

Biodegradáció a talajban

Biotesztek szennyezőanyagok talajban történő biodegradációjának vizsgálatára

KÖRINFO

Tartalomjegyzék:

1. Elméleti áttekintés	3
1.1 A biodegradáció	3
1.2 A biodegradáció mérése	3
2. Új módszerek biodegradáció mérésére	4
2.1 Szénhidrogént vagy más szerves szennyezőanyagot bontó sejtek számának meghatározása határhígítással	4
2.1.1 A mérés célja	4
2.1.2 Tápoldat	5
2.1.3 A mérés menete	5
2.1.4 A módszer alkalmassága biodegradáció mérésére	6
2.2 Talajlégzés mérése a termelt CO ₂ alapján	6
2.2.1 A mérőrendszer összeállítása	7
2.2.2 A mérés célja	8
2.2.3 A mérés kivitelezése	8
2.2.4 CO ₂ mennyiségi meghatározása	9
2.1.4 A módszer alkalmassága biodegradáció mérésére	9
2.3 Talaj aktivitásának mérése hőtermelés alapján	9
2.3.1 A mikrokalorimetriás mérőrendszer bemutatása	9
2.3.1.1 Rövid történeti áttekintés	9
2.3.1.2 A berendezés felépítése	10
2.3.1.3 A mérés elve	11
2.3.1.4 A mikrokaloriméter alkalmazási lehetőségei	11
2.3.2 A mikrokalorimetriás mérések eredményei	12
2.3.3 A módszer alkalmassága biodegradáció mérésére	13
2.4 Zárt palack teszt – új gyors teszt protokoll	13
2.4.1 A légzésmérő rendszer elemei, alkatrészei	14
2.4.2. A mérőrendszer adaptálása talajra	15
2.4.2.1. A mérés kivitelezése talajok esetében	15
2.4.2.2. A kiértékelés módja, végpontok, interpretáció	16
2.4.3 Módszerfejlesztés – zárt palack teszt alkalmazása talajlégzés vizsgálatára	16
2.4.3.1 A mért jel	16
2.4.3.1 A talaj előkezelése: adalékok szükségességének vizsgálata	18
2.4.3.3 A jel nagyságának változása a talajminta mennyiségével	20
2.4.3.4 Reprodukálhatóság	20
2.4.3.5 A módszerfejlesztés összefoglalója – a zárt palack teszt protokollja	21
2.4.4 Biodegradálhatóság mérése zárt palack tesztel – a talaj mikroflórájának biodegradációs képessége	22
2.4.4.1 Zárt palack teszt alkalmazhatósága biodegradáció mérésére	22
2.4.4.2 Eltérő típusú talajok biodegradációs képessége	23
2.4.4.3 Szerves szennyezőanyagok hatására a talajlégzésre	24
2.4.4.4 Zárt palack teszt alkalmazhatósága biodegradáció mérésére – az eredmények összefoglalása, a módszer előnye	25

1. Elméleti áttekintés

1.1 A biodegradáció

A biodegradáció aerob vagy anaerob folyamat, melynek során a talaj mikroorganizmusai feltárják és mineralizálják, vagyis a növények számára ismét felvehető szerves állapotba hozzák azokat a biogén elemeket, amelyek részt vesznek a szerves anyagok felépítésében, az energia raktározásában és transzportjában. Ez biztosítja a szervesanyag-produkció szakadatlanágát. A biodegradáció mértéke határozza meg egy adott ökoszisztémán belül az elemek körforgalmának sebességét.

Nagy jelentőséggel bír a hulladékok kezelésében és ártalmatlanításában, a környezet-szennyeződések biológiai úton történő eltávolításában, a környezet öntisztulásában és természetes helyreállításában.

A szennyezőanyagok biodegradálhatóságának nagy szerepe van a környezeti kockázat felmérésében. A kockázat a biodegradálhatósággal fordítottan arányos, minél inkább biodegradálható egy szennyezőanyag, annál kevesebb ideig lesz jelen a környezetben.

Egy szennyező vegyi anyag általános és lokális (helyspecifikus) biodegradálhatósága nagymértékben eltérhet a mikroflóra adaptálódása miatt. Tehát helyspecifikus kockázat felmérése esetén mindig a lokális, pl. a helyszínen található szennyezett talajból mért biodegradációból kell kiindulni. Különösen fontos ez, ha szennyezett területek öntisztulását, vagy *in situ* remediációs technológiákat kívánunk tervezni vagy követni.

A biodegradáció eredménye a vegyületek lebomlása, az összes szerves szén CO_2 -dá való átalakulása, és/vagy szerkezeti anyagként a biomasszába történő visszatérése. Így végeredményben a biodegradáció a szerves szén, a nitrogén és egyéb makro-, mezo- és mikroelemek mineralizációjához vezet.

A biodegradáció nyomon követésére, mértékének megállapítására szolgáló módszerek gyakran olyan detektálási technikák, amelyek direkt vagy indirekt módon mérik a szerves szén oxidációját.

A biodegradációs vizsgálatoknak több céljuk is lehet: a szennyezőanyag perzisztenciájának vizsgálata igen fontos, mind a kockázat nagyságának megállapítása, mind pedig a remediáció tervezése szempontjából. A remediációs technológia saját kockázatának megítélésénél is ez az egyik legfontosabb faktor, főképpen *in situ* remediációs technológia alkalmazása esetén (Gruiz et al., 2001).

1.2 A biodegradáció mérése

Egy szennyezett területen folyó biodegradáció indikálása és mennyiségi és minőségi jellemzése összetett feladat. A biodegradáció jellemzése különféle szinteken történhet, a szennyezőanyag koncentrációjának monitorozásától, a biodegradációra képes sejtek mennyiségi és minőségi jellemzésén és aktivitásuk biokémiai-enzimológiai jellemzésén keresztül, a biodegradációban szerepet játszó enzimek génjeinek kimutatásáig, gyakoriságuk méréséig.

Egy régebből örökölt, szennyezett területen folyó biodegradáció mértéke kémiai módszerekkel nyert eredmények alapján jellemezhető a szubsztrát-fogyásával, minősége pedig a szubsztrát- illetve a maradék-összetételével.

A légzés mértéke, a termelt széndioxid, vagy az elfogyasztott oxigén mennyisége szintén a biodegradációt jellemzik.

Speciális bontóképességű mikroorganizmusok jelenléte bizonyító erejű a biodegradációt illetően.

A biodegradációban szerepet játszó enzimeket aktivitásuk alapján, enzimekreakciók segítségével, enzim-analitikai eljárásokkal mutathatjuk ki. Az enzimeket, mint fehérjéket immunanalitikai eljárásokkal is indikálhatjuk. Az ilyen vizsgálati rendszereket korai figyelmeztető rendszerként is működtethetjük.

A biodegradációért felelős mikroorganizmusok szennyezőanyagot bontani képes enzimjeit kódoló gének jelenléte és előfordulási gyakorisága a legközvetlenebb jellemzője a biodegradációnak. A modern géntechnikák, a hibridizáció és a polimeráz láncreakció (PCR) ezeknek a géneknek a meglétét képesek kimutatni.

A hibridizáció során a felelős gént, a vele komplementer szerkezetű, radioaktív, vagy enzimes jelölést hordozó m-RNS próba segítségével találhatjuk meg. Ma már izolálás és tenyésztés nélkül, direkt a talajból lehet hibridizációt végezni, egyes gének jelenlétének bizonyítására.

A PCR technika alkalmazásával még nagyobb érzékenységet tudunk elérni, már egy-két gén jelenlétét is ki tudjuk mutatni az eljárás hatványozó képessége miatt. A modern géntechnikák alkalmazásának feltétele, hogy hibridizációs próbák illetve primer (indító) molekulák birtokában legyünk. Ezeket ismert, a biodegradációért felelős gének nukleotid szekvenciája alapján tudjuk előállítani. A szakirodalom, az adatbankok egyre több, környezetvédelem szempontjából jelentős gén nukleotid szekvenciáját tartalmazzák (Gruiz et al., 2001).

2. Új módszerek biodegradáció mérésére

2.1 Szénhidrogént vagy más szerves szennyezőanyagot bontó sejtek számának meghatározása határhígítási eljárással

A biodegradáció mérhető a szénhidrogént vagy más szerves szennyezőanyagot bontó sejtek számának meghatározásával. A szénhidrogént vagy más szerves szennyezőanyagot bontó sejtek számát határhígítási eljárással határozzuk meg, olyan tápoldatban történő tenyésztés után, mely egyedüli szénforrásként a vizsgálandó szerves anyagot tartalmazza. A statisztikai módszerrel meghatározott sejt szám értéket „legvalószínűbb sejt számnak” nevezik, az angol „most probable number” rövidítéseként MPN módszerként is jelölik.

A vizsgálathoz alapsuszpenziót, majd tízes léptékű hígítási sorozatot kell készíteni a talajból, vagy más környezeti mintából, 3-5 párhuzamossal. Megfelelő inkubáció után megfigyelhető, hogy milyen hígításokban mutatkozik mikroorganizmus növekedés vagy aktivitás. A módszer kivitelezésekor az alapsuszpenziót addig hígítjuk, amíg az utolsó hígítás 1 ml-ében valószínűleg már nincs a szénhidrogén bontására képes élő sejt. A hígítás olyan alapsóoldatban történik, amelyben energiatermelésre alkalmas szerves szubsztrát nincsen. Ezekhez a szubsztrátmentes tesztsövekhez adjuk azt a steril szénhidrogént, vagy más szerves szennyezőanyagot (pl. dízelolaj, pakura, kőszénkátrány olaj, PAHok, peszticidek stb.), melynek bontására képes mikróbák jelenlétét akarjuk bizonyítani, vagy számát akarjuk meghatározni.

