

Veszélyes hulladékok vizsgálata – Azotobacter agile teszt
Az MSZ 21978/30-1988 számú szabvány alapján

Vizsgálat elve:

Az Azotobacter agile laboratóriumi tenyésztete alkalmas a hulladékban lévő mérgező szerves és szervesetlen komponensek talajbaktériumokra kifejtett hatásának jelzésére. A hulladék ökotoxikus hatását a tesztbaktérium 28°C hőmérsékleten meghatározott inkubációs idő (48 óra) alatti szaporodása, illetve a szaporodás gátlása alapján értékeljük.

A szaporodást vörös szín megjelenése kíséri, amely a táptalajhoz adott trifenil-tetrazolium-klorid dehidrogenáz enzim jelenlétében redukálódott formájától, a trifenil-formazántól származik.

Vizsgálati körülmények:

A tesztvizsgálat elkészítéséhez 100 cm³ folyékonyhulladék vagy hulladékkivonat szükséges.

Tesztstervezet:

A tesztbaktérium törzstenyésztését kémcsőben ferdére szilárdított Fjodorov-féle agar táptalajon 2 hetenkénti átoltással tartjuk fenn.

Az átoltást steril kaccsal végezzük Fjodorov-táptalajra, a tenyésztetet 48 óráig 28°C hőmérsékleten inkubáljuk, majd hűtőszekrényben tároljuk 5-10°C hőmérsékleten. A tesztbaktérium érzékenységét félévenként ellenőrizzük 1000 mg/dm³ koncentrációjú rézoldat hígításaival.

Szükséges eszközök:

Autómata pipetta, mérőhenger, Erlenmeyer-lombikok, alufólia, Petri-csészék, mikrotitrátorlemezek, bakteriológiai kacs, kémcsövek fémkupakkal, pipetta, keverőgép, termosztát.

Szükséges anyagok, táptalajok:

Törzsfenntartáshoz szükséges Fjodorov-féle táptalaj, a vizsgálatok elvégzéséhez szükséges módosított Fjodorov-féle táptalaj, 2,3,5-trifenil-2H tetrazolium-klorid (TTC) 1%(m/m)-os vizes oldata, dimetil-szulfoxid (DMSO) 0,1 %(m/m)-os vizes oldata, nátrium-klorid-oldat 0,85 g/100 cm³-es, hűtőszekrényben 5-10°C hőmérsékleten tároljuk.

Standardrézoldat, 1000 mg/dm³ rézkoncentrációjú, gyári (pl. Titrisol) vagy ennek hiányában réz-kloridból előállított készítmény.

Vizsgálat menete:

A folyékony hulladékból, illetve az MSZ 21978/10 szerint elkészített hulladékkivonatból hígítási sort készítünk. A folyékony hulladékok és a vizes hulladékkivonatok hígításához desztillált vizet vagy ionmentes vizet, a dimetil-szulfoxidos kivonatok hígításához 0,1%(m/m)-os dimetil-szulfoxidot használunk.

A hígítási sort az 1. táblázat szerint készítjük.

1. táblázat

Sorszám	Minta	Hígítófolyadék	Hígítási fok
1.	4 cm ³	4 cm ³ eredeti anyag vagy hulladékkivonat	kétszeres
2.	8 cm ³	2 cm ³ eredeti anyag vagy hulladékkivonat	ötszörös
3.	9 cm ³	1 cm ³ eredeti anyag vagy hulladékkivonat	tízszeres
4.	9 cm ³	1 cm ³ a kétszeres hígításból	húszszoros
5.	9 cm ³	1 cm ³ az ötszörös hígításból	ötvenszeres

A vizsgálatokhoz a szilárd táptalajról az Azotobacter agile baktériumtenyészetet 5 cm³ 0,85 g/100 cm³ nátrium-klorid-oldattal mossuk le és a baktérium szuszpenziót homogenizáljuk rázógéppel, vagy annak hiányában kézzel, sodró mozgással.

A fenti Azotobacter agile tenyészetet 100 cm³ módosított Fjodorov-táptalajba visszük, amelyhez előbb 1 cm³ 1%-os vizes TTC-oldatot adunk, majd a táptalajbaktériumtenyészet-szuszenziót homogenizáljuk rázógéppel, vagy alapos körkörös mozzgatással.

Rendszeres keverés mellett automata pipettával 0,2-0,2 cm³ mennyiségeket mérünk a fenti szuszpenzióból a mikrotitrátorlemez mélyedéseibe. Ezután a folyékony hulladék, illetve hulladékkivonat előkészített hígításaiból 0,05-0,05 cm³-t adunk a táptalajbaktériumtenyészetet tartalmazó mikrotitrátorlemez mélyedéseibe.

A mikrotitrátorlemez 73-85. helyre 0,05 cm³ 10 mg/dm³ koncentrációjú rézoldatot, a 86.-96. helyre pedig 0,05 cm³ hígítófolyadékot adunk negatív, illetve pozitív kontrollként.

A vizsgálandó anyagokat váltott pipettavéggel vagy a pozitív kontrolltól visszafelé haladva a koncentráltabb minták felé mérjük be.

A negatív kontrollt mindig külön pipettavéggel mérjük be. Minden egyes hígítással 3 párhuzamos tesztelést végzünk. A véghígításokat a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat

Sorszám	Táptalaj-baktérium tenyészet cm ³	Minta cm ³	Véghígítás
1.	0,2	0,05 cm ³ eredeti anyagból	ötszörös
2.	0,2	0,05 cm ³ kétszeres hígításból	tízszeres
3.	0,2	0,05 cm ³ ötszörös hígításból	huszonötszörös
4.	0,2	0,05 cm ³ tízszeres hígításból	ötvenszeres
5.	0,2	0,05 cm ³ húszszoros hígításból	százszoros
6.	0,2	0,05 cm ³ ötvenszeres hígításból	kétszázötvenszeres
7.	0,2	0,05 cm ³ 10 mg/dm ³ -es rézoldat	kontroll (-)
8.	0,2	0,05 cm ³ hígítófolyadék	kontroll (+)

Az elegyet óvatos mozzgatással elkeverjük, majd a mikrotitrátor lemezeket egyenként Petri-csészékbe helyezük, a lemez mellé nedves vattát helyezünk, majd a Petri-csészéket lefedjük. Ezután 3 órára 5-10°C hőmérsékletű hűtőszekrénybe helyezük a Petri-csészékben lévő lemezeket, ezt követően pedig 48 órán át 28°C hőmérsékletű termosztátban inkubáljuk.

Az eredmények kiértékelése:

Inkubálás után vizuálisan értékeljük a mikrotitrátorlemez mélyedéseiben képződött szint. Vörös szín: az eredmény + (pozitív), a tesztbaktérium elszaporodott nincs gátlás. Halvány piros szín: az eredmény ±, a szaporodásgátlás gyenge. Fehér (színtelen): az eredmény - (negatív), teljes a szaporodásgátlás.

Az *Azotobacter agile* talajmikrobiológiai tesztet piros színű, továbbá redukáló anyagokat tartalmazó hulladék, vagy hulladékkivonatok esetén nem szabad alkalmazni.