működése, amely általánosságban nem annyira hatékony, de a sejtfal alacsony fluiditásának köszönhetően a kevés bejutott béta-laktám antibiotikumot képes lebontani. Továbbá, toleranciát alakít ki a metabolikus folyamatok lassítása, mivel az antibiotikumok elsősorban a metabolikusan aktív baktériumokat támadják. Végül, de nem utolsósorban, antibiotikum stressz hatására a *Mycobacterium* képes a metabolikus folyamatok útvonalait is megváltoztatni annak érdekében, hogy az antibiotikum által támadott specifikus útvonalak ellenére is fent tudjon maradni a homeosztázis a sejten belül [19].

2.3.2.2. A szerzett rezisztencia jellemzői

A mikobaktériumok esetén a szerzett rezisztencia genetikai mutációknak köszönhető [19]. Ilyen mechanizmuson alapul az RNS-polimerizációt gátló rifampicin (RIF) ellen megjelenő mikobakteriális tolerancia. Mivel a rifampicin működése során az RNS-polimeráz β-alegységéhez kötődve fejti ki hatását, így a legtöbb esetben az ezt kódoló *rpoB* génben történő mutáció miatt alakul ki tolerancia [65]. A mutációnak köszönhetően a rifampicin csupán kisebb affinitással tud kötődni a célpontjához, így hatását nem tudja kifejteni. A RIF jelenléte által okozott stresszre a mikobaktérium válaszai közé tartozik az *rpoB* gén kódjának a félreolvasása, amelynek köszönhetően a transzláció eredménye egy mutációt tartalmazó fehérje termék lesz [66], amelyhez nem tud kötődni az antibiotikum.

Egy másik széleskörűen alkalmazott antituberkulotikum, az izoniazid (INH) ellen is kialakulhat genetikai mutációkon alapuló rezisztencia. Az izoniazid egy olyan előanyag, amely a sejten belül a KatG enzim segítségével izonikotinoillá alakul, amely pedig a NAD-hoz kötődik [19]. Az így létrejött izonikotinoil-NAD komplex gátolja a mikolsav szintézisben kulcsszerepet betöltő InhA enzimet, így gátolva a mikobaktérium sejtfalszintézisét. Az INH rezisztencia egyik mechanizmusa során a *Mycobacterium tuberculosis* a NADH-dehidrogenázt kódoló gének expresszióját szabályozza alul, így kevesebb NAD keletkezik [67]. Emiatt az InhA enzimet gátló izonikotinoil-NAD komplexből is kevesebb jöhet csak létre, amelynek köszönhetően nem gátlódik a mikolsav szintézis. Ehhez a reverzibilis folyamathoz

hasonlóan azonban létrejöhet egy fix mutáció is a NADH-dehidrogenázt kódoló *ndh* génben [68], amely viszont irreverzibilis rezisztenciát alakít ki az INH ellen [69].

2.3.3. A ciprofloxacin rezisztencia

A tuberkulózis kezelése során alkalmazott második vonalbeli szerek között igen elterjedten használják az én kísérleteim során alkalmazott ciprofloxacint (CIP) is [19], amely a fluorokinolon antibiotikum családhoz tartozik [2]. A fluorokinolonok hatásukat a DNS szintézis akadályozásával fejtik ki, ezen belül is két enzim, a DNS giráz és DNS topoizomeráz IV gátlásán keresztül, ezzel akadályozva a DNS-replikációt [70].

A fluorokinolonok elleni rezisztencia a mikobaktériumok esetén viszonylag ritka, azonban a multidrog-rezisztens baktériumok sokszor válnak toleránssá a fluorokinolonok, így a CIP ellen is. Az *in vitro Mycobacterium tuberculosis* és *Mycobacterium smegmatis* esetén kialakult nagymértékű fluorokinolon tolerancia annak köszönhető, hogy a DNS-giráz A alegységét kódoló gyrA fehérjében történt aminosav szubsztitúció eredményeképpen a fluorokinolon nem képes kötődni az enzimhez [71]. Ennek következtében az antibiotikum nem tudja megakadályozni az enzim működését, így a DNS-szintézis akadálytalanul végbe megy. Továbbá, az *mfpA* gén által kódolt fehérje esetében is kialakulhat alacsony mértékű rezisztencia, amely annak köszönhető, hogy a DNS-girázhoz kötődő fehérje miatt a fluorokinolon nem tud hozzákapcsolódni a DNS-girázhoz, így kialakítva egyfajta rezisztenciát az antituberkulotikum ellen [70].

2.3.4. A mikobakteriális dUTPázok és a genomi integritás

A mutációk kialakulásának valószínűsége fordítottan arányos a DNS hibajavító rendszer hatékonyságával, tehát minél jobban működik a hibajavítás a sejtben, annál kevesebb mutáció jelenik meg. Ezért a rezisztencia kialakulásának a tanulmányozásában egyik fontos kulcspont lehet a DNS hibajavító rendszer vizsgálata.

A kutatócsoportunk nagy érdeklődést mutat a dUTPáz (dezoxiuridin-trifoszfát pirofoszfatáz) enzim működésének, és genomi integritásban betöltött szerepének vizsgálata iránt különböző élőlények esetében. A dUTPáz elsődleges feladata a sejtben a dUTP (dezoxiuridin-trifoszfát) dUMP-vé (dezoxiuridin-monofoszfát) és inorganikus pirofoszfáttá történő hidrolízise [72]. A dUTPáz szerepe az, hogy ezáltal megakadályozza az uracil káros DNS-be történő beépülését.

A mikobakteriális dUTPáz tartalmaz egy C-terminális hurok régiót. Ennek hiányában életképtelen az organizmus, azonban ennek jelenléte nem befolyásolja a hidroláz funkciót [73]. Annak megértésére, hogy ennek a régiónak mi a pontos funkciója az organizmus működésében már több kutatás is irányult. A mikobakteriális dUTPáz genomi integritásban betöltött szerepéhez kapcsoló kutatásokból kiderült, hogy igen fontos szerepe van a genomi uracil szint csökkentésében, emellett funkcionálisan aktív dUTPáz hiányában a becsült mutációs ráta is emelkedett [74].

Kutatócsoportunkban a korábbi munkákhoz kapcsolódóan sikeresen állítottak elő funkcionálisan aktív dUTPázt nem termelő mutáns törzset (dut-), illetve olyan törzset, mely a vad típusú dUTPáz mellett egy hurokrégiót nem tartalmzó dUTPázt is termel (Δ-loop). Utóbbi esetben igazolták a mutáns enzim termelődését a vad típusú enzim mellett.

A kutatások folytatásaként élesztő két-hibrid esszé segítségével próbáltak dUTPáz kölcsönható partnert keresni. Az élesztő két-hibrid esszé fehérje-fehérje kölcsönhatások kimutatására alkalmas módszer [75]. Lényege, hogy egy genomi könyvtárat élesztősejtekbe transzformálnak. Minden élesztősejtbe a könyvtár más-más tagja kerül. A sejtekben a letermelt fehérjekészlet „csali”-fehérjével való kölcsönhatásától teszik függővé egy „reporter” gén termelődését. Ezt követően az egysejttelepekből történő szekvenálással azonosítják be a kölcsönható fehérjét kódoló régiót. Az elvégzett kísérlet során jelentős kölcsönhatást mutattak ki a dUTPáz és az AdnA fehérjék között. Az AdnA a DNS-kettősszáltörések homológ rekombinációval történő javításának egy kulcsenzime mikobaktériumokban [76]. Felmerült tehát, hogy a dUTPáz kanonikus hidrolizáló funkcióján túl direkt módon hozzájárul a kettősszáltörések javításához is.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Szakdolgozati munkám során a Természettudományi Kutatóközpont Enzimológiai Intézet Genom Metabolizmus Kutatócsoport munkájába kapcsolódtam be. A kutatócsoportban korábban elvégzett kísérletek alapján van okunk azt feltételezni, hogy a mikobakteriális dUTPáz különleges szerepet tölt be a mikobakteriális genom integritásának megőrzésében azáltal, hogy a dUTPáz kanonikus hidrolizáló funkcióján túl direkt módon hozzájárul a kettősszáltörések javításához is. Mivel a kettősszáltörések javításában betöltött szerepre fókuszáltunk, kísérleteink során a kettősszáltöréseket előidéző ciprofloxacint használtuk. Diplomamunkám során ezt a kapcsolatot vizsgáltam egy fluktuációs esszé segítségével. A vizsgálatához vad típusú, illetve dUTP-áz mutáns *Mycobacterium smegmatis* törzseket használtam. Kísérletes munkám céljai az alábbiak voltak:

- Kísérletesen vizsgálni a rezisztencia kialakulásának mértékét genotoxikus környezetben növekedő mikobaktérium sejteken. A genotoxikus környezetet szubletális mennyiségű ciprofloxacin jelenléte biztosította.
- A vizsgálatot két különböző dUTPáz mutáns törzsben elvégezni, hogy ebből következtethessek az enzim genomi integritásra gyakorolt szerepére.
- A kutatáshoz kapcsolódóan fontos célom volt továbbá egy módszertani anyag kidolgozása is középiskolás diákok számára.

Tanításom során fontosnak tartom a gyakorlatorientált, életközpontú oktatást és azt, hogy a tanulási folyamat során a gyerekek minél több életközeli tudást szerezzenek, amelyet a későbbiekben is alkalmazni tudnak. Ennek függvényében kiemelt fontosságúnak tartom, hogy a biológiaórákon a diákok saját élményeiken keresztül, gyakorlati órákon próbálják ki az egyes kísérleteket. Emiatt az antibiotikumok és antibiotikum rezisztencia témaköréhez kapcsolódóan egy szakkör tervezetet készítettem el, amely számos olyan gyakorlati óra kísérletét, menetét írja le, amelyek kapcsolódnak a kutatásban végzett kísérleteimhez.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kísérletek során használt baktérium a *Mycobacterium smegmatis* volt, amely a *Mycobacterium tuberculosis*-hoz képest egy gyorsan növő, nem patogén baktérium, így kiválóan használható a laboratóriumi kísérletek során [77]. A vizsgálatok során a vad típusú törzset és két mutáns törzset vizsgáltam, amelyek esetében tehát azt figyeltem meg, hogy a vad típusú törzsekhez képest a mutáns törzsek milyen valószínűséggel és milyen mértékben tolerálják a használt antibiotikumot, a ciprofloxacint.

4.1. A kísérlet során használt baktérium törzsek és tápoldatok

A kísérleteimhez háromféle törzset vizsgáltam, a vad típusú *Mycobacterium smegmatis*-t, illetve két mutáns törzset, amelyek esetében a mikobakteriális dUTP-áz mutációja történt meg.

A baktériumok növesztése Lemco broth tápoldatban és Lemco agar táptalajokon történt. A táptalajok elkészítéséhez a következő recepteket használtam:

	Lemco broth	**Lemco agar**
Lemco por	2,5 g	2,5 g
Nátrium-klorid (NaCl)	2,5 g	2,5 g
Bacto Pepton	5,0 g	5,0 g
Bacto Agar	-	7,5 g
10%-os Tween-80	2,5 ml	-
Desztillált víz	500 ml	400 ml

2. táblázat
A táptalajok elkészítéséhez használt összetevők.

Az összetevők bemérése után a tápoldatok és a kísérlet során használt összes eszköz sterilizálva volt nedves vagy száraz autokláv segítségével; a sterilizálás mindkét esetben 130 °C-on történt, száraz autoklávban 4 óráig, nedves autoklávban 30 percig. A Lemco broth tápoldatot a baktériumok növesztéséhez használtam, a baktériumok táptalajon való növesztéséhez és a későbbi sejtszámoláshoz pedig a Lemco agar táptalajt használtam.

4.2. A kísérlet során használt antibiotikum

A kísérlet során a használt ciprofloxacint (Sigma-Aldrich) 1 µg/ml koncentrációban használtam, amihez a port 9,7%-os sósavban oldottam be, majd a kész oldatot maximum két hétig 4 °C-on tároltam.

4.3. A kísérlet menete

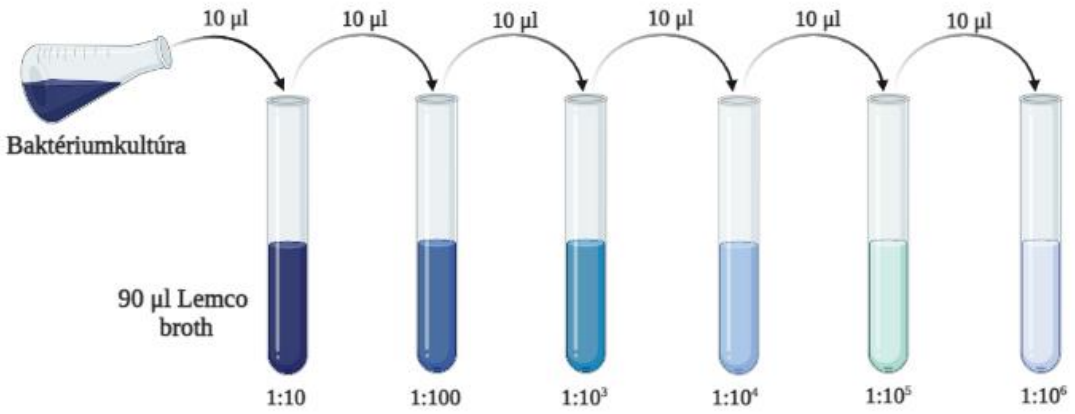
Méréseim során egy módosított fluktuációs esszé segítségével becsültem a mutációs rátát. Ez a módszer kevésbé pontos, mint a teljes genom szekvenálás, azonban jóval költség- és időhatékonyabb.

A kísérlet (6. ábra) az előkultúrák növesztésével kezdődött, amely során három párhuzamos törzset növesztettem egy éjszakán keresztül Lemco broth tápoldatban 37 °C-on, 160 RPM-en rázó inkubátorban. A baktériumok növesztése után megmértem mindhárom törzs optikai denzitását (OD_{600}), amely a tápoldatban lévő baktériumok koncentrációjával arányos, így megmutatja, hogy mekkora mennyiségű baktérium növekedett egy éjszaka alatt. Az általam mért OD-k a kísérleteim során 0,25-0,4 között voltak. Ezt követően az előkultúrákat centrifugacsőbe öntöttem, majd 4 °C-on, 2000 RPM-en 30 percig centrifugáltam.

A centrifugálás végeztével a centrifugacsövekből óvatosan leöntöttem a felülúszót. A csövekben maradt sejteket ezután 1 ml Lemco broth tápoldatban szuszpendáltam. A szuszpendálás fázisa után következett a baktériumok szélesztése a már korábban elkészített táptalajokon; egy agarlemez 12 ml Lemco agar táptalajt tartalmazott. A szélesztéshez szélesztőbotot használtam, melyet a szélesztések között leégetéssel csírátlanítottam – alkoholba mártás után meggyújtottam –, majd steril vízben lehűtöttem, és azt követően egyenletesen szétkentem a táptalajra helyezett 100 µl mennyiségű baktériumkultúrát. A szélesztés során minden korábban felnövesztett kultúrát két táptalajon szélesztettem, amelyek közül az egyik normál agar táptalaj volt, azonban a másik tartalmazott 0,3 µg/ml ciprofloxacint is. Ennek megfelelően tehát voltak baktériumok, amelyek normál táptalajon, és voltak, amelyek pedig szubletális, antibiotikumot tartalmazó táptalajon növekedtek. A lemezeket ezt követően 37 °C-on inkubáltam. Az inkubálási idők 4, 24, 48, 72 óra hosszúak voltak.

Az inkubálási idők letelte után a teleplemosás szakasza következett, mely során 3 ml Lemco tápoldat segítségével lemostam a sejteket, és fél óráig billegtettem a lemezeket annak érdekében, hogy minél inkább sikeres legyen a sejtek lemosása. Ezt a műveletet egyszer megismételtem, így tehát a telepek lemosása után volt hat baktériumkultúrám, amelynek mennyisége körülbelül 4,5-5,5 ml volt.

A kísérletem következő lépése a sejtszámlálás volt CFU (colony-forming unit) segítségével. Ehhez első lépésként hattagú hígítási sorokat készítettem a korábban lemosott baktériumkultúrákból (5. ábra). Először kimértem 90 µl Lemco tápoldatot, majd ehhez hozzáadtam 10 µl-t a baktériumkultúrából, és szuszpendáltam. Ezt követően ebből a szuszpenzióból vettem ki 10 µl-t, amelyet ismét 90 µl tápoldatba helyeztem, és így tovább. A hígítási sor elkészülte után a szuszpenziókat tartalmazó Eppendorf-csövek tartalmát vortex segítségével összekevertem.



5. ábra
A hígítási sor készítésének a folyamata.

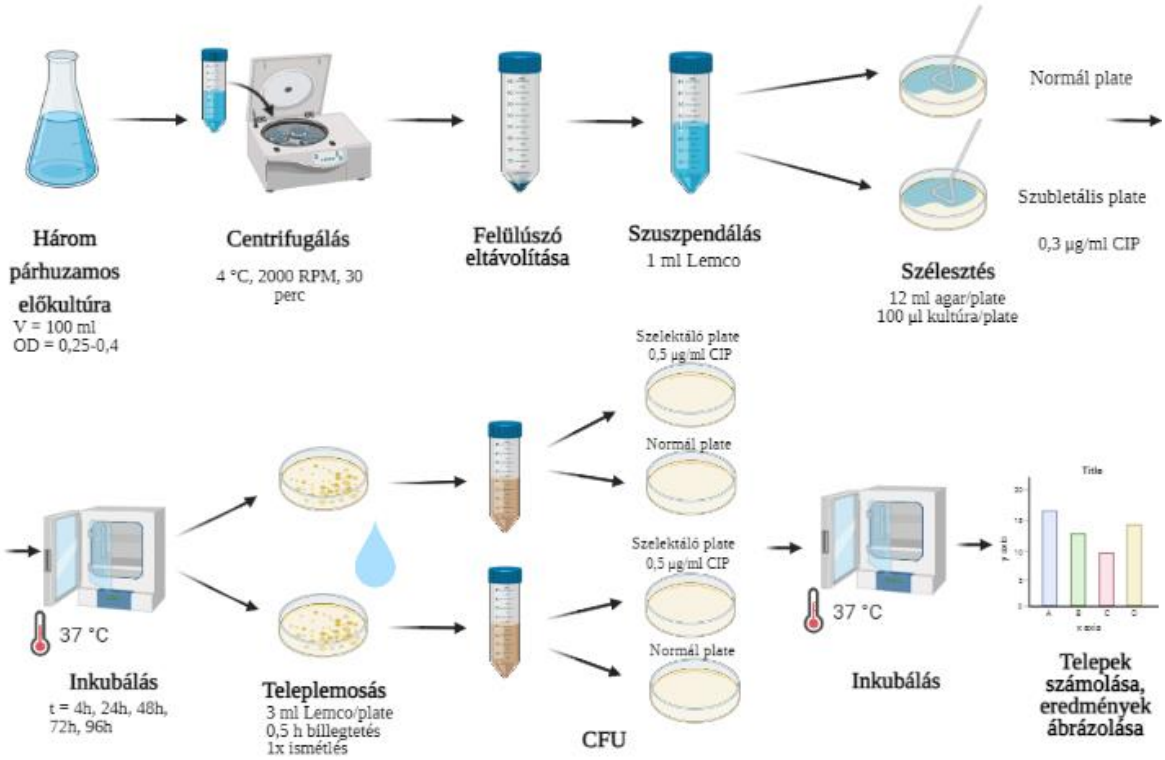
Az ezt követő szakaszban következett maga a CFU lemezek elkészítésének fázisa, amelyhez kísérletenként hat táptalajt tartalmazó lemezre volt szükségem. Három lemez sima táptalajt tartalmazott, háromba pedig olyan táptalajt öntöttem, amely tartalmazott 0,5 µg/ml ciprofloxacint is, így ezeket szelektáló táptalajnak nevezzük.

A sejtszámolás (CFU) során három technikai párhuzamost készítettem. Az adott hígításnak megfelelően minden baktériumkultúrából felvittem három-három 10 µl

mennyiségű cseppet a sima és antibiotikumot tartalmazó táptalajra is. Ezt megismételtem az összes hígítással az összes baktériumkultúra esetében.

Az elkészített CFU lemezeket a száradás után 37 °C-on inkubáltam három napig, majd megszámoltam a kinőtt baktériumtelepeket, végül pedig oszlopdiagramon ábrázoltam az eredményeket az Origin program segítségével.

Minden mérést három biológiai párhuzamossal és három technikai párhuzamossal végeztem el.



6. ábra
A kísérlet menete.

4.4. Az eredmények kiértékelésénél használt statisztikai próbák

Az eredményeknél bemutatott állításokat Student-féle kétmintás t-próbával teszteltem. A bemutatott p-értékek a kétszélű eloszlásra vonatkoznak. A próbák előtt minden esetben teszteltem F-próbával, hogy a vizsgált valószínűségi változók varianciája megegyezik-e. Amennyiben az F-próba alapján elfogadtam a varianciák egyenlőségére vonatkozó nullhipotézist, homoscedasztikus kétmintás t-próbát végeztem, ellenkező esetben Welch-féle (heteroscedasztikus) t-próbát. A próbák során a CFU lognormális eloszlása

alapján feltételeztem, hogy a generációs idők normális eloszlású valószínűségi változók, a tolerancia ráták pedig lognormális eloszlású valószínűségi változók. Emiatt a tolerancia ráták esetén a próbastatisztikák során a $\log(t_r)$ értékekkel számoltam.

5. EREDMÉNYEK

A laborban elvégzett munkám során három mikobaktérium törzset vizsgáltam. Elsőként a vad típusú, majd két mutáns törzzsel – Δ-loop és dut(-) – végeztem el a kísérleteket. A vizsgálatok végén az inkubálási idő letelte után minden lemezen megszámoltam a kinőtt baktériumtelepeket, majd ezekből az adatokból kiszámoltam az egyes törzsekre vonatkozó generációs időt, valamint tolerancia rátát. Az így kapott eredményeket az Origin program segítségével ábrázoltam és értékeltem ki. Végül az egyes törzsek generációs idejét és tolerancia rátáját összehasonlítva megállapítottam, hogy van-e közöttük szignifikáns különbség, illetve állításaimat t-próbával támasztottam alá.

5.1. A vizsgált tényezők

5.1.1. Generációs idő

A baktériumok nagy része bináris hasadással szaporodik, amely következtében az egyetlen baktérium sejtből két organizmus alakul ki [9]. Ez a szaporodás típus egy viszonylag egyszerű folyamat, amely során a kromoszóma replikációja után a sejt megnyúlik, a sejtmembrán betűrődik szeptumot létrehozva, majd ez a szeptum kettéhasad, melynek köszönhetően kialakul két önálló életre képes baktérium sejt. Tehát a bakteriális szaporodás során a sejtek száma mindig megduplázódik bizonyos időközönként. A baktérium sejt kettéosztódásához szükséges időt hívjuk generációs időnek. Ez az adat tehát arra vonatkozik, hogy egy baktérium sejt mennyi idő alatt osztódik ketté, így létrehozva a két utódsejtet. (Ezt követően már ez a két sejt fog osztódni négy utódsejtet létrehozva, és így tovább.)

A generációs idő kiszámításához a következő egyenletet használtam:

$$t\ gen_{t_1-t_0} = \frac{t_1 - t_4}{log_2\left(\frac{CFU_{total;\ t_4}}{CFU_{total;\ t_1}}\right)}\ [h/gen]$$

Az egyenlet szerint tehát a t_0 és t_1 időpontok közt jellemző generációs időket megkapom, ha t_0 és t_1 közt eltelt inkubálási időt elosztjuk a t_4 időpontban készített CFU és a t_1 időpontban készített CFU hányadosának kettes alapú logaritmusával. Az én esetemben a t_0 időpont 4 óra volt a szélesztéshez képest. Ennek az egyenletnek a használatával a vad és mutáns törzsekre

vonatkozóan is kiszámítottam a generációs időket, melynek bemutatására a későbbiekben térek ki majd.

5.1.2. Tolerancia ráta

A másik fontos vizsgált tényező a tolerancia ráta. Mivel nem genotípus, hanem fenotípus alapján különböztetjük meg az antibiotikumnak ellenálló sejteket, a rezisztencia szó helyett a továbbiakban a tolerancia szót használjuk. Ez azt jelzi, hogy izogenikus sejtek is adhatnak eltérő fenotipikus választ egy adott antibiotikumra (lásd 2.3.2 fejezet). A tolerancia ráta tehát egy becslés a mutációs rátára, és annak a valószínűségét mutatja meg, hogy az egyes inkubálási idők elteltével a baktérium sejtek milyen mértékben lesznek toleránsak az antibiotikumra nézve, tehát mekkora a toleráns sejtek aránya az összes sejthez viszonyítva. Jelen esetben tehát arról ad információt, hogy az egyes *Mycobacterium smegmatis* törzsek toleranciája a ciprofloxacinra nézve hogyan változik az inkubálási idők függvényében.

A tolerancia ráta kiszámításához a következő egyenletet használtam:

$$tr_{x\,h} = \frac{\dfrac{CFU_{rez.}^{t_1} - CFU_{rez.}^{t_0}}{CFU_{totál}^{t_1} - CFU_{totál}^{t_0}}}{t\,gen_{t_1 - t_0}} \left[\frac{1}{h/gen}\right]$$

Az egyenlet szerint tehát az adott inkubálási idő eltelte után jellemző tolerancia rátát úgy kapom meg, ha az adott inkubálási idő eltelte utáni rezisztens CFU adatból kivonom a referencia inkubálási időre jellemző rezisztens CFU adatot, majd ezt elosztom az adott inkubálási idő eltelte utáni összes CFU adatunk és a referencia inkubálási időre jellemző összes CFU különbségével. Végül ezt a hányadost elosztva az adott inkubálási időre jellemző generációs idővel megkapom az adott baktérium törzs tolerancia rátáját. A generációs időkhöz hasonlóan minden törzs esetében kiszámoltam a tolerancia rátákat is, amelyeket a következő fejezetben fejtek ki.

5.2. Az eredmények bemutatása

5.2.1. A vad típusú *Mycobacterium smegmatis* generációs ideje és tolerancia rátája

A vad típusú *Mycobacterium smegmatis* törzs esetén három egymással párhuzamos mintával végeztem vizsgálatokat (A, B, C biológiai párhuzamosok). A 68 óráig növesztett törzsek esetén a C minta nem volt értékelhető (egyéb, morfológia alapján nem mikobaktérium telepek is kinőttek a CFU mérése során), így ezt az adatok értékelésénél nem használtam. Mindegyik törzs esetében volt olyan, amely kontrollként szolgált, tehát antibiotikumot nem tartalmazó táptalajon növekedett, illetve volt olyan, amelyik ciprofloxacint tartalmazó táptalajon növekedett bizonyos inkubálási időn keresztül.

	Generációs idő (h)			Tolerancia ráta		
t (h)	**A**	**B**	**C**	**A**	**B**	**C**
20	2,8	3,3	2,5	2,1E-06	6,4E-08	6,7E-07
44	6,0	5,2	6,7	1,3E-06	1,2E-07	7,2E-07
68	7,0	7,7	na	5,3E-07	3,3E-07	na
20	-3,0	-4,3	-4,4	7,1E-05	1,6E-05	4,8E-05
44	-12,9	-23,2	-21,4	8,1E-04	1,1E-04	1,0E-03
68	-54,2	-28,3	na	1,1E-02	5,4E-03	na

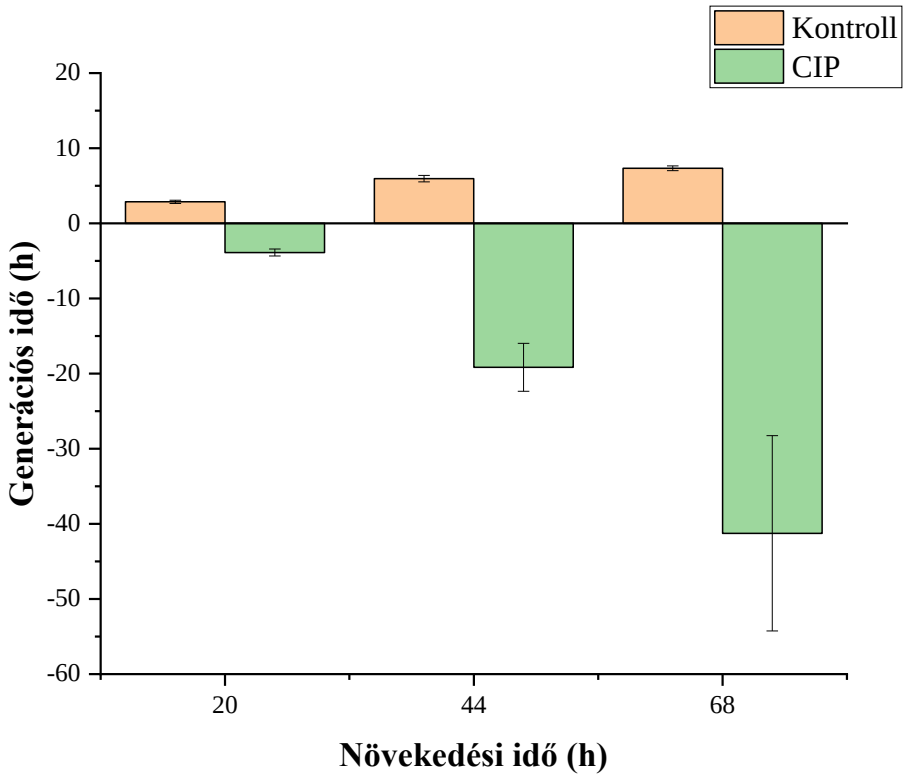
3. táblázat
A táblázat a három párhuzamos vad típusú Mycobacterium smegmatis törzs (A, B, C) generációs idejét és tolerancia rátáját mutatja az inkubálási idők függvényében. (A kontroll minta narancssárga színnel van jelölve, míg a szubletális koncentrációjú ciprofloxacint tartalmazó táptalajon inkubált minta zöld színnel jelölve látható.)

	Generációs idő (h)		Tolerancia ráta	
t (h)	**t gen$_{átlag}$**	**SEM**	**t r$_{átlag}$**	**SEM**
20	2,9	0,21	9,5E-07	6,13E-07
44	6,0	0,42	7,2E-07	3,47E-07
68	7,3	0,32	4,3E-07	1,01E-07
20	-3,9	0,47	4,5E-05	1,57E-05
44	-19,2	3,19	6,5E-04	2,78E-04
68	-41,3	13,00	8,4E-03	3,01E-03

4. táblázat
A táblázat a vad típusú Mycobacterium smegmatis minták átlagolt generációs idejét és tolerancia rátáját, illetve az átlagok standard hibáját (SEM) mutatja az inkubálási idők függvényében. (A kontroll minta narancssárga színnel van jelölve, míg a szubletális koncentrációjú ciprofloxacint tartalmazó táptalajon inkubált minta zöld színnel jelölve látható.)