2.1.1 A mérés célja

- A mérés célja, lehet pusztán az, hogy bizonyítékot szolgáltatson arra, hogy a talaj tartalmaz a kérdéses szennyezőanyagra specializálódott bontó mikroorganizmusokat.

- Ez természetesen megfordítva is értelmezhető: ha vannak a talajban specializálódott mikroorganizmusok, akkor nagyon valószínű a szennyezőanyag jelenléte.
- 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.
- 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.

2.1.2 Tápoldat

A hígításhoz felhasznált, szubsztrát-mentes tápsóoldat összetétele (1dm³ 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-oldat)

2.1.3 A mérés menete

A környezeti mintákból 3-5 párhuzamossal végezzük a kérdéses szerves szennyezőanyagot bontó sejtek számának meghatározását.

A vizsgálandó mintákból steril kémcsövekbe 0,5-0,5 g-t mérünk be, amit 4,5 ml tápsóoldatban szuszpendálunk. Ebből a szuszpenzióból készítünk tízes léptékű hígítási sort, tápsóoldatban.

Ezután minden egyes szuszpenzióba bemérünk 0,5 cm³, 1 g/cm³ töménységű steril INT (2(p-jódifenil)-3(p-nitrofenil)-5feniltetrazólium-klorid) oldatot. Ez a halványsárga reagens mesterséges elektronakceptorként szolgál. Az INT oldat sterilitásának biztosítása végett 0,45 µm pórusátmérőjű membránszűrőn csíramentesítjük az oldatot. 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 szubsztrát bonthatóságának függvényében 48 órától 2 hétig, 30 °C-os termosztátban inkubáljuk.

A párhuzamos sorozatokban pozitívnak minősített kémcsövek számából a hígítások ismeretében a Hoskins-féle táblázat segítségével határozzuk meg a legvalószínűbb élőcsíraszámot.

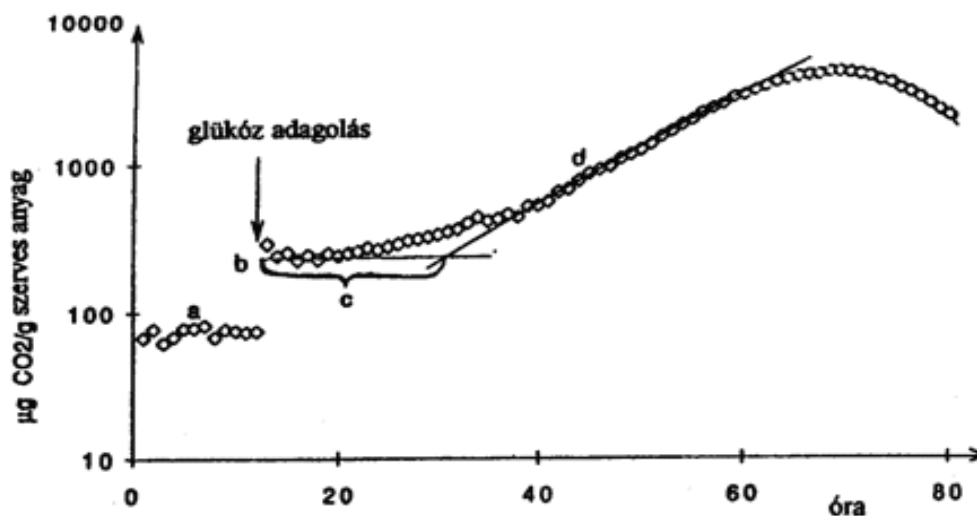
2.1.4 A módszer alkalmazása biodegradáció mérésére

Ez a módszer a BME MGKT-n lett kidolgozva. Hátránya, hogy hosszú ideig, általában 2 hétig tart, ezért gyorsmódként nem alkalmazható. Másik hátránya, hogy a talaj közvetlen mérése helyett talajszuszpenzitót alkalmaz, így környezeti realizmusa kisebb.

2.2 Talajlégzés mérése a termelt CO₂ alapján átlevégőztetett minireaktorban

A talaj állapota, aktivitása úgy jellemezhető talajlégzési teszttel a legegyszerűbben, hogy a megfelelően előkészített és levegőztetett talaj széndioxid termelését folyamatosan mérjük. Az termelt széndioxid abszolút mennyisége is alkalmas durva jellemzésre, de a folyamat dinamikáját jobban jellemzi az a módszer, amit Torstensson (1994) javasol. A talajlégzés folyamatos mérése közben bontható szubsztrátot adagolunk a rendszerhez. A pillanatszerű beadagolás hatására bekövetkező légzésintenzitás növekedést a széndioxid termelés időgörbéjének meredekségével lehet jellemezni. A széndioxid termelés alapján mért talajlégzés mind tiszta, mind szennyezett talajok esetében jellemzi a talaj állapotát. A dinamikus vizsgálat szintén alkalmas mind tiszta, mind szennyezett talajok jellemzésére, várható viselkedésük vizsgálatára.

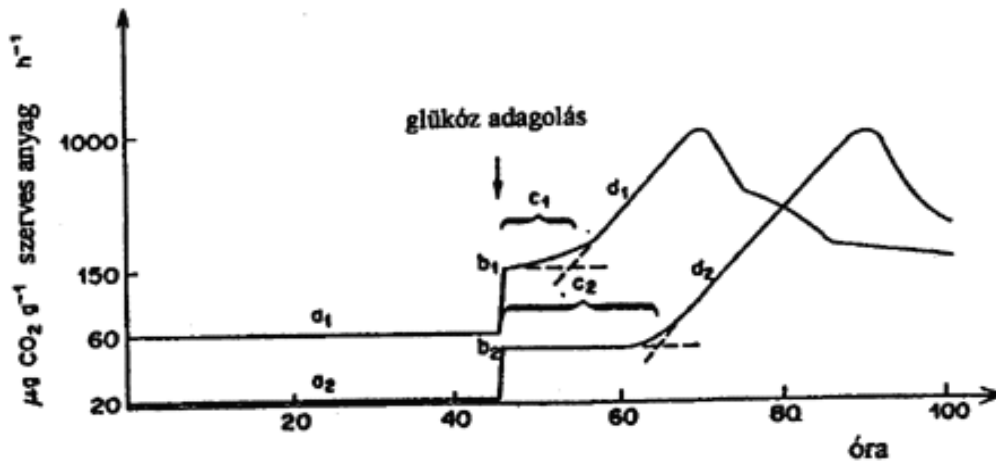
Az 1. ábra és a 2. ábra a talajlégzés intenzitását mutatja szubsztrát adagolás előtt és után szennyezett és szennyezőanyagot nem tartalmazó talajokban.



1. ábra: Talajlégzés könnyen bontható szubsztrát (glükóz) adagolása előtt és után (Torstensson, 1994)

Jelölések:

- a – Talajlégzés mértéke alapállapotban, szubsztrát adagolása nélkül. Ez az érték jellemzi a teljes mikrobiális aktivitást a talajban.
- b – Talajlégzés mértéke egy könnyen bontható szubsztrát (glükóz) adagolása után.
- c – Lag szakasz. A glükóz adagolása után az exponenciális növekedés megindulásáig eltelt idő. Ez az érték jelzi a mikroorganizmusok életképességét.
- d – Növekedési konstans a légzési ráta exponenciális növekedési szakaszában.



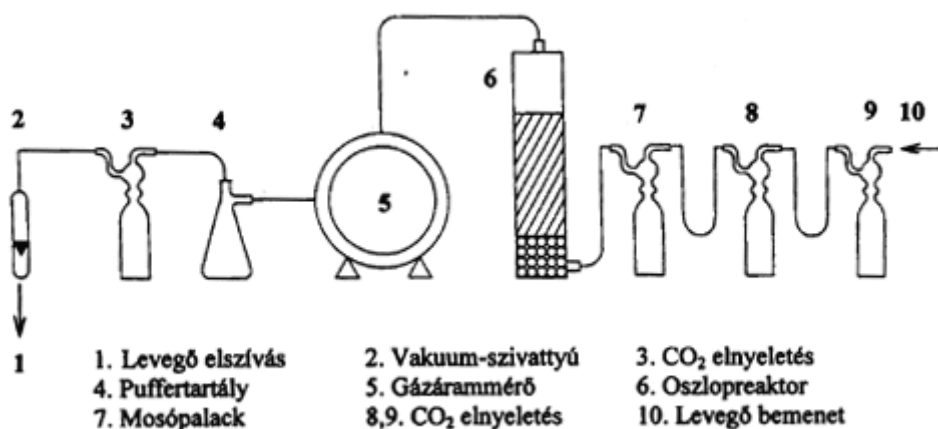
2. ábra: Talajlégzés könnyen bontható szubsztrát adagolása előtt és után, nem szennyezett talaj esetén (Index 1) és fémekkel szennyezett talaj esetén (Index 2) (Torstensson, 1994)

Jelölések:

- a – Talajlégzés mértéke alapállapotban, szubsztrát adagolása nélkül. Ez az érték jellemzi a teljes mikrobiális aktivitást a talajban.
- b – Talajlégzés mértéke egy könnyen bontható szubsztrát (glükóz) adagolása után.
- c – Lag szakasz. A glükóz adagolása után az exponenciális növekedés megindulásáig eltelt idő. Ez az érték jelzi a mikroorganizmusok életképességét.
- d – Növekedési konstans a légzési ráta exponenciális növekedési szakaszában.

Hasonló tesztmódszert dolgoztunk ki a BME Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszékén. Egy minireaktoros rendszert terveztünk szennyezett talajok jellemzésére, a szennyezőanyagok biodegradálhatóságának vizsgálatára és a bioremediáció technológiai paramétereinek tájékoztató jellegű kimérésére.

