

Szénhidrogént bontó sejtek számának meghatározása határhígítási eljárással

Összeállította: Gruiz Katalin, Molnár Mónika, Feigl Viktória, 2010.

A szénhidrogéneket (vagy más szerves szennyezőanyagokat) bontó baktériumok számát határhígítási eljárással határozzuk meg, tenyésztés után olyan tápoldatban, mely egyedüli szénforrásként a vizsgálandó szénhidrogént tartalmazza. A statisztikai módszerrel meghatározott sejtszám értéket „legvalószínűbb sejtszámnak” nevezik; az angol „Most Probable Number” rövidítéseként, MPN módszerként is jelölik.

A módszer elve:

A módszer kivitelezésénél az alapszuszpenziót addig hígítjuk, amíg az utolsó hígítás 1 cm³-ében valószínűleg már nincs a szénhidrogén bontására képes élő sejt. A hígítás olyan alapsóoldatban történik, melyben energiatermelésre alkalmas szerves szubsztrát nincsen. Ezekhez a szubsztrátmentes tesztsövekhez adjuk azt a steril szénhidrogént, vagy más szerves szennyezőanyagot (pl. dízelolaj, pakura, kőszénkátrányolaj, transzformátorolaj), melynek bontására képes mikrobák jelenlétét akarjuk bizonyítani, vagy számát akarjuk meghatározni.

A mérés célja:

1. A mérés egyik célja, lehet pusztán az, hogy bizonyítékot szolgáltatson arra, hogy a talaj tartalmaz a kérdéses szennyezőanyagra specializálódott bontó mikroorganizmusokat.
2. Ez fordítottan is értelmezhető: ha vannak a talajban specializálódott mikroorganizmusok, akkor nagyon valószínű a szennyezőanyag jelenléte.
3. Másik célja lehet a vizsgálatnak, hogy különböző mértékű hígításokkal körbehatárolja azt a hígítást, amelyben milliliterenként már csak egy mikroba van jelen, vagyis meghatározza a bontóképességgel rendelkező sejtek legvalószínűbb számát a talajban. Ebből a sejtszámból a talaj bontó aktivitásának mértékére lehet következtetni, amely a bioremediáció tervezésénél igen fontos információ.
4. Ha izolálni is szeretnénk a specializálódott mikroorganizmusokat, akkor a speciális bontóképesség meghatározásához használt, csak a bontandó szubsztrátot tartalmazó határhígítási sorozatot dúsító tápoldatként fogjuk fel és abból kiindulva izoláljuk a bontó mikroorganizmusokat.

Szükséges eszközök:

- steril kémcsövek (121 °C-on 20 percig autoklávban sterilizálva)
- pipetták és pipetta hegyek (5 ml-es, 1 ml-es és 20 µl-es)
- vegyszer kanál
- táramérleg
- vortex
- lamináris box
- 28 °C-os termosztát

Szükséges anyagok:

Táppoldat

A hígításhoz felhasznált, szubsztrát-mentes tápsóoldat összetétele: 1 dm³ desztillált vízben

0,6 g	KH ₂ PO ₄	0,13 g	MgCl ₂ ·6H ₂ O
0,14 g	Na ₂ SO ₄	1 g	(NH ₄) ₂ SO ₄
0,001 g	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,5 g	KNO ₃
0,5 g	NaCl	1 ml	nyomelem-oldat (Pfennig)

Nyomelem oldat összetétele:

1 g	AlCl ₃	0,5 g	Na ₂ MoO ₄
0,5 g	KI	0,1 g	NaVO ₃ ·H ₂ O
0,5	KBr	0,5 g	szelénsó
0,5 g	LiCl	0,5 g	BaCl ₂
7,0 g	MnCl ₄ ·H ₂ O	0,05 g	SnCl ₂ ·2H ₂ O
11 g	H ₃ BO ₃	1 g	ZnCl ₂
1 g	CuCl ₂	1 g	NiCl ₂
5 g	CoCl ₂	3600 cm ³	desztillált vízben oldva

A táppoldatot 121 °C-on 20 percig autoklávban sterilizzük

INT oldat:

2-(p-jódfenil)-3(p-nitrofenil)-5feniltetrazólium-klorid, 1 g/dm³ töménységű.

Az INT oldatot 0,45 µm pórusátmérőjű membránszűrőn csíramentesítettük.

Szerves szennyezőanyag:

A vizsgálandó szerves szennyezőanyagot 121 °C-on 20 percig autoklávban sterilizzük.

A vizsgálat menete:

A vizsgálandó mintákból steril kémcsövekbe 0,5–0,5 g-t mértünk, amit 4,5 ml tápsóoldatban szuszpendálunk. Ebből a szuszpenzióból készítettünk tízes léptékű hígítási sort, tápsóoldatban. A talajmintákból 3-3 párhuzamossal végezzük a kérdéses szerves szennyezőanyagot bontó sejtek számának meghatározását.

Ezután minden egyes szuszpenzióba bemérünk 0,5 cm³, 1 g/dm³ töménységű steril INT oldatot. Ez a halványsárga reagens mesterséges elektronakceptorként szolgál. Ha az adott hígításban akár egyetlen élő, a kérdéses szerves szennyezőanyag bontására képes sejt volt, akkor az elkezd szaporodni, a szennyezőanyagot egyedüli szénforrásként tartalmazó csőben. A légzési lánc anyagcsere-folyamatainak következtében az INT rózsaszínűvé redukálódik, így jelezve a mikrobiológiai aktivitást.