A generációs idők esetében a táblázatban szereplő adatok (3. táblázat és 4. táblázat) alapján jól látható, hogy a normál táptalajon növekedett törzsek generációs ideje minden

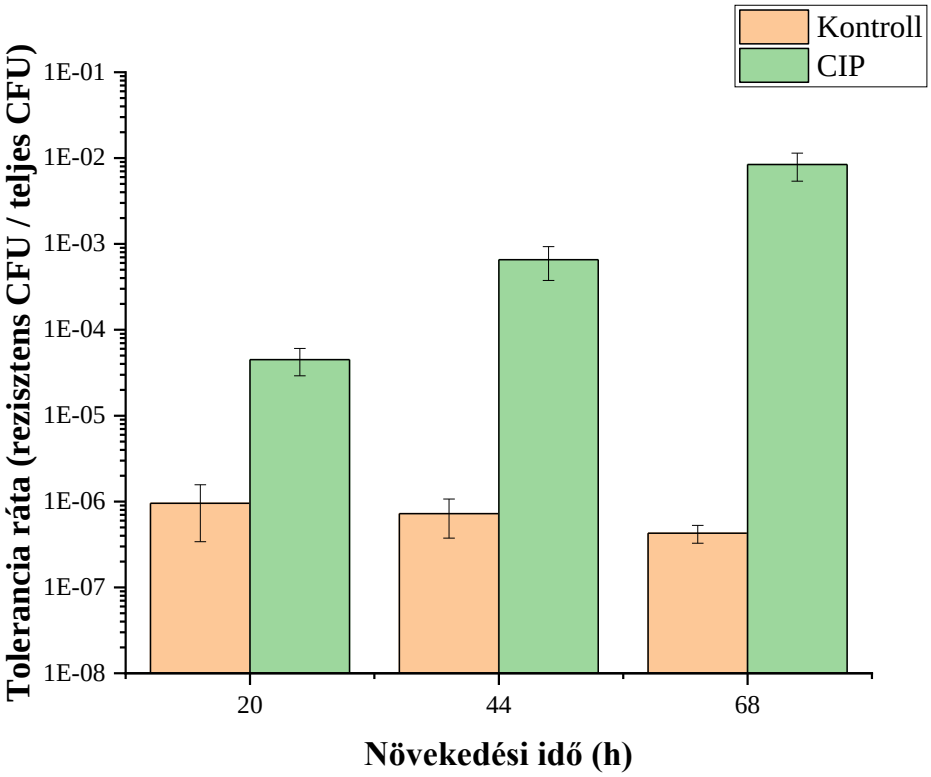
esetben pozitív, tehát a sejtek aktívan osztódtak. Az új sejtek létrehozásának ideje azonban az egyes inkubálási idők függvényében változó, minél hosszabb volt az inkubálási idő, annál hosszabb volt a törzsek generációs ideje (7. ábra). Ennek az az oka, hogy minél hosszabb ideg vannak a sejtek a táptalajon, annál lassabban osztódnak, mivel a telep környékén csökken a rendelkezésre álló tápanyagok mennyisége, azonban megnő a metabolitok mennyisége. A ciprofloxacint tartalmazó táptalajon növekedett baktériumok esetében a generációs idők mindig negatívak, amelyből arra következtetek, hogy nem történt növekedés, illetve több sejt pusztult el, mint amennyi az osztódások során keletkezett. Ez az érték az inkubálási idő növelésével itt is negatív irányban növekedik, tehát minél hosszabb volt az inkubálási idő, annál több sejt pusztult el az antibiotikumot tartalmazó táptalajon növekedve.



7. ábra
A vad típusú Mycobacterium smegmatis generációs idejei a növekedési idők függvényében.

A tolerancia ráták vizsgálata esetében általánosságban elmondható, hogy minél kevesebb baktérium sejt vált toleránssá a ciprofloxacinra nézve, annál alacsonyabb ez az érték. Az általam felvett adatokat (3. táblázat és 4. táblázat) megvizsgálva az látható, hogy a normál táptalajon növekedett baktériumok esetében a tolerancia ráták minden inkubálási időnél alacsonyabbak, mint az antibiotikumot tartalmazó lemezek esetében (Student-féle

kétmintás kétvégű t-próbára adódó p<0,02 minden inkubálási időnél a kezelt és nem kezelt mintákat összehasonlítva). A ciprofloxacint tartalmazó lemezeknél az figyelhető meg, hogy az inkubálási idő növekedésével arányaiban több baktérium sejt válik toleránssá az antibiotikummal szemben, tehát több sejt marad életben szelektáló mennyiségű ciprofloxacin jelenlétében is (8. ábra). Ez azt jelenti, hogy minél tovább növekedik a sejt szubletális mennyiségű ciprofloxacin jelenlétében, annál nagyobb eséllyel válik toleránssá a szelektáló ciprofloxacinnal szemben.



8. ábra
A vad típusú Mycobacterium smegmatis tolerancia rátái a növekedési idők függvényében.

5.2.2. A Δ-loop mutáns *Mycobacterium smegmatis* generációs ideje és tolerancia rátája

A Δ-loop mutáns mikobaktérium esetében is a vad típushoz hasonlóan három törzset vizsgáltam (A, B, C biológiai párhuzamosok). A C törzs mintái a 68 órás inkubálási idő esetében nem voltak értékelhetőek, így ezeket az adatok értékelésénél nem használtam A kísérletek során a baktériumokat szintén többféle táptalajon növesztettem, a korábban említettekkel egyezően, minden törzs növekedett normál, kontroll táptalajon, illetve antibiotikumot tartalmazó táptalajon is.

	Generációs idő (h)			Tolerancia ráta		
t (h)	**A**	**B**	**C**	**A**	**B**	**C**
20	2,5	2,0	2,5	3,2E-07	2,0E-06	4,7E-07
44	4,4	4,0	4,3	2,9E-07	5,6E-07	5,2E-07
68	4,8	5,0	na	1,8E-08	4,2E-07	na
20	-15,2	8,4	30,9	1,8E-05	1,3E-05	3,2E-05
44	7,4	10,4	-23,1	2,5E-05	1,5E-04	1,8E-03
68	18,0	5,4	na	8,0E-03	9,1E-05	na

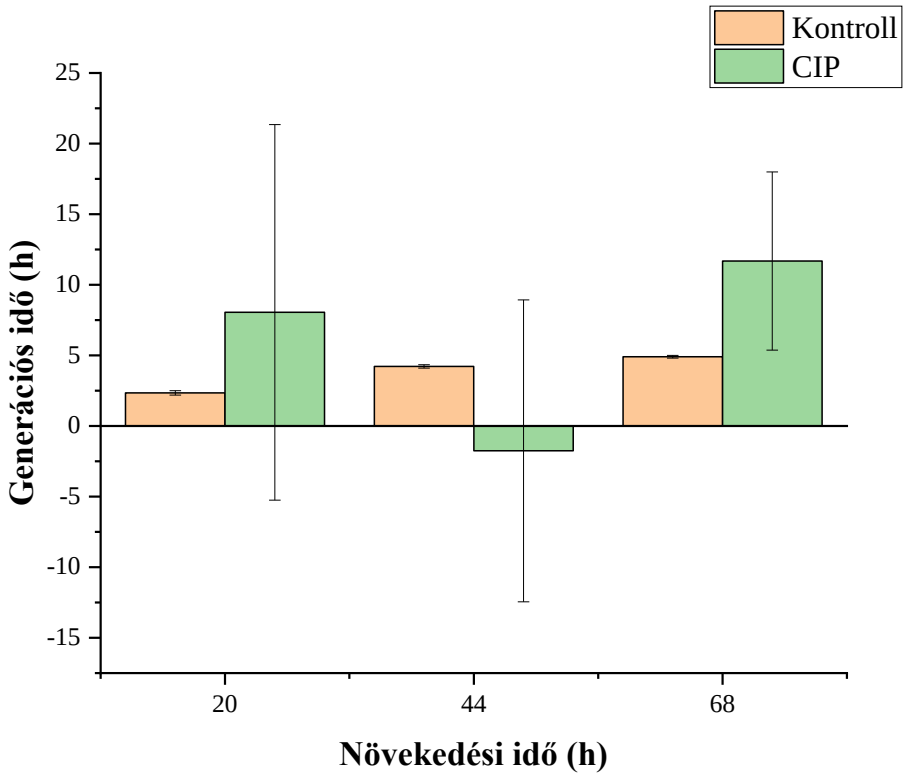
5. táblázat
A táblázat a három párhuzamos Δ-loop mutáns Mycobacterium smegmatis törzs (A, B, C) generációs idejét és tolerancia rátáját mutatja az inkubálási idők függvényében. (A kontroll minta narancssárga színnel van jelölve, míg a szubletális koncentrációjú ciprofloxacint tartalmazó táptalajon inkubált minta zöld színnel jelölve látható.)

	Generációs idő (h)		Tolerancia ráta	
t (h)	**t gen$_{átlag}$**	**SEM**	**t r$_{átlag}$**	**SEM**
20	2,3	0,15	9,4E-07	5,53E-07
44	4,2	0,12	4,6E-07	8,44E-08
68	4,9	0,09	2,2E-07	1,99E-07
20	8,0	13,30	2,1E-05	5,43E-06
44	-1,8	10,69	6,7E-04	5,77E-04
68	11,7	6,31	4,0E-03	3,95E-03

6. táblázat
A táblázat a Δ-loop mutáns Mycobacterium smegmatis minták átlagolt generációs idejét és tolerancia rátáját, illetve az átlagok standard hibáját (SEM) mutatja az inkubálási idők függvényében. (A kontroll minta narancssárga színnel van jelölve, míg a szubletális koncentrációjú ciprofloxacint tartalmazó táptalajon inkubált minta zöld színnel jelölve látható.)

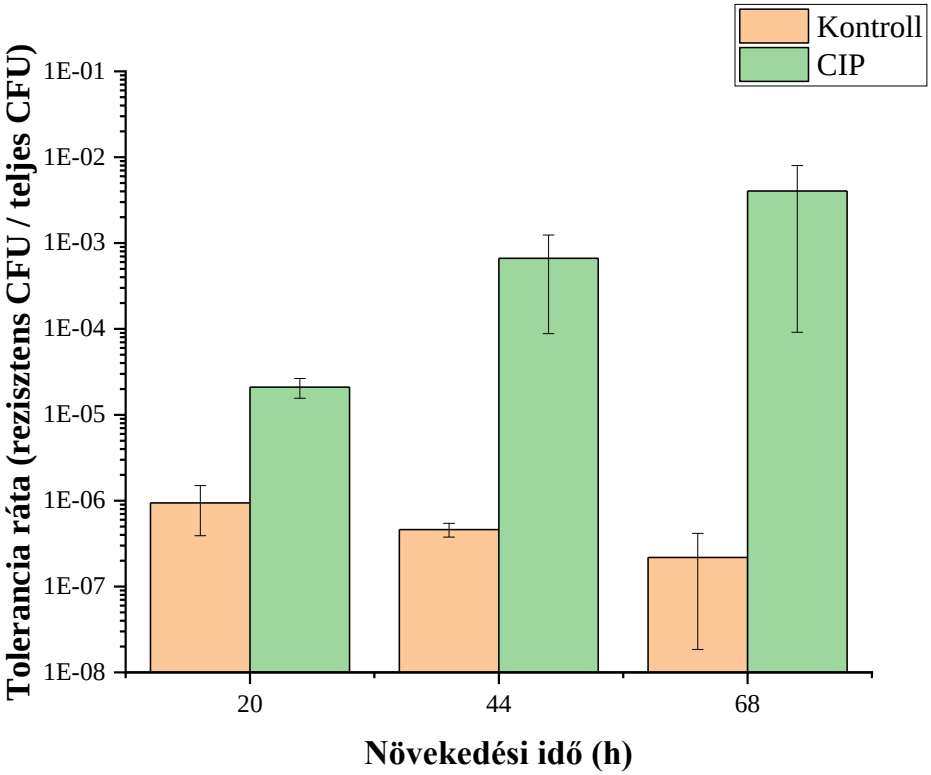
A generációs idők esetében a normál táptalajon növekedett baktériumnál itt is megfigyelhető egy, a vad típushoz hasonló tendencia, miszerint a generációs idő minden esetben pozitív (5. táblázat és 6. táblázat). Emellett az is szintén jellemző, hogy az inkubálási idő növekedésével ezek az értékek fokozatosan növekednek, tehát az új sejtek létrehozásának ideje az inkubálási idő növekedésével emelkedik (9. ábra). A ciprofloxacint tartalmazó táptalajon növesztett Δ-loop mutáns mikobaktériumoknál a vad típushoz képest az az eltérés látható, hogy itt a generációs idő a legtöbb esetben pozitív, tehát a sejtek száma a növekedési időszakok többségében ténylegesen nőtt. A különbségeket megvizsgáltam a Student-féle kétmintás kétvégű t-próba segítségével. Az adott inkubálási időhöz tartozó generációs idők különbözőségére vonatkozó nullhipotézist teszteltem a vad típus és a Δ-loop törzsek között. A 68 órás kezelt mintákra számolt generációs idők statisztikailag szignifikánsan különböznek a vad típushoz képest ($p<0,07$). A vad típusú sejtek generációs ideje a 44 és 68 órás inkubálási időnél nem kezelt esetben is különbözik ($p<0,02$). Ebből az

a következtetés vonható le, hogy a Δ-loop mutáns sejtek antibiotikummentes, valamint ciprofloxacint tartalmazó táptalajon is jobban szaporodnak, mint a vad típusú sejtek.



9. ábra
A Δ-loop mutáns Mycobacterium smegmatis generációs idejei a növekedési idők függvényében.

A tolerancia rátákat megnézve (5. táblázat és 6. táblázat) látható, hogy a vad típusú törzshöz nagyon hasonló eredményeket kaptunk, a tolerancia ráták nagyságrendileg a legtöbb esetben megegyeznek. A Δ-loop mutáns törzseknél is megfigyelhető az a tendencia, miszerint a kontroll táptalajon növekedett baktérium sejtek tolerancia rátája alacsonyabb, míg az előzetesen ciprofloxacint tartalmazó táptalajon növekedett mikobaktériumok sokkal nagyobb hányada válik toleránssá az antibiotikummal szemben ($p<0,08$ minden inkubálási időnél a kezelt és nem kezelt mintákat összehasonlítva) (10. ábra). Nem kezelt esetben a Δ-loop mutáns *Mycobacterium smegmatis* esetében is az látható, hogy a kontroll mintáknál a tolerancia ráta kis mértékben csökken. Az antibiotikumot tartalmazó táptalajon történt növekedésnél viszont ennek megint csak az ellenkezője figyelhető meg, tehát a tolerancia ráta növekedik az inkubálási idővel együtt. Ebből arra következtetek, hogy az előzetesen ciprofloxacint tartalmazó táptalajon növekedett baktériumok később nagyobb mértékben képesek tolerálni az antibiotikum jelenlétét.



10. ábra
A Δ-loop mutáns Mycobacterium smegmatis tolerancia rátái a növekedési idők függvényében.

5.2.3. A dut(-) mutáns *Mycobacterium smegmatis* generációs ideje és tolerancia rátája

A dut(-) mutáns *Mycobacterium smegmatis* törzs esetén három egymással párhuzamos mintával végeztem vizsgálatokat (A, B, C biológiai párhuzamosok). A C törzs mintáinak vizsgálata során más baktérium fajokkal történő fertőződés volt tapasztalható, így ezt az adatok értékelésénél nem használtam egyik inkubálási idő esetén sem. A fertőződésre a CFU kiértékelése során a mikobaktériumokétól eltérő telepmorfológiájú telepek jelenléte alapján következtettem. A korábbi kísérletekkel megegyező módon mindhárom minta növekedett normál és antibiotikumot tartalmazó táptalajon is.

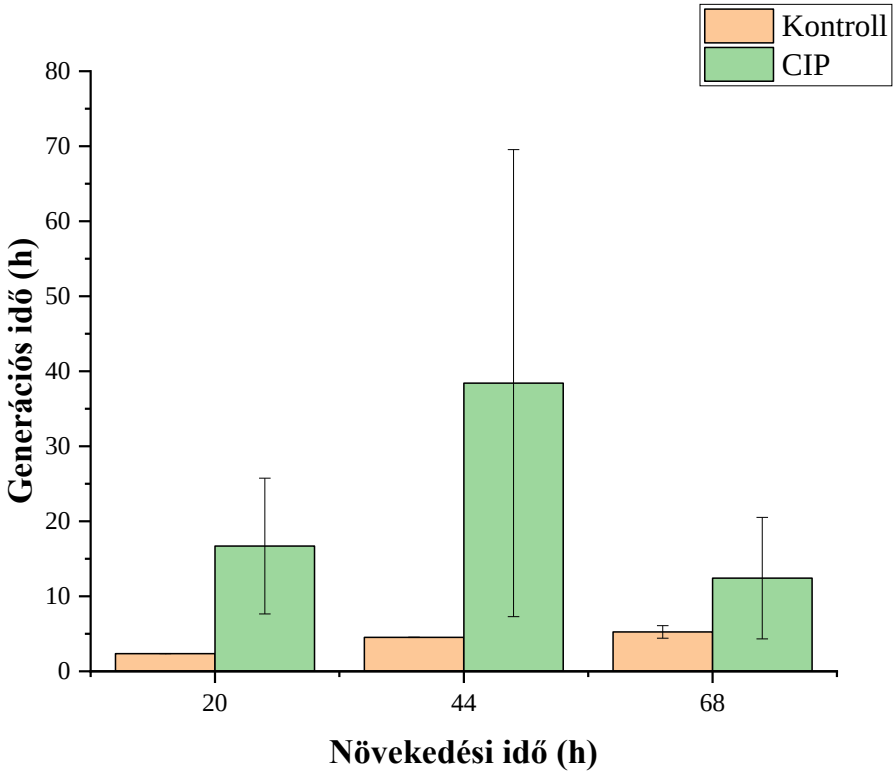
	Generációs idő (h)			Tolerancia ráta		
t (h)	**A**	**B**	**C**	**A**	**B**	**C**
20	2,4	2,4	na	8,7E-07	2,7E-06	na
44	4,5	4,5	na	3,0E-07	4,4E-07	na
68	6,1	4,4	na	3,0E-07	1,7E-08	na
20	7,7	25,8	na	9,6E-06	8,0E-05	na
44	7,3	69,5	na	2,4E-05	4,1E-04	na
68	20,5	4,3	na	3,5E-03	3,1E-06	na

7. táblázat
A táblázat a három párhuzamos dut(-) mutáns Mycobacterium smegmatis törzs (A, B, C) generációs idejét és tolerancia rátáját mutatja az inkubálási idők függvényében. A C minta nem volt értékelhető, mert a CFU-s lemezeken más baktériummal történt fertőződés volt tapasztalható. (A kontroll minta narancssárga színnel van jelölve, míg a szubletális koncentrációjú ciprofloxacint tartalmazó táptalajon inkubált minta zöld színnel jelölve látható.)

	Generációs idő (h)		Tolerancia ráta	
t (h)	**t gen$_{átlag}$**	**SEM**	**t r$_{átlag}$**	**SEM**
20	2,4	0,01	1,8E-06	9,34E-07
44	4,5	0,01	3,7E-07	7,05E-08
68	5,2	0,84	1,6E-07	1,40E-07
20	16,7	9,05	4,5E-05	3,54E-05
44	38,4	31,13	2,2E-04	1,94E-04
68	12,4	8,11	1,8E-03	1,77E-03

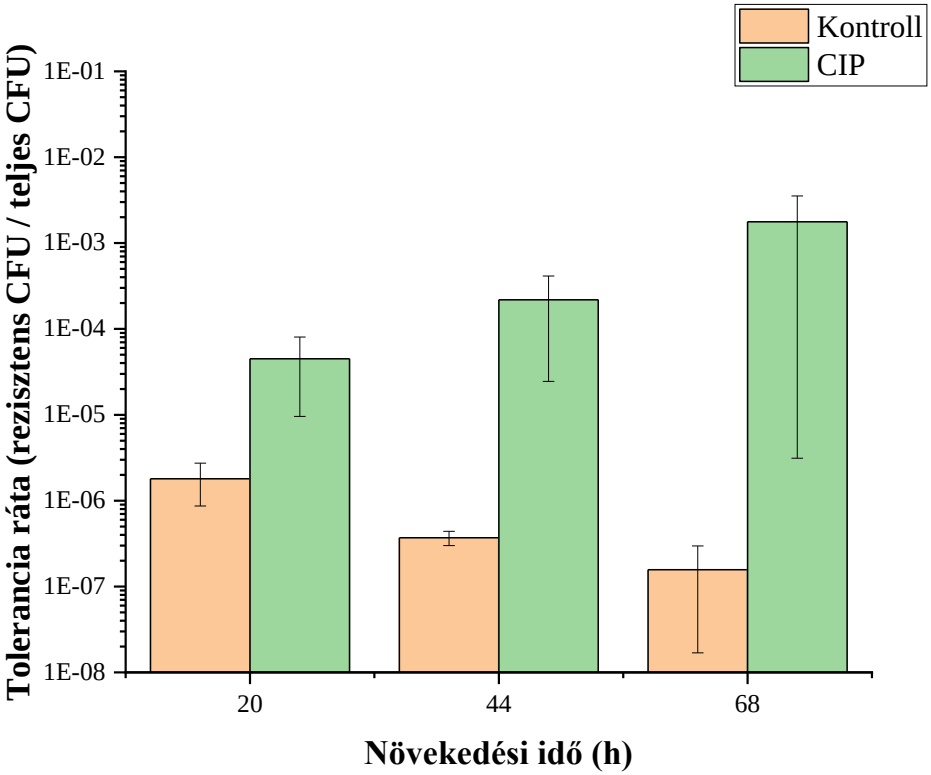
8. táblázat
A táblázat a dut(-) mutáns Mycobacterium smegmatis minták átlagolt generációs idejét és tolerancia rátáját, illetve az átlagok standard hibáját (SEM) mutatja az inkubálási idők függvényében. (A kontroll minta narancssárga színnel van jelölve, míg a szubletális koncentrációjú ciprofloxacint tartalmazó táptalajon inkubált minta zöld színnel jelölve látható.)

A dut(-) mutáns nem tartalmaz funkcionálisan aktív dUTPázt. Ezen törzs generációs idejét vizsgálva látható, hogy az összes érték pozitív, tehát minden esetben növekedett a sejtek száma, aktív osztódás történt (7. táblázat és 8. táblázat). A kontroll értékek esetén elmondható a korábbiakhoz hasonló összefüggés, amely szerint az inkubálási idő növekedésével az átlagos generációs idő is növekedik (11. ábra). Az antibiotikumot tartalmazó lemez esetében a korábbiakhoz eltérően azonban igen változatos értékek láthatóak, nem figyelhető meg sem növekedő, sem csökkenő tendencia.



11. ábra
A dut(-) mutáns Mycobacterium smegmatis generációs idejei a növekedési idők függvényében.

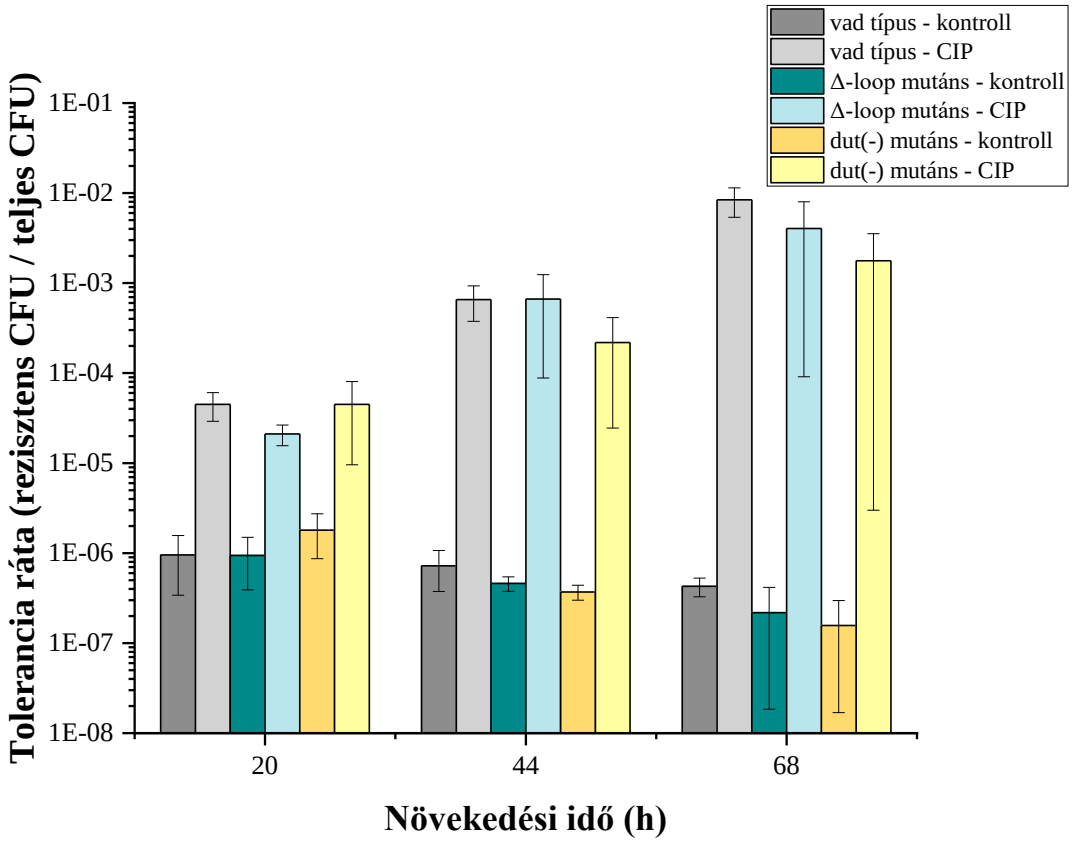
A tolerancia ráták a dut(-) mutáns *Mycobacterium smegmatis* minták esetén is nagyon hasonlítanak a vad típusú és Δ-loop mutáns törzseknél megfigyeltekhez. Itt is jellemző az, hogy a kontroll táptalajokon növekedett baktériumok tolerancia rátája és a növekedési idő fordított arányosságban vannak egymással, tehát az inkubálási idő növekedésével a tolerancia ráta csökken (7. táblázat és 8. táblázat). Azonban a ciprofloxacint tartalmazó lemezeken történt növesztés esetében megint az látható, hogy a baktériumok tolerancia rátája az inkubálási idő növekedésével szintén emelkedik (12. ábra). Emellett, a normál és antibiotikumot tartalmazó táptalajon növekedett minták kapcsolatáról elmondható, hogy ugyanaz az inkubálási idő mellett a ciprofloxacint tartalmazó lemezeken növekedő baktériumok tolerancia rátája magasabb ($p<0,2$ minden inkubálási időnél a kezelt és nem kezelt mintákat összehasonlítva). A Student-féle t-próbánál kijött nagyobb elsőfajú hiba oka, hogy ennél a mérésnél csak két biológiai párhuzamossal dolgoztam. Ezekből az adatokból tehát ismét az állapítható meg, hogy a már előzetesen antibiotikumot tartalmazó táptalajon növekedett mikobaktérium sejtek nagyobb mértékben válnak toleránssá a későbbiekben a ciprofloxacinra nézve.



12. ábra
A dut(-) mutáns Mycobacterium smegmatis tolerancia rátái a növekedési idők függvényében.

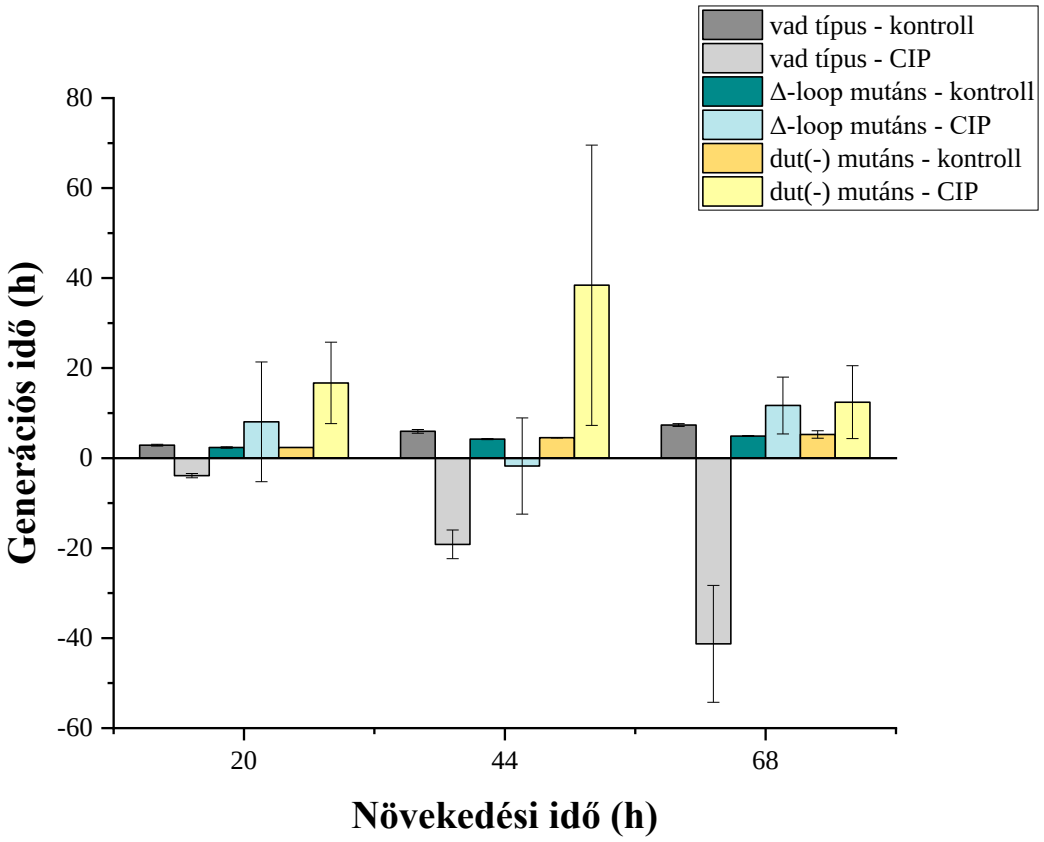
5.3. Az eredmények összegzése

Az előző fejezetben leírt eredmények alapján megfigyelhető, hogy a vad típusú, a Δ-loop mutáns és a dut(-) mutáns *Mycobacterium smegmatis* törzsek esetén a ciprofloxacinnal történő előkezelés minden esetben szignifikánsan növelte a tolerancia rátát (13. ábra). Abban az esetben tehát, ha a baktériumok először szubletális mennyiségű ciprofloxacint tartalmazó táptalajon növekedtek, akkor később jóval nagyobb eséllyel váltak toleránssá a szelektáló mennyiségű ciprofloxacinra. A kontroll, antibiotikumot nem tartalmazó táptalajokon növekedő baktériumokat vizsgálva az inkubálási idő növelésével mindhárom esetben a tolerancia ráta csökkenése volt megfigyelhető, tehát az idő múlásával egyre kevesebb sejt vált toleránssá az antibiotikummal szemben.