A következő, 3. ábra a tanszéken tervezett minireaktort és a talajlégzés mérésére alkalmazott mérőrendszert mutatja.



3. ábra: A talajlégzés mérésére szolgáló rendszer ábrája

2.2.1 A mérőrendszer összeállítása

A mérőrendszer szénhidrogénnel szennyezett talajok mikrobiológiai állapotára ad felvilágosítást. Segítségével megállapítható, hogy van-e a talajban működőképes mikroflóra, a

mikroflóra aktiválható-e a technológiai paraméterek megváltoztatásával (pl. levegőztetéssel, hozzáférhetőséget fokozó adalékanyagok adagolásával). A talaj származhat szennyezett területről, de vizsgálhatunk mesterséges szennyezett talajokat is.

A talajlégzést vizsgáló testrendszerben központi szerepe van egy folyamatosan levegőztethető 1100 cm³ hasznos térfogatú üvegreaktornak. Az üvegreaktor aljára kavicsréteget, erre pedig vászonlapot teszünk a levegőztető eldugulásának elkerülésére. A reaktor tetejéhez gumidugó, üvegcső és gumicső segítségével csatlakozik a vízszugárvattyú, melynek segítségével levegőt áramoltatunk át a rendszeren. A talajjal töltött reaktoron való áthaladás előtt kétszeres, lúgban történő elnyeletéssel, eltávolítható a levegő CO₂ tartalma. Így titrálás során már csak azt a CO₂ -t mérjük, amely a mikroorganizmusok életműködéséből származik, tehát az olajbontást jellemzi.

2.2.2 A mérés célja

A légzést mérő testrendszer segítségével az alkalmazástól függően választ kaphatunk a következőkre:

- szennyezett-e a talaj,
- toxikusan hat-e a szennyezőanyag, vagyis gátolt-e a mikrobák működése vagy sem,
- adaptálódott-e a mikroflóra és aktívan működik-e,
- aktiválható-e a mikroflóra,
- ha aktiválható a mikroflóra, milyen technológiai paraméterekre van szükség az optimális működéshez.

A termelődött CO₂ mennyisége arányos az elbontott szénhidrogén mennyiségével, a biológiai oxidáció mértékével, tehát a rendszer alkalmas, mind a talaj biológiai állapotának felmérésére, mind a biodegradáció folyamatának jellemzésére és követésére.

A szénhidrogén vagy más szerves szennyezőanyag típusából, a talaj fajtájából, a szennyezőanyag korából és koncentrációjából adódó különbségek kimérésére is alkalmazható a mérőrendszer.

A technológiát tekintve válasz kapható például arra, hogy milyen mértékű levegőztetésre van szükség a mikroflóra aktiválásához. Szükség van-e tápanyag adagolásra (N-, P-forrás), szükségesek-e adalékanyagok (pl. hozzáférhetőséget javító anyagok).

Karbonátos talajok esetén a felszabaduló CO₂ zavarhatja a mérést.

2.2.3 A mérés kivitelezése

A mérés során általában szennyezett talajokat vizsgálunk. Az oszlopreaktorba töltött vizsgálandó talajjal elindítjuk a levegőztetést. A CO₂ termelődés felfutását és állandósult állapotát mérhetjük megfelelő gyakorisággal végzett CO₂ meghatározással.

1. A szennyezett talaj levegőztetése
2. A termelt CO₂ mennyiségének meghatározása
3. Termelődött CO₂ mennyiségének ábrázolása az idő függvényében

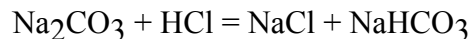
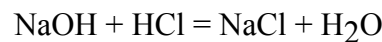
Az egyensúlyi helyzetbe került talajt impulzusszerűen kitehetjük szennyezőanyag és adalékanyagok hatásának, a levegőztetés mértékének megváltoztatásának, stb. Az impulzusszerű hatásra adott válasz gyorsaságából, a felfutás meredekségéből következtethetünk a talaj állapotára, terhelhetőségére és a remediációjánál szükséges technológiai paraméterekre.

2.2.4 CO₂ mennyiségi meghatározása

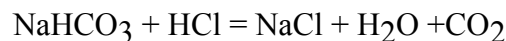
A meghatározás gázanalitikai módszerrel, sav-bázis titrálással történik. A CO₂ elnyelését 150 cm³-es gázmosópalackban, 100 cm³ 1 mólos NaOH oldatban végezzük. Az elnyelés után a lúgoldatból 10 cm³ térfogatú mintákat titrálunk. 3 párhuzamos mérést végzünk.

A titrálás menete:

A mintát 3 csepp fenolftalein indikátor jelenlétében 0,1 mólos HCl oldattal halványrózsaszínig titráljuk. A reakciók:



Majd 3 csepp metilvörös indikátor jelenlétében hagymaszínig titráljuk a bürettában levő 0,1 mólos faktorozott HCl-val. A végpont előtt az oldatot kiforraljuk, majd hűtés után tovább titráljuk hagymaszínig.



Megjegyzés:

Fontos, hogy a titrálást viszonylag alacsony hőmérsékleten (15 °C körül), az erős rázogatót kerülve végezzük.

A termelődött CO₂ mennyiségét ábrázolva az idő függvényében egy görbét kapunk, melynek meredeksége jellemző a szennyezőanyag biodegradálhatóságára, a vizsgált talaj biológiai aktivitására.

2.1.4 A módszer alkalmazása biodegradáció mérésére

A módszer hátránya, hogy mérőműszer összeállítása bonyolult, nagy a helyigénye, gyakoriak a tömitési és összeillesztési problémák, ami szivárgást okoz. A keletkezett CO₂ mennyiségének meghatározása titrálásos módszerrel körülményes és időigényes.

2.3 Talaj aktivitásának mérése hőtermelés alapján

Az említett módszerek a biodegradálhatóság mérésére rutinszerűen használhatóak, de jelentős hátrányokkal bírnak, ezért új lehetőségek felé fordultunk. Az egyik új módszer a talajok aktivitásának, a szennyezőanyag biodegradálhatóság mérésére a mikrok calorimetria, amely biztató eredményeket mutat. A mikrok calorimetriás mérés alapja, hogy zárt rendszerben, adott hőmérsékleten való inkubálás után mérjük a hőtermelést. A termelt hő mennyiségéből a lejátszódó folyamatok intenzitására lehet következtetni.

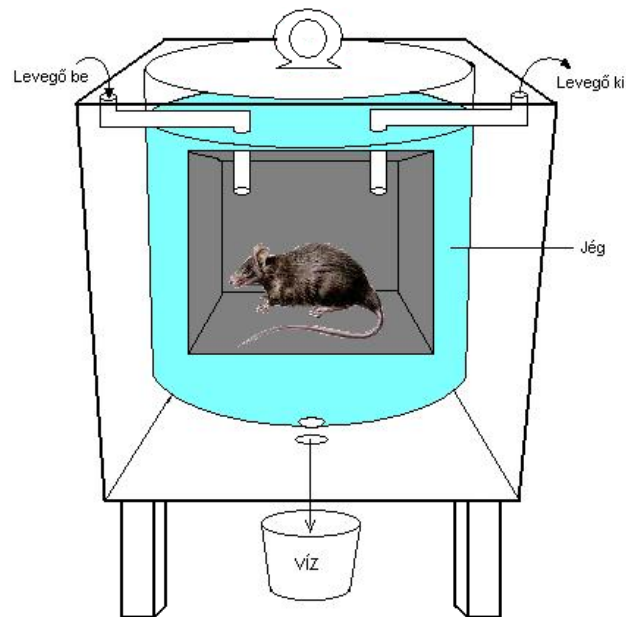
2.3.1 A mikrok calorimetriás mérőrendszer bemutatása

2.3.1.1 Rövid történeti áttekintés

Az első olyan készüléket, amellyel egy biológiai rendszer hő leadását lehetett mérni, Lavoisier és munkatársai már 1780-ban megépítették. A „Jég Kaloriméter” elnevezésű berendezést (4.Ábra) kisméretű állatok hőtermelésének mérésére használták, az eredményeket pedig összefüggésbe hozták a kísérleti állat testtömegével és légzésének mértékével.

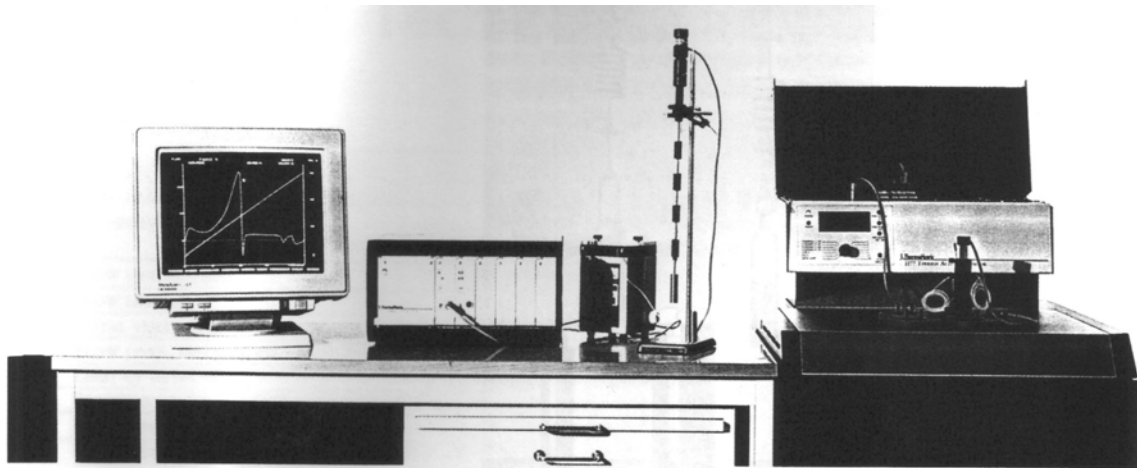
Lavoisier a kísérletek során a megolvadt és készülékből kicsepegett jég mennyiségét mérte és ebből számolt vissza a leadott hőmennyiségre. A számolásokat a jég olvadáshőjének és a kontroll kísérletek eredményeinek ismeretében végezhetette el.