Végül minden egyes szuszpenzióhoz 5 µl steril vizsgálandó szerves szennyezőanyagot adunk. Ilyenkor a vizsgálandó szénhidrogén az egyedüli szénforrás a rendszerben, így a kémcsövekben mutatkozó elszíneződés (az anyagcsere következtében) a szénhidrogén felhasználásának köszönhető.

Az így előkészített kémcsöveket a szénhidrogén bonthatóságának függvényében 1–2 hétig 28 °C-on inkubáljuk.

A mérés kiértékelése:

Az értékelést ismert valószínűségi eloszlás alapján végeztük. A párhuzamos sorozatokban pozitívnak minősített kémcsövek számából, a hígítások ismeretében, a Hoskins-féle táblázat segítségével határoztuk meg a legvalószínűbb élőcsíra számot.

Hoskins-féle táblázat 3-3 párhuzamos leoltás esetén:

Kulcsszámok	Kulcsszámoknak megfelelő alapértékek	Kulcsszámok	Kulcsszámoknak megfelelő alapértékek
0 0 0	-	2 0 0	0,91
0 0 1	0,3	2 0 1	1,4
0 0 2	0,6	2 0 2	2,0
0 0 3	0,9	2 0 3	2,6
0 1 0	0,3	2 1 0	1,5
0 1 1	0,61	2 1 1	2,0
0 1 2	0,92	2 1 2	2,7
0 1 3	1,2	2 1 3	3,4
0 2 0	0,61	2 2 0	2,1
0 2 1	0,93	2 2 1	2,8
0 2 2	1,2	2 2 2	3,5
0 2 3	1,6	2 2 3	4,2
0 3 0	0,94	2 3 0	2,9
0 3 1	1,3	2 3 1	3,6
0 3 2	1,6	2 3 2	4,4
0 3 3	1,9	2 3 3	5,3
1 0 0	0,36	3 0 0	2,3
1 0 1	0,72	3 0 1	3,9
1 0 2	1,1	3 0 2	6,4
1 0 3	1,5	3 0 3	9,5
1 1 0	0,73	3 1 0	4,3
1 1 1	1,1	3 1 1	7,5
1 1 2	1,5	3 1 2	12
1 1 3	1,9	3 1 3	16
1 2 0	1,1	3 2 0	9,3
1 2 1	1,5	3 2 1	15
1 2 2	2,0	3 2 2	21
1 2 3	2,4	3 2 3	29
1 3 0	1,6	3 3 0	24
1 3 1	2,0	3 3 1	46
1 3 2	2,4	3 3 2	110
1 3 3	2,9	3 3 3	-

A kiértékelés első lépéseként meghatározzuk a kulcsszámot. A kulcsszám első tagja olyan hígítási szintből adódik, ahol az összes párhuzamos leoltások pozitív eredményt adnak. Az ennél eggyel kisebb hígításhoz tartozó kémcsöveknek is mind pozitívnak kell lenniük.

A példában a három párhuzamos leoltással végzett vizsgálattal a következő eredmények adódnak (10^0 az alapszuspenziót jelenti):

10^0	10^1	10^2	10^3	10^4
+	+	+	+	-
+	+	+	-	-
+	+	-	-	-

A kulcsszám első tagja a 10^1 hígítási tag lesz, a kulcsszám: 3 2 1. A Hoskins-féle táblázatból ennek a kulcsszámnak a 15-ös érték felel meg. Az alapszuspenzió legvalószínűbb szénhidrogén bontó sejt száma: $15 \cdot 10^1 = 1,5 \cdot 10^2$ db/ml.

A bemért vizsgálandó talajra vonatkozó szénhidrogén bontó sejtszámnál figyelembe kell venni az alapszuszpenzió készítésénél bemért anyag és alkalmazott hígítófolyadék mennyiségét. 0,5 g talajt 4,5 ml tápsóoldatban szuszpendálva 10-szeres hígítást alkalmazunk az alapszuszpenzióval, így a vizsgált talaj szénhidrogén bontó sejtszáma: $1,5 \cdot 10^2 \cdot 10 = 1,5 \cdot 10^3$ db/g.

A mérés pontossága:

Az adatok megbízhatóságának jellemzéséhez Cochran munkája alapján meghatározzuk a 95 %-os konfidencia intervallumokat. A kiszámított adatok szórása a hígítási faktortól (jelen esetben 10) és a párhuzamosok (jelen esetben 3) számától függ. Minél finomabb a hígítási faktor és minél több a párhuzamos, annál kisebb a szórás.

Cochran munkája alapján a 10-es hígítási faktorra és 3 párhuzamosra a 95%-os konfidencia intervallumhoz 4,68-as faktor tartozik. A konfidencia intervallum alsó határát a szénhidrogén bontó sejtek számát a faktorial leosztva, a felső határt a faktorial beszorozva kapjuk. Példánkban: felső határ: $1,5 \cdot 10^3 / 4,68 = 3,2 \cdot 10^2$ db/g, alsó határ: $1,5 \cdot 10^3 \cdot 4,68 = 7,0 \cdot 10^3$ db/g.

Források:

Gruiz Katalin, Horváth Beáta, Molnár Mónika: Környezettoxikológia, Műegyetemi Kiadó, 2001.

Erdélyi Anna, Gruiz Katalin, Janzsó Béla, Pap Géza: Ipari mikrobiológia gyakorlatok, Műegyetemi Kiadó, 2001.