13. ábra
A kontroll és szubletális mennyiségű ciprofloxacint tartalmazó táptalajon növekedett vad típusú, Δ-loop mutáns és dut(-) mutáns Mycobacterium smegmatis törzsek tolerancia rátája.

A generációs idő összefüggéseit vizsgálva általános tendencia az, hogy a ciprofloxacinnal történő előkezelés hatására a generációs idő a legtöbb esetben nőtt, vagy negatív irányba tolódott el (14. ábra), amely az előkezelés hatékonyságát mutatja. Ezen túl, általánosan elmondható, hogy az inkubálási idő növekedésével a generációs idő is növekedett. Ennek az az oka, hogy a tápanyagok limitált mennyiségben vannak jelen, melynek köszönhetően a tápanyagok mennyisége csökken, míg a metabolitok mennyisége nő. Továbbá, amennyiben az egész lemezt baktériumtelepek borítják, akkor ez esetben a sejtek egy része a tápanyaghoz, másik része pedig az oxigénhez nem fér hozzá rendesen.



14. ábra
A kontroll és szubletális mennyiségű ciprofloxacint tartalmazó táptalajon növekedett vad típusú, Δ-loop mutáns és dut(-) mutáns Mycobacterium smegmatis törzsek generációs ideje.

A kíséretek eredményeinek értékelésekor továbbá megfigyelhető, hogy a vad típus és a mutánsok között a tolerancia ráták esetén nem tapasztalható szignifikáns különbség. Azonban a generációs időket összehasonlítva látható, hogy egyes inkubálási időknél a mutáns törzsek szignifikánsan életképesebbek voltak ciprofloxacin jelenlétében.

Összességében, az eredmények igazolják a funkcionálisan aktív dUTPáz korábban is megfigyelt genomi integritás megőrzésében betöltött szerepét. Azonban a kísérletek alapján a Δ-loop mutáns és a dut(-) mutáns *Mycobacterium smegmatis* törzsekre vonatkozóan nem vonhatók le egyértelmű következtetések abból a szempontból, hogy a mutációk milyen szerepet töltenek be a mikobakteriális dUTPáz adaptációs készségében. A kísérletben bemutatott mérések azonban jól mutatják a mikobaktériumok nagymértékű, robosztus alkalmazkodóképességét. Emellett, a szubletális mennyiségű ciprofloxacin jelenléte a táptalajban minden esetben nagyban megnövelte a nagyobb (máskülönben letális) dózisú antibiotikumra történő tolerancia kialakulásának esélyét, így az előkezelés jelentőségét is jól mutatja a kísérlet.

6. BIOLÓGIA SZAKMÓDSZERTANI FELDOLGOZÁS

6.1. Bevezetés

6.1.1. A biológia oktatáshoz kapcsolódó célkitűzések, fejlesztendő területek

A közoktatás általános célkitűzéseit, műveltségi területeit, tartalmi elemeit és fejlesztési területeit a mindenkor hatályos Nemzeti Alaptanterv (NAT) határozza meg. Fontos dokumentumok még az alap és emelt óraszámra íródott kerettantervek, illetve az érettségi vizsgakövetelményeket tartalmazó dokumentumok. (A szakdolgozat írásakor a közoktatásban mind a 2012-ben, mind a 2020-ban íródott NAT és kerettanterv is használatban van, illetve az érettségi követelményrendszerből főként a 2017-es verziót használják. Mivel a 2020-as NAT-hoz sem emelt szintű kerettanterv, sem érettségi követelményrendszer nem készült még el a szakdolgozatom megírásáig, így a dolgozatomban főleg a 2012-ben és 2017-ben készült dokumentumokra hivatkozok, de igyekszem figyelembe venni a legújabb dokumentumok tartalmát is.)

A természettudományos nevelés fontossága a régebbi és az újabb NAT-ban is megjelenik. A 2012-ben készült dokumentumban még megjelent a „természettudományos és technikai kompetencia” is [78], azonban ez a 2020-ban megjelent módosított alaptantervben [79] már nem szerepel, hanem a „Természettudomány és földrajz” tanulásterületen belül jelennek meg a természettudományi fejlesztési célok. A természettudományos oktatási-nevelési tevékenységben a legfontosabb célok a természet egyes folyamatainak megismerése és magyarázata, illetve ezeknek az emberi életre és természetre való hatásának a vizsgálata. A tartalmi tudás elsajátítása mellett kiemelkedő fontosságú egyfajta természettudományos szemlélet elsajátítása, amely magában foglalja a biológia szaknyelvének megismerését és különféle kutatási, kísérleti módszerek elsajátítását. Emellett fontos a problémamegoldási készségek fejlesztése is, ezzel elősegítve a tanulók kritikus gondolkodását a mindennapi életben. A tanulási-tanítási folyamat tervezése során kiemelkedően fontos még a diákok kíváncsiságának felkeltése, így esetlegesen elősegítve a tudományos területek irányába történő elköteleződésüket.

6.1.2. A témakörök megjelenése a gimnáziumi biológia oktatásban

A szakdolgozatban megjelenő főbb témakörök – baktériumok, antibiotikumok, antibiotikum rezisztencia, tuberkulózis – mind a középszintű, mind az emelt szintű gimnáziumi biológia oktatásban megjelennek valamilyen mértékben. Sajnos a 2020-ban megjelent alapórás kerettanterv a témakört kisebb mértékben érinti, de mind a 2012-ben, mind a 2020-ban elkészült kerettantervekben a téma több nagyobb témakör kapcsán is előkerül.

A 2012-ben kiadott A változatú kerettanterv [80] szerint a diákok már a 9-10. évfolyamos tananyag kezdetén megismerkednek a baktériumokkal az „Élet a mikroszkóp alatt – Mikrobiológia" tematikai egység keretein belül. Ebben az egységben hangsúlyt kap a mikróbák elterjedése, illetve a mikroorganizmusok egészségügyi és gazdasági jelentősége. További fontos ismeret ebben a tematikai egységben az egyes fertőzések megelőzésének módjai, valamint az ember és a mikroorganizmusok kapcsolata. Ezt követően a 11-12. évfolyamon a „Védelmi vonalaink – Az immunrendszer" egységében is megjelenik a baktériumok témaköre, ahol a kórokozók hatásáról és a védekezés lehetőségeiről esik bővebben szó.

A 2012-es emelt óraszámú kerettanterv [81] nagyobb hangsúlyt fektet a témakörre, több óraszámban foglalkozik a baktériumok sajátosságaival. A 9-10. évfolyamon tanult „Önálló sejtek. Szerkezet és működés a prokarióták világában" tematikai egységen belül nagy hangsúlyt kap a baktérium sejt felépítése és működése, illetve a baktériumok csoportosítása is. Emellett fontos tanítandó ismeretként jelennek meg az emberi szervezetben élő szimbionta és parazita baktériumok is, illetve a kórokozók által terjesztett betegségek. Az egységen belül megjelenik a baktériumok elleni antibiotikummal történő védekezés szempontja is, illetve szó esik a védőoltásokról is. Az 10. évfolyam végéig a tanulási folyamat várt eredménye az, hogy a diákok ismerjék a baktériumok jelentőségét evolúciós, környezeti, ipari, mezőgazdasági és egészségügyi szempontból vizsgálva. A diákoknak ismerniük kell a baktériumok emberi betegségekben való szerepét, illetve a védekezés lehetséges formáit és az antibiotikum rezisztenciát, mint az antibiotikum szedés következményét. A 11-12. évfolyamon az „Immunológiai szabályozás. Az immunválasz molekuláris alapjai" tematikai egységen belül a diákok kibővítik a témában szerzett tudásukat azzal, hogy az antibiotikumok használata milyen kapcsolatban van az

immunrendszer működésével, illetve, hogy mi a különbség a vírusok és baktériumok által okozott betegségek kezelése között.

A 2020-tól felmenő rendszerben bevetésre kerülő alapórás kerettantervben [82] „A sejt és genom szerveződése és működése” elnevezésű témakörben jelenik meg jelentős mértékben a baktériumok témaköre. Ezen belül szóba kerül a baktériumok anyagcseréjének sokfélesége és a baktériumok okozta betegségek. Az antibiózisról, mint populációs kölcsönhatásról „Az élőlények jellemzői, alkalmazkodás, és életközösségek biológiai sokfélesége” témakörben esik szó, amelynek keretein belül taglalható az antibiotikum használata és annak esetleges következményei.

Összességében, a 2012-ben és 2020-ban készült kerettanterveket elemezve megállapítható, hogy a témakörök fontosságuk ellenére nem kapnak akkora hangsúlyt a biológia oktatásban. Ez és a témák érdekessége miatt döntöttem úgy, hogy a baktériumokhoz, antibiotikumokhoz és antibiotikum rezisztenciához kapcsolódóan egy szakkör tervezetét készítem el, melynek keretein belül a diákoknak lehetősége van megismerkedni a témához kapcsolódó főbb tudnivalókkal érdekes kísérleteken keresztül.

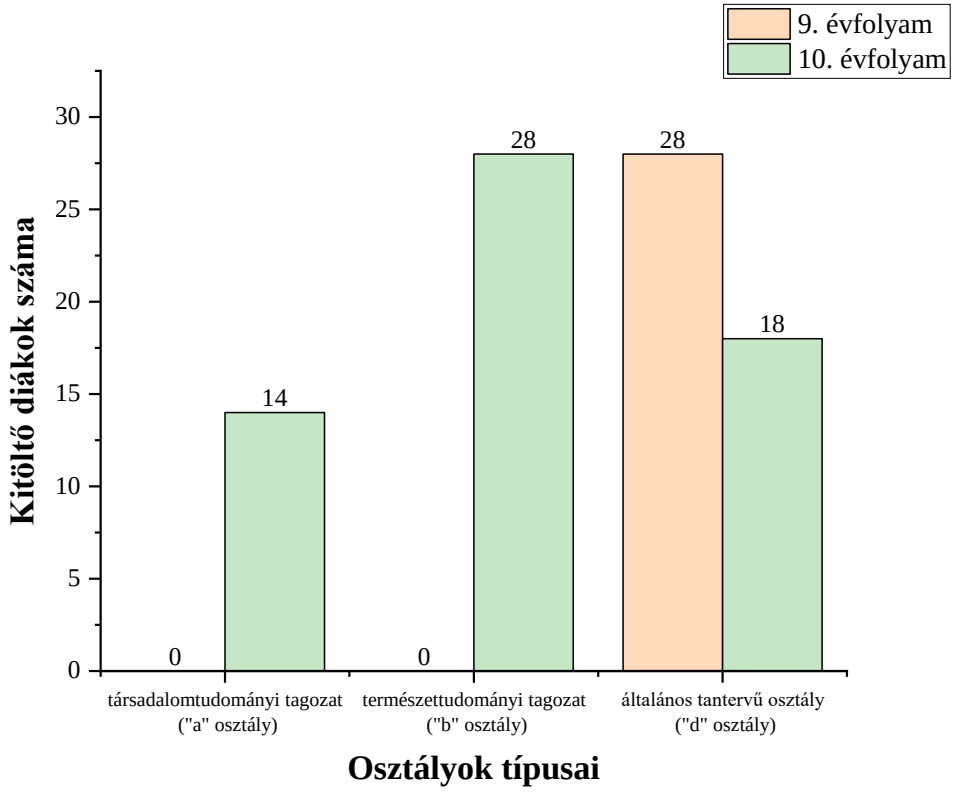
6.2. A 9. és 10. évfolyamos diákok ismerete a témában

A gimnáziumi szakkör tematikájának az összeállításához fontosnak tartottam, hogy tisztában legyek a gimnáziumi diákok tudásával az adott témakörökben. Ezért egy kérdőív formájában (7.1) felmértem a 9. és 10. évfolyamos tanulók tudását abban az iskolában, ahol a hosszú tanítási gyakorlatomat végzem (Budapesti Fazekas Mihály Gyakorló Általános Iskola és Gimnázium). Az évfolyamok és osztályok választásának az indoka az volt, hogy ezeken az évfolyamokon és ezekben az osztályokban tanítok vagy tanítottam biológiát, illetve angol nyelvet, így a diákok egy részét ismerem. A kérdőívet végül 88 diák töltötte ki négy osztályból. A következő bekezdésekben arra térek ki, hogy a kérdőívre adott válaszokból milyen következtetést vontam le a diákok tudásával kapcsolatban.

6.2.1. A kitöltő diákok általános jellemzése

Mint már korábban említettem, a kérdőívet 88 diák töltötte ki. A 9. évfolyamról egy osztály, míg a 10. évfolyamról három osztály is kitöltötte. Az osztályokkal kapcsolatosan azt érdemes tudni, hogy a gimnáziumban az „a” osztály a társadalomtudományi tagozat, a

„b” osztály a természettudományi tagozat, a „d” osztály pedig az általános tanterv alapján tanuló osztály (a „c” osztály a speciális tantervű matematikát emelt szintű óraszámban tanuló osztály, azonban ők a kérdőív kitöltésében nem vettek részt) [83]. A kérdőív első és második kérdésében az évfolyamot és az osztályt kellett megjelölniük, így képet kaptam arról, hogy a diákok melyik tagozatra járnak (15. ábra), amelyből valamilyen mértékben lehet következtetni a természettudományos érdeklődésükre is.



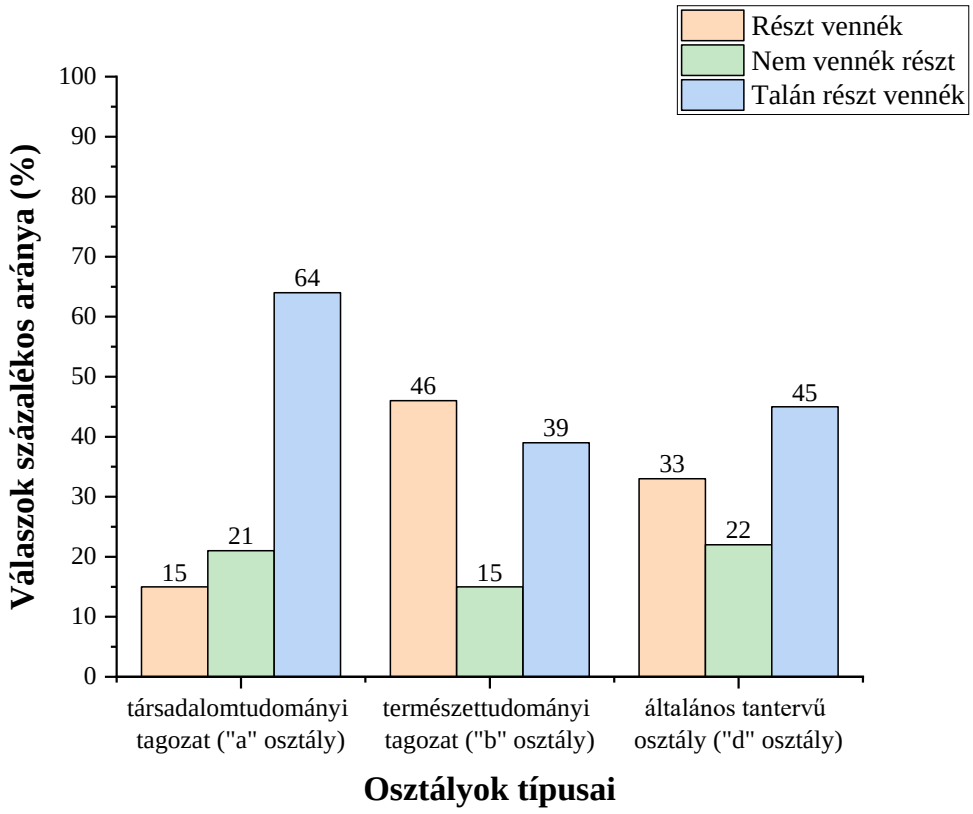
15. ábra
A kérdőívet kitöltő diákok száma az évfolyamok és osztályok szerint rendezve.

A grafikonon látható, hogy a kérdőívet legnagyobb mennyiségben a „d” osztályok diákjai töltötték ki, őket követi a „b” osztály, a legkevesebb kitöltés pedig az „a” osztályból érkezett.

A diákokról a kérdőív alapján azt is megtudtam, hogy előreláthatólag a tanulók közül mennyien szeretnének a jövőben valamilyen formában biológiával foglalkozni. Összesen 28 diák jelölte meg az igen választ, emellett pedig 17-en egyelőre nem tudják, hogy milyen irányban fognak továbbtanulni.

Egy utolsó általános jellegű kérdésben kíváncsi voltam arra, hogy ha az iskolában valóban indulna az adott témakört feldolgozó szakkör, akkor arra hány diák járna szívesen. A válaszok meglepetésként értek, hiszen a diákok közül összesen 30-an szívesen részt

vennének a szakkörön, míg 41 diák azt jelölte, hogy talán részt venne egy ehhez hasonló szakkörön. A válaszok a várakozásaimnak megfelelően azt mutatják, hogy a természettudományi tagozat és az általános tantervű osztály diákjai szívesebben vennének részt egy ilyen tematikájú szakkörön, mivel a „b” osztályból a diákok 46%-a, míg a „d” osztályok tanulóinak a 33%-a venne részt a szakkörön (16. ábra).



16. ábra
A diákok részvételi szándékának százalékos aránya az osztályok típusainak megfelelően.

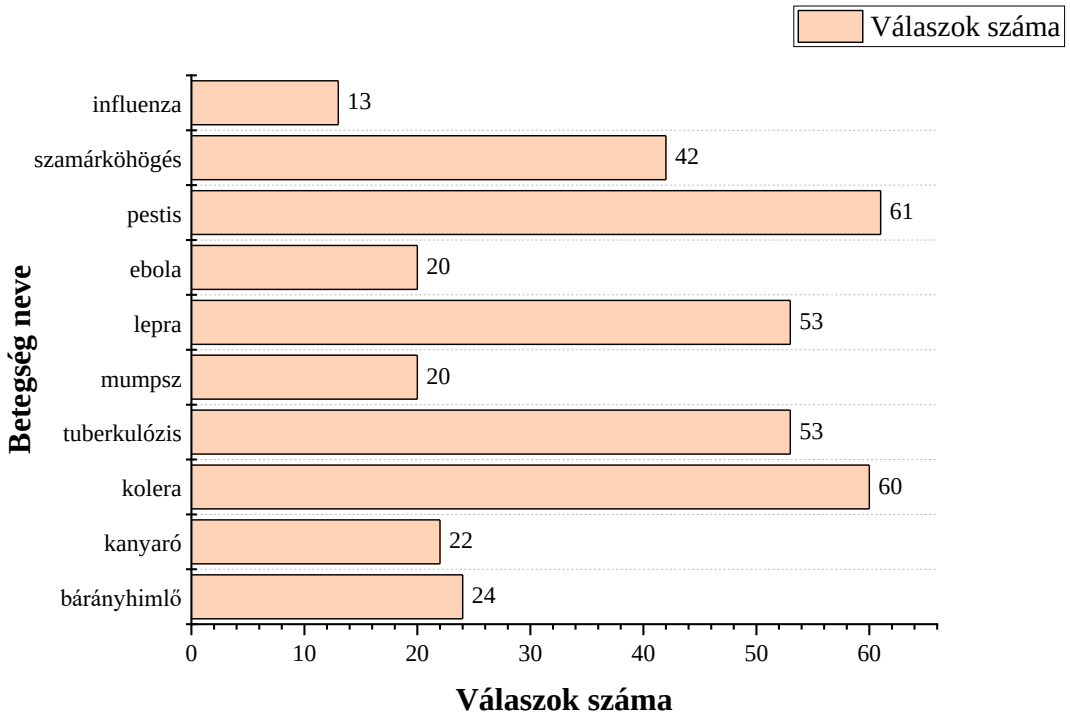
A diákok válaszaiból arra következtetek, hogy a diákok többségét érdekli az adott témakör, és szívesen részt vennének egy ilyen témakört feldolgozó biológia szakkörön, ahol gyakorlati órákon keresztül mélyedhetnek el a témakörben.

6.2.2. A diákok tudása a baktériumok témakörében

Az általános kérdések után a diákoknak négy témakörben – baktériumok, antibiotikumok, antibiotikum rezisztencia, tuberkulózis – kellett kérdésekre válaszolniuk. Elsőként a baktériumokkal kapcsolatban kellett három kérdést megválaszolniuk.

Az első kérdés egy többszörös választás, amelyben a diákoknak ki kellett választaniuk, hogy tíz felsorolt betegség közül melyeket okozzák baktériumok. A diákok

válaszai (17. ábra) alapján levonható az a következtetés, hogy a tanulók többsége tisztában van a baktériumok és vírusok által okozott betegségekkel, és a többség a helyes válaszokat jelölte meg. Azonban vannak olyan diákok is, akik vírusok által okozott betegségeket is bejelöltek, így úgy gondolom, hogy ez a témakör mindenképpen megerősítést igényel a szakkör keretében is.



17. ábra
A diákok szerint baktériumok által okozott betegségek.

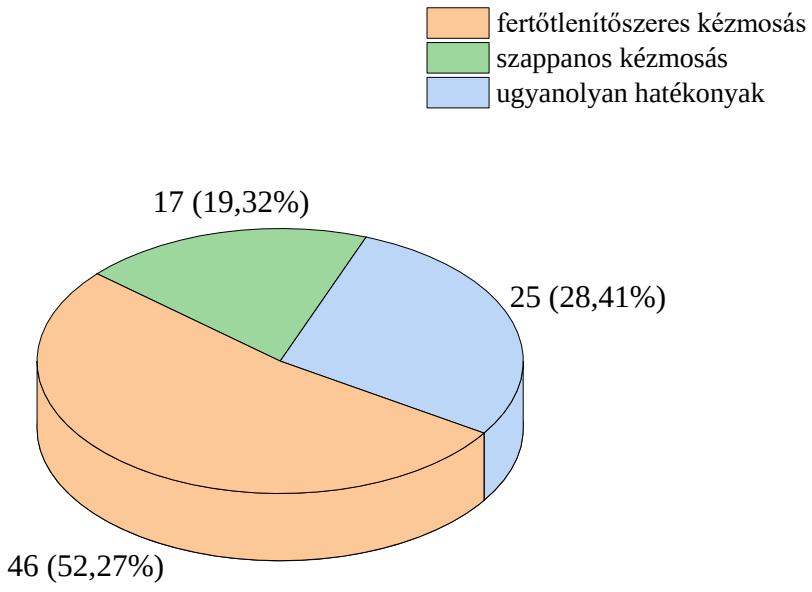
A második kérdésben azt kellett megfogalmaznia minden tanulónak, hogy szerinte mi a fő különbség a baktériumok és vírusok között. A diákok többsége nagyon szépen megválaszolta ezt a kérdést, a válaszokat a diákok által megjelölt szempontok szerint rendezve az alábbi táblázat (9. táblázat) mutatja be.

Szempontok	Baktériumok	Vírusok
Élőlény-e?	A baktériumok élőlények, a prokarióták közé tartoznak.	A vírusok nem élőlények, csupán a gazdaszervezetben mutatnak életjelenségeket.
Felépítés	A baktériumok egysejtűek, számos sejtalkotóval rendelkeznek.	A vírusok fehérjeburokból és örökítőanyagból (RNS vagy DNS) épülnek fel.
Méret	A baktériumok mikrométeres nagyságrendűek.	A vírusok nanométeres nagyságrendűek.
Szaporodás módja	A baktériumok ivaros és ivartalan szaporodásra is képesek.	A vírusok csupán a gazdaszervezetben képesek szaporodni.
Életmód	A baktériumok életmódja többféle lehet (pl. szimbionta, szaprofita, parazita).	A vírusok „élősködők”.
Emberre való hatásuk	Pozitív vagy negatív.	Negatív.
Hogyan védekezhetünk ellenük?	A baktériumok ellen antibiotikumokkal is lehet védekezni.	A vírusok ellen az antibiotikumok hatástalanok, ellenük antivirális szerekkel és védőoltásokkal védekezhetünk.

9. táblázat
A baktériumok és a vírusok közötti különbségek a diákok szerint.

A szempontok rendszeréből és a válaszokból is jól látszik az, hogy a diákok nagy része ismeri a baktériumok és vírusok közötti különbségeket.

Végül, az utolsó kérdésem a baktériumokkal kapcsolatban egy specifikusabb témához kapcsolódik. A diákoknak azzal kapcsolatosan kellett véleményt formálniuk, hogy a kézmosás melyik típusa a leghatékonyabb (18. ábra).



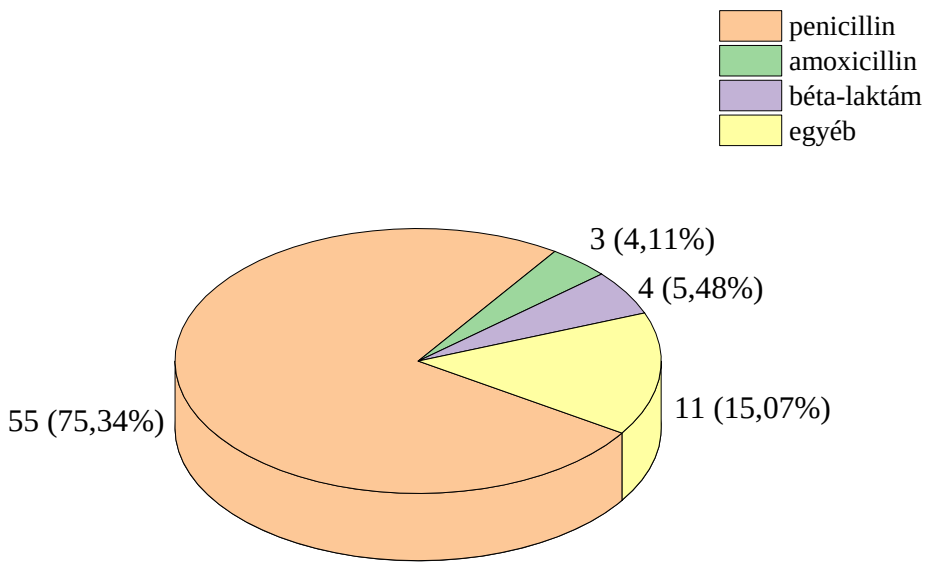
18. ábra
A diákok véleménye a kézmosás egyes típusainak – szappanos és fertőtlenítőszeres kézmosás – hatékonyságáról.

A válaszokból jól látszik, hogy a tanulók véleménye igen megosztó a kérdést illetően, így a szakköri tematikába mindenképpen belefoglaltam egy olyan gyakorlatot, amely bizonyíthatja, hogy a valóságban melyik kézmosás a leghatékonyabb a baktériumok ellen.

6.2.3. A diákok tudása az antibiotikumok témakörében

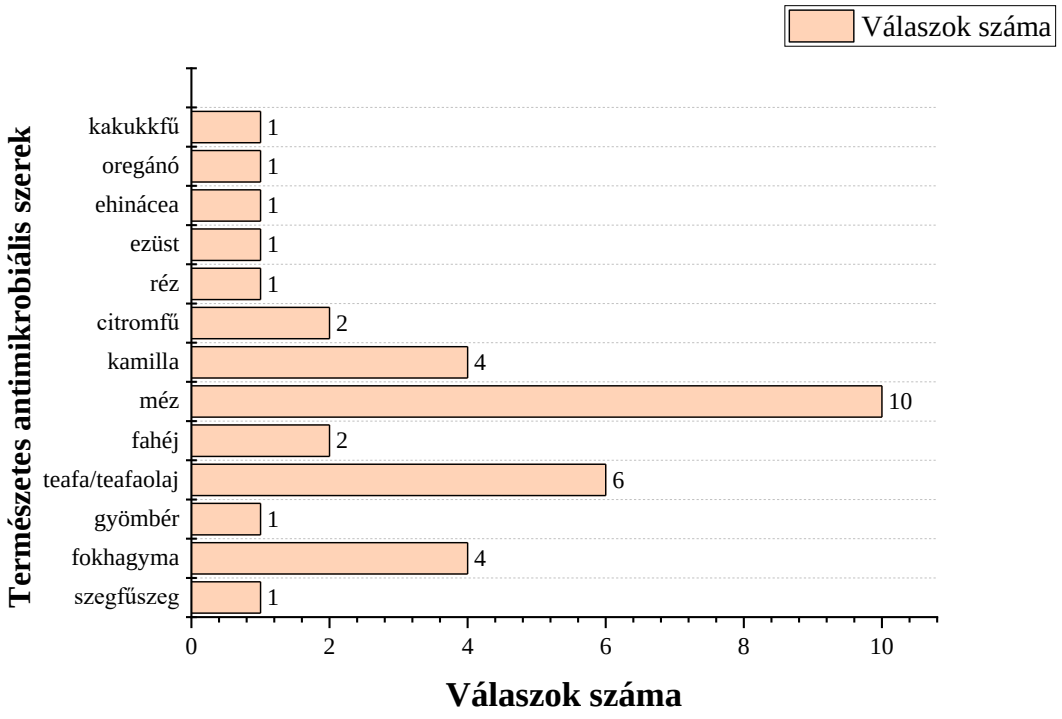
A baktériumokkal kapcsolatos kérdések után a kérdőívben az antibiotikumok témakörében kellett néhány kérdést megválaszolniuk a diákoknak. A válaszokból megtudtam, hogy a tanulók viszonylag ritkán szednek antibiotikumot, az utóbbi egy hónapban csupán 2 diák, az utóbbi fél évben pedig 16 diák szedett antibiotikumot, azonban 5 tanuló még sosem szedett semmiféle antibiotikumot.

Az antibiotikum hatóanyagok felsorolásakor a diákok sok példát hoztak. Több diák is felsorolt kettőnél több antibiotikumot, azonban a nagy többség a penicillint emelte ki. A válaszaikat összefoglaltam egy diagramon (19. ábra), amely megerősíti azt, hogy a diákok többsége valóban a béta-laktámokat – beleértve a penicillint –, illetve az amoxicillint ismeri. Ezen kívül egy-egy diák írt másféle antibiotikum hatóanyagokat is, mint például a ciprofloxacint, meticillint és a karbapenemet.



19. ábra
A diákok ismerete az antibiotikum hatóanyagok körében.