Az általunk használt készülék is egy szabályozott biológiai kísérletben leadott hő mennyiségét képes regisztrálni az idő függvényében, mérési elvében (megolvadt jég mennyiségének mérése) azonban már nem összehasonlítható az eredeti Lavoisier-féle készülékkel.



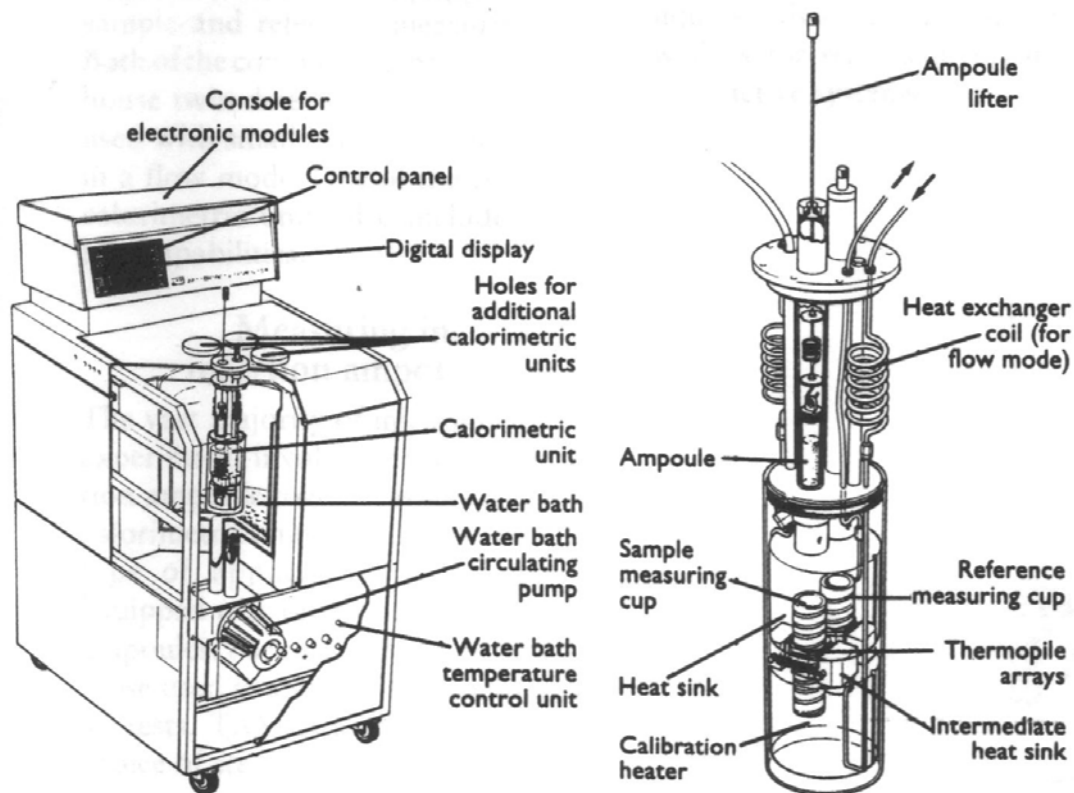
4. ábra: Lavoisier-féle "Jég Kaloriméter"

2.3.1.2 A berendezés felépítése



5. ábra: Mikrokalorimetriás mérőberendezés (TAMTM – Thermal Activity Monitor)

Az általunk használt készülékek (5. és 6. ábra) egyenként 4 mérőhellyel rendelkeztek. Az egyes mérőhelyek tartalmaztak egy a mintához és egy a referenciához tartozó detektort, kivéve a 25 ml-es edények esetében, ahol nincsen referencia. Minden egyes detektor termikus összeköttetésben áll két Peltier elemekből álló tömbbel (egy tömb több elem kapcsolódásából áll, a feszültségjelük összeadódik). A két tömb egymással szembe van kapcsolva, így a kijövő nettó feszültség tartalmazza a referenciától való eltérést is. A feszültség erősítést követően kerül egy feszültségmérő detektorra vagy egy adatrögzítő eszközre.



6. ábra: A mérőrendszer és a kalorimetriás mérőegység felépítése

2.3.1.3 A mérés elve

A mérés alapvetően egy termoelektromos jelenségre, a Seebeck effektusra épül. Ennek lényege, hogy hőmérsékletváltozás hatására elektromos töltésvándorlás indul meg, azaz elektromos áram generálódik. A „termoelektromos generátor” jelen esetben Peltier elemekből álló tömb. A Peltier elemek egy szabályozható hőmérsékletű hőtartályhoz kapcsolódnak és ennek adják át az általuk felvett hőt. A kialakult feszültségkülönbséget pedig egy Volt-mérő detektálja.

2.3.1.4 A mikrokaloriméter alkalmazási lehetőségei

A kaloriméter alapvetően különböző biológiai rendszerekben zajló metabolikus és növekedéshez kapcsolható folyamatok hőváltozásának folyamatos, érzékeny és gyors megfigyelésére alkalmas berendezés. A minta lehet akár egy sejtalkotó, sejt, többsejtes organizmus, szövet, szerv, kis méretű állat vagy növény is. A készülék összetett rendszerek vizsgálatára is felhasználható, így többek között talajok viselkedésének vizsgálatára. A mintát akár természetes körülményeknek megfelelő rendszerbe is helyezhetjük, majd figyelhetjük a különböző zavaró tényezők (pl.: talajszennyezés) hatását.

A kísérletek eredményeként olyan görbéket kapunk, melyeken az idő függvényében látható a hőváltozás mértéke. A görbék alakjáról vonhatók le következtetések a tanulmányozott folyamatról.

Konkrét felhasználási lehetőségek:

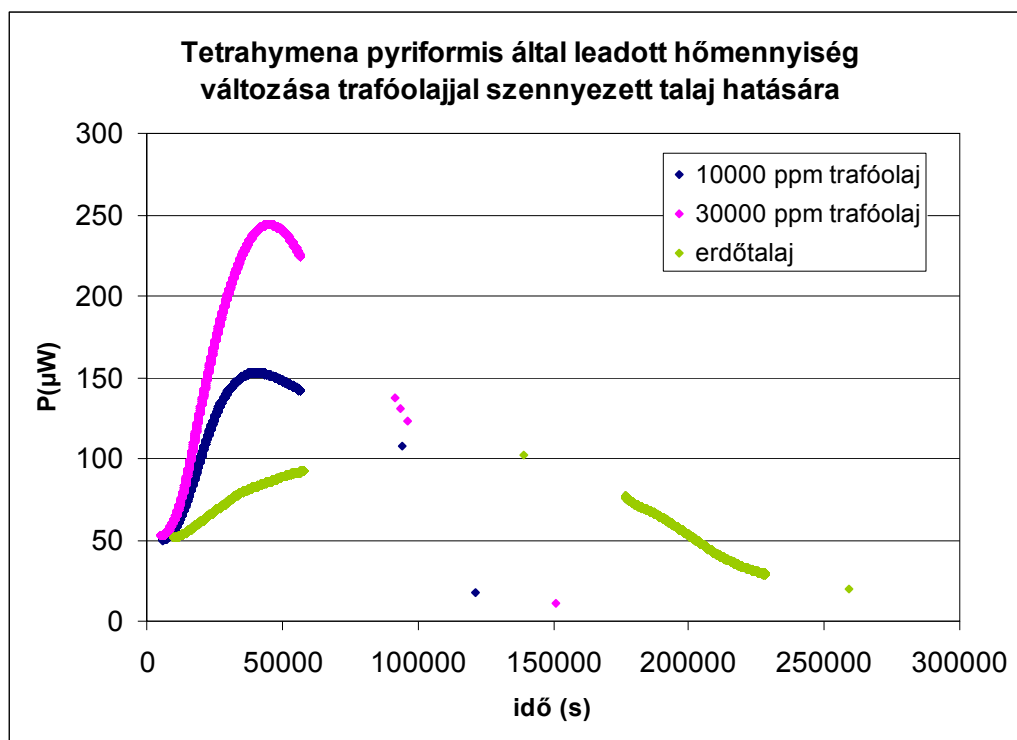
- Baktériumok, élesztők, gombák, algák és protozoák
- Élő sejtszám meghatározás, számlálás

- Identifikálás, törzsek azonosítása
- Növekedési és metabolikus folyamatok megfigyelése
- Inhibíció vizsgálata
- Spórák csírázásának vizsgálata

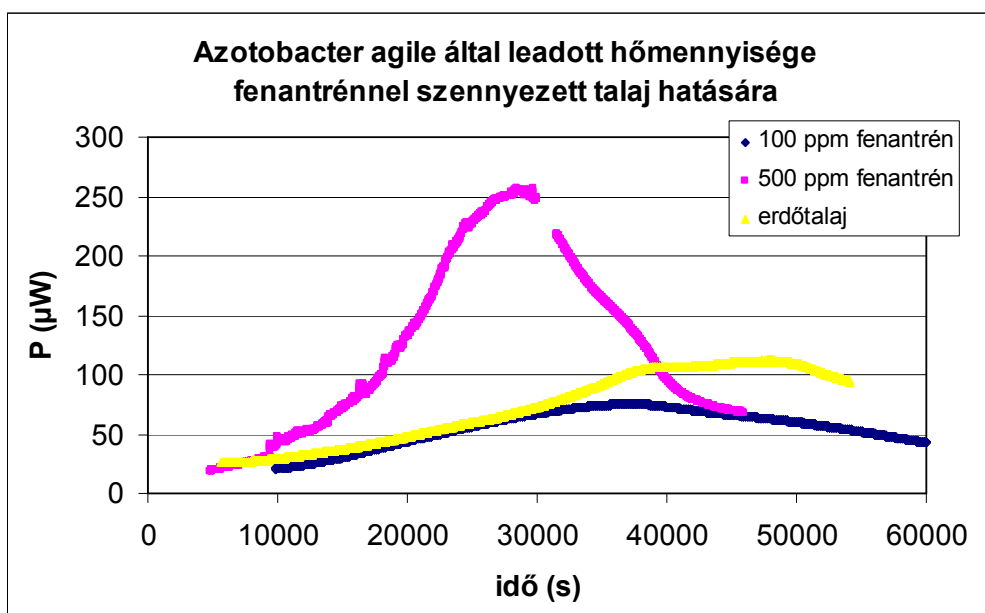
2.3.2 A mikrok calorimetriás mérések eredményei

Mikrokaloriméteres méréseink során a szennyezetlen és szerves szennyezőanyagokkal szennyezett talajok mellett a talaj és három trófikus szintről (baktérium, növény és állat) származó tesztorganizmus kölcsönhatását is vizsgáltuk. Az élőlények hőtermelése megváltozik, ha a szennyezett talajjal érintkezésbe kerülnek, és az általuk leadott hő mennyiségéből következtetni lehet a talaj toxikusságára és a szennyezőanyag biodegradálhatóságára.

A kísérletek kezdeti fázisában az eredményekből látszik, hogy a trafóolajjal vagy egyéb szerves szennyezőanyaggal (fenantrén, cypermetrin) szennyezett talajjal érintkezésbe kerülve a legtöbb tesztorganizmus (pl. *Azotobacter agile*, *Tetrahymena pyriformis*) hőtermelése fokozódik, ami a biodegradáció, illetve a toxikus anyaggal szembeni reakció eredménye lehet (7. és 8. ábra).



7. ábra: *Tetrahymena pyriformis* által leadott hőmennyiség steril erdőtálatjal, illetve 10000 ppm és 30000 ppm trafóolajjal szennyezett talajjal érintkezésbe kerülve (1 g talaj + 250 μl TP táp + 250 μl *Tetrahymena pyriformis* tenyészet)



8. ábra: *Azotobacter agile* által leadott hőmennyiség steril erdőtalajjal, illetve 100 ppm és 500 ppm fenantrénnel szennyezett talajjal érintkezésbe kerülve (0,5 g talaj + 75 μl Fjodorov tápoldat + 75 μl *Azotobacter agile* tenyészet)

Az előzetes kísérletekből az is látszik, hogy a szennyezett talajjal érintkezésbe kerülve a kezdeti szakaszban a termelt hőmennyiség növekedésének léptéke, a maximálisan termelt hő, és a hőtermelés megszűnésének ideje mind összefüggésben állnak a szennyezőanyag koncentrációjával. A pontos összefüggések és a hőtermelés háttérében álló folyamatok megértéséhez a méréseket tovább folytatjuk.

2.3.3 A módszer alkalmassága biodegradáció mérésére

Ennek a módszernek a hátránya azonban, hogy a mikrokaloriméteres készülék nagyon drága és ma még kevés helyen hozzáférhető (Magyarországon két helyen van ilyen készülék). A mérés még viszonylag hosszú időt vesz igénybe, azonban az eredmények ígéretesek és várhatóan a mérési idő lecsökkenthető lesz, azonban a rendelkezésre álló idő még nem volt elegendő a protokoll kidolgozásához.

2.4 Zárt palack teszt – új gyorssteszt protokoll

A légzés mérése a biodegradáció mértékének meghatározására az eddig bemutatott CO₂ termelés mérése mellett más, gyorsabb és egyszerűbb módszerrel is mérhető. Míg a vizek vizsgálatára már évtizedek óta a rutinjeljárások része a biológiai aktivitás (BSB, spontán oxigén-fogyasztás [DIN 38409 és DIN 38409]) mérése a hasonló eljárások mind ez ideig nem tettek szert különösebb jelentőségre a talajvizsgálat területén annak ellenére, hogy ilyen eljárások már régóta ismeretesek (Isermeyer, 1952). Ennek oka többek között abban keresendő, hogy egyetlen egyszerűen kezelhető eljárás sem állt rendelkezésre: az ismert eljárások vagy túlságosan időigényesek voltak, vagy nagy műszerezettséget kívántak, és ez megdrágította őket (Alef, 1995). A régebbi szeméttelpek talajának biológiai úton történő tisztítására, valamint a hulladékok biológiai kezelésére vonatkozó egyre növekvő érdeklődés ráirányította az ezzel foglalkozók figyelmét a szilárdanyagok egyszerű biológiai mérését lehetővé tevő eljárások és eszközök kidolgozásának fontosságára (DECHMA, 1992, 1995).

Kísérleteink során eredetileg BOI mérésre tervezett készülékkel kidolgoztunk egy eljárást, amellyel talajok aktivitása mérhető. A Sensomat légzésmérő rendszer a manometrikus

oxigénmeghatározás elvét használja, amely azon alapszik, hogy az élő szervezetek az oxigén fogyasztása mellett egyidejűleg széndioxidot állítanak elő. Ha a keletkező CO₂-ot abszorpciós szerrel megkötjük, a mért nyomásváltozás kizárólag az oxigénfogyasztásra vezethető vissza.

A kísérleteink célja az volt, hogy meghatározzuk a készülékkel történő talaj aktivitás mérés optimális körülményeit, a szükséges talajmennyiséget, a szükséges talaj előkezelést, illetve kondicionálást, annak érdekében, hogy megfelelő, jól mérhető jelet kapjunk, továbbá hogy milyen hosszú idejű mérésekre van szükség, és milyen módon történjen a kiértékelés. A kísérletek eredményeként kidolgoztunk egy protokollt, amely alapján a szennyezett talajok aktivitása mérhető. Az eljárás alkalmazható biodegradáció mérésére, de emellett adaptáció és toxikus anyagok hatásának mérésére is alkalmas.

2.4.1 A légzésmérő rendszer elemei, alkatrészei

A Sensomat légzésmérő rendszer a léggéssel arányos biológiai aktivitást mérő készülék. A mérőrendszer háromnyakú üvegedényből, az érzékelő fejből, a mérést vezérlő és az adatokat rögzítő kézi távirányítóból, a megfelelő és szükséges tömítésekből és azok rögzítő csavarjaiból áll (9. és 10. ábra).



9. ábra: Mérőfej, mérőedény és tömítések

A készülékkel lehetőség van szennyvizek, szennyvíz iszapok, komposztok és talajminták légzésének mérésére. A mérés a mintában lévő élő mikroorganizmusok aerob folyamataihoz felhasznált oxigén fogyását követi nyomon. Az üvegedényben elhelyezett minta légmentesen lezárható. A mikrobák életfolyamataik fenntartása alatt oxigént fogyasztanak az edény légteréből, és széndioxidot juttatnak oda. A széndioxid talajból kikerülő részét a légtérbe nyúló tartályban elhelyezett nátrium-hidroxid szemcsékkel elnyeletjük. Az oxigénfelhasználás nyomáscsökkenést hoz létre a mintatartó edényben, amit az edény tetején lévő érzékelő fejjel, egy nyomásmérővel mérni lehet.

A készülék vezérlése és az információ lekérdezése a kézi egységgel történik (10. ábra). A kapcsolatot a mérőfej és a kézi egység között infravörös portok biztosítják. A lekérdezett és a kézi vezérlőben tárolt adatokat egy interface (adatkábel) és egy software segítségével a számítógépbe vihetők, ahol további tárolásra, illetve adat elemzésre van lehetőség. A mérőrendszer saját számítógépes szoftveréből az adatok egy az egyben Excel kompatibilisak,

vagyis átvihetők. Az Excelben pedig lehetőség van bármilyen formában átszámolni és interpretálni az eredményeket.



10. ábra: Kézi adatrögzítő és reakcióedény az érzékelő fejjel

A készülékek elem méretű akkumulátorral működnek, nincs szükség hálózati csatlakozásra. A méréseket állandó hőmérsékletű helyen kell végezni.

2.4.2. A mérőrendszer adaptálása talajra

A készüléket eredetileg iszapok, szennyvizek oxigénfogyasztásának mérésére, a BOI, vagyis biológiai oxigén igény meghatározására fejlesztették ki. A készülékbe beépített négy funkció közül három BOI mérésre szolgál. A készülék leírása tartalmaz egy említést arra vonatkozólag, hogy lehetőség van talajminták oxigén fogyasztásának meghatározására is, ám a leírás a konkrét alkalmazási lehetőségeket nem említi..

A készülék négy beépített funkciója közül három BOI mérést tesz lehetővé. A negyedik funkció az eredendően mért, ha úgy tetszik, nyers nyomás érték eredményeket szolgáltatja. Ez azt jelenti, hogy a három BOI mérő funkciónál egy megadott és gyárilag rögzített képlet alapján a mért nyomáscsökkenésből kiszámítja a BOI-t. A negyedik funkciónál ("pressure p") ez az átszámítás elmarad, és a felhasználóra van bízva, hogy hogyan és mit számít belőle, illetve minek értelmezi az értékeket. Így hát lehetőség nyílik arra, hogy saját magunk meghatározott mennyiségű és minőségű mintát helyezünk el a mintatartóban.