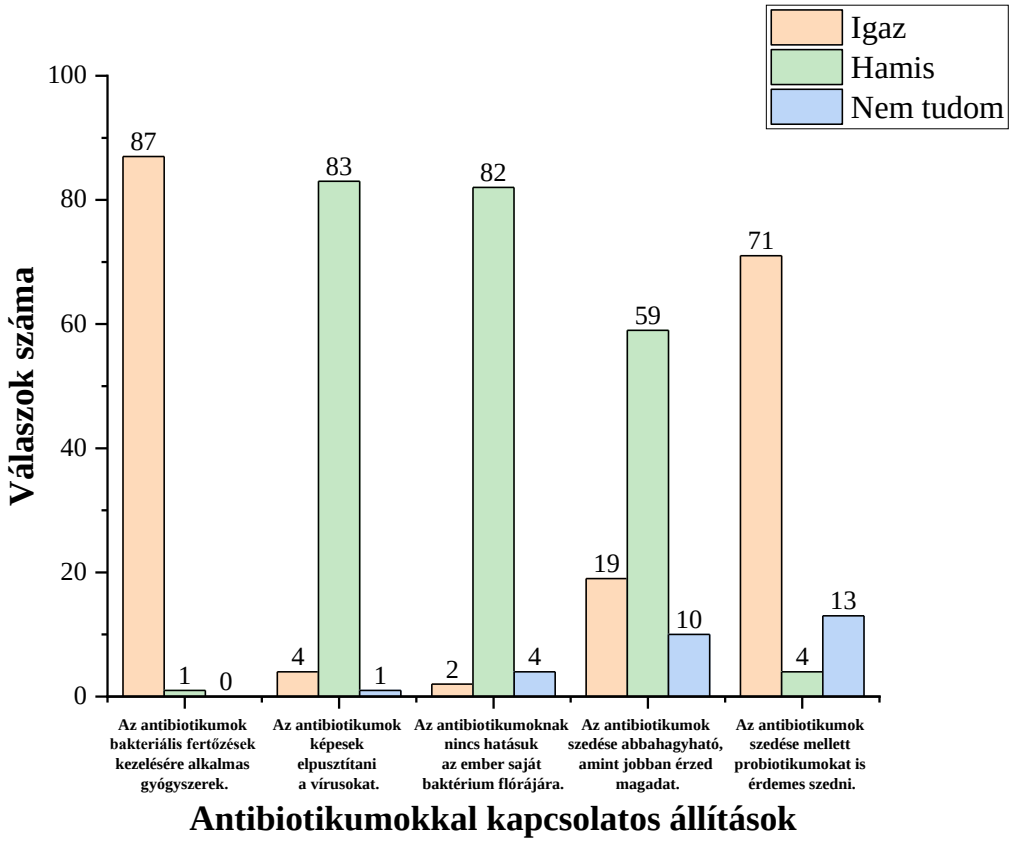
Az antibiotikum hatóanyagokhoz képest sokkal széleskörűbb válasz érkezett a természetes antimikrobiális szerekkel kapcsolatosan. A diákok összesen 13 féle anyagot vagy vegyületet soroltak fel (20. ábra).



20. ábra
A diákok ismerete a természetes antimikrobiális szerek körében.

A diákok válaszaira alapozva azt gondolom, hogy az egyik szakköri órán mindenképpen érdemes megvizsgálni az antibiotikumok és a természetes antimikrobiális szerek baktériumokra való hatását is.

Végül, az antibiotikumokkal kapcsolatos állításokról kellett eldönteniük a diákoknak, hogy azok igazak vagy hamisak (21. ábra). A diákok válaszai alapján arra a következtetésre jutottam, hogy az antibiotikumokkal kapcsolatosan sok ismerettel rendelkeznek, így a szakkör keretein belül egy közös ismétlésre kerül sor.



21. ábra
A diákok antibiotikumokkal kapcsolatos kérdésekre adott válaszai.

6.2.4. A diákok tudása az antibiotikum rezisztencia témakörében

Az antibiotikum rezisztenciával kapcsolatban a diákoknak elsőként meg kellett fogalmazniuk, hogy mit jelent ez a fogalom. A diákok többsége válaszaiban azt írta, hogy an antibiotikum rezisztencia azt jelenti, hogy a baktériumokat nem képesek elpusztítani az antibiotikumok. Néhány diák arra is kitért, hogy sokszor az emberek tehetnek róla azért, mert az antibiotikumokat nem megfelelő ideig, illetve mennyiségben szedik. Sokan

megemlítették, hogy az antibiotikum rezisztencia egy napjainkban veszélyes jelenség, mert így számos betegség nehezebben kezelhetővé válik.

Második feladatként a diákoknak el kellett dönteniük, hogy bizonyos állításokkal mennyire értenek egyet. A diákok válaszaikkal azt bizonyították, hogy ebben a témakörben is igen nagy a tudásuk. Szinte minden diák egyetértett azzal, hogy az orvosoknak tényleg csak indokolt esetben kellene antibiotikumot felírniuk, illetve mindig be kell szedni az előírt dózist. Az antibiotikumok szedésének idő előtti abbahagyása egy megosztó kérdés volt, itt csupán a diákok fele mondta azt, hogy ez a jelenség a rezisztencia kialakulását segítheti elő. A tanulók nagy része azzal is egyetértett, hogy a túl sok antibiotikum használata is a rezisztencia széleskörűbb kialakulását eredményezheti. Szinte minden diák szerint számos olyan baktérium van, amely több antibiotikumra nézve is rezisztens, illetve majdnem mindenki egyetértett abban is, hogy akár új antibiotikumok kifejlesztésével, akár a felelősség vállalásával sokat tehetünk a rezisztencia kialakulása ellen.

A válaszok alapján úgy gondolom, hogy a diákok meglátásai a rezisztenciát illetően többnyire helyesek, így inkább az esetleges megoldásokkal foglalkoznánk többet a szakköri órák keretein belül.

6.2.5. A diákok tudása a tuberkulózis témakörében

A kérdőív alapján a vizsgált korosztályban a diákok 88%-a hallott már a tuberkulózis betegségről. Arra a kérdésre, hogy világszerte évente hány embert érint a betegség már kevesebben tudtak helyesen válaszolni, csupán 34 diák jelölte azt, hogy évente kb. 10 millió új esetet regisztrálnak. A tuberkulózis elleni védekezésben a diákok harmada kiemelte a védőoltás fontosságát, többen meg is nevezték, hogy a BCG oltás véd a tüdőgümőkór ellen. A diákok egy része kiemelte a higiénia és a tüdőszűrő vizsgálatok fontosságát is. Többen pedig megjegyezték, hogy egy antibiotikumokkal kezelhető betegségről van szó.

A diákok válaszai alapján úgy gondolom, hogy a tuberkulózissal kapcsolatban érdemes kitérni a betegséggel kapcsolatos kutatások fontosságára, és arra, hogy a valóban tüneteket mutató betegek mellett mennyi úgynevezett látens beteg fordul elő világszerte.

6.3. A gimnáziumi biológia szakkör tervezete

A kutatáshoz kapcsolódó főbb témakörökhöz – baktériumok, antibiotikumok, antibiotikum rezisztencia, tuberkulózis – kapcsolódóan tehát egy gimnáziumi diákok számára tartandó szakkör tervezetét készítettem el. A szakkör fő célja az, hogy a diákok előzetes tudásának átismétlése és kibővítése után különféle érdekes kísérleteken keresztül ismerkedjenek meg a témakörrel. A szakköri tematikát a tudás felelevenítésével és kibővítésével kezdjük, a szakkörök célcsoportja így a 9-12. évfolyamos diákok körét fedi le. A kísérleteknek köszönhetően a diákoknak lehetőségük van maguk megismerni a körülöttünk élő mikroorganizmusok világát, így a tanulási folyamat sokkal élményszerűbbé válik. Emellett fontosnak tartom, hogy a diákoknak a szakkör keretein belül lehetőségük van a laborban végzett munkák kipróbálására, így erősítve a biológia tudománya iránti elköteleződésüket.

Az továbbiakban tehát a biológia szakkörökre tervezett óráimat mutatom be. Az alábbi táblázat (10. táblázat) összefoglalva tartalmazza a szakkör óráinak legfontosabb, módszertani szempontból figyelembe vett jellemzőit.

Biológia szakkör tervezete	
Műveltségi terület / Tanulásterület	Ember és természet / Természettudomány és földrajz
Tantárgy	Biológia
Évfolyam	9-12. évfolyamos gimnáziumi osztályok
A szakkör témája	A baktériumok világa. Az antibiotikumok használata és működése. Az antibiotikum rezisztencia kialakulása és emberi társadalomra való hatása. A tuberkulózis.
A szakkör időkerete	Hét alkalomból áll a szakkör, a gyakorlati órák egyenként 60 percesek.
A szakkör cél- és feladatrendszere	• A baktériumokkal, antibiotikumokkal és antibiotikum rezisztenciával kapcsolatos háttértudás megszerzése. • A baktériumok által okozott betegségek megismerése, különös tekintettel a tuberkulózisra.

	• A laboratóriumi eszközök (pl. automata pipetta, szélesztőbot) használatának a megismerése és gyakorlása. • Hígítási sor készítésének a megtanulása. • A táptalajok készítésének módja és lemezek öntésének a technikája. • A baktériumok szélesztési technikájának a megismerése szélesztőbot segítségével. • A környezetünkben élő baktériumok demonstrálása, a kézmosás hatékonyságának megismerése. • Az antibiotikumok, természetes antimikrobiális vegyületek és nehézfémek baktériumokra való hatásának a vizsgálata. • Telepmorfológiai megfigyeléseken keresztül a baktériumok egyes tulajdonságainak (pl. méret, alak, szegély, felület, denzitás) megismerése. • A CFU, mint sejtszámolási módszer készítésének a megtanulása és a sejtszámolás menetének a megismerése.
A szakkör nevelési-fejlesztési céljai	A diákok a szakköri foglalkozások végére megismerik a témakörhöz kapcsolódó háttértudást. Képesek lesznek különféle laboratóriumi eszközök használatára, megtanulják a kísérletek elvégzésének menetét és a kísérletek értékelésének módját. A diákok a szakkör végére belátják, hogy az egyéni felelősségnek milyen nagy mértékű szerepe van a társadalom egészsége szempontjából.
A szakkör didaktikai feladata	Ismeretbővítés, a korábbi tudás rendszerezése, a feldolgozott ismeretek gyakorlati alkalmazása.
A szakkör tantárgyi kapcsolatai, a diákok előzetes ismerete	A szakkörön részt vevő diákok életkorának megfelelően a témakört érintő előzetes tudásuk eltérő lehet. 7-8. évfolyam – biológia: • Baktériumok általános jellemzői, tipikus képviselői. 9-10. évfolyam – biológia:

	• A mikrobák elterjedtsége és a változatossága. • A baktériumok egészségügyi és gazdasági jelentőségének megismerése példákon keresztül. 11-12. évfolyam – biológia: • A baktériumok és vírusok megkülönböztetése. • Fertőzés és járvány fogalma. • Antibiotikumok hatása, jelentősége. Kémia: • Laboratóriumi eszközök és használatuk ismerete. Matematika: • Mennyiségi összehasonlítás, mértékegységek. Földrajz: • Az antibiotikumok bevezetésének hatása a népességszám változására.
Kulcsfogalmak	Baktérium, antimikrobiális vegyület, antibiotikum, antibiotikum rezisztencia, tuberkulózis, fertőzés, járvány, hígítási sor, táptalajok, szélesztés, telepmorfológiai megfigyelések, sejtszámolás, CFU.
Szükséges eszközök	Számítógép, projektor, powerpoint bemutatók (az elméleti órához), gyakorlati munkalapok, laboratóriumi eszközök (digitális labormérleg, pipetta, automata pipetta, pipettahegyek, kémcső, kémcsőállvány, kémcsőfogó, Eppendorf-cső, Eppendorf-cső tartó, szélesztőbot, Bunsen-égő, mérőhenger, Erlenmeyer-lombik, folyadéküveg, spriccflakon, vegyszeres kanalak, vegyszerek, tápoldat, lemez, lemez agar táptalaj, antimikrobiális anyagok és vegyületek, antibiotikum vagy antibiotikum korongok)
Felhasznált források	NAT [78,79], Kerettantervek [80–82], Részletes érettségi vizsgakövetelmény [84].

10. táblázat
A témakörhöz készített biológia szakkör óráinak módszertani szempontból figyelembe vett jellemzői.

A szakkör általános jellemzőinek vázolása után magára a szakkör óráinak a tartalmára térek ki részletesebben (11. táblázat). Minden gyakorlati órához készült az óra

tevékenységeit részletező óraterv, illetve az egyes témákhoz kapcsolódóan készítettem gyakorlati munkalapokat is, melyeket a diákoknak kell kitölteniük a kísérletek elvégzése közben. A részletes óratervek és a kísérletekhez kapcsolódó gyakorlati lapok a mellékletek között olvashatók. Egy-egy kísérlet kiértékelése a baktériumok növekedéséhez szükséges inkubálási idők hossza miatt sok esetben átcsúszik az azt követő óra első felére. Ennek köszönhetően az óratervek mindig az adott gyakorlati órára szólnak, azonban a munkalapok sok esetben több órához is kapcsolódhatnak, mivel a kísérletet az adott órán végzik el a diákok, azonban az eredmények értékelése a következő órák feladata.

Óraszám (A témák sorrendje)	**Az óra tananyaga**
1.	Az elméleti tudás átismétlése és esetleges kibővítése. Ezeken az órákon a következő témák kerülnek szóba: a baktériumok jellemzői, az antibiotikumok típusai és hatásmechanizmusuk, az antibiotikum rezisztencia kialakulásának okai, a tuberkulózis.
2.	A laboratóriumi szabályok megismerése és a laboratóriumi eszközök használatának gyakorlása, különös tekintettel az automata pipetta használatára. A hígítási sor készítésének a megtanulása (brómfenolkék és szörp használatával).
3.	A táptalajok készítésének módja és lemezek öntésének a technikája. A környezetünkben élő baktériumok demonstrálása, a kézmosás hatékonyságának megismerése.
4.	A baktériumok szélesztési technikájának a megismerése szélesztőbot segítségével. Az antibiotikumok, a természetes antimikrobiális vegyületek, és nehézfémek baktériumokra való hatásának a vizsgálata.
5.	Telepmorfológiai megfigyeléseken keresztül a baktériumok egyes tulajdonságainak (pl. méret, alak, szegély, felület, denzitás) megismerése. Előre elkészített CFU lemezek elemzése, a sejtszámolási módszer megismerése.

6.	A CFU, mint sejtszámolási módszer, használatának a megtanulása és gyakorlása.
7.	A szakkör során szerzett tudás összegzése a megszerzett tudás ellenőrzése egy játékos kvízen keresztül.

11. táblázat
A szakköri órák tananyaga.

6.3.1. Az elméleti tudás átismétlése és esetleges kibővítése

6.3.1.1. Az óra célja

A szakkör első órájának (7.2) a célja a baktériumokkal, antibiotikumokkal, antibiotikum rezisztenciával és a tuberkulózissal kapcsolatos legfontosabb információk megbeszélése és kibővítése. Ennek megvalósítását egy powerpoint bemutató (7.3) és néhány páros, csoportos munka elvégzésével képzelem el.

6.3.1.2. Az óra menete

Az óra első lépése az előzetes tudás előhívása egy közös szófelhő készítésével a Mentimeter weboldalon. A diákoknak párban kell olyan kifejezéseket gyűjteniük, amelyek a baktérium szó hallatán eszükbe jutnak. Ennek szemléltetéséhez elkészítettem egy szófelhőt (22. ábra), amelyhez hasonló készülne valószínűleg a szakköri órán is.

22. ábra
A szakkör tematikájához kapcsolódó szófelhő.

Az előzetes tudás felmérése után a diákok tudásának felelevenítése és kibővítése fog következni. Ez egy powerpoint bemutató közös megbeszélésén keresztül történik. A tanári előadás során elsőként fontos szerepet kap a baktériumok általános jellemzőinek ismertetése, itt kitérve a baktériumok alakjára, felépítésére, életmódjára és szaporodására (3. és 4. dia).

Ezt követően áttérünk a baktériumok ellen használt antibiotikumok tárgyalására (5. dia). Ezen a nagyobb témakörön belül fontosnak tartom, hogy a tanulók megismerjék a penicillin feltalálásával kapcsolatos tudnivalókat, az antibiotikumok csoportosításának módjait és az antibiotikumok hatásmechanizmusainak sokféleségét. Továbbá, fontos célom az, hogy a diákok tisztában legyenek azzal, hogy egyes, a múltban vagy a jelenben gyakori betegségeket baktériumok vagy vírusok okoznak, és hogy melyik esetben hatásos az antibiotikumok szedése (6. dia).

Az óra harmadik nagy témaköre az antibiotikum rezisztencia, amely egy igen releváns probléma napjainkban. A témával kapcsolatosan kitérünk a rezisztencia lehetséges mechanizmusaira (7. dia), majd sokkal életközelibb dolgokra koncentrálva az antibiotikum rezisztencia kialakulásának a problémáiról beszélgetnünk (8. dia), illetve kitérnünk a kialakulását elősegítő tényezőkre is (9. dia). Ezt követően a diákoknak csoportokban kell ötleteket gyűjteniük, hogy szerintük hogyan lehet megakadályozni az antibiotikum rezisztencia kialakulását. Az ötleteket a csoportmunka után közösen beszéljük meg.

Végül, de nem utolsó sorban, az első gyakorlati óra utolsó elméleti része a tuberkulózis (11. dia), amely egy világszerte problémát okozó, egyes *Mycobacterium* fajok által okozott fertőző betegség. A diákokkal megbeszéljük a betegség súlyosságát, a betegség főbb tüneteit, illetve kitérünk a tuberkulózis antibiotikumokkal történő kezelés folyamatára. A tuberkulózis tárgyalása során fontosnak tartom még azt, hogy a gyerekek lássák, hogy a betegség milyen elváltozásokat okoz az emberi tüdőben, így egy ilyen képet is megtekintünk közösen.

Összességében tehát, a szakkör első órájának a célja a szakdolgozatomban is megjelenő témakörök megbeszélése. Ennek köszönhetően a diákokkal átismételjük és kiegészítjük a témában meglévő tudásukat, így előkészítve a szakkör elkövetkezendő gyakorlati óráit.

6.3.2. A laboratóriumi szabályok megismerése, a laboratóriumi eszközök használatának gyakorlása, hígítási sor készítése

6.3.2.1. Az óra célja

A második szakköri órán (7.4) elkezdődik a valós gyakorlati munka, ahol a diákoknak már lehetőségük van kísérletek elvégzésére is. A második szakköri óra célja sokrétű: a főbb, szakkör során fontos laboratóriumi szabályok megismerése; a laboratóriumi eszközök bemutatása; hígítási sor készítése brómfenolkék oldat és szörp felhasználásával. A gyakorlat elvégzéséhez a diákoknak segítséget nyújt az órához készített gyakorlati munkalap (7.5), amely megtalálható a mellékletek között.

6.3.2.2. Az óra menete

Az óra első célja tehát a laboratóriumi szabályok megismerése vagy átismétlése. A főbb szabályok a következők:

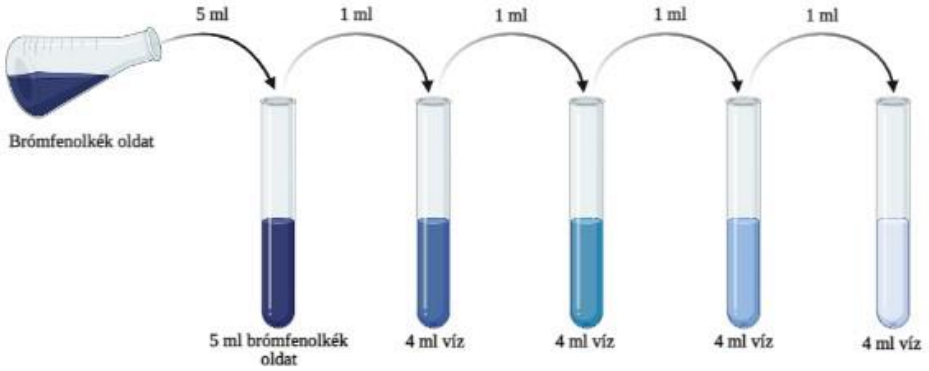
- a gyakorlatok során csak az előre megbeszélt, a munkalapokon is szereplő kísérleteket szabad elvégezni szigorúan tanári felügyelet mellett, tehát a laboratóriumban egyedül dolgozni tilos;
- a laboratóriumba ételt és italt bevinni tilos;
- a laboratóriumból vegyszert kivinni tilos;
- a tanulók a táskákat és a ruhadarabokat (pulcsi, kabát) a teremben egy helyre tegyék le, például a terem végébe;
- bármilyen probléma – például vegyszer bőrre kerülése, eszköz eltörése – esetén a tanárhoz kell fordulni;
- a balesetek elkerülése érdekében a diákok magatartása legyen kellően fegyelmezett;
- a gyakorlati órákon laborköpeny viselése ajánlott;
- a gyakorlati órákon kísérletek végzése közben egyszer használatos gumikesztyű viselése kötelező.

Úgy gondolom, hogy ezek azok a legfontosabb szabályok, amelyek betartása egy gyakorlati óra keretein belül fontosak, a balesetek elkerülése érdekében.

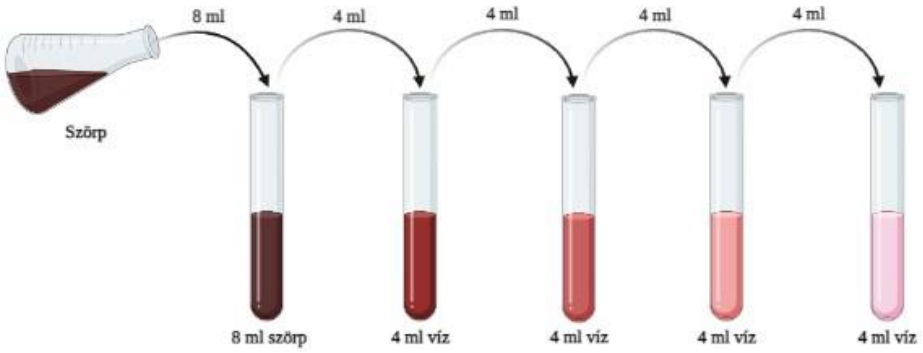
A szabályok megbeszélése után megnézzük a laboratóriumban található eszközöket, különös tekintettel azokra, amelyeket a kísérletek során használni is fogunk. Az eszközök többségét a diákok már ismerik, így erre a részre nem szentelünk sok időt. Ehhez

kapcsolódóan a diákoknak egy feladatuk is van a gyakorlati munkalapon, melyben a képen látható laboratóriumi eszközöket kell megnevezniük.

Az óra harmadik, azonban fő célja az automata pipetta használatának a gyakorlása hígítási sorok készítésén keresztül. A kísérlet menetének közös megbeszélése után a diákok párokat alkotnak és az asztalukhoz viszik a kísérlet során használandó anyagokat és eszközöket (brómfenolkék oldat, szörp, mérőhenger, 10 db kémcső, kémcsőállvány, vízzel töltött spriccflakon, automata pipetta, pipettahegyek). Ez után kezdődik a tényleges gyakorlati munka, amelynek elvégzéséhez nagy segítséget nyújt a gyakorlati munkalap (7.5), amelyen a diákok megtalálják a kísérletek menetének leírását. Ennek megfelelően a diákoknak két hígítási sort kell készíteniük, az egyiket brómfenolkék oldat (23. ábra), a másikat pedig szörp (24. ábra) felhasználásával.



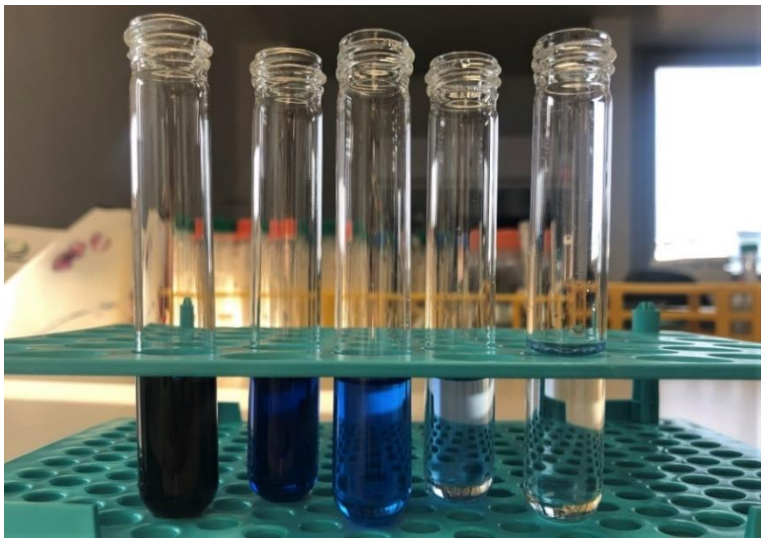
23. ábra
Hígítási sor elkészítésének menete brómfenolkék festékoldat használata esetén.



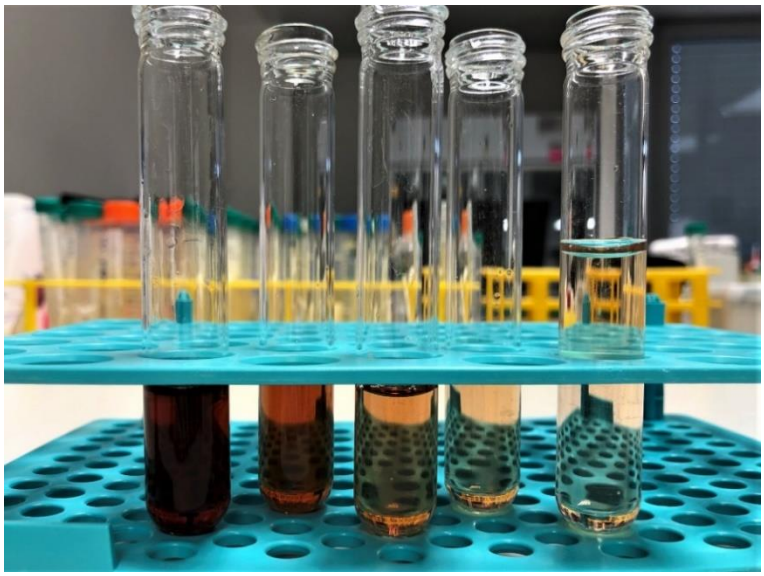
24. ábra
Hígítási sor elkészítésének menete szörp használata esetén.

A kísérlet első fontos lépése a kémcsövek feliratozása, számozása és a már beszámozott kémcsövek kémcsőállványba helyezése. Ez után ki kell mérni a munkalapokon szereplő mennyiséget a brómfenolkék oldatból, vagy a szörpből az első kémcsőbe. A többi (2.-5.)

kémcsőbe mindkét hígítási sor készítésekor 4-4 ml vizet kell önteni. Amint ezzel kész vannak a diákok, az első kémcsőből át kell mérni a megadott mennyiségű brómfenolkék oldatot vagy szörpöt a második kémcsőbe és az oldatot jól össze kell keverni. Az összekeverés után a második kémcsőből kell megadott mennyiségű oldatot átvinni a harmadikba, és ismét összerázással összekeverni az oldatot. A leírt mechanizmust addig kell folytatni, amíg a diákok az utolsó kémcsőig érnek. A hígítási sorok elkészítését követően a diákok az alábbiakhoz hasonló hígítási sorokat kapnak (25. ábra és 26. ábra).



25. ábra
A brómfenolkék oldat használatával elkészített hígítási sor. Ebben az esetben ötszörös hígítás történt.



26. ábra
A szörp használatával elkészített hígítási sor. Ebben az esetben kétszeres hígítás történt.

Az óra utolsó öt percében a kísérletek értékelése történik, illetve a csoporttal közösen megbeszéljük a munkalapokon szereplő feladatok megoldását.

6.3.3. A táptalajok készítésének módja, a lemezek öntésének a technikája, a környezetünkben élő baktériumok demonstrálása és a kézmosás hatékonyságának megismerése

6.3.3.1. Az óra célja

A harmadik gyakorlati órán folytatjuk a laboratóriumi technikák megismerését. Elsőként, a diákoknak lehetőségük van megismerni az agar tápoldat készítésének a módját, illetve maguk is fognak készíteni tápoldatot három-négy fős csoportokban. Az óra második célja a táptalajok öntési technikájának az elsajátítása. Végül, az óra harmadik célja a környezetünkben élő baktériumok demonstrálása és a kézmosás hatékonyságának a megismerése. A mellékletek között megtalálható a részletes óraterv (7.6), illetve a gyakorlati munkalap (7.7) is.

6.3.3.2. Az óra menete

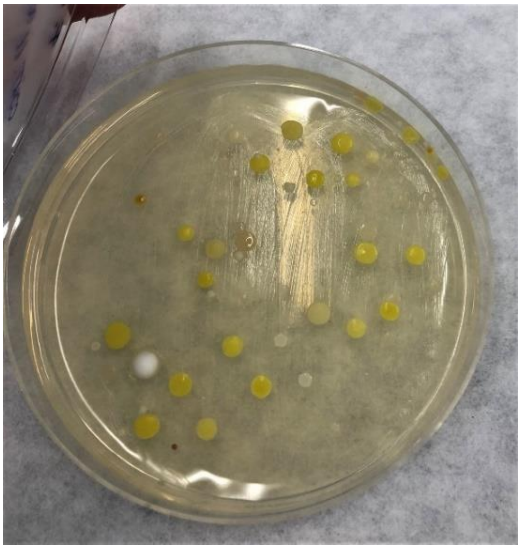
A harmadik szakköri óra a diákok köszöntése után az adott gyakorlat tartalmának áttekintésével kezdődik, amely során közösen megbeszéljük, hogy melyik gyakorlat során mi a feladat, mire kell figyelnie a tanulóknak.

A közös megbeszélés után elkezdődik a gyakorlati munka. Elsőként, a diákok 3-4 fős csoportokban agar tápoldatot kevernek be a gyakorlati munkalapon található recept segítségével. Ehhez sokféle anyagra és eszközre (Lemco por, nátrium-klorid, Bacto Pepton, Bacto Agar, desztillált víz, digitális labormérleg, főzőpohár, vegyszeres kanalak, folyadéküveg) lesz szükségük, amelyeket a tanár előre összekészít a gyakorlat előtt. A diákok az elkészített tápoldatokat a tanárnak adják oda, aki autoklávozással sterilizálja azokat (ha erre van lehetősége).

Az óra második gyakorlata a már steril Lemco agar tápoldatok használatával tanulókként öt táptalaj öntése. A táptalajok öntésekor a diákok úgy dolgoznak, hogy mellettük egy égő gyertya (ennek hiányában Bunsen-égő vagy borszeszégő) található, amely felfelé mozgó légáramlást hoz létre, így viszonylag steril körülményeket biztosítva. Emiatt kiemelten fontos a diákok figyelmének a felhívása az óvatosságra, illetve a lányok ezen a gyakorlati órán csak összefogott hajjal vehetnek részt, a tűzzel kapcsolatos balesetek elkerülése érdekében.

A környezetünkben élő baktériumok demonstrálása és a kézmosás hatékonyságának a kipróbálása lesz az óra harmadik felének a fő célja. A kísérlet során a diákok az előző

feladat során saját maguk által készített táptalajokat fogják használni. A környezetünkben élő baktériumok demonstrálásához egy általuk kiválasztott felületről (pl. telefon kijelzője, kilincs, cipő talpa stb.) vehetnek mintát egy mintavevő pálca segítségével, amelyet szétkennek a táptalaj felületén. A diákok az inkubálási idő után a következő képhez (27. ábra) hasonló lemezeket fognak kapni.



27. ábra
A telefonomról vett minta.

A környezeti mintavétel után a diákok egy másik lemezt maguk elé téve a táptalaj egyik harmadára helyezik az ujjukat, majd ugyanezt teszik szappanos kézmosás és kézfertőtlenítő használata után is. A kísérlet elvégzése és az inkubálási idő letelte után a következő képhez (28. ábra) hasonló eredményt fognak látni a lemezeken.

28. ábra
Az ujjamon található baktériumok kézmosás előtt, szappanos kézmosás után, illetve kézfertőtlenítő használata után.

A harmadik szakköri órán elkészített mintákat az ötödik gyakorlati órán fogjuk értékelni, ahol a diákok feladata lesz az ehhez az órához tartozó gyakorlati lap ehhez a részhez vonatkozó részének a kitöltése, illetve további megfigyelések elvégzése.

Összességében tehát a harmadik szakköri órán a diákoknak lehetősége van megismerni a táptalajok elkészítésének módját, illetve a saját maguk által készített lemezeket használják fel az órai kísérlet során. A laboratóriumi munka megismerésével és kipróbálásával próbálom a biológia tudományát közelebb hozni a diákokhoz. Továbbá, a diákok kíváncsiságának felkeltésén keresztül próbálom megerősíteni a tudományos területek irányába történő elköteleződésüket.

6.3.4. A baktériumok szélesztési technikájának a megismerése; az antibiotikumok, a természetes antimikrobiális vegyületek és nehézfémek baktériumokra való hatásának a vizsgálata

6.3.4.1. Az óra célja

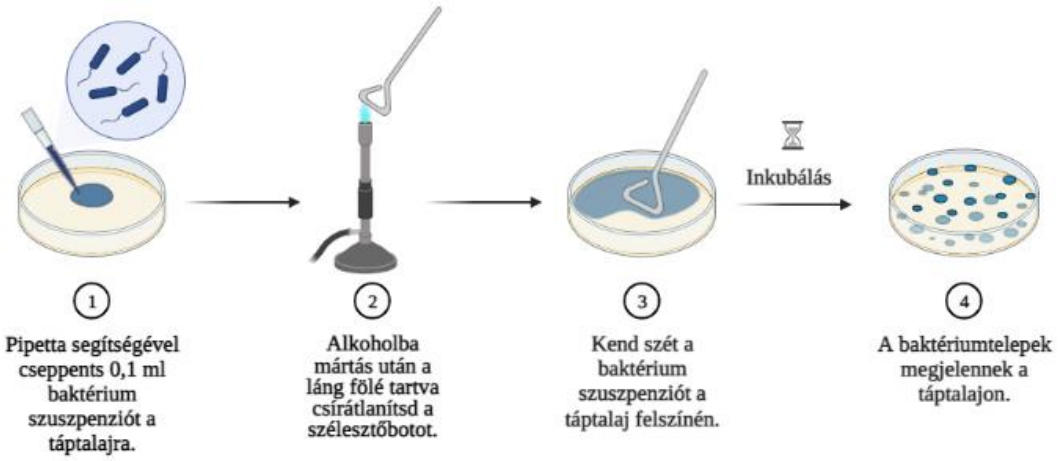
A negyedik gyakorlati órán a diákoknak a korábbi órákhoz hasonlóan ismét lehetőségük van laboratóriumi kísérleteket végezni. Elsőként az előző órán használt táptalajokon fognak baktériumokat széleszteni szélesztőbot segítségével. Ez esetben az elsődleges cél a szélesztés ezen módjának az elsajátítása. A gyakorlat további részében a diákok az általuk szélesztett baktériumokkal dolgoznak tovább. Ezen kísérletek során a cél az antibiotikumok, a természetes antimikrobiális vegyületek és a nehézfémek baktériumokra való hatásának a vizsgálata. A mellékletek között megtalálható a részletes óraterv (7.8) és a gyakorlati órához tartozó munkalap (7.9).

6.3.4.2. Az óra menete

A korábbi gyakorlati órákhoz hasonlóan az óra a diákok köszöntésével kezdődik, majd az azt követő pár percben a gyakorlat menetét beszéljük meg közösen.

Az adott óra első gyakorlati feladata a baktériumok szélesztési technikájának a megismerése (29. ábra). Ennek során az előző órán elkészített táptalajokon fognak a diákok széleszteni, de a gyakorlati órára viszek be előre elkészült lemezeket is, ha a diákok által készítettek nem sikerültek volna megfelelően. A szélesztések során szélesztőbotot használnak a diákok, amely használatakor fontos a szélesztőbot csírátlanítása, hogy az adott lemezen tényleg csak az a baktérium törzs nőjön ki, amelyiket mi szeretnénk. A csírátlanítás

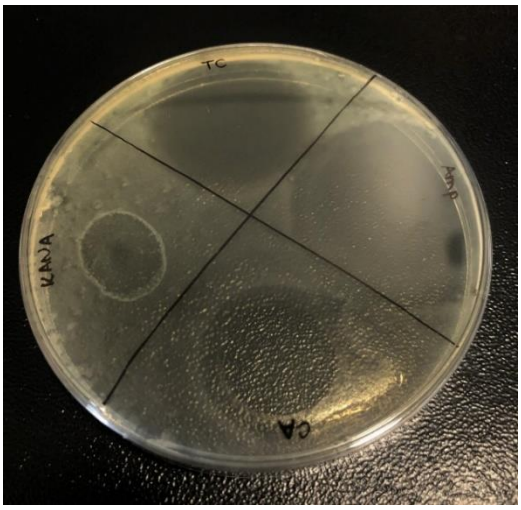
úgy történik, hogy a szélesztőbotot alkoholba mártják, majd Bunsen-égő lángjába tartják, vagy öngyújtóval meggyújtják a szélesztőbot alkoholba mártott részét. Ennél a gyakorlatnál is kiemelten fontos a diákok figyelmének a felhívása a tűzvédelmi szabályokra.



29. ábra
A szélesztőbottal történő szélesztés menete.

A szélesztések eredményének megtekintése a következő gyakorlati óra feladata a szükséges inkubálási idő miatt. Az eredmények értékelésénél a diákoknak le kell rajzolniuk, amit a lemezeken látnak, illetve meg kell állapítaniuk, hogy a táptalajon hányféle baktérium nőtt ki, és hogy vajon ennek mi az oka (tehát sikerült-e valóban steril környezetet biztosítani ahhoz, hogy csak a baktérium szuszpenzióban lévő baktérium faj növekedjen a táptalajon).

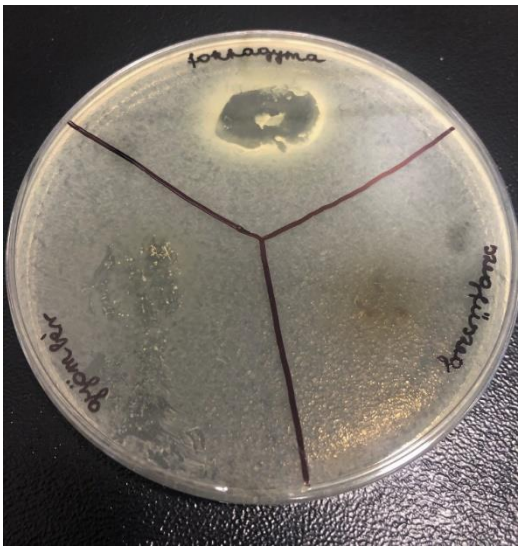
A szakköri óra második felében különböző anyagok, vegyületek baktériumokra való hatását vizsgáljuk páros munka keretein belül. Elsőként a diákoknak négyféle általuk választott antibiotikumkorongot kell a már szélesztett baktériumokat tartalmazó táptalajra helyezniük. A kísérlet elvégzésekor a diákoknak a munkalap alapján mindössze az a feladatuk, hogy felírják az általuk használt antibiotikumok nevét. Az eredmények értékelésekor kell majd leírniuk azt, hogy mit látnak a lemezen. Emellett a diákoknak le kell mérniük az egyes antibiotikumkorongok körül kialakult gátlási zónák átmérőjét, amelyből következtetni lehet az antibiotikumok hatékonyságára is az adott baktériummal szemben. Az eredmények értékelésekor az antibiotikumok hatását vizsgálva a diákok az alábbi képen (30. ábra) látottakhoz hasonlót fognak látni a lemezeken.



30. ábra
Négy antibiotikum – tetraciklin (TC), kanamicin (KANA), kloramfenikol (CA) és ampicillin (AMP) – baktériumokra való hatása.

Az antibiotikumok vizsgálatát követően a diákoknak lehetőségük van ötféle természetes antimikrobiális vegyület hatásának a vizsgálatára. A kísérlet során szintén az általuk szélesztett baktériumokat tartalmazó táptalajokat használják. Az egyik táptalajra fokhagymát, gyömbért és szegfűszeget helyeznek a diákok, a másikra pedig egy-egy lyuk táptalajba szúrása után teafa és fahéj illóolajat csepegtetnek. A kísérlet kapcsán előzetes feladat annak a leírása, hogy mit várnak az egyes anyagok hatásaival kapcsolatban, az eredmények értékelésekor pedig azt kell leírniuk, hogy mi látható a lemezeken. A lemezek inkubálása után a következő képeken (31. ábra és 32. ábra) látottakhoz hasonló eredményt várhatunk. (A kísérlet elvégzése közben azonban előfordulhat, hogy ebben a formában nem lesz látványos az eredmény. Ennek elkerülése érdekében úgy is elvégezhető a kísérlet, hogy az antimikrobiális anyagokat és vegyületeket ráhelyezzük a lemezre, majd az anyagok táptalajba diffundálása után szélesztjük a baktériumokat.)

31. ábra
Három természetes antimikrobiális anyag – gyömbér, fokhagyma, szegfűszeg – az inkubálási idő letelte után.



32. ábra
Három természetes antimikrobiális anyag - gyömbér, fokhagyma, szegfűszeg – baktériumokra való hatása.

Végül a diákok a nehézfémek baktériumokra való hatását vizsgálják meg. Ennek során a diákoknak réz-szulfát oldatot és rézből készült pénzérmét kell a szélesztett baktériumokat tartalmazó táptalajra helyezniük. A munkalapon található feladatokat a diákoknak az eredmények kiértékelésekor kell megoldaniuk. Az egyik feladatban le kell rajzolniuk azt, amit a lemezen látnak, a második feladatban pedig azt kell megállapítaniuk, hogy melyik esetben látható nagyobb gátlási zóna.

Összességében tehát a negyedik szakköri órán a diákoknak lehetőségük lesz megismerni és kipróbálni a szélesztés technikáját, illetve emellett elkezdik az egyes antimikrobiális szerek hatásának a vizsgálatát. A gyakorlati órán készített összes lemez megfigyelése az inkubálási idők letelte után történik.

6.3.5. Telepmorfológiai megfigyelések, előre elkészített CFU lemezek elemzése, a sejtszámolási módszer megismerése

6.3.5.1. Az óra célja

A biológia szakkör keretében tartott ötödik gyakorlati óra (7.10) fő célja a korábbi két alkalom során készített minták eredményeinek a megfigyelése és értékelése, amelyhez nagy segítséget nyújtanak az előző órák gyakorlati lapjai (7.7 és 7.9). Emellett, a diákok az általuk korábban készített mintákat telepmorfológiai szempontból is megvizsgálják, amely során megfigyelhetik, hogy mennyire sokfélék lehetnek a baktériumtelepek. Végül, a következő óra előkészítéséhez fontos cél az, hogy a diákok megismerjék a CFU lemezek használatának és értékelésének a módját. A telepmorfológiai megfigyeléséhez és a CFU lemezek értékeléséhez a diákok a gyakorlati munkalapon (7.11) találják meg a szempontokat.

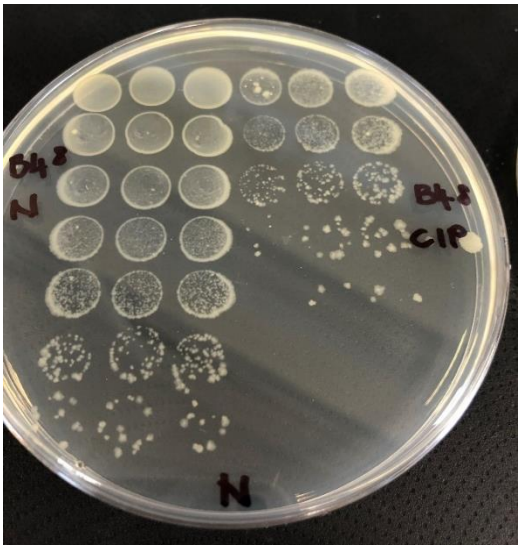
6.3.5.2. Az óra menete

A tanulók szakkörön való köszöntése után az eredmények értékelését a harmadik szakkör mintáinak a megfigyelésével kezdik. Tehát a környezetünkben élő baktériumok demonstrálása és a különféle kézmosások után készített minták értékelése az első feladat. A minták megfigyelése után a diákoknak meg kell oldaniuk a harmadik gyakorlati munkalapon (7.7) szereplő feladatokat, amelyek során le kell rajzolniuk a látottakat, illetve rövid kérdésekre válaszolnak.

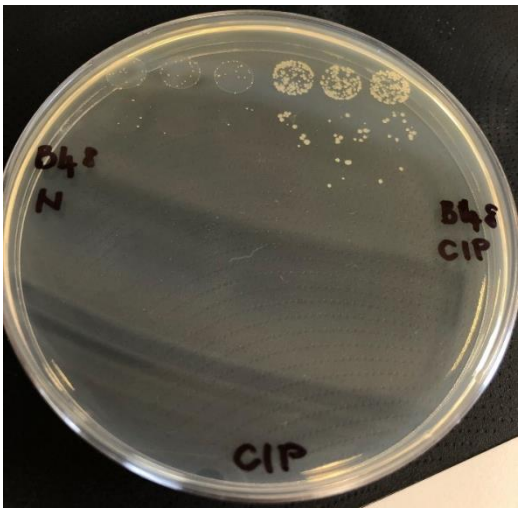
Amint végeztek a harmadik óra értékelésével, a diákoknak lehetőségük van megfigyelni azt, hogy a különféle antibiotikumok és egyéb antimikrobiális vegyületek hogyan hatottak a növekedő baktériumokra. Az antibiotikumkorongokat tartalmazó lemez esetében a gátlási körök átmérőjének leméréséből következtethetünk az antibiotikum hatékonyságára az adott baktériummal szemben, illetve arra is, hogy vajon a baktérium rezisztens-e a hatóanyaggal szemben. A természetes antimikrobiális vegyületek esetén a tanulók feladata az általuk vélt hatások és a tényleges hatások vizsgálata. Végül, a nehézfémek vizsgálatánál azt kell megállapítaniuk a diákoknak, hogy megfigyelhető-e lényeges különbség a réz-szulfát és a rézből készült pénzérme hatása között. A megfigyelések során a diákoknak a negyedik gyakorlati órához készült munkalapot kell kitölteniük (7.9).

A telepmorfológiai megfigyeléseken keresztül a diákok három lemezen kinőtt baktériumokat vizsgálják aszerint, hogy mekkorák az egyes baktériumtelepek, milyen ezeknek az alakja, szegélye, felülete és denzitása.

Az óra utolsó részében pedig a csoporttal közösen vizsgálunk meg CFU lemezeket előre elkészített CFU lemezekről készített képek segítségével (33. ábra és 34. ábra). A diákok feladata a feliratok értelmezése, illetve a baktériumok számának a kiszámolása. Majd ebből az adatból következtetni tudunk a hígítás fokára, abból pedig arra, hogy az eredeti baktérium szuszpenzió mennyi baktériumot tartalmazott. A diákok által is vizsgált CFU lemezek a következő képeken láthatók. Ugyanezeket a képek a gyakorlati munkalapon is szerepelnek, amelyek segítségével a diákok dolgoznak a szakköri órán (7.11).



33. ábra
A képen egy általam készített CFU látható. A lemezen a három biológiai párhuzamos közül a B mintából készített CFU látható 48 óra inkubálási idő után. A lemez alján látható „N" betű arra utal, hogy a CFU-hoz használt táptalaj nem tartalmaz antibiotikumot. A lemez bal oldalán látható „N" betű azt jelzi, hogy a táptalaj, amelyen a baktériumok szélesztése és növesztése történt, nem tartalmazott antibiotikumot. A lemez jobb oldalán látható „CIP" felirat azt jelzi, hogy a baktériumok szélesztése és növesztése antibiotikumot tartalmazó, úgynevezett szubletális plate-n történt.



34. ábra
A képen egy általam készített CFU látható. A lemezen a három biológiai párhuzamos közül a B mintából készített CFU látható 48 óra inkubálási idő után. A lemez alján látható „CIP" felirat arra utal, hogy a CFU-hoz használt táptalaj antibiotikumot tartalmazó, úgynevezett szelektáló táptalaj. A lemez bal oldalán látható „N" betű azt jelzi, hogy a táptalaj, amelyen a baktériumok szélesztése és növesztése történt, nem tartalmazott antibiotikumot. A lemez jobb oldalán látható „CIP" felirat azt jelzi, hogy a baktériumok szélesztése és növesztése antibiotikumot tartalmazó, úgynevezett szubletális plate-n történt.

Az ötödik szakköri óra felépítésének tehát az a legfontosabb célja, hogy az előző gyakorlatokon végzett kísérletek eredményeit értékeljük. Illetve, emellett fontos szerepet kap a sejtszámolási módszer megismerése is, így előkészítve és megkönnyítve a diákok munkáját a következő órán.

6.3.6. A CFU, mint sejtszámolási módszer készítésének a megtanulása és gyakorlása

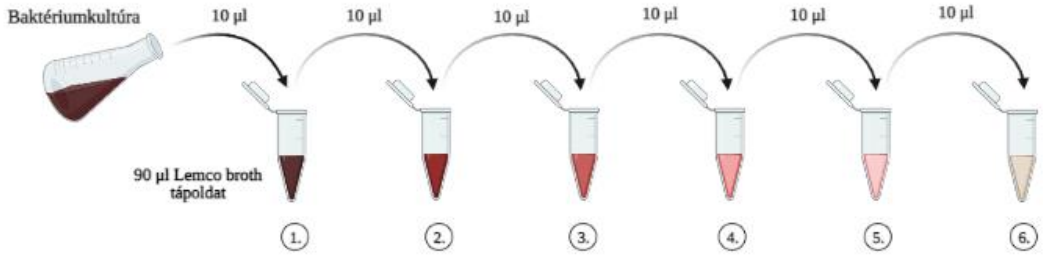
6.3.6.1. Az óra célja

A szakkör gyakorlati órájának a célja a CFU (colony-forming unit) sejtszámolási módszer elvégzésének a megtanulása, melyet a kutatások során én is nagyon sokszor alkalmaztam. A CFU-k készítése kapcsán átismétlésre kerül a már korábbi órán begyakorlott hígítási soroknak a készítése is. Ebben az esetben azonban nem brómfenolkék oldat vagy szörp használatával dolgozunk, hanem a hígítási sorok baktériumkultúra használatával készülnek el, így a diákoknak egy újabb lehetőségük van a hígítási sor készítésében való tapasztalat szerzésére. Emellett, az óra másik célja a CFU módszerének a megismertetése a diákokkal és annak kipróbálása. A mellékletek között megtalálható a részletes óraterv (7.12) és a gyakorlati órához tartozó munkalap (7.13) is, amelynek célja a diákok munkájának a segítése.

6.3.6.2. Az óra menete

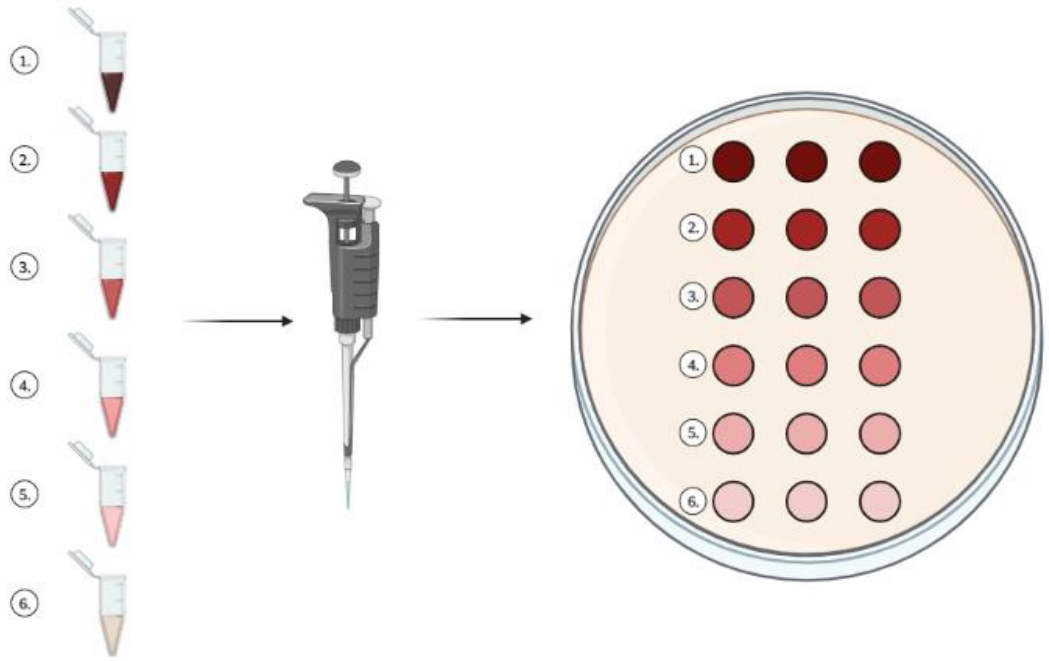
Mivel a CFU készítése egy igen bonyolult folyamat, így az óra a diákok köszöntése után a gyakorlat lépéseinek a megbeszélésével kezdődik.

Az első fő lépés a hígítási sorok elkészítése, melyhez a gyakorlati lapon leírt útmutató és a mellékelt ábra (35. ábra) is sokat segít. A diákoknak egy hattagú hígítási sort kell készíteniük, amelynek első lépése a hat Eppendorf-cső feliratozása. Ezt követően a diákoknak ki kell mérniük automata pipetta segítségével 90-90 µl Lemco tápoldatot mind a hat Eppendorf-csőbe. Majd az 1-es számú Eppendorf-csőben lévő tápoldathoz pipetta segítségével hozzá kell adniuk 10 µl baktériumkultúrát, és össze kell keverniük az oldatot (fel-le fordítással). Ez után az 1-es számú Eppendorf-csőből a diákok kivesznek 10 µl-t, amelyet hozzáadnak a 2-es számú Eppendorf-csőben lévő tápoldathoz, majd ismét összekeverik az oldatot. Ezt a mechanizmust folytatják egészen addig, amíg az utolsó Eppendorf-csőig érnek. Ekkor a diákok előtt már ott lesz a hattagú hígítási sor, amellyel tovább dolgozunk a gyakorlat második részében.



35. ábra
Hígítási sor készítésének menete a CFU készítésekor.

A szakköri óra másik fő gyakorlata a CFU elkészítése (36. ábra). Ennek során a diákok a táptalaj felületére minden egyes Eppendorf-csőből (minden hígításból) három-három 10 µl mennyiségű cseppet helyeznek egymás mellé automata pipetta segítségével. Mivel hat különféle hígítással dolgozunk, így a lemezen hat sorban és három oszlopban lesznek olyan cseppek, amelyek bizonyos mennyiségű baktériumot tartalmaznak.



36. ábra
CFU készítésének a menete.

A lemezeket a következő gyakorlatig 28 °C-on inkubáljuk, majd az eredményeket a gyakorlati lapon lévő feladatokon keresztül értékeljük.

Ennek a gyakorlati órának tehát a fő témája a CFU készítése volt. Azért volt indokolt ezt az utolsóelőtti óra témájának hagyni, mert ekkorra a diákok már megtanultak és begyakoroltak néhány olyan technikát, amelyet ezen gyakorlat során is használniuk kell. Így a diákoknak sikerélményük lehet abból, hogy már milyen jól tudják használni az eszközöket, így növelve a biológia tudománya felé mutató motivációjukat.

6.3.7. A szakkör során szerzett tudás összegzése

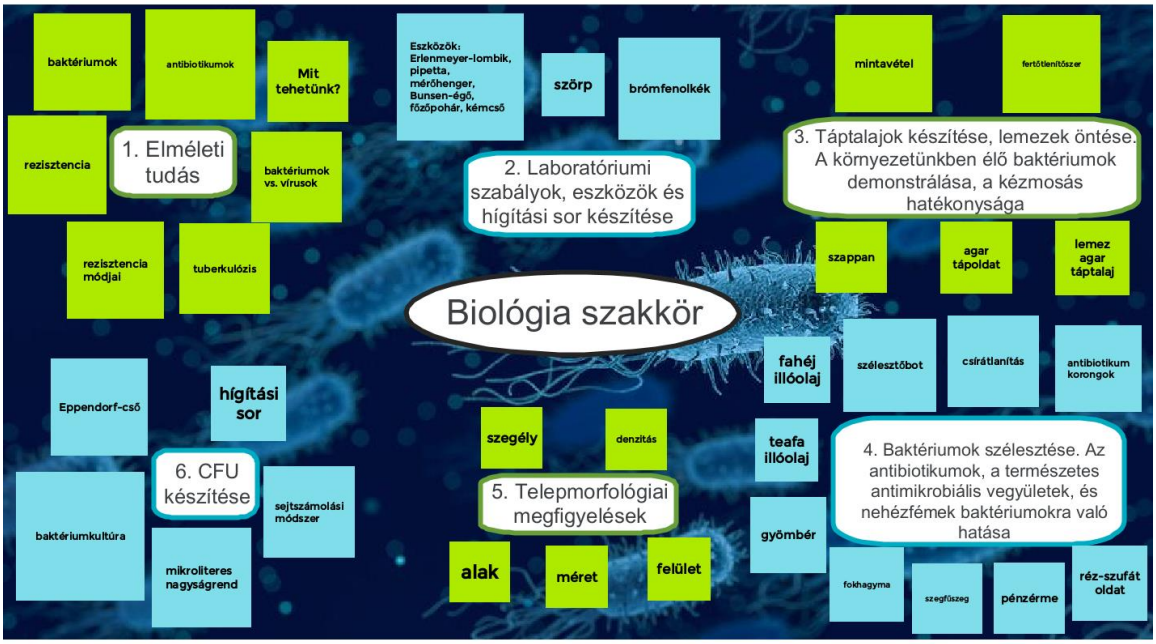
6.3.7.1. Az óra célja

Az utolsó szakköri óra a korábbi órákhoz hasonlóan több szakaszból épül fel. Az óra első részében az előző órákon történt CFU lemezek eredményeinek a kiértékelése történik a munkalapon (7.13) lévő feladatok segítségével. Az óra ezt követő részének fő hangsúlya az ismétlés köré rendeződik, először egy gondolattérképet készítünk arról, amit tanultunk a szakkörön, majd egy játékos kvízen keresztül ellenőrizzük, hogy ki emlékszik legjobban a szakköri órákkal kapcsolatos dolgokra. Az utolsó szakköri óra részletes óraterve (7.14) és a játékos kvíz kérdései (7.15) a mellékletek között találhatóak meg.

6.3.7.2. Az óra menete

Az óra első 20 percében tehát az előző gyakorlati órán készített CFU lemezek elemzése folyik. A lemezeken látottakat a diákok ez esetben párokban olvassák le, mivel ez már a második olyan alkalom, ahol CFU lemezek eredményeit kell kiértékelni. A diákoknak az előző CFU értékeléshez hasonlóan meg kell számolniuk a baktériumok számát egy adott sorban, majd következtetniük kell arra, hogy abban a baktériumkultúrában, amelyből készítettük a hígítási sort, vajon mennyi baktérium volt.

Az utolsó óránk további részében a tudás összegzésén és ellenőrzésén van a hangsúly. Először egy online gondolattérképet (37. ábra) készítünk a Jamboard online weboldal segítségével (a diákok a gondolattérképeket lapon is elkészíthetik, ha az online alkalmazás használata nem megoldható). A diákok csoportmunka keretein belül dolgoznak. Minden csoport egy adott szakköri órának a témáját dolgozza fel úgy, hogy a kísérlethez kapcsolódó fogalmakat sorolják fel. Az információk összegyűjtése után az általuk készített gondolattérképet be kell mutatniuk a társaiknak.



37. ábra
Egy általam készített gondolattérkép az egyes gyakorlati órákhoz kapcsolódó legfontosabb fogalmakkal.

A tudás ellenőrzése egy Kahoot kvízen (7.15) keresztül történik. Ennek során a diákoknak tíz egyszerű vagy többszörös választás jellegű kérdésre kell válaszolniuk minél gyorsabban. A rendszer a helyes válaszok és a gyorsaság szerint rangsorolja a diákokat, így sok esetben az a döntő, hogy ki milyen gyorsan válaszol. A csoport jellegétől függően a Kahoot kvíz játszható egyéni vagy páros munka keretein belül.

Összességében úgy gondolom, hogy ezeken a rendszerező, ismétlő és tudást ismétlő feladatokon, játékokon keresztül sikerül a diákokkal élményszerű formában átismételni a szakköri órákon elhangzottakat, így motiválva őket egy jövőbeli biológia szakkörön való részvételre is.

6.4. A szakkör értékelése, kitekintés a jövőbe

A szakdolgozati témámhoz kapcsolódó szakkör tervezésekor a fő célom az volt, hogy a kérdőív során gyűjtött információkra alapozva egy valóban hatékony szakkört tervezzek. A diákok tudásának kibővítése mellett az volt a célom, hogy számos olyan érdekes és tanulságos kísérletet végezzenek el a tanulók, amelyek az élményszerű oktatás vonalát erősítik. A diákoknak a gyakorlati órákon keresztül így lehetőségük van jobban megismerni a számunkra szabad szemmel nem látható, azonban óriási jelentőségű baktériumokat. Úgy gondolom, hogy azzal, hogy a kísérleteket maguk végzik el és lehetőségük van a laborban végzett munkák kipróbálására, erősödik bennük a biológia szeretete és az érdeklődésük a tantárgy iránt. Emellett, a biológia tudománya iránti elköteleződésük is növekedhet, így elősegítve azt, hogy olyan hivatást válasszanak maguknak a jövőben, ahol a biológia tudásukat is használniuk kell.

A hosszú tanítási gyakorlaton szerzett tanítási tapasztalataim és a kérdőívben adott válaszok alapján is azt mondhatom, hogy a diákok örömmel vesznek részt gyakorlati órákon. A tanév során a jelenléti oktatás keretein belül volt lehetőségem öt növényszervezettanhoz kapcsolódó gyakorlati órát tartani tizedikes, nem biológia tagozaton tanuló, de a természettudományok iránt érdeklődő diákoknak. A diákok többségén azt vettem észre, hogy nagyon élvezték, hogy ők maguk végeznek el kísérleteket és izgalommal töltötte el őket a várakozás, hogy vajon mit fognak látni a mikroszkópban, vagy éppen milyen eredményeket kapnak a kísérletek során. A gyakorlati évem során szerzett tapasztalataim miatt döntöttem úgy, hogy a szakdolgozatomhoz kapcsolódóan mindenképpen egy olyan szakkör tervezetet szeretnék készíteni, amely sok-sok változatos és érdekes gyakorlati órából épül fel. A pandémia miatt a szakköri terveimet sajnos nem sikerült kipróbálnom osztálytermi keretek között. Azonban bízom abban, hogy tanári hivatásom során a jövőben lesz lehetőségem egy ehhez hasonló tematikájú szakkört tartani gimnáziumi diákok részére, ahol még inkább motiválhatom őket a tantárgy érdekességeinek bemutatásán keresztül.

7. MELLÉKLETEK

7.1. A diákok előzetes tudásának a felmérésére készített kérdőív [85]

Általános kérdések:

1. Hányadik évfolyamra jársz?
    a. 9. évfolyam
    b. 10. évfolyam

2. Milyen típusú osztályba jársz?
    a. társadalomtudományi tagozat („a” osztály)
    b. természettudományi tagozat („b” osztály)
    c. általános tantervű osztály („d” osztály)

3. Előreláthatólag tervezel-e biológiából érettségizni, szükséged lesz-e a biológiára a továbbtanuláshoz (pl. orvosi egyetem, gyógyszerész szak stb.)?
    a. igen
    b. nem
    c. nem tudom

4. Ha lenne rá lehetőséged, akkor részt vennél-e az adott témakört feldolgozó szakkörön?
    a. igen
    b. nem
    c. talán

Baktériumok

5. Korábbi tudásod alapján az alábbi betegségek közül melyeket okozzák baktériumok?
    a. bárányhimlő
    b. kanyaró
    c. kolera
    d. tuberkulózis
    e. mumpsz
    f. lepra
    g. ebola
    h. pestis
    i. szamárköhögés
    j. influenza

6. Írd le röviden saját szavaiddal, hogy mik a különbségek a baktériumok és a vírusok között!

7. Mit gondolsz, a szappanos vagy a fertőtlenítőszeres kézmosás hatékonyabb a baktériumok ellen?

a. szappanos kézmosás
b. fertőtlenítőszeres kézmosás
c. ugyanolyan hatékonyak

Antibiotikumok:

8. Mikor szedtél utoljára antibiotikumot?
   a. az utóbbi egy hónapban
   b. az utóbbi hat hónapban
   c. az utóbbi egy évben
   d. régebben, mint egy éve
   e. soha
   f. nem emlékszem

9. Milyen antibiotikumokat (antibiotikum hatóanyagokat) ismersz?

10. Milyen természetes antimikrobiális (baktérium ellenes) vegyületeket, anyagokat (pl. teafaolaj) ismersz?

11. Döntsd el, hogy szerinted az alábbi állítások igazak vagy hamisak!

	Igaz	Hamis	Nem tudom
Az antibiotikumok bakteriális fertőzések kezelésére alkalmas gyógyszerek.			
Az antibiotikumok képesek elpusztítani a vírusokat.			
Az antibiotikumoknak nincs hatásuk az ember saját baktérium flórájára.			
Az antibiotikumok szedése abbahagyható, amint jobban érzed magadat.			
Az antibiotikumok szedése mellett probiotikumokat is érdemes szedni.			

Antibiotikum rezisztencia

12. Fogalmazd meg saját szavaiddal, hogy mit jelent az antibiotikum rezisztencia!

13. Mennyire értesz egyet a következő állításokkal?

	Teljes mértékben egyetértek	Egyetértek	Nem értek egyet	Egyáltalán nem értek egyet
Az orvosnak csak akkor kellene antibiotikumot				

felírnia, amikor az tényleg indokolt.				
Az embereknek mindig be kellene szedniük az előírt dózisú antibiotikumot.				
Antibiotikum rezisztencia kialakulását segítheti, ha valaki idő előtt abbahagyja az antibiotikum szedését.				
Antibiotikum rezisztencia kialakulását segítheti a túl sok antibiotikum használata.				
Ha helyesen szedem az antibiotikumokat, akkor nem fenyeget a rezisztens baktériumokkal való megfertőződés veszélye.				
Vannak olyan baktériumok, amelyek számos antibiotikumra nézve rezisztensek.				
A gyógyszercégeknek új antibiotikumokat kellene kifejleszteniük a rezisztencia megakadályozása érdekében.				
Minden embernek felelősséget kellene vállalnia az antibiotikum rezisztencia megállításában.				

A tuberkulózis betegség

14. Hallottál-e már a tuberkulózis (TBC) betegségéről?
    a. igen
    b. nem

A következő kérdésekre csak akkor válaszolj, ha az előző kérdésre igennel válaszoltál, tehát már hallottál a betegségről.

15. Mit gondolsz, világszerte évente hány embert érint a tuberkulózissal való megfertőződés?
    a. kb. 100 ezer
    b. kb. 1 millió
    c. kb. 10 millió
    d. kb. 100 millió

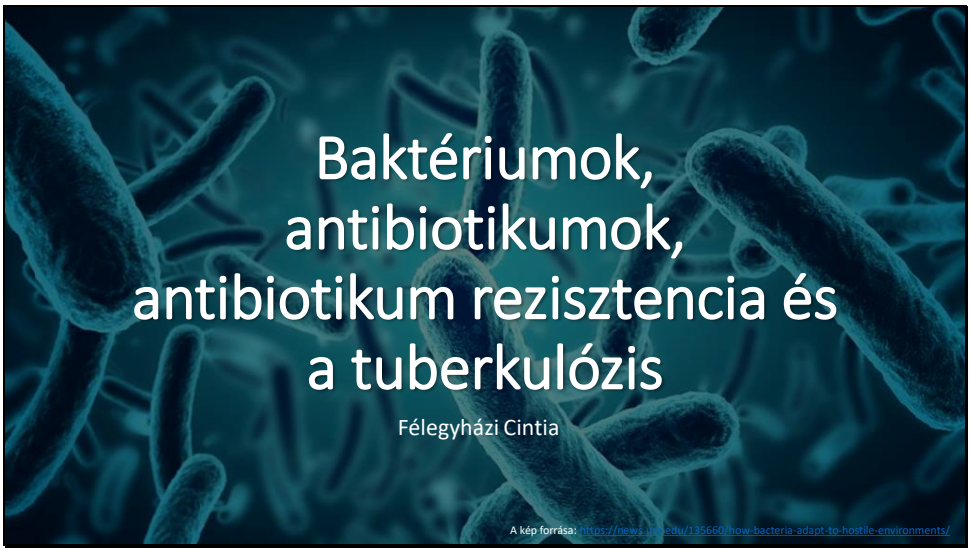
16. Hallottál-e arról, hogy a fejlett országok hogyan védekeznek a tuberkulózis ellen?

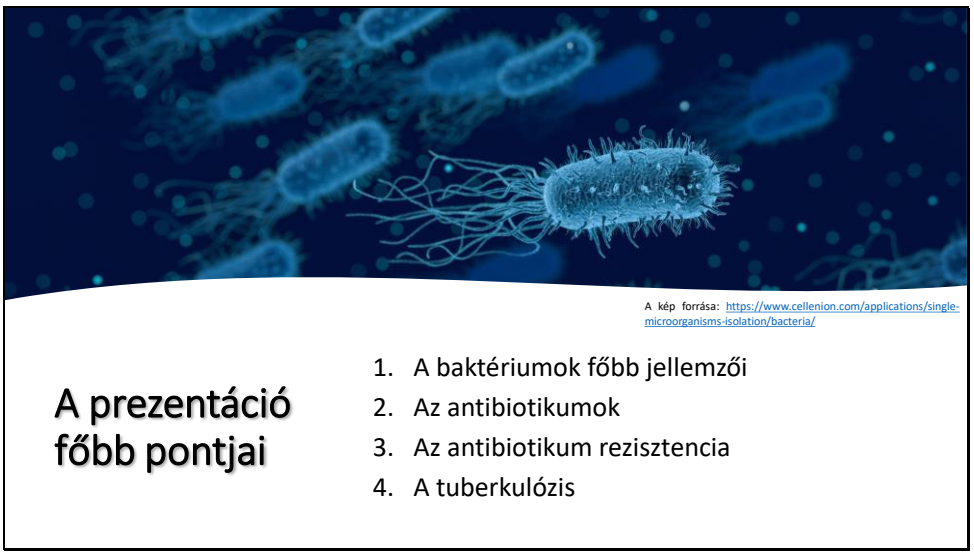
7.2. Az első szakköri óra óraterve

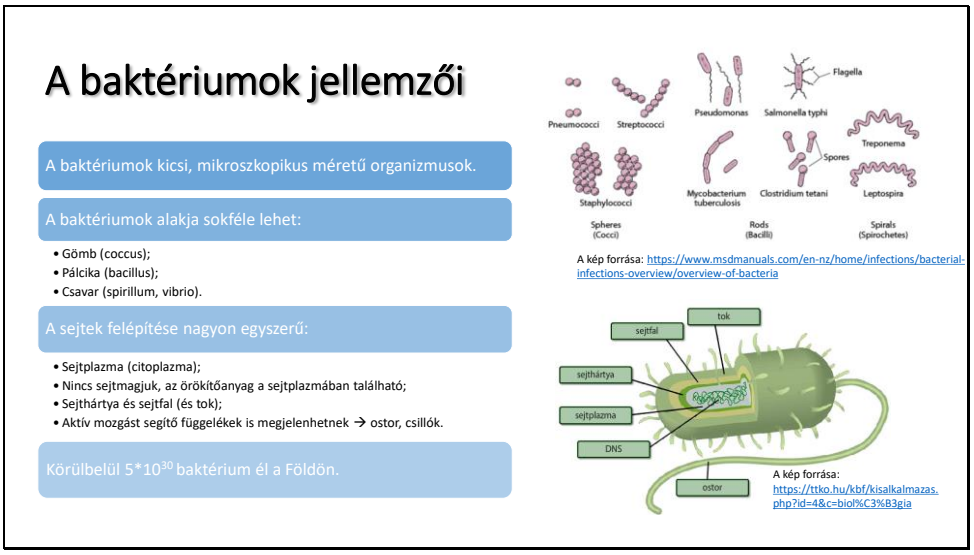
Idő	Az óra menete	Módszer	Munkaforma	Anyagok, eszközök	Megjegyzések
4’	Köszöntés, célkitűzések	megbeszélés	-	-	Az óra első mozzanata a diákok köszöntése a szakkörön. A szakkör célja: a baktériumokkal, antibiotikumokkal, rezisztenciával és a tuberkulózissal kapcsolatos korábbi tudás bővítése különféle gyakorlati órákon keresztül. Az óra célja: az elméleti tudás megszerzése.
8’	Mi jut eszedbe a baktériumokról?	brainstorming (korábbi tudás felidézése)	páros munka	számítógép, projektor, Mentimeter szófelhő készítő weboldal	A diákok párokban összegyűjtenek olyan kifejezéseket, amelyek a baktériumokkal kapcsolatosan eszükbe jutnak. Az összegyűjtött szavak weboldalra történő beírása után a szavak megjelennek a kivetítőn, így mindenki látni fogja az összegyűjtött kifejezéseket.
10’	A baktériumok	megbeszélés, kérdve kifejtés	frontális, tanári magyarázat	számítógép, ppt (7.3)	Az óra ezen részén átismételjük a baktériumok főbb jellemzőit: ➢ a baktériumok alakja; ➢ a főbb sejtalkotók; ➢ a baktériumok életmódjának sokfélesége; ➢ a baktériumok esetében jellemző szaporodási formák.
10’	Antibiotikumok	megbeszélés, kérdve kifejtés	frontális, tanári magyarázat	számítógép, ppt (7.3)	Az antibiotikumokat a következő szempontok alapján vizsgáljuk meg: ➢ antibiotikum fogalma: mikroorganizmusok által vagy szintetikusan előállított vegyületek, amelyek

					korlátozzák a baktériumok növekedését, vagy megölik azokat; ➢ az antibiotikum felfedezése (A. Fleming); ➢ az antibiotikumok csoportosítása; ➢ az antibiotikumok hatásmechanizmusa, példákkal szemléltetve; ➢ a baktérium és vírus közötti különbségek, antibiotikum használata.
10’	Antibiotikum rezisztencia	megbeszélés, kérdve kifejtés	frontális, tanári magyarázat	számítógép, ppt (7.3)	A következő szempontokat vesszük figyelembe: ➢ antibiotikum rezisztencia lehetséges módjai (a teljesség igénye nélkül); ➢ az antibiotikum rezisztencia, mint probléma; ➢ az antibiotikum rezisztencia okai.
8’	Az antibiotikum rezisztencia problémájának lehetséges megoldásai	csoportos, majd közös megbeszélés	kooperatív csoportmunka	-	A diákok csoportokban ötleteket gyűjtenek ahhoz, hogy hogyan lehetne megoldani ezt a problémát.
8’	Tuberkulózis	megbeszélés, kérdve kifejtés	frontális, tanári magyarázat	számítógép, ppt (7.3)	Az óra utolsó részében fontos kitérni a nagy mértékben rezisztens baktériumokra, így például a tuberkulózisra. A következő szempontok kerülnek figyelembe: ➢ mi ez a betegség, hol jellemző, mik a főbb tünetek; ➢ a tuberkulózis kezelési folyamata.
2’	Az óra tartalmának az összegzése	közös megbeszélés	frontális	-	-

7.3. Az első gyakorlati óra powerpoint bemutatója







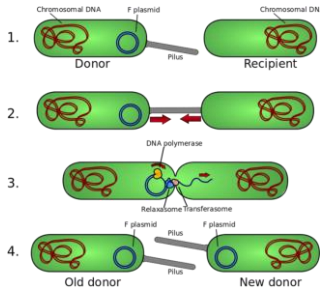
A baktériumok jellemzői

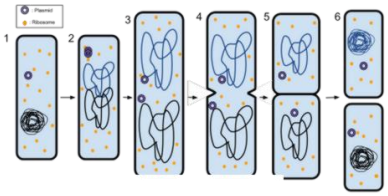
A baktériumok életmódja rendkívül sokrétű:

- Autotrófok → fotoautotrófok, kemoautotrófok.
- Heterotrófok → paraziták, szimbionták, szaprofiták.

A baktériumok szaporodása történhet ivaros és ivartalan módon:

- Ivaros → átmeneti egyesülés (konjugáció).
- Ivartalan → kettéosztódés (hasadás).





A képek forrása: https://hu.weblogographic.com/difference-between-binary-fission-and-conjugation-1741

Antibiotikumok

Mikroorganizmusok által vagy szintetikusan előállított vegyületek, amelyek korlátozzák a baktériumok növekedését, vagy megölik azokat.

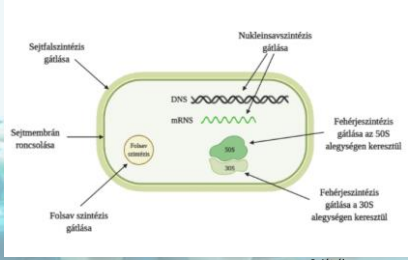
Felfedezője: Alexander Fleming – penicillin.

Az antibiotikumok csoportosítása:

- Szűk és széles spektrumú antibiotikumok;
- Bakteriosztatikus és baktericid hatású antibiotikumok.

Hatásmechanizmus → sokféle módon fejthetik ki hatásukat.

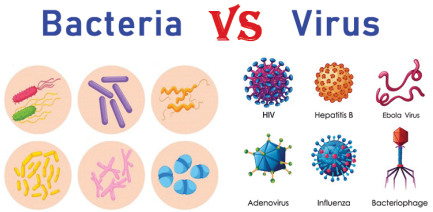
A kép forrása: https://time.com/4250235/penicillin-1942-history/



Saját ábra

Baktériumok vs. vírusok

- Az antibiotikumok a vírusokkal szemben hatástalanok.



A kép forrása: https://microbenotes.com/differences-between-bacteria-and-virus/

Baktériumok által okozott betegségek

kolera, tuberkulózis, lepra, pestis, szamárköhögés, lépfene, szalmonellózis, tetanusz

Antibiotikum? **IGEN**

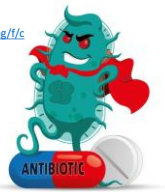
Vírusok által okozott betegségek

bárányhimlő, ebola, influenza, kanyaró, mumpsz, AIDS, fekete himlő, HPV

Antibiotikum? **NEM**

Antibiotikum rezisztencia

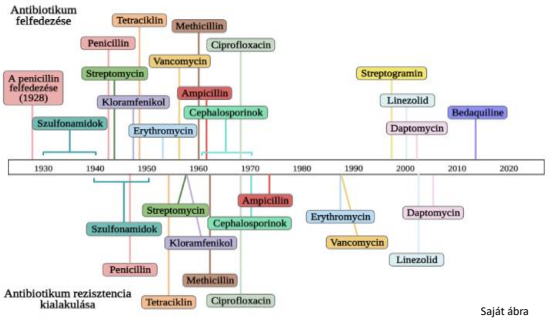
A kép forrása: https://coastalpedscare.com/blog/f/combating-antibiotic-resistance



Az utóbbi évszázadban nagy problémát okoz az, hogy egyre több baktérium rezisztens az antibiotikumokra.

Az antibiotikum rezisztencia lehetséges mechanizmusai:

- Antibiotikum felvételének akadályozása;
- Antibiotikum eltávolítása a sejtből;
- A sejtbe került antibiotikum lebontása;
- Az antibiotikum támadáspontjának a módosítása.

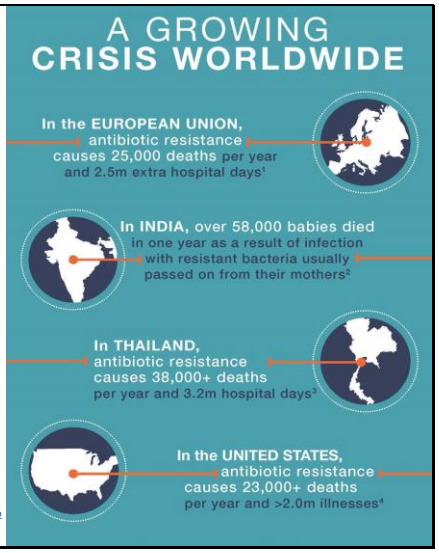


Saját ábra

Miért probléma az antibiotikum rezisztencia?

- A kezelések sikertelenségéhez vezethet.
- Számos betegség kezelhetetlenné válhat.
- A rezisztens baktériumok számos ember halálát okozzák világszerte.

A kép forrása: https://www.cdc.gov/globalhealth/infographics/antibiotic-resistance/antibiotic_resistance_global_threat.htm



Mik az antibiotikum rezisztencia kialakulásának elősegítői?

- Túlzott mértékű antibiotikum használat
- Az antibiotikumok előírttól eltérő szedése (pl. az antibiotikum terápia korábbi befejezése)
- A mezőgazdaságban való túlzott antibiotikum használat
- Fertőzések veszélye a kórházakban
- Nem megfelelő higiéniai körülmények
- Új antibiotikumok felfedezésének hiánya

A kép forrása: https://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/education,-awareness-and-behaviour-change/infographics/infographic-causes-of-antibiotic-resistance

Hogyan lehetne megoldani az antibiotikum rezisztencia problémáját? Mit tehetünk mi, emberek?

A kép forrása: https://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/education,-awareness-and-behaviour-change/infographics/infographic-what-you-can-do

- Csak akkor szedjünk antibiotikumot, amikor azt az orvos javasolja.
- Mindig az előírt mennyiségű antibiotikumot szedjük be, ne hagyjuk abba a szedést, ha már jobban érezzük magunkat.
- Sose használjunk „maradék" antibiotikumot.
- Sose használjunk antibiotikumot valaki mással közösen.
- Figyeljünk a higiéniára – kézmosás, beteg emberek elkerülése, védőoltások.

A tuberkulózis

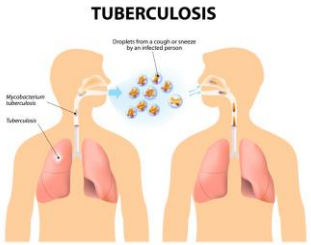
A tuberkulózis a Mycobacterium tuberculosis által okozott fertőző betegség.

- Globálisan évente kb. 10 millióan betegszenek meg → ebből 1,5 millió ember halálát okozza.

Főbb tünetek: láz, fáradtság, étvágytalanság, éjjeli izzadás.

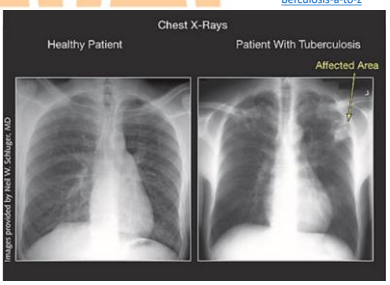
Kezelése:

- Antituberkulotikumokkal kezelik.
- A terápia hat hónapig tart:
  - 1.-2. hónap → ripampicin, isoniazid, pirazinamid és ethambutol
  - 3.-6. hónap → rifampicin és isoniazid.



A kép forrása: https://microbiology84.wordpress.com/2019/03/11/tuberculosis-is-it-a-death-sentence/

A kép forrása: https://www.health.harvard.edu/a_to_z/tuberculosis-a-to-z



7.4. A második szakköri óra óraterve

Idő	Az óra menete	Módszer	Munkaforma	Anyagok, eszközök	Megjegyzések
2’	A diákok köszöntése, a gyakorlat témájának az elmondása	-	frontális	-	Az óra céljai: ➢ a laboratóriumi szabályok átismétlése; ➢ az eszközök megismerése, használatuk felelevenítése; ➢ hígítási sor készítése.
5’	A laboratóriumi szabályok átismétlése	tanári magyarázat, közös megbeszélés	frontális	-	A főbb laboratóriumi szabályok a következők: ➢ csak a munkalapokon szereplő feladatokat szabad elvégezni, tanári felügyelet mellett (egyedül dolgozni a laborban tilos); ➢ a laboratóriumba ételt, italt bevinni tilos; ➢ a laboratóriumból vegyszert kivinni tilos; ➢ a táskát és a ruhadarabokat a teremben egy helyen kell lerakni; ➢ bármilyen probléma esetén a tanárhoz kell fordulni (pl. vegyszer bőrre kerülése, eszköz eltörése esetén); ➢ a diákok magatartása legyen kellően fegyelmezett; ➢ a kísérletek elvégzése közben laborköpeny viselése ajánlott; ➢ a gyakorlati órákon kísérletek végzése közben egyszer használatos gumikesztyű viselése kötelező.

8’	A laboratóriumi eszközök, automata pipetta használata	szemléltetés	frontális, közös munka	laboratóriumi eszközök, munkalap (7.5)	A diákok előzetes tudására alapozva megbeszéljük, hogy milyen eszközök találhatók a laborban, kiemelt tekintettel a gyakorlatok során használt eszközökre. A bemutatott eszközök: digitális labormérleg, kémcső, kémcsőállvány, kémcsőfogó, mérőhenger, Erlenmeyer-lombik, Bunsen-égő, spriccflakon, vegyszeres kanalak, szélesztőbot, pipetta, automata pipetta. A tanár megmutatja az automata pipetta használatát.
5’	A hígítási sor készítésének folyamata	tanári magyarázat, közös megbeszélés	frontális, közös munka	tábla	A tanár elmagyarázza az adott gyakorlati feladat, a hígítási sorok készítésének menetét.
3’	Eszközök összeszedése, párok alkotása	-	páros munka	brómfenolkék festék, szörp, laboratóriumi eszközök: kémcső, kémcsőállvány, spriccflakon (víz), automata pipetta, pipettahegyek.	A diákok párokat alkotnak és tanári segítséggel összegyűjtik a hígítási sorok készítéséhez szükséges anyagokat, eszközöket.
32’	A hígítási sorok elkészítése	kísérletezés, munkalap kitöltése	páros munka	a korábban is említett anyagok és laboratóriumi eszközök, gyakorlati munkalap (7.5)	A diákok párban kétféle hígítási sort készítenek; az egyikhez brómfenolkék festéket, a másikhoz szörpöt használnak. A kísérlet menetét és a kísérlethez kapcsolódó kérdéseket a gyakorlati munkalapon találják meg. A tanár feladata a tanulók segítése, az esetleges kérdések megválaszolása.
5’	A kísérlet megbeszélése	közös megbeszélés	frontális, közös munka	-	Az óra utolsó mozzanata a kísérlet közös megbeszélése, a tapasztaltak összegzése.

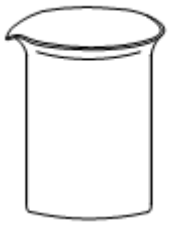
7.5. A második szakköri órához tartozó gyakorlati munkalap

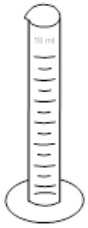
Gyakorlati munkalap

A laboratóriumi szabályok, laboreszközök és hígítási sor készítése

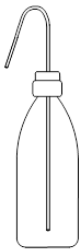
I. Laboratóriumi eszközök

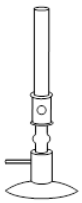
1. Nevezd meg a képeken látható laboreszközöket!

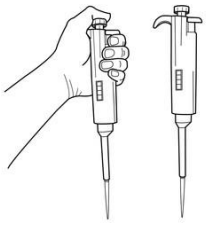




_____ _____ _____ _____







_____ _____ _____

II. Hígítási sor készítése

<u>Szükséges anyagok, eszközök:</u>

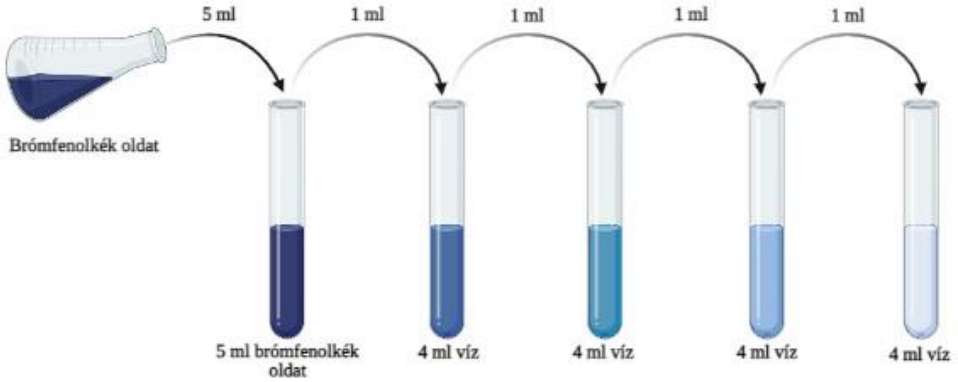
Brómfenolkék oldat, szörp, mérőhenger, kémcső (10 db), kémcsőállvány, vízzel töltött spriccflakon, automata pipetta, pipettahegyek.

<u>A kísérlet menete:</u>

a) Hígítási sor készítése brómfenolkék használatával

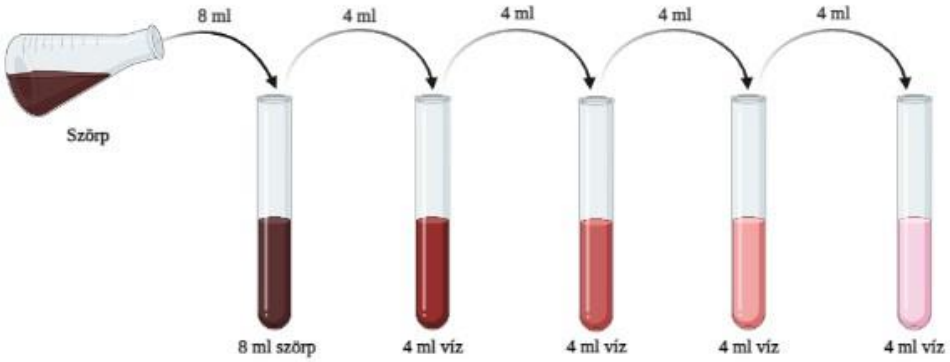
1. Lásd el felirattal a kémcsöveket (számozás) és helyezd a már feliratozott kémcsöveket a kémcsőállványba.
2. Mérj ki mérőhenger segítségével 5 ml brómfenolkék oldatot, majd ezt öntsd az 1-es számú kémcsőbe.
3. A többi (2.-5.) kémcső mindegyikébe mérj ki 4-4- ml vizet.

4. Ezt követően az 1. kémcsőből pipetta segítségével mérj át 1 ml brómfenolkék oldatot a 4 ml vizet tartalmazó 2-es számú kémcsőbe. Jól keverd össze.
5. Ha összekeverted, akkor a 2. kémcsőből pipetta segítségével mérj át 1 ml oldatot a 3. kémcsőbe, majd ismét keverd össze az oldatot.
6. Az előző pontban leírt mechanizmust folytasd addig, amíg az utolsó kémcsőig érsz.



b) Hígítási sor készítése szörp használatával

1. Lásd el felirattal a kémcsöveket (számozás) és helyezd a már feliratozott kémcsöveket a kémcsőállványba.
2. Mérj ki mérőhenger segítségével 8 ml szörpöt, majd ezt öntsd az 1-es számú kémcsőbe.
3. A többi (2.-5.) kémcső mindegyikébe mérj ki 4-4- ml vizet.
4. Ezt követően az 1. kémcsőből pipetta segítségével mérj át 4 ml szörpöt a 4 ml vizet tartalmazó 2-es számú kémcsőbe. Jól keverd össze.
5. Ha összekeverted, akkor a 2. kémcsőből pipetta segítségével mérj át 4 ml oldatot a 3. kémcsőbe, majd ismét keverd össze az oldatot.
6. Az előző pontban leírt mechanizmust folytasd addig, amíg az utolsó kémcsőig érsz.



Feladatok:

1. Az alábbi táblázat a kísérlet során használt anyagok (brómfenolkék oldat, szörp, desztillált víz) mennyiségét tartalmazza. Egészítsd ki a táblázat hiányzó részeit a megfelelő mennyiségek beírásával!

	1. hígítási sor (brómfenolkék)					**2. hígítási sor (szörp)**				
Kémcsövek sorszáma	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Brómfenolkék oldat (ml)						**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
Szörp (ml)	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**					
(Desztillált) víz (ml)										

2. Hányszoros hígítás történt az egyes hígítási sorok készítése során?
   a) Hígítás mértéke az 1. esetben (brómfenolkék): _____
   b) Hígítás mértéke a 2. esetben (szörp): _____

7.6. A harmadik szakköri óra óraterve

Idő	Az óra menete	Módszer	Munkaforma	Anyagok, eszközök	Megjegyzések
2’	A diákok köszöntése, a gyakorlat témájának az elmondása	-	frontális	-	Az óra céljai: ➢ a táptalajok készítésének a megismerése; ➢ a lemezek öntésének a technikájának a megtanulása; ➢ a környezetünkben élő baktériumok demonstrálása; ➢ a kézmosás és kézfertőtlenítés fontosságának a vizsgálata.
6’	Elméleti rész – táptalajok készítése, lemezek öntése	tanári magyarázat, közös megbeszélés	frontális	-	A harmadik szakköri órán a felsorolt három különféle gyakorlattal fogunk foglalkozni, amelynek módját beszéljük meg elsőként. Fontos felhívni a figyelmet a balesetveszélyre – meleg tápoldatok, öngyújtó használata, alkohol.
10’	Lemco agar tápoldat készítése	kísérletezés	csoportmunka (3-4 fős csoportok)	gyakorlati munkalap (7.7), tápoldat készítéséhez szükséges anyagok (Lemco por, nátrium-klorid, Bacto Pepton, Bacto Agar, desztillált víz), laboratóriumi eszközök (digitális labormérleg, főzőpohár, vegyszeres kanalak, folyadéküveg)	A diákok három fős csoportokban elkészítik a tápoldatot a gyakorlati munkalapon található információk felhasználásával. A tanár feladata a diákok segítése a tápoldatok készítése közben, és az esetleges kérdésekre való válaszadás.

18’	Agar lemez táptalaj öntése	kísérletezés	egyéni munka / páros munka	gyakorlati munkalap (7.7), táptalaj öntéséhez szükséges anyagok (steril Lemco agar tápoldat), laboratóriumi eszközök (lemezek, gyertya / Bunsen-égő)	A diákok páronként kapnak egy-egy megmelegített, használatra kész Lemco agar tápoldatot. A feladatuk páronként 10 táptalaj öntése. A gyertya/Bunsen-égő melletti munka lehetővé teszi azt, hogy a lemezek ne fertőződjenek be, mert a felfelé történő légáramlás steril környezetet biztosít. A tanár feladata a táptalajok öntése közbeni kérdések megválaszolása és a diákok segítése a munka során.
10’	A környezetünkben élő baktériumok demonstrálása	kísérletezés	egyéni munka	gyakorlati munkalap (7.7), lemez agar táptalaj, mintavevő pálca (csipesz és vatta)	A diákok feladata egy általuk választott helyről (pl. telefon, kilincs) a mintavevő pálca (vagy csipesz és vatta) segítségével mintát venni. Ezt követően a mintát a diákok szétkenik a táptalajon.
10’	A kézmosás és kézfertőtlenítés fontossága	kísérletezés	egyéni munka	gyakorlati munkalap (7.7), lemez agar táptalaj, szappan, kézfertőtlenítő	A diákok feladata az, hogy a következő feladat elvégzése után helyezzék ujjukat a lemez egyik harmadára, majd ugyanezt tegyék meg szappanos kézmosás és kézfertőtlenítő használata után is.
4’	A kísérletek megbeszélése	közös megbeszélés	frontális, közös munka	-	Az óra utolsó mozzanata a kísérlet közös megbeszélése, a tapasztaltak összegzése. Az eredmények értékelése az ötödik szakköri órán történik.

7.7. A harmadik szakköri órához tartozó gyakorlati munkalap

Gyakorlati munkalap

Táptalaj és tápoldat készítése, lemez agar táptalaj öntése. A környezetünkben élő baktériumok demonstrálása, a kézmosás hatékonyságának megismerése.

I. Táptalaj és tápoldat készítése

Szükséges anyagok, eszközök:

Lemco por, nátrium-klorid, Bacto Pepton, Bacto Agar, desztillált víz, digitális labormérleg, főzőpohár, vegyszeres kanalak, folyadéküveg.

A gyakorlat menete:

1. A táptalaj készítéséhez digitális labormérleg segítségével mérd ki az alábbi táblázatban látható szilárd anyagokat egy-egy főzőpohárban. A különböző vegyszerek kiméréséhez mindig új, tiszta vegyszeres kanalat használj!

	Lemco agar
Lemco por	1,25 g
Nátrium-klorid (NaCl)	1,25 g
Bacto Pepton	2,5 g
Bacto Agar	3,75 g
Desztillált víz	200 ml

2. Az anyagok kimérése után a szilárd anyagokat öntsd bele egy folyadéküvegbe, majd add hozzá a desztillált vizet.
3. A folyadék hozzáadása után a folyadéküvegre csavard rá a kupakod, majd jól rázd össze az oldatot.
4. Végül, a folyadéküvegre ragassz címkét, amelyre írd rá a nevedet (a neveiteket). Ez után a folyadéküveget add oda a tanárodnak. (Ha van rá lehetőség, akkor a tanárod autoklávozással fogja sterilizálni a tápoldatokat.)

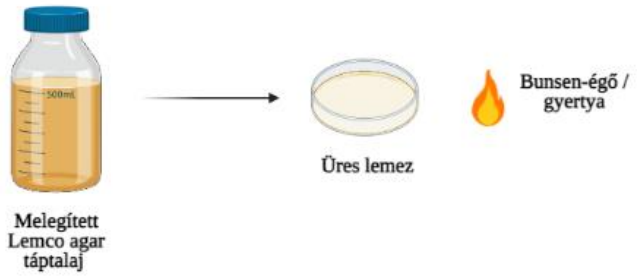
II. Lemez agar táptalaj öntése

Szükséges anyagok, eszközök:

Steril Lemco agar tápoldat, lemezek, gyertya/Bunsen-égő (*a felfelé történő légáramlás steril környezetet biztosít a táptalajok öntésekor*)

A gyakorlat menete:

1. Gyújtsd meg a gyertyát magad mellett. / Gyújtsd meg a Bunsen-égőt magad mellett (ha nem használtad korábban ezt az eszközt, akkor ehhez kérj segítséget a tanárodtól).
2. Az így létrehozott (viszonylag) steril körülmények között csavard le a már megmelegített és steril Lemco agar tápoldat kupakját, majd a lemezek fedelét leemelve önts ki kb. 15 ml-t a lemezre (ez a mennyiség pont elfedi a lemez alját).
3. Helyezd vissza a lemez fedelét és várd meg, amíg megszárad a táptalaj.
4. A leírt mechanizmus alapján önts 5 lemezre tápoldatot. (Így páronként összesen 10 lemezetek lesz.)
5. Várd meg, amíg megszáradnak, majd a lemezekre írd fel a monogramodat.



III. A környezetünkben élő baktériumok demonstrálása.

Szükséges anyagok, eszközök:

Lemez agar táptalaj (diákonként 1 db), mintavevő pálca (csipesz és vatta).

A kísérlet menete:

1. A mintavevő pálca segítségével vegyél mintát egy általad választott felületről (pl. telefon képernyője, cipő talpa, kilincs).
2. A mintát kend szét a táptalajon, majd fedd le a lemezt.
3. A lemezeket 28 °C-on inkubáljuk.

Feladatok (az eredmények értékelésekor):

1. Rajzold le, amit a lemezen látsz!

2. A látottak alapján mit gondolsz, mennyire szennyezett az adott felület? Miért?

_____

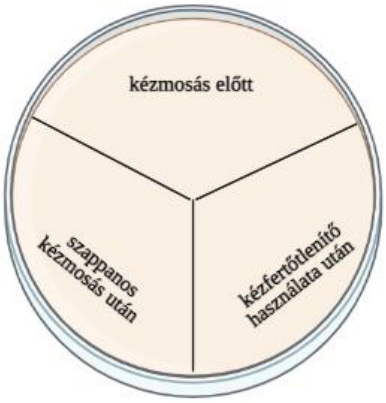
IV. A kézmosás hatékonyságának megismerése.

Szükséges anyagok, eszközök:

Lemez agar táptalaj (diákonként 1 db), szappan, kézfertőtlenítő.

A kísérlet menete:

1. A lemezt egy filmtoll segítségével oszd három részre és a részeket lásd el a következő feliratokkal:
    a. kézmosás előtt
    b. szappanos kézmosás után
    c. kézfertőtlenítő használata után



2. Ezt követően a hüvelykujjadat helyezd rá a lemez „kézmosás előtt” részére.
3. Moss kezet szappannal, majd helyezd a hüvelykujjadat a lemez „szappanos kézmosás után” részére.
4. Használj kézfertőtlenítőt, majd helyezd a hüvelykujjadat a lemez „kézfertőtlenítő használata után” részére.
5. Végül fedd le a lemezt.
6. A lemezeket 28 °C-on inkubáljuk.

Feladatok (a kísérlet elvégzésekor):

1. Mit gondolsz, melyik esetben lesz a legkevesebb baktérium a táptalajon?
    a. kézmosás előtt
    b. szappanos kézmosás után
    c. kézfertőtlenítő használata után

Feladatok (az eredmények értékelésekor):

1. Rajzold le, amit a lemezen látsz!

2. A lemezen látható eredmények megfelelnek-e a várakozásaidnak?

_____

3. Mit gondolsz, milyen hátránya lehet annak, ami az egyik esetben megfigyelhető? (kevés számú baktérium/nincs baktérium)

_____

7.8. A negyedik szakköri óra óraterve

Idő	Az óra menete	Módszer	Munkaforma	Anyagok, eszközök	Megjegyzések
2’	A diákok köszöntése, a gyakorlat témájának az elmondása	-	frontális	-	Az óra céljai: ➢ az előző gyakorlati óra értékelése; ➢ a baktériumok szélesztési technikájának a megismerése; ➢ különféle antibiotikumok, természetes antimikrobiális vegyületek és nehézfémek baktériumokra való hatásának a vizsgálata.
6’	Az órai gyakorlatok menetének megbeszélése	tanári magyarázat, közös megbeszélés	frontális	-	Közösen megbeszéljük a gyakorlatok menetét.
20’	Baktériumok szélesztése szélesztőbot segítségével	kísérletezés	egyéni munka / páros munka	gyakorlati munkalap (7.9), anyagok (lemez agar táptalaj, baktérium szuszpenzió, alkohol), laboratóriumi eszközök (pipetta, szélesztőbot, Bunsen-égő/öngyújtó)	A diákok feladata a baktérium szuszpenzió szélesztése az általuk előző órán elkészített agar táptalajokra. A diákoknak páronként 6 lemezre kell baktériumot szélesszteniük. (Ebből kettőt inkubálunk, négyet pedig a következő kísérletek során használunk fel.) A tanár feladata a diákok munkájának segítése. Emellett nagyon fontos, hogy a tanár felhívja a figyelmet az alkohollal és tűzhasználattal kapcsolatos tudnivalókra.
10’	Az antibiotikumok	kísérletezés	páros munka	gyakorlati munkalap (7.9), szélesztett	A diákok feladata az, hogy az előző feladatban

	baktériumokra való hatása			baktériumok – agar lemezek (1 db), antibiotikum korongok (vagy antibiotikummal átitatott szűrőpapír darab), csipesz, vonalzó	szélesztett baktériumokat tartalmazó egyik lemezre antibiotikum korongot helyezzenek.
10’	A természetes antimikrobiális vegyületek baktériumokra való hatása	kísérletezés	páros munka	gyakorlati munkalap (7.9), szélesztett baktériumok – agar lemezek (2 db), természetes antimikrobiális anyagok és vegyületek (fokhagyma, gyömbér, szegfűszeg, teafa és fahéj illóolaj, csipesz, lyuk kiszúrására alkalmas eszköz	A diákok feladata az, hogy az előző feladatban szélesztett baktériumokat tartalmazó egyik lemezre fokhagymakarikát, gyömbérkarikát és egy darab szegfűszeget helyezzenek. Egy másik szintén baktériumokat tartalmazó lemezre pedig teafa és fahéj illóolajat kell önteniük.
10’	A nehézfémek baktériumokra való hatása	kísérletezés	páros munka	gyakorlati munkalap (7.9), szélesztett baktériumok – agar lemezek (1 db), réz-szulfát oldat, réz pénzérmék, csipesz, pipetta	A 4., diákok által szélesztett baktériumokat tartalmazó lemezre pedig réz-szulfát oldatot és réz pénzérmét kell helyezniük, így vizsgálva a nehézfémek hatását.
2’	A kísérletek megbeszélése	közös megbeszélés	frontális, közös munka	-	Az óra utolsó mozzanata a kísérlet közös megbeszélése, a tapasztaltak összegzése. Az eredmények értékelése a következő órán történik.

7.9. A negyedik órához tartozó gyakorlati munkalap

Gyakorlati munkalap

Baktériumok szélesztése szélesztőbot segítségével. Az antibiotikumok, a természetes antimikrobiális vegyületek és nehézfémek baktériumokra való hatásának a vizsgálata.

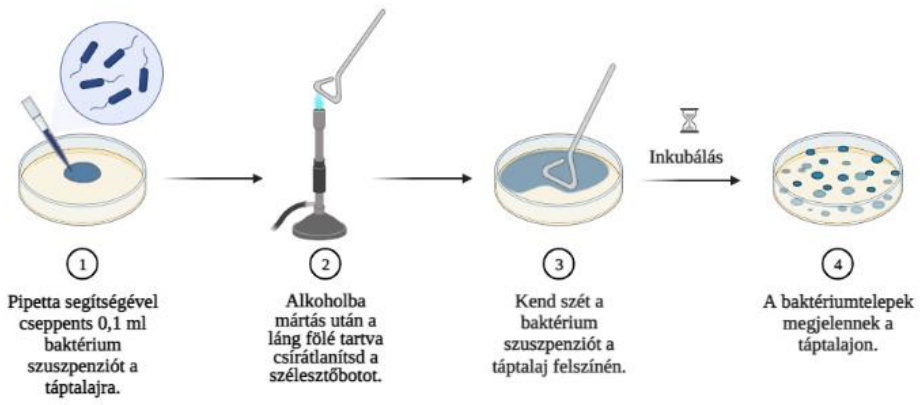
I. Baktériumok szélesztése szélesztőbot segítségével

Szükséges anyagok, eszközök:

Lemez agar táptalaj, baktérium szuszpenzió, pipetta, szélesztőbot, Bunsen-égő/öngyújtó, alkohol

A gyakorlat menete:

1. Az előző feladat során elkészített lemez agar táptalajok egyikének a fedelét nyisd ki résnyire.
2. Pipetta segítségével cseppents 0,1 ml (100 µl) baktérium szuszpenziót a táptalajra.
3. Ezt követően csírátlanítsd a szélesztőbotot – mártsd alkoholba, majd tartsd a Bunsen-égő lángjába / öngyújtóval gyújtsd meg.
4. A szélesztőbotot a lemezek fedelének a felső oldalához érintve hűtsd le.
5. Kend szét a baktérium szuszpenziót a táptalaj felszínén.
6. A lemezek fedelét helyezd vissza.
7. A fent leírt mechanizmus alapján szélessz baktériumot még két további táptalajon (tehát összesen páronként 6 szélesztett lemezetek legyen).
8. Az elkészített szélesztett lemezek közül kettőt a következő gyakorlatig 28 °C-on inkubálunk. Négy lemezzel pedig a következő feladatok során dolgozunk.



Feladatok (az eredmények értékelésekor):

1. Rajzold le, amit a lemezen látsz!

2. Hányféle baktérium nőtt ki a táptalajon? _____

3. Vajon miért nőtt ki ennyiféle baktérium a táptalajon?

   _____

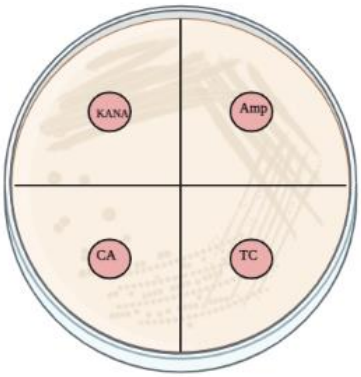
II. Az antibiotikumok baktériumokra való hatása

Szükséges anyagok, eszközök:

Szélesztett baktériumok – agar lemez (1 db), antibiotikum korongok (vagy antibiotikummal átitatott szűrőpapír darab), csipesz, vonalzó.

A kísérlet menete:

1. A korábbi feladat során elkészített, baktériumokat tartalmazó lemez alsó részét filctollal oszd fel négy részre.
2. Ez után válassz négy különböző antibiotikum korongot, és a rövidített betűjelüket írd a négy felosztott részre.
3. Helyezd el a négy féle antibiotikum korongot a baktériumokat tartalmazó táptalajon csipesz segítségével (a képen látható módon).
4. Helyezd vissza a lemezek fedelét.
5. A lemezeket a következő gyakorlatig 28 °C-on inkubáljuk.



Feladatok (a kísérlet elvégzésekor és az eredmények értékelésekor):

1. Az alább látható táblázatba a kísérlet elvégzésekor írd fel, hogy milyen antibiotikumokat használtál.
2. Az eredmények értékelésekor írd le, hogy mit látsz a lemezen az adott antibiotikum esetében.
3. Vonalzó segítségével mérd le az antibiotikum korongok körül látható körök (gátlási zónák) átmérőjét.

	Antibiotikum	**Mi látható a lemezen?**	**Gátlási zónák átmérője**
1.			
2.			
3.			
4.			

4. Mire következtetsz a gátlási zónák átmérőjének nagyságából?

   _____

   _____

5. Melyik antibiotikum hatékony a baktérium ellen?

   _____

6. Van-e olyan antibiotikum, amelyikkel szemben a baktérium rezisztens?

   _____

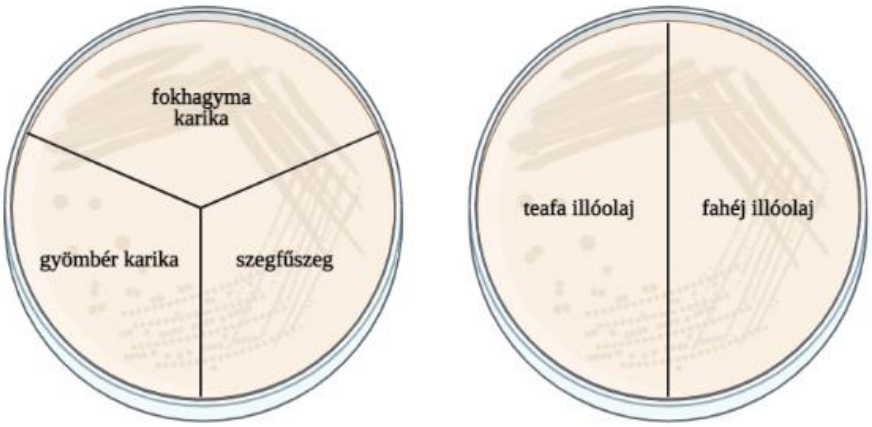
III. A természetes antimikrobiális vegyületek baktériumokra való hatása

Szükséges anyagok, eszközök:

szélesztett baktériumok – agar lemezek (2 db), természetes antimikrobiális anyagok és vegyületek (fokhagyma, gyömbér, szegfűszeg, teafa és fahéj illóolaj), csipesz, lyuk kiszúrásához alkalmas eszköz.

A kísérlet menete:

1. Páronként tegyetek magatok elé két olyan agar lemezt, amelyekre korábban baktériumokat szélesztettetek.
2. Az egyik lemez alsó részét filctollal oszd fel három részre, a másikat pedig két részre.
3. A három részre osztott lemezen szélesztett baktériumokra helyezd el a már előre elkészített fokhagyma és gyömbér karikát, illetve egy darab szegfűszeget.
4. A két részre osztott lemezre szúrj 2 lyukat, majd tegyél a táptalaj kilyukasztott részére 1-1 csepp teafa, illetve fahéj illóolajat.
5. Helyezd vissza a lemezek fedelét.
6. A lemezeket a következő gyakorlatig 28 °C-on inkubáljuk.



Feladatok (a kísérlet elvégzésekor és az eredmények értékelésekor):

1. Az alábbi táblázat első oszlopában láthatók a használt természetes antimikrobiális vegyületek. A kísérlet elvégzésekor töltsd ki a táblázat második oszlopát aszerint, hogy az egyes anyagok szerinted milyen mértékben gátolják a baktériumok növekedését. Az eredmények értékelésekor az előbbieknek megfelelően töltsd ki a harmadik oszlopot is.

Természetes antimikrobiális vegyületek	Előzetes várakozásaim a vegyületek hatásáról	Tapasztalatok a vegyületek hatásáról
fokhagyma		
gyömbér		
szegfűszeg		
teafa illóolaj		
fahéj illóolaj		

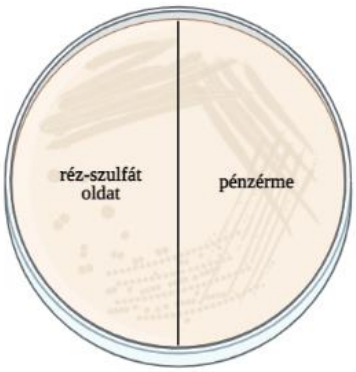
IV. A nehézfémek baktériumokra való hatása

Szükséges anyagok, eszközök:

Szélesztett baktériumok – agar lemez (1 db), réz-szulfát oldat, réz pénzérmék, csipesz, pipetta.

A kísérlet menete:

1. A korábbi feladat során elkészített, baktériumokat tartalmazó lemez alsó részét filctollal oszd fel két részre.
2. A táptalaj egyik felére szúrj egy lyukat, melybe helyezz egy csepp réz-szulfát oldatot.
3. A táptalaj másik felére pedig helyezz el egy előzetesen fertőtlenítőszerrel megtisztított pénzérmét.
4. Helyezd vissza a lemezek fedelét.
5. A lemezt a következő gyakorlatig 28 °C-on inkubáljuk.



Feladatok (az eredmények értékelésekor):

1. Rajzold le, amit a lemezen látsz!

2. Melyik esetben látható nagyobb gátlási zóna?

_____

7.10. Az ötödik szakköri óra óraterve

Idő	Az óra menete	Módszer	Munkaforma	Anyagok, eszközök	Megjegyzések
2’	A diákok köszöntése, a gyakorlat témájának az elmondása	-	frontális	-	Az óra céljai: ➢ az előző két szakköri órán készített minták eredményeinek megfigyelése és értékelése; ➢ CFU lemezek megismerése, leolvasásának folyamata.
10’	A harmadik szakköri órán készített minták értékelése	kísérleti eredmények értékelése	páros munka / egyéni munka	a harmadik szakköri órán készített minták (környezetünkben élő baktériumok, kézmosás hatékonysága), a harmadik órához tartozó gyakorlati munkalap (7.7)	A diákok feladata párokban a harmadik szakköri órán készített minták kiértékelése és a gyakorlati lapon kapcsolódó feladatok megoldása. A tanár feladata az eredmények értékelésének a segítése.
20’	A negyedik szakköri órán készített minták értékelése	kísérleti eredmények értékelése	páros munka / egyéni munka	a negyedik szakköri órán készített minták (szélesztett baktériumok, antibiotikumok, antimikrobiális vegyületek, nehézfémek hatása a mikrobákra), a negyedik órához tartozó gyakorlati munkalap (7.9)	Az óra ezen részében a tanulók feladata az előző szakköri órán készített minták értékelése és a kapcsolódó feladatok megoldása. A tanár feladata az eredmények értékelésének segítése és a feladatokra adott válaszok közös megbeszélésének az irányítása.
15’	Telepmorfológiai megfigyelések	kísérlet, megfigyelés	páros munka	gyakorlati munkalap (7.11)	A diákoknak néhány általuk készített mintán kinőtt baktériumot kell megfigyelniük és jellemezniük

					különféle szempontok alapján (a szempontok: a telep mérete, a telep alakja, a telep szegélye, a telep felülete, a telep denzitása).
10’	CFU lemezek megismerése	kísérlet, megfigyelés	páros munka, közös megbeszélés	CFU lemezekről készített képek (vagy előre elkészített CFU lemezek)	A diákokkal közös megbeszélés során megismerjük a CFU lemezeket, és közösen megállapítjuk, hogy mi olvasható le a lemezekről.
3’	A kísérletek megbeszélése	közös megbeszélés	frontális, közös munka	-	Az óra utolsó mozzanata a kísérlet közös megbeszélése, a tapasztaltak összegzése.

7.11. Az ötödik órához tartozó gyakorlati munkalap

Gyakorlati munkalap

Telepmorfológiai megfigyelések. CFU lemezek elemzése, a sejtszámolási módszer megismerése.

I. Telepmorfológiai megfigyelések

Szükséges anyagok, eszközök:

A környezetünkben élő baktériumokat tartalmazó minta, kézmosás hatékonyságának a vizsgálatakor készített minták, szélesztett baktériumokat tartalmazó minta, vonalzó.

A megfigyelés menete:

1. Válassz ki mindegyik mintán egy-egy baktériumtelepet, amely jól vizsgálható.
2. Figyeld meg a telepeket a megadott szempontok alapján, majd töltsd ki a táblázatot.

A vizsgálandó szempontok:

- a telep mérete – vonalzóval mérd le a telep átmérőjét;
- a telep alakja – körszerű, szabálytalan, fonalas, rhizoid;
- a telep szegélye – ép, karéjos, csipkézett, fonalas;
- a telep felülete – fényes, matt;
- a telep denzitása – átlátszó, átlátszatlan.

Feladat:

1. Töltsd ki a táblázatot a megfigyeléseid alapján!

	A környezetünkben élő baktériumokat tartalmazó minta	**A kézmosás hatékonyságának a vizsgálatakor készített minta**	**Szélesztett baktériumokat tartalmazó minta**
A telep mérete			
A telep alakja			
A telep szegélye			
A telep felülete			
A telep denzitása			

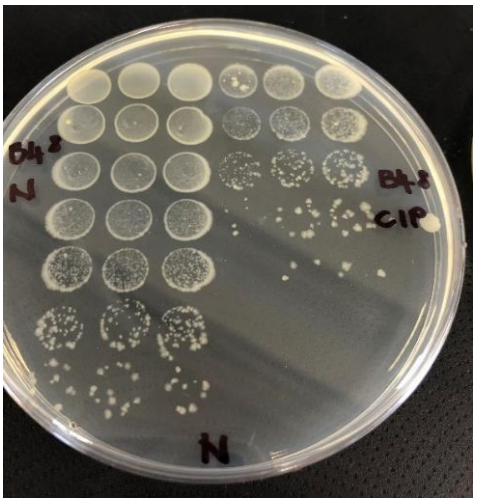
II. CFU lemezek elemzése, a sejtszámolási módszer megismerése

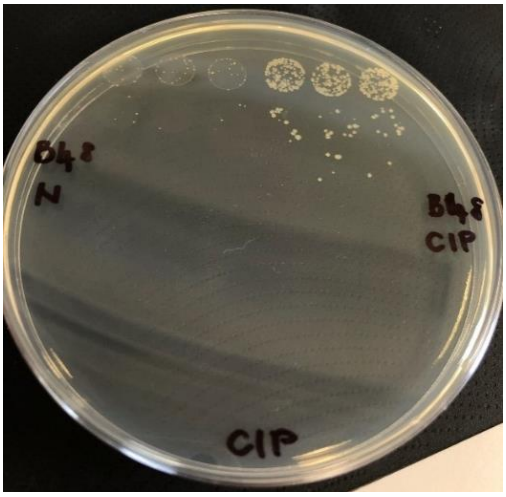
Szükséges anyagok, eszközök:

CFU lemezekről készített képek (vagy előre elkészített CFU lemezek)

Feladatok:

1. Figyeld meg, hogy mi látható az alábbi CFU lemezeken!





2. Mit jelentenek az alábbi feliratok?
   a. N - _____
   b. CIP - _____
   c. B48N - _____
   d. B48CIP - _____

3. Számold meg, hogy az egyes lemezeken hány baktérium nőtt ki! Azt is írd fel, hogy hányadik sorban számoltad a baktériumokat. Az adatokat írd be az alább látható táblázat megfelelő soraiba. (Érdemes azt a sort figyelni, ahol a kinőtt baktériumok száma 5-15 között van.)

4. Vajon hány darab baktérium növekedett abban a baktérium szuszpenzióban, amelyből készültek a lemezek? Ezt is írd be a táblázat megfelelő soraiba.

	N		CIP	
	B48N	B48CIP	B48N	B48CIP
A lemezen kinőtt baktériumok száma				
A sor száma (hányadik sorban számoltad a baktériumokat?)				
A baktérium szuszpenzióban lévő baktériumok száma				

7.12. A hatodik szakköri óra óraterve

Idő	Az óra menete	Módszer	Munkaforma	Anyagok, eszközök	Megjegyzések
2’	A diákok köszöntése, a gyakorlat témájának az elmondása	-	frontális	-	Az óra célja: ➢ CFU készítésének a megtanulása és gyakorlása.
6’	A gyakorlat menetének a megbeszélése	tanári magyarázat, közös megbeszélés	frontális	-	A tanár elmondja, hogy a mai órán az előző órán vizsgált CFU lemezekhez hasonlót fogunk készíteni. Elsőként egy hígítási sort készítünk, majd maga a CFU lemezeket készítjük el.
20’	Hattagú hígítási sor készítése baktérium szuszpenzióból	kísérletezés	páros munka / egyéni munka	gyakorlati munkalap (7.13), baktérium szuszpenzió, Lemco Broth tápoldat, Eppendorf-csövek (páronként 6 darab), Eppendorf-cső tartó, automata pipetta, pipettahegyek	A diákok feladata egy hattagú hígítási sor készítése a második szakköri órán tanultak alapján. Az egyetlen különbség az, hogy ezen az órán nem brómfenolkék oldat és szörp segítségével készítünk hígítási sort, hanem a baktérium szuszpenzióból. A tanár feladata a hígítási sorok elkészítése közben a diákok segítése.
30’	CFU lemezek készítése	kísérletezés	páros munka / egyéni munka	gyakorlati munkalap (7.13), lemez agar táptalaj (páronként két darab), az elkészített hígítási sorok, automata pipetta, pipettahegyek	A diákok a CFU módszerének egy egyszerűsített verzióját készítik el az órán. Ennek során minden diák egy lemezen három technikai párhuzamost készít az egyes hígításoknak megfelelően. Tehát összesen egy

					lemezen három oszlopban és hat sorban lesznek olyan „cseppek”, amelyek baktériumokat tartalmaznak.
2’	A kísérletek megbeszélése	közös megbeszélés	frontális, közös munka	-	Az óra utolsó mozzanata a kísérlet közös megbeszélése, a tapasztaltak összegzése. Az eredmények értékelése a következő órán történik.

7.13. A hatodik órához tartozó gyakorlati munkalap

Gyakorlati munkalap

A CFU, mint sejtszámolási módszer; készítésének a megtanulása és gyakorlása.

A CFU készítésének a menetét két részre osztjuk, az első lépés a hígítási sorok elkészítése, a második pedig maga a CFU elkészítése a lemezeken.

I. Hígítási sor készítése

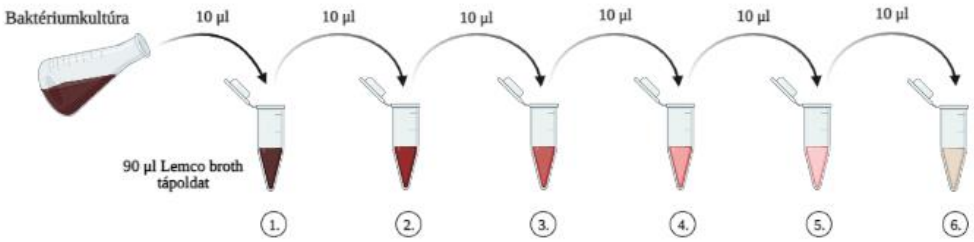
Szükséges anyagok, eszközök:

Baktérium szuszpenzió, Lemco Broth tápoldat, Eppendorf-csövek (páronként 6 darab), Eppendorf-cső tartó, automata pipetta, pipettahegyek.

A gyakorlat menete:

1. Készíts magad elé hat darab Eppendorf-csövet egy Eppendorf-cső tartóban.
2. Feliratozd az összes Eppendorf-csövet számozással (1-6).
3. Mindegyik Eppendorf-csőbe mérj ki automata pipetta segítségével 90 µl Lemco tápoldatot.
4. Az 1-es számú Eppendorf-csőben lévő tápoldathoz adj hozzá 10 µl-t a baktériumkultúrából, majd keverd össze az oldatot.
5. Ezt követően az 1-es számú Eppendorf-csőből vegyél ki 10 µl-t, amelyet adj hozzá a 2-es számú Eppendorf-csőben lévő tápoldathoz, majd ismét keverd össze az oldatot.
6. Az előző pontban leírt mechanizmust folytasd addig, amíg az utolsó Eppendorf-csőig érsz.

Az alábbi ábra a hígítási sor készítésének lépéseit mutatja:



II. CFU lemezek készítése

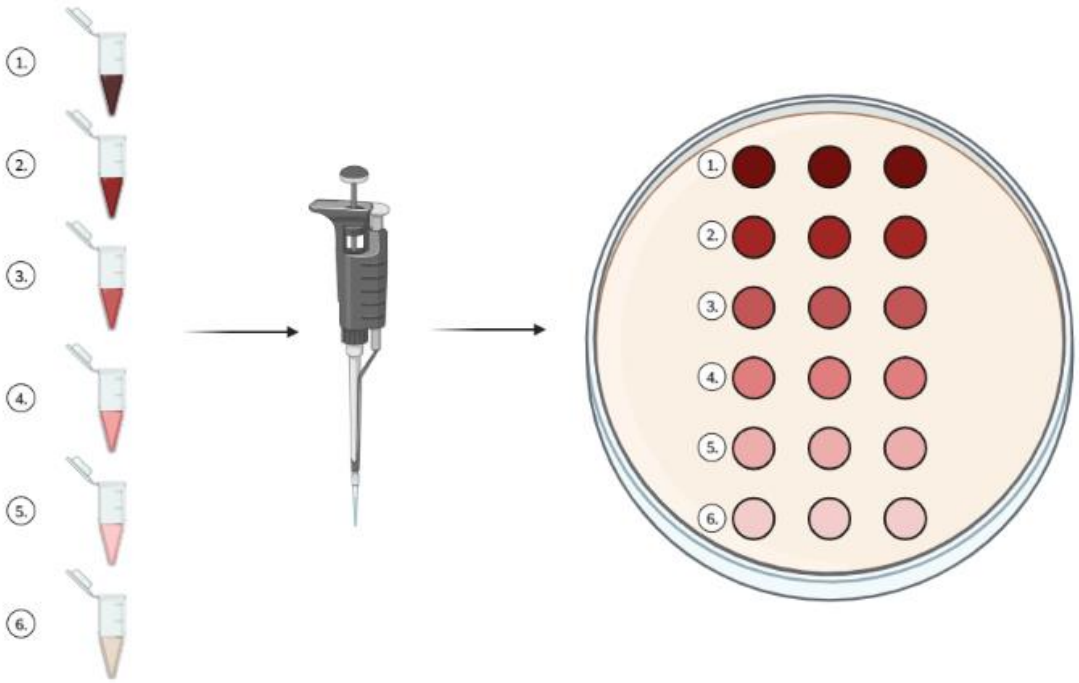
Szükséges anyagok, eszközök:

Lemez agar táptalaj (diákonként egy darab), az elkészített hígítási sorok, automata pipetta, pipettahegyek.

A gyakorlat menete:

1. Készítsd magad elé az előző fő lépésben elkészített hígítási sorodat (tehát a hat Eppendorf-csövet).
2. Helyezd a CFU készítéséhez szükséges mintát a lemez alá (ez segít abban, hogy pontosan hova kell oldatot cseppentened automata pipettával).
3. Minden egyes Eppendorf-csőből (minden hígításból) három-három 10 µl mennyiségű cseppet kell egymás mellé felvinned.
4. Tehát, az 1-es számú Eppendorf-csőben lévő oldatból helyezz három cseppet egymás mellé úgy, hogy minden csepp 10 µl oldatot tartalmazzon.
5. Az előző pontban leírt mechanizmust végezd el mind a hat Eppendorf-cső esetén. Így egy olyan lemezt fogsz kapni, amelyen három oszlopban és hat sorban találhatóak cseppek, melyek bizonyos mennyiségű baktériumokat tartalmaznak.
6. A lemezeket a következő gyakorlatig 28 °C-on inkubáljuk.

Az alábbi ábra a CFU készítésének lépéseit mutatja:



Feladatok (az eredmények értékelésekor):

1. Számold meg, hogy az egyes lemezeken hány baktérium nőtt ki! Azt is írd fel, hogy hányadik sorban számoltad a baktériumokat. Az adatokat írd be az alább látható táblázat megfelelő soraiba. (Érdemes azt a sort figyelni, ahol a kinőtt baktériumok száma 5-15 között van.)

2. Vajon hány darab baktérium növekedett abban a baktérium szuszpenzióban, amelyből készültek a lemezek? Ezt is írd be a táblázat megfelelő sorába.

	Az általad készített lemez
A lemezen kinőtt baktériumok száma	
A sor száma (hányadik sorban számoltad a baktériumokat?)	
A baktérium szuszpenzióban lévő baktériumok száma	

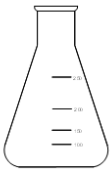
7.14. A hetedik szakköri óra óraterve

Idő	Az óra menete	Módszer	Munkaforma	Anyagok, eszközök	Megjegyzések
2’	A diákok köszöntése, a gyakorlat témájának az elmondása	-	frontális	-	Az óra célja: ➢ az előző órán készített CFU eredményeinek kiértékelése, a munkalapon lévő feladatok kitöltése; ➢ a szerzett tudás összegzése; ➢ játékos kvízen keresztüli tudásellenőrzés.
18’	CFU lemezek eredményének az értékelése	kísérlet, megfigyelés	páros munka	gyakorlati munkalap (7.13), az előző órán készített CFU lemezek	A diákok az ötödik órához hasonlóan megbeszélik, hogy mit látnak a lemezeken. Azonban ebben az esetben az előzetes tudásukra alapozva párokban beszélik meg az eredményeiket, amelyeket utána minden pár bemutat, így közösen is megbeszélve, hogy mi látható.
20’	Mit tanultunk?	csoportos, majd közös megbeszélés	csoportmunka / páros munka	Jamboard online alkalmazás / A3-as méretű lapok	A Jamboard online weboldal felületén / lapokon a diákok csoportonként fogalmakat gyűjtenek az adott szakköri órák anyagával kapcsolatosan.
15’	Játékos kvíz	játékos kvíz	egyéni munka / páros munka	Kahoot online alkalmazás (7.15)	A szakkört egy játékos kvízzel zárjuk a Kahoot alkalmazás segítségével, ahol a diákoknak egyénileg vagy esetleg párban dolgozva kell eldönteniük, hogy

					négy válasz közül melyik a helyes.
5’	A szakkör lezárása	közös megbeszélés	frontális, közös beszélgetés	-	A szakkör utolsó mozzanata a produktív közös munka megköszönése.

7.15. A hetedik órán Kahoot alkalmazás formájában játszott kvíz kérdései

1. Melyik betegséget nem baktérium okozza a felsoroltak közül?
    a. kolera
    b. tuberkulózis
    c. bárányhimlő
    d. lepra
2. Az antibiotikumokat csak mikroorganizmusok tudják előállítani.
    a. igaz
    b. hamis
3. Globálisan évente hány ember betegszik meg tuberkulózissal?
    a. 100 ezer
    b. 1 millió
    c. 10 millió
    d. 100 millió
4. A felsoroltak közül melyik antibiotikumot nem használják a tuberkulózis kezelése során?
    a. rifampicin
    b. pirazinamid
    c. penicillin
    d. etambutol
5. Melyik laboratóriumi eszköz látható a képen?



    a. Eppendorf-cső
    b. főzőpohár
    c. Erlenmeyer-lombik
    d. mérőhenger
6. Milyen anyagokat használtunk a hígítási sorok készítésekor?
    a. brómfenolkék festékoldat
    b. kristályibolya festékoldat
    c. szörp

   d. baktérium szuszpenzió / baktériumkultúra

7. A kézmosás hatékonyságának vizsgálatakor melyik esetben nőtt ki a legtöbb baktérium a táptalajon?
   a. kézmosás előtt
   b. szappanos kézmosás után
   c. fertőtlenítőszeres kézmosás után
8. Melyik természetes antimikrobiális vegyület hatását nem vizsgáltuk?
   a. gyömbér
   b. fokhagyma
   c. teafaolaj
   d. citrusolaj
9. Az alábbi jelzők közül melyik vonatkozhat a telep alakjára?
   a. szabálytalan
   b. karéjos
   c. ép
   d. átlátszó
10. Hány baktériumokat tartalmazó csepp volt az általunk készített CFU lemezeken?
   a. 12
   b. 18
   c. 24
   d. 30

IRODALOMJEGYZÉK

1. WA, A. The Treasure Called Antibiotics. *Ann. Ibadan Postgrad. Med.* **14**, 56–57 (2016).

2. Ebimieowei, E. & Ibemologi, A. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res.* **4**, (2016).

3. Mohr, K. I. History of antibiotics research. *How to Overcome Antibiot. Cris.* 237–272 (2016) doi:10.1007/82_2016_499.

4. Adzitey, F. Antibiotic Classes and Antibiotic Susceptibility of Bacterial Isolates from Selected Poultry; A Mini Review. *World s Vet. J.* **5**, 36–41 (2015).

5. Kapoor, G., Saigal, S. & Elongavan, A. Action and reistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.* **33**, 300–305 (2017).

6. Dias, C. & Rauter, A. P. Membrane-targeting antibiotics: recent developments outside the peptide space. *Future Med. Chem.* **11**, 211–228 (2019).

7. Epand, R. M., Walker, C., Epand, R. F. & Magarvey, N. A. Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *BBA - Biomembr.* (2015) doi:10.1016/j.bbamem.2015.10.018.

8. Silhavy, T. J., Kahne, D. & Walker, S. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, 1–16 (2010).

9. Clark, D. P., Pazdernik, N. J. & McGehee, M. R. *Molecular biology*. (2019). doi:https://doi.org/10.1016/C2015-0-06229-3.

10. Popescu, A. & Doyle, R. J. The gram stain after more than a century. *Biotech. Histochem.* **71**, 145–151 (1996).

11. Rohde, M. The Gram-Positive Bacterial Cell Wall. *Microbiol. Spectr.* **7**, 1–21 (2019).

12. Falagas, M. E., Rafailidis, P. I. & Matthaiou, D. K. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resist. Updat.* **13**, 132–138 (2010).

13. Alborn, W. E., Allen, N. E. & Preston, D. A. Daptomycin Disrupts Membrane Potential in Growing Staphylococcus aureus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 2282–2287 (1991).

14. Sarkar, P., Yarlagadda, V., Ghosh, C. & Haldar, J. A review on cell wall synthesis inhibitors with an emphasis on glycopeptide antibiotics. *Medchemcomm* **8**, 516–533 (2017).

15. Silver, L. L. Fosfomycin : Mechanism and Resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **7**, 1–12 (2017).

16. Josephine, H. R., Kumar, I. & Pratt, R. F. he perfect penicillin? Inhibition of a bacterial DD-peptidase by peptidoglycan-mimetic β-lactams. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 8122–8123 (2004).

17. Bambeke, V., Laethem, Y. Van, Courvalin, P. & Tulkens, P. M. Glycopeptide Antibiotics. *Drugs* **64**, 913–936 (2004).

18. Zhu, C., Liu, Y., Hu, L., Yang, M. & He, Z. G. Molecular mechanism of the synergistic activity of ethambutol and isoniazid against Mycobacterium tuberculosis. *J. Biol. Chem.* **293**, 16741–16750 (2018).

19. Goossens, S. N., Sampson, S. L. & Rie, A. Van. Mechanisms of Drug-Induced Tolerance in Mycobacterium tuberculosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **34**, (2020).

20. Hong, W., Zeng, J. & Xie, J. Antibiotic drugs targeting bacterial RNAs. *Acta Pharm. Sin. B* **4**, 258–265 (2014).

21. Yonath, A. Antibiotics Targeting Ribosomes: Resistance, Selectivity, Synergism, and Cellular Regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 649–679 (2005).

22. Chopra, I. & Roberts, M. Tetracycline Antibiotics : Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 232–260 (2001).

23. Forge, A. & Schacht, J. Aminoglycoside Antibiotics. *Audiol. Neurotol.* **5**, 3–22 (2000).

24. Tenson, T. & Lovmar, M. The Mechanism of Action of Macrolides, Lincosamides and Streptogramin B Reveals the Nascent Peptide Exit Path in the Ribosome. *J. Mol.*

Biol. **330**, 1005–1014 (2003).

25. Hooper, D. C. Emerging Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 337–341 (2001).

26. Mayer, C. & Takiff, H. The Molecular Genetics of Fluoroquinolone Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Mol. Genet. Mycobact.* 455–478 (2014) doi:10.1128/9781555818845.ch23.

27. Sharma, P. C., Jain, A., Jain, S., Pahwa, R. & Yar, M. S. Ciprofloxacin: Review on developments in synthetic, analytical, and medicinal aspects. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **25**, 577–589 (2010).

28. Masters, P. A., O'Bryan, T. A., Zurlo, J., Miller, D. Q. & Joshi, N. Trimethoprim-Sulfamethoxazole Revisited. **163**, 402–410 (2003).

29. C Reygaert, W. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology* vol. 4 482–501 (2018).

30. Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. & Piddock, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 42–51 (2015).

31. Kumar, A. & Schweizer, H. P. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 1486–1513 (2005).

32. Thakare, R., Kesharwani, P., Dasgupta, A., Srinivas, N. & Chopra, S. *Antibiotics: past, present, and future*. *Drug Discovery Targeting Drug-Resistant Bacteria* (Elsevier Inc., 2020). doi:10.1016/B978-0-12-818480-6/00001-1.

33. Palumbi, S. R. Humans as the World' s Greatest Evolutionary Force The Pace of Human-Induced Evolution. *Science (80-.).* **293**, 1786–1790 (2001).

34. Rossolini, G. M., Arena, F., Pecile, P. & Pollini, S. Update on the antibiotic resistance crisis. *Curr. Opin. Pharmacol.* **18**, 56–60 (2014).

35. Ventola, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis: part 1: causes and threats. *Pharm. Ther.* **40**, 277–283 (2015).

36. Harbottle, H., Thakur, S., Zhao, S. & White, D. G. Genetics of antimicrobial resistance. *Anim. Biotechnol.* **17**, 111–124 (2006).

37. Smith, T., Wolff, K. A. & Nguyen, L. Molecular Biology of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Pathog. Mycobacterium Tuberc. Its Interact. with Host Org.* 53–80 (2012) doi:10.1007/82_2012_279.

38. Cox, G. & Wright, G. D. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int. J. Med. Microbiol.* **303**, 287–292 (2013).

39. Walsh, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* **406**, 775–781 (2000).

40. Dever, L. A. & Dermody, T. S. Mechanisms of Bacterial Resistance to Antibiotics. *Arch. Intern. Med.* **151**, 886–895 (1991).

41. Delcour, A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1794**, 808–816 (2009).

42. Jose M. Munita & Cesar A. Arias. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Spectr.* **4**, (2016).

43. Wright, G. D. Bacterial resistance to antibiotics : Enzymatic degradation and modification. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 1451–1470 (2005).

44. Ali, J., Rafiq, Q. A. & Ratcliffe, E. Antimicrobial resistance mechanisms and potential synthetic treatments. *Futur. Sci. OA* **4**, (2018).

45. Annunziato, G. Strategies to overcome antimicrobial resistance (AMR) making use of non-essential target inhibitors: A review. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).

46. Pacios, O. *et al.* Strategies to Combat Multidrug-Resistant and Persistent Infectious Diseases. *Antibiotics* **9**, 1–20 (2020).

47. Tyers, M. & Wright, G. D. Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 141–155 (2019).

48. Acar, J. F. Antibiotic synergy and antagonism. *Med. Clin. North Am.* **84**, 1391–1406 (2000).

49. Minato, Y. *et al.* Mutual potentiation drives synergy between trimethoprim and sulfamethoxazole. *Nat. Commun.* **9**, 1–7 (2018).

50. Geneva: World Health Organization. *Global tuberculosis report 2020*. (2020).

51. Queval, C. J., Brosch, R. & Simeone, R. The macrophage: A disputed fortress in the battle against Mycobacterium tuberculosis. *Front. Microbiol.* **8**, 1–11 (2017).

52. Pieters, J. Mycobacterium tuberculosis and the Macrophage: Maintaining a Balance. *Cell Host Microbe* **3**, 399–407 (2008).

53. Kaufmann, S. H. E. How can immunology contributed to TB control. *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 20–30 (2001).

54. Pál, T. Az orvosi mikrobiológia tankönyve. *Med. Könyvkiadó Zrt.* 145–146 (2013).

55. Espinal, M. A. *et al.* Global Trends in Resistance to Antituberculosis Drugs. *N. Engl. J. Med.* **344**, 1294–1303 (2001).

56. Eker, B. *et al.* Multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 1700–1706 (2008).

57. Cohen, K. A., Bishai, W. R. & Pym, A. S. Molecular Basis of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Microbiol. Spectr.* **2**, 1–16 (2014).

58. Palomino, J. C. & Martin, A. Drug Resistance Mechanisms in Mycobacterium tuberculosis. *Antibiot.* **3**, 317–340 (2014).

59. Sun, G. *et al.* Dynamic population changes in Mycobacterium tuberculosis during acquisition and fixation of drug resistance in patients. *J. Infect. Dis.* **206**, 1724–1733 (2012).

60. Supply, P. *et al.* Linkage disequilibrium between minisatellite loci supports clonal evolution of Mycobacterium tuberculosis in a high tuberculosis incidence area. *Mol. Microbiol.* **47**, 529–538 (2003).

61. Kucukyildirim, S. *et al.* The rate and spectrum of spontaneous mutations in Mycobacterium smegmatis, a bacterium naturally devoid of the postreplicative mismatch repair pathway. *G3 Genes, Genomes, Genet.* **6**, 2157–2163 (2016).

62. Nguyen, L. Antibiotic resistance mechanisms in M. tuberculosis: an update. *Arch. Toxicol.* **90**, 1585–1604 (2016).

63. Liu, J., Rosenberg, E. Y. & Nikaido, H. Fluidity of the lipid domain of cell wall from Mycobacterium chelonae. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 11254–11258 (1995).

64. Kalscheuer, R. *et al.* The Mycobacterium tuberculosis capsule: a cell structure with

key implications in pathogenesis. *Biochem. J.* **476**, 1995–2016 (2019).

65. Zaw, M. T., Emran, N. A. & Lin, Z. Mutations inside rifampicin-resistance determining region of rpoB gene associated with rifampicin-resistance in Mycobacterium tuberculosis. *J. Infect. Public Health* **11**, 605–610 (2018).

66. Zhu, J. H. *et al.* Rifampicin can induce antibiotic tolerance in mycobacteria via paradoxical changes in rpoB transcription. *Nat. Commun.* **9**, (2018).

67. Jeeves, R. E. *et al.* Mycobacterium tuberculosis is resistant to isoniazid at a slow growth rate by single nucleotide polymorphisms in katG codon Ser315. *PLoS One* **10**, 1–21 (2015).

68. Vilchèze, C. *et al.* Altered NADH/NAD+ ratio mediates coresistance to isoniazid and ethionamide in Mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 708–720 (2005).

69. Miesel, L., Rozwarski, D. A., Sacchettini, J. C. & Jacobs, W. R. Mechanisms for isoniazid action and resistance. *Novartis Found. Symp.* 209–221 (1998) doi:10.1002/0470846526.ch15.

70. Hegde, S. S. *et al.* A Fluoroquinolone Resistance Protein from Mycobacterium tuberculosis That Mimics DNA. *Science (80-.).* **308**, 1480–1483 (2005).

71. Von Groll, A. *et al.* Fluoroquinolone Resistance in Mycobacterium tuberculosis and Mutations in gyrA and gyrB. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 4498–4500 (2009).

72. Harris, J. M., McIntosh, E. M. & Muscat, G. E. O. Structure/function analysis of a dUTPase: Catalytic mechanism of a potential chemotherapeutic target. *J. Mol. Biol.* **288**, 275–287 (1999).

73. Pecsi, I. *et al.* The dUTPase enzyme is essential in Mycobacterium smegmatis. *PLoS One* **7**, 1–11 (2012).

74. Hirmondo, R., Lopata, A., Suranyi, E. V., Vertessy, B. G. & Toth, J. Differential control of dNTP biosynthesis and genome integrity maintenance by the dUTPase superfamily enzymes. *Sci. Rep.* **7**, 1–12 (2017).

75. Paiano, A., Margiotta, A., De Luca, M. & Bucci, C. Yeast Two-Hybrid Assay to Identify Interacting Proteins. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **95**, 1–33 (2019).

76. Sinha, K. M., Unciuleac, M. C., Glickman, M. S. & Shuman, S. AdnAB: A new DSB-

resecting motor-nuclease from mycobacteria. *Genes Dev.* **23**, 1423–1437 (2009).

77. Fujiwara, N. *et al.* Characteristics of Mycobacterium smegmatis J15cs strain lipids. *Tuberculosis* **92**, 187–192 (2012).

78. Nemzeti Alaptanterv. *Magy. Közlöny* 10635–10847 (2012) doi:10.14267/retp2020.04.06.

79. Nemzeti Alaptanterv. *Magy. Közlöny* 290–446 (2020).

80. Biológia - egészségtan kerettanterv A változat. *51/2012. (XII. 21.) számú EMMI Rendel. 3. melléklet* (2012).

81. Biológia - egészségtan emelt óraszámú kerettanterv. *51/2012. (XII. 21.) számú EMMI Rendel. 3. melléklet* (2012).

82. Biológia kerettanterv alap óraszám esetén. (2020).

83. Pedagógiai program - Budapesti Fazekas Mihály Gyakorló Általános Iskola és Gimnázium. (2021).

84. Biológia részletes érettségi vizsgakövetelmény. *33/2015. (VI. 24.) EMMI Rendel. 1. melléklet* 1–44 (2017).

85. Kosiyaporn, H. *et al.* Surveys of knowledge and awareness of antibiotic use and antimicrobial resistance in general population: A systematic review. *PLoS One* **15**, 1–27 (2020).

JEGYZÉKEK

Ábrák

1. ábra Az antibiotikumok egyes típusai hatásmechanizmusuk alapján [2]. (Etebu & Arikepar, 2016 ábrája alapján készült) 12
2. ábra A Gram-pozitív és Gram-negatív sejtfal felépítése [11]. (Rohde, 2019 ábrája alapján készült) 13
3. ábra Az egyes antibiotikumok felfedezése és az ezekre történő antibiotikum rezisztencia kialakulása a 20. és 21. században [32,33]. (Thakare és mtsai, 2020 ábrái és Palumbi, 2001 ábrája alapján készült) 18
4. ábra A *Mycobacterium tuberculosis* sejtfalának a felépítése [64]. (Kalscheuer és mtsai, 2019 ábrája alapján készült) 27
5. ábra A hígítási sor készítésének a folyamata. 34
6. ábra A kísérlet menete. 35
7. ábra A vad típusú *Mycobacterium smegmatis* generációs idejei a növekedési idők függvényében. 40
8. ábra A vad típusú *Mycobacterium smegmatis* tolerancia rátái a növekedési idők függvényében. 41
9. ábra A Δ-loop mutáns *Mycobacterium smegmatis* generációs idejei a növekedési idők függvényében. 43
10. ábra A Δ-loop mutáns *Mycobacterium smegmatis* tolerancia rátái a növekedési idők függvényében. 44
11. ábra A dut(-) mutáns *Mycobacterium smegmatis* generációs idejei a növekedési idők függvényében. 46
12. ábra A dut(-) mutáns *Mycobacterium smegmatis* tolerancia rátái a növekedési idők függvényében. 47
13. ábra A kontroll és szubletális mennyiségű ciprofloxacint tartalmazó táptalajon növekedett vad típusú, Δ-loop mutáns és dut(-) mutáns *Mycobacterium smegmatis* törzsek tolerancia rátája. 48
14. ábra A kontroll és szubletális mennyiségű ciprofloxacint tartalmazó táptalajon növekedett vad típusú, Δ-loop mutáns és dut(-) mutáns *Mycobacterium smegmatis* törzsek generációs ideje. 49

15. ábra A kérdőívet kitöltő diákok száma az évfolyamok és osztályok szerint rendezve. 53
16. ábra A diákok részvételi szándékának százalékos aránya az osztályok típusainak megfelelően. 54
17. ábra A diákok szerint baktériumok által okozott betegségek. 55
18. ábra A diákok véleménye a kézmosás egyes típusainak – szappanos és fertőtlenítőszeres kézmosás – hatékonyságáról. 57
19. ábra A diákok ismerete az antibiotikum hatóanyagok körében. 58
20. ábra A diákok ismerete a természetes antimikrobiális szerek körében. 58
21. ábra A diákok antibiotikumokkal kapcsolatos kérdésekre adott válaszai. 59
22. ábra A szakkör tematikájához kapcsolódó szófelhő. 65
23. ábra Hígítási sor elkészítésének menete brómfenolkék festékoldat használata esetén. 68
24. ábra Hígítási sor elkészítésének menete szörp használata esetén. 68
25. ábra A brómfenolkék oldat használatával elkészített hígítási sor. Ebben az esetben ötszörös hígítás történt. 69
26. ábra A szörp használatával elkészített hígítási sor. Ebben az esetben kétszeres hígítás történt. 69
27. ábra A telefonomról vett minta. 71
28. ábra Az ujjamon található baktériumok kézmosás előtt, szappanos kézmosás után, illetve kézfertőtlenítő használata után. 71
29. ábra A szélesztőbottal történő szélesztés menete. 73
30. ábra Négy antibiotikum – tetraciklin (TC), kanamicin (KANA), kloramfenikol (CA) és ampicillin (AMP) – baktériumokra való hatása. 74
31. ábra Három természetes antimikrobiális anyag – gyömbér, fokhagyma, szegfűszeg – az inkubálási idő letelte után. 75
32. ábra Három természetes antimikrobiális anyag - gyömbér, fokhagyma, szegfűszeg – baktériumokra való hatása. 75
33. ábra A képen egy általam készített CFU látható. A lemezen a három biológiai párhuzamos közül a B mintából készített CFU látható 48 óra inkubálási idő után. A lemez alján látható „N” betű arra utal, hogy a CFU-hoz használt táptalaj nem tartalmaz antibiotikumot. A lemez bal oldalán látható „N” betű azt jelzi, hogy a táptalaj, amelyen a baktériumok szélesztése és növesztése történt, nem tartalmazott antibiotikumot. A lemez jobb oldalán látható „CIP” felirat azt jelzi, hogy a baktériumok szélesztése és növesztése antibiotikumot tartalmazó, úgynevezett szubletális plate-n történt. 77

34. ábra A képen egy általam készített CFU látható. A lemezen a három biológiai párhuzamos közül a B mintából készített CFU látható 48 óra inkubálási idő után. A lemez alján látható „CIP” felirat arra utal, hogy a CFU-hoz használt táptalaj antibiotikumot tartalmazó, úgynevezett szelektáló táptalaj. A lemez bal oldalán látható „N” betű azt jelzi, hogy a táptalaj, amelyen a baktériumok szélesztése és növesztése történt, nem tartalmazott antibiotikumot. A lemez jobb oldalán látható „CIP” felirat azt jelzi, hogy a baktériumok szélesztése és növesztése antibiotikumot tartalmazó, úgynevezett szubletális plate-n történt. 78
35. ábra Hígítási sor készítésének menete a CFU készítésekor. 79
36. ábra CFU készítésének a menete. 80
37. ábra Egy általam készített gondolattérkép az egyes gyakorlati órákhoz kapcsolódó legfontosabb fogalmakkal. 81

Táblázatok

1. táblázat Néhány közismert Gram-pozitív és Gram-negatív baktérium [8,9]. 13
2. táblázat A táptalajok elkészítéséhez használt összetevők. 32
3. táblázat A táblázat a három párhuzamos vad típusú *Mycobacterium smegmatis* törzs (A, B, C) generációs idejét és tolerancia rátáját mutatja az inkubálási idők függvényében. (A kontroll minta narancssárga színnel van jelölve, míg a szubletális koncentrációjú ciprofloxacint tartalmazó táptalajon inkubált minta zöld színnel jelölve látható.) 39
4. táblázat A táblázat a vad típusú *Mycobacterium smegmatis* minták átlagolt generációs idejét és tolerancia rátáját, illetve az átlagok standard hibáját (SEM) mutatja az inkubálási idők függvényében. (A kontroll minta narancssárga színnel van jelölve, míg a szubletális koncentrációjú ciprofloxacint tartalmazó táptalajon inkubált minta zöld színnel jelölve látható.) 39
5. táblázat A táblázat a három párhuzamos Δ-loop mutáns *Mycobacterium smegmatis* törzs (A, B, C) generációs idejét és tolerancia rátáját mutatja az inkubálási idők függvényében. (A kontroll minta narancssárga színnel van jelölve, míg a szubletális koncentrációjú ciprofloxacint tartalmazó táptalajon inkubált minta zöld színnel jelölve látható.) 42
6. táblázat A táblázat a Δ-loop mutáns *Mycobacterium smegmatis* minták átlagolt generációs idejét és tolerancia rátáját, illetve az átlagok standard hibáját (SEM) mutatja az inkubálási

idők függvényében. (A kontroll minta narancssárga színnel van jelölve, míg a szubletális koncentrációjú ciprofloxacint tartalmazó táptalajon inkubált minta zöld színnel jelölve látható.) 42
7. táblázat A táblázat a három párhuzamos dut(-) mutáns *Mycobacterium smegmatis* törzs (A, B, C) generációs idejét és tolerancia rátáját mutatja az inkubálási idők függvényében. A C minta nem volt értékelhető, mert a CFU-s lemezeken más baktériummal történt fertőződés volt tapasztalható. (A kontroll minta narancssárga színnel van jelölve, míg a szubletális koncentrációjú ciprofloxacint tartalmazó táptalajon inkubált minta zöld színnel jelölve látható.) 45
8. táblázat A táblázat a dut(-) mutáns *Mycobacterium smegmatis* minták átlagolt generációs idejét és tolerancia rátáját, illetve az átlagok standard hibáját (SEM) mutatja az inkubálási idők függvényében. (A kontroll minta narancssárga színnel van jelölve, míg a szubletális koncentrációjú ciprofloxacint tartalmazó táptalajon inkubált minta zöld színnel jelölve látható.) 45
9. táblázat A baktériumok és a vírusok közötti különbségek a diákok szerint. 56
10. táblázat A témakörhöz készített biológia szakkör óráinak módszertani szempontból figyelembe vett jellemzői. 63
11. táblázat A szakköri órák tananyaga. 65