2.4.2.1. A mérés kivitelezése talajok esetében

A 0.5 literes mintatartó üvegbe elhelyezzük a mintát, és a szükséges adalékok hozzáadása után alaposan elkeverjük egy hosszú kanállal, hogy biztosítva legyen a homogén eloszlás. Felhelyezzük a nátrium-hidroxid tárolására alkalmas elemet, és feltöltjük friss nátrium-hidroxid granulátummal. Ezt követően a helyére tesszük és rögzítjük a tömítéseket a két szélső nyíláson. Ügyelni kell a megfelelő erősségű meghúzásra a jó tömítettség érdekében. A mérőfejet is felhelyezzük az edény tetejére, és rögzítjük. Célszerű a kézi vezérlőn előre beállítani a szükséges mérési feltételeket a mérési módot, mérési időt, valamint a méréshatárt.

Magát a mérést a megfelelő gombok használatával indíthatjuk el. A mérés időtartama alatt biztosítani kell az állandó hőmérsékletet. Miután lejárt az előre meghatározott idő, a kézi vezérlővel leállítjuk a mérést, és a mérőfejet használaton kívüli, úgynevezett szabad állapotba hozzuk. E két dolgot az adatok lekérdezésével egy időben a mérőrendszer automatikusan elvégzi.

Az adatokat a feldolgozás érdekében a készülékhez tartozó interface-en keresztül, és a mérőrendszerhez tartozó szoftver segítségével átvisszük számítógépre, ahol a Microsoft Excel Táblázatkezelő programmal kiértékelhetők.

2.4.2.2. A kiértékelés módja, végpontok, interpretáció

Attól függően, hogy milyen hosszú idejű mérést végeztünk, a számítógépben a nyomáscsökkenés értékei az idő függvényében percben vagy másodpercben jelennek meg. Mindkét esetben célszerű órára átszámítani az idő adatokat, főleg akkor, amikor félnapos, illetve egy- vagy kétnapos méréseket végzünk.

A nyomásértékek ábrázolása az idő függvényében történik. Érdemes a kiemelt pontokat külön ábrázolni, amelyek a 3, 6, 12, 24, illetve 48 órás adatokat jelentik. Ez nagymértékben megkönnyíti az eredmények átláthatóságát. Természetesen a teljes kiértékeléshez szükség van az eredeti görbékre is, mert vannak olyan esetek is, amikor elengedhetetlen az eredeti görbe lefutásának vizsgálata.

Végpontnak a mérés jellegétől függően mindig mást és mást kell tekintenünk. Egy adaptációs vagy biodegradációs vizsgálatnál a mért nyomáscsökkenés 24 órás értékét lehet végpontnak tekinteni, egy ökotoxikológiai vizsgálatnál pedig a mért értékekből számítható légzésintenzitás gátlás százalékos értékét, az EC 20-as, EC 50-es értékeket.

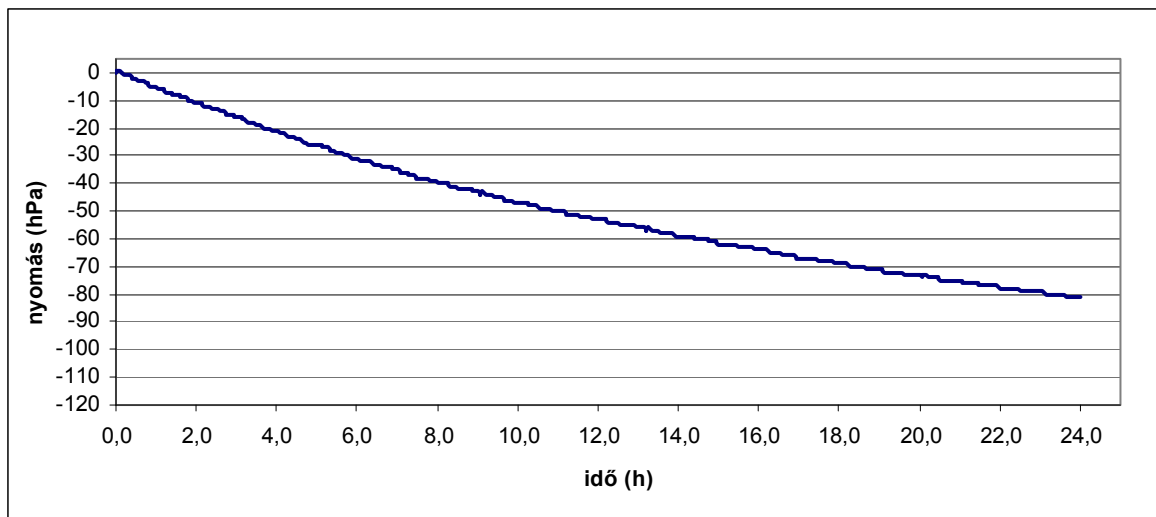
Az eredmények interpretálása szintén függvénye a mérés jellegének, mert a megfelelő végpontokat ábrázolhatjuk az idő függvényében, vagy a kísérletben változtatott paraméterek függvényében. Például egy toxikus anyag növekvő koncentrációjának függvényében ábrázolt légzés értékek lehetővé teszik az eredmények összehasonlítását a koncentráció növelése és az idő múlása függvényében.

2.4.3 Módszerfejlesztés – zárt palack teszt alkalmazása talajlégzés vizsgálatára

Célunk az volt, hogy meghatározzuk a légzésmérő készülékkel történő talaj aktivitás mérés optimális körülményeit, a szükséges talajmennyiséget, a szükséges talaj előkezelést, illetve kondicionálást, annak érdekében, hogy megfelelő, jól mérhető jelet kapjunk, továbbá hogy milyen hosszú idejű mérésekre van szükség, és milyen módon történjen a kiértékelés. A tapasztalatszerzés érdekében előkísérleteket végeztünk, amelyek során megismertük az alapvető működési eljárásokat, a körülmények változásának hatását a mért jelre, és az irányvonalat a mérés protokolljának kidolgozásához.

2.4.3.1 A mért jel

A 11. ábrán egy tipikus nyomásgörbe látható, mely egy jó minőségű és megfelelően előkezelt talajminta Sensomat készülékkel mérhető légzésével, oxigén fogyasztásával arányos. A mérésnél barna erdőtalajt használtunk. A talaj a Szépvölgyi út végénél lévő Kecskéhegyről származik, a talajtakaró 10 és 30 cm közötti része. Mészköves alkőzet jellemző a területre.



11. ábra: Tipikus légzési görbe: nyomáscsökkenés az idő függvényében

A készülék az idő függvényében méri a mintatartó edényben lévő nyomást. A mintatartó hermetikusan zárható, így a mérőfej csak az edényben lévő nyomást méri. Nincs szükség a mérés előtt, közben vagy után a külső légnyomás nyomon követésére, mert a mérőfej az üvegben lévő abszolút nyomáscsökkenést méri, ezért nem kell az aktuális külső légnyomáshoz viszonyítani. A nulla nyomásértéket az üveg lezárásakor benne lévő légnyomás szolgáltatja ugyan, de a mérés során ennek változása már nem befolyásolja a kapott jelet.

A 11. ábrán látható átlagos görbe a talajmintában lévő mikroorganizmusok oxigénfogyasztását mutatja. A mérés kezdeti szakaszában a meredekség értéke nagyobb, és ez egyenletes csökkenés és kellően hosszú idő után nullává válik. Ez azért történik így, mert mind a felhasználható szubsztrátok, mind az oxigén és a tápanyagok, a kezdetekben még nagy mennyiségben vannak jelen. A mikrobák számára kellemes körülmények között a szubsztrátok felhasználása gyors. A felhasznált tápanyag és oxigén az energiatermelésre és az új sejttömeg létrehozására fordítódik. A növekvő új sejttömeg következménye az egyre nagyobb igény és ezzel szemben az egyre csökkenő szubsztrátmennyiség. Ezek együttesen azt eredményezik, hogy a talajlégzés mértéke csökken, és a görbe meredeksége a nullához tart. A jel nagysága függ a talaj sejtszámától, a felhasználható tápanyag, az oxigén és a talajminta mennyiségétől, a mintában lévő, légzést gátló vegyi anyagoktól és a hőmérséklettől.

Méréseink során több görbetípussal találkoztunk, melyeket a következőképpen lehet értelmezni:

- A nyomás egy rövid ideig csökken az idővel, majd lassan újra növekszik: hibás mérés, tömítetlenség.
- A nyomás a mérés indulása után megnő, majd elindul a nyomáscsökkenés: az edény fala belülről nedves és a víz párolgásából kifolyólag a nyomás megnő.
- A 11. ábrán látott görbéhez képest kezdetben a nyomás kisebb mértékben csökken, majd beáll egy fokozatos csökkenés: adaptáció az új közeghez, késleltetett tápanyag felhasználás.
- A nyomás lecsökken az idővel a 11. ábrához hasonlóan, majd a viszonylag alacsony értékről újra növekedni kezd: túl hosszúvá választott mérésidő, az oxigén elfogyott, a mikrobák anaerob gáztermelő anyagcserére tértek át.
- Növekvő nyomás az időben: a zárt edényben anaerob folyamatok domináltak, mert nyomásnövekedés, tehát gáztermelés volt megfigyelhető.

A méréshez megfelelő alap görbetípus a 11. ábrán látható, ebben az esetben, a talajmintában a légzés dominál, és a jel elég nagy ahhoz, hogy a légzésgátlás értelmezhető legyen.

2.4.3.1 A talaj előkezelése: adalékok szükségességének vizsgálata

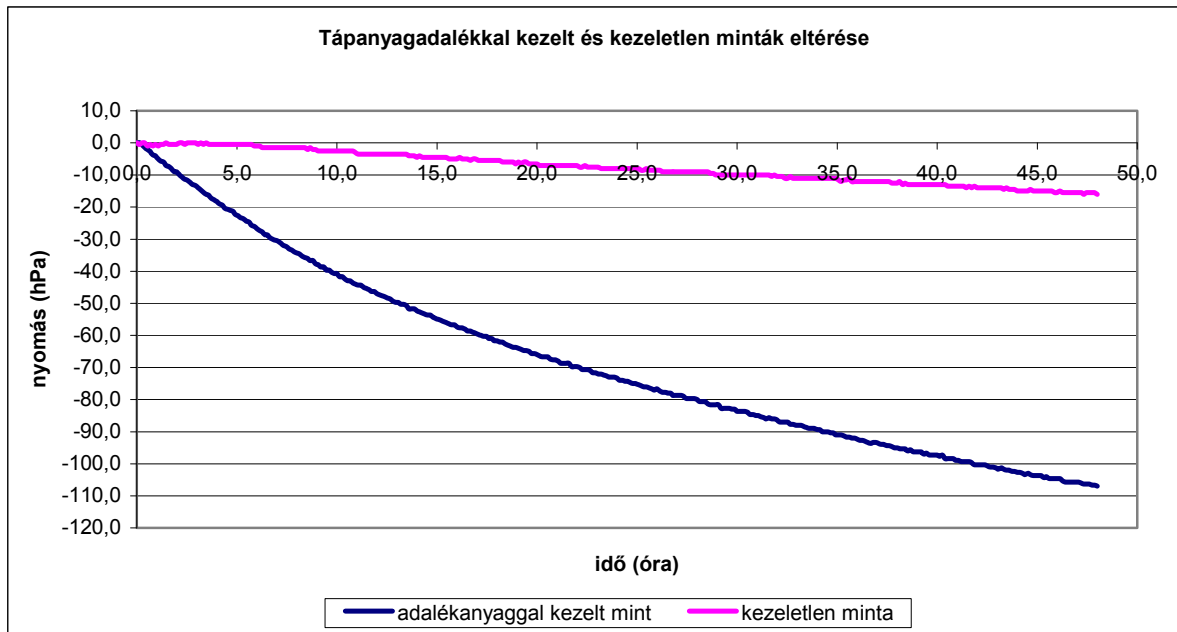
A következőkben ismertetett vizsgálat célja annak eldöntése, hogy a talaj alaplégzése fokozható-e. Olyan talajelőkezelési módszert kellett találnunk, melynek hatására a természetes mikroflóra légzése erősödik, és így nagyobb jelet kapunk, ezáltal érzékenyebbé válik a mérés. A vizsgálat alapját képező elméletek szerint a talaj légzése megfelelő szén-, nitrogén-, foszforforrás és tápanyag felvételt elősegítő ásványi anyagok jelenlétében megnő.

Az előkísérletek alapján elmondható, hogy nem minden szénforrás alkalmas a légzési jel megnövelésére. A glükóz és a keményítő nem váltotta be a hozzájuk fűzött reményeket, mert a folyamatok rövid idő alatt anaerobbá váltak az edényben.

A választásunk végül a húslére és egy tápsó keverékre esett, melyekkel számos kombinációban végeztünk kísérleteket. Az adalékok alkalmazásának szükségszerűségét és fontosságát alátámasztják az eredményeink. A minta 200 g erdőtalaj, az adalékok mennyisége pedig 10 cm³ húslé és 10 cm³ tápsó oldat volt. Az adalékok mennyiségét a mikrobák tenyésztéséhez használt mennyiségek analógiájára választottuk meg. A mérőpalackba adandó talajminta optimális mennyiségének meghatározására is végeztünk vizsgálatokat.

Az adalékok összetétele:

Húslé: 5g pepton		Tápsó: 0,6 g KH ₂ PO ₄
5g glükóz		0,1 g (NH ₄) ₂ SO ₄
3g húskivonat		0,14 g Na ₂ SO ₄
0,5g nátrium-klorid	0,5 g	0,5 g NaCl
1000cm ³ víz		0,13 g MgCl ₂ x 6H ₂ O
		0,001 g CaCl ₂ x 2H ₂ O
		0,5 g KNO ₃
		1 cm ³ nyomelem-oldat (Pfenig, 1965)
		1000cm ³ desztillált víz



1

2. ábra: Húslével és tápsóval kezelt és adalék nélküli minták jele

Jól hasznosítható szubsztrát hatására a nyomáscsökkenés ugrásszerűen megnövekszik, és így lehetőség nyílik az olyan vizsgálatok elvégzésére is, amelyeknél a vizsgált behatás csak kis mértékű változást okoz. Megnö a rendszer érzékenysége, és könnyebbé válik a kiértékelés, sőt sok esetben csak így válik kiértékelhetővé az eredmény.

Felmerült a kérdés, hogy szükséges-e mind a tápsó mind a húslé használata a talajminták aktiválására, és hogy mennyi időnek kell eltelnie a mérés és a minta előkészítése, az adalékanyagok hozzáadása között. Ezért minden lehetséges kombinációt megmértünk. Egy- és kétnapos állásidőket hasonlítottunk állásidő nélkülihez. Hosszabb állásidők választása azért nem indokolt, mert munkánk egyik fő célja a rövid idejű mérések kidolgozása volt. A 200-200 g erdőtalaj mintákat csak 10 cm³ húslével, csak 10 cm³ tápsóval, illetve 10 cm³ húslével +10 cm³ tápsóval készítettük elő, majd méréseket végeztünk rögtön, egy nap és két nap elteltével. A kezelt mintákat nyitott edényben tároltuk a mérés kezdetéig. A mérések időtartama 24 óra volt.

A kétnapos állás eredménye két összeállításnál a nyomás növekedését eredményezte, tehát mérésre nem alkalmas. Húslé alkalmazása és állás esetén az eredmények nem hogy nem javultak, de romlottak. Ezt azzal lehet magyarázni, hogy az ilyen hosszú várakozás alatt a talaj a zárt térben berothad, és anaerob gáztermelés alakul ki. A gáztermelődés a vizsgált készülék mérés-technikai megoldása miatt zavaró, nem megfelelő, hiszen olyan folyamat játszódik le, ami a mérendő jellel ellentétes, és nem lehet kontrollálni.

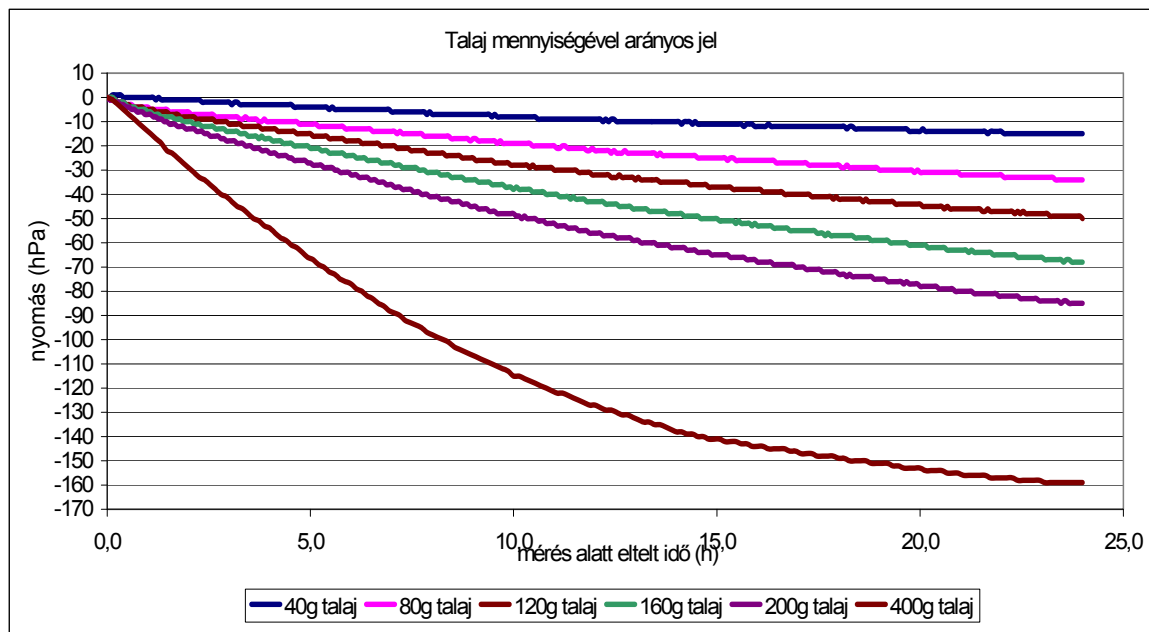
Az egynapos állás már elfogadható eredményt hozott, mégpedig a csak húslé és a húslé + tápsó alkalmazásánál. Az egy napos állást sem javasoljuk, mert mint látható a várakozás nélküli mérésekkel, még hozzá a húslé + tápsó együttes alkalmazásával, sokkal jobb eredmények is elérhetőek. Az intenzív légzés elérésének oka, hogy mind a tápanyag mennyisége, mind a felvételhez szükséges ásványi anyagok jelenléte rendkívül jó körülményeket biztosít a mikrobák számára.

A mérésorozat eredményeiből levonható tanulság, hogy az adalékok mintához adását közvetlenül a mérés előtt kell elvégezni, ami azért is előnyös, mert így a vizsgálat teljes időigénye is jelentős mértékben csökken.

Vizsgálataink során arra is kíváncsiak voltunk, hogy mennyi élő sejtet jelenthet a mérés során kapott jel, adott módon kezelt minták esetében. Az eredmények azt mutatták, hogy a nagy jelet a magas sejtszámú minta adja, és az adalékok hozzáadása négy nagyságrenddel növeli a sejtszámot.

2.4.3.3 A jel nagyságának változása a talajminta mennyiségével

Ebben a mérésorozatban a vizsgálódásunk célja az volt, hogy megállapítsuk az optimális mintamennyiséget. Hasznosítva a korábbi tapasztalatainkat, előkészítésként húslét és tápsót adtam a mintákhoz, természetesen arányosan a minta mennyiségével. Erre azért volt szükség, mert kevesebb talajban kevesebb mikroorganizmus él, és az eredmények csak akkor vethetőek össze, ha azonos mértékben kapnak tápanyagot. A vizsgált mennyiségek: 40 g, 80 g, 120 g, 160 g, 200 g, 400 g volt. Az adalékok pedig rendre 2 cm³, 4 cm³, 8 cm³, 10 cm³ és 20 cm³ húslé és tápsó volt.



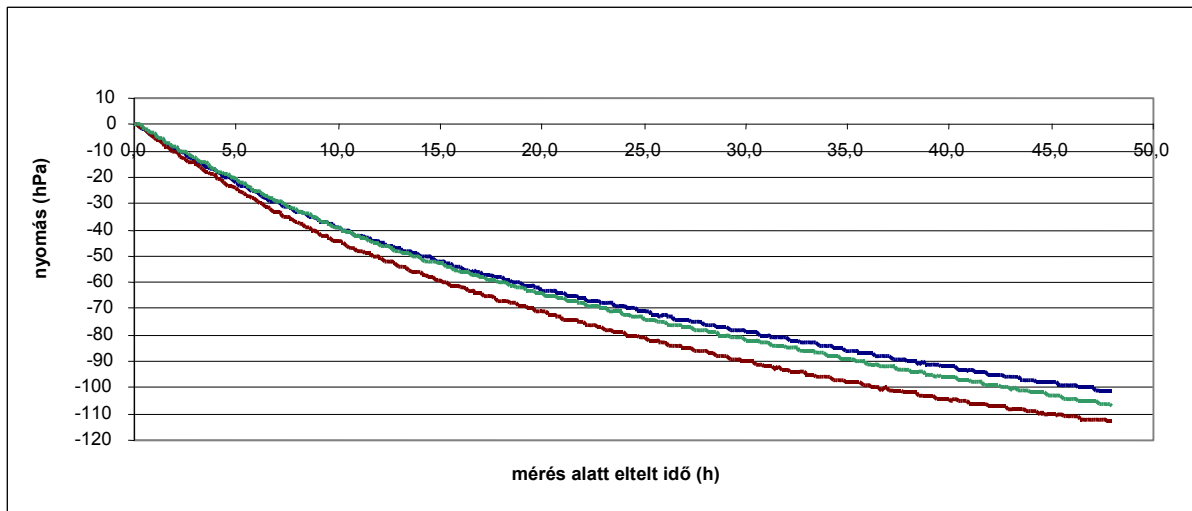
13. ábra: A nyomás változása különböző mennyiségű talaj esetén

A 13. ábrát nézve látható, hogy a legjobb jelet a 400 g talajminta szolgáltatja, ám a mérés kivitelezését nehezíti ez a mennyiség, mert az edény túlságosan tele lesz a talajmintával és ez nagyon nehézkesé teszi a vele való munkát, pl. keverést. Továbbá a gazdasági szempontokat is figyelembe véve, előnyösebb a 200 g mintamennyiség, kevesebb tápsót, kevesebb húslét igényel, és a vizsgálandó mintát sem fogyasztja olyan mértékben. A 200g minta értékei és kezelhetősége is megfelelő a vizsgálatok lefolytatásához, de olyan esetekben, amikor kicsi az alapjel gondolhatunk a mintamennyiség további növelésére.

2.4.3.4 Reprodukálhatóság

Minden analitikai, kémiai, biológiai és ökotoxikológiai mérési módszer alkalmazásának alapfeltétele a reprodukálhatóság. A mérés akkor reprodukálható, ha ugyanazon minták azonos mennyisége, azonos módon előkezelve és azonos környezeti paraméterek között lemérve, a kapott válaszok értékei között a különbség a megengedhető hibahatáron belül van. Talán az egyik legfontosabb kísérlet ez, mert reprodukálhatóság nélkül nem lenne használható a készülék, az innen származtatott eredmények nem lennének hitelesek. A reprodukálhatóság ellenőrzéséhez egy méréssort indítottunk, illetve a felhalmozódott eredmények közül válogattuk ki azokat, amelyek azonos módon kezelt minták méréséből származnak. Az

egységes mintakezelés ebben az esetben is 10 cm^3 húslét és 10 cm^3 tápsót jelentett, a minta mennyisége 200 g, a mérés időtartama pedig két nap volt.



14. ábra: Azonosan előkezelt minták 48 órás mérési eredményei

Az ábrák értékelésekor világossá vált, hogy olyan kontroll nem készíthető, amely mindenkor viszonyítási alapot képezne, ezért minden vizsgálatnál szükség van összehasonlítási alapot képező eredményekre. Látszik, hogy az idő előrehaladtával az értékek jobban elválnak egymástól. Annak érdekében, hogy számszerűsíteni lehessen az eltéréseket, kiszámítottuk az eredmények szórását, vagyis az eredmények átlagértékétől való +/- eltérését. Mind a szórás mind a görbesereg azt mutatja, hogy a reprodukálhatóság szempontjából jobbak a rövidebb idejű mérések. Elhúzódó vizsgálatoknál egyre nő a mérőrendszer hibája, csökken az érzékenysége a növekvő szórás miatt.

2.4.3.5 A módszerfejlesztés összefoglalója – a zárt palack teszt protokollja

Ezek a kísérletek választ adtak az olyan alapvető kérdésekre, hogy mennyi mintát kell használni, mivel és hogyan kell a mintát kezelni, meddig érdemes a mérést végezni, és végül, de nem utolsósorban milyen mértékben reprodukálhatók a vizsgálatok. Ezek alapján megadható a zárt palack teszt protokollja talajok vizsgálatára.

Protokoll:

0.5 literes mintatartó üvegbe elhelyezzünk 200 g talajmintát., és hozzáadunk 10 cm^3 húslét és 10 cm^3 tápsót (összetételüket lásd 2.4.3.1-es pont alatt). Ezután alaposan elkeverjük a mintát a homogenitás biztosítása érdekében. Felhelyezzük a nátrium-hidroxid tárolására alkalmas elemet, és feltöltjük friss nátrium-hidroxid granulátummal. Ezt követően a helyére tesszük és rögzítjük a tömítéseket a két szélső nyíláson. A mérőfejet is felhelyezzük az edény tetejére, és rögzítjük. A kézi vezérlőn beállítjuk a szükséges mérési feltételeket a mérési módot, mérési időt, valamint a méréshatárt.

Elindítjuk a mérést. A mérés időtartama alatt a mintákat sötét helyen és állandó hőmérsékleten tartjuk. Miután lejárt az előre meghatározott idő, a kézi vezérlővel leállítjuk a mérést, és a mérőfejet használaton kívüli, úgynevezett szabad állapotba hozzuk. E két dolgot az adatok lekérdezésével egy időben a mérőrendszer automatikusan elvégzi.

Az adatokat a feldolgozás érdekében a készülékhez tartozó interface-en keresztül, és a mérőrendszerhez tartozó szoftver segítségével átvisszük számítógépre, ahol a Microsoft Excel programmal kiértékelhetők.

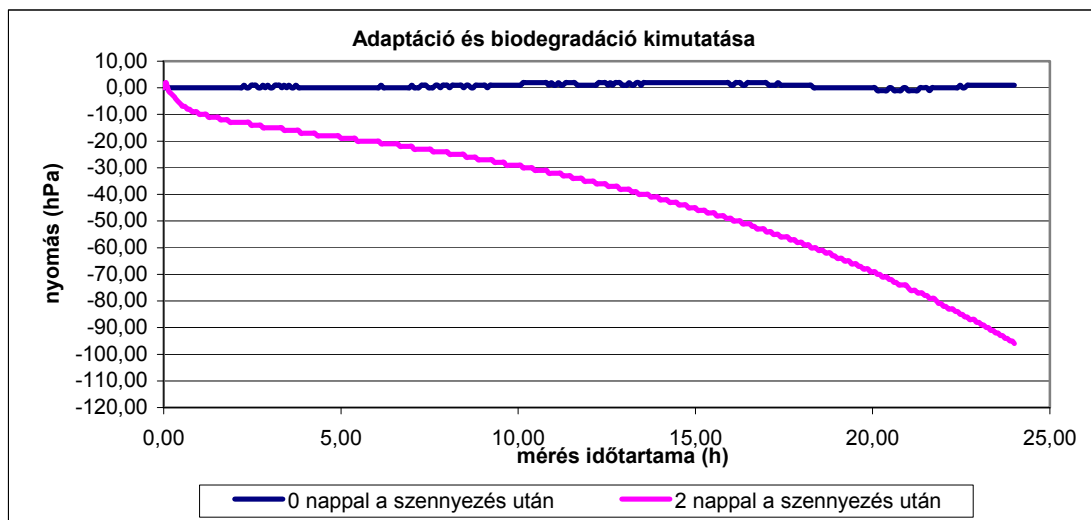
A nyomáscsökkenést ábrázoljuk az idő függvényében. Egy adaptációs vagy biodegradációs vizsgálatnál a mért nyomáscsökkenés 24 órás értékét tekintjük végpontnak, egy ökotoxikológiai mérésnél pedig a mért értékekből számítható légzésintenzitás gátlás százalékos értékét, az EC₂₀-as, EC₅₀-es értékeket.

Fontos megvizsgálni, hogy a kidolgozott zárt palack teszt talajlégzés mérés milyen vizsgálatokra alkalmazható. Ezért konkrét alkalmazási lehetőségeket vizsgáltunk, minthogy a talaj, mint tesztorganizmus, miként használható a mérőkészülékben (ökotoxikológiai tesztek), másrészt méréseket végeztünk annak megállapítására, hogy adott biológiai folyamatok, mint a biodegradáció, vagy az adaptáció kimutatható-e ezzel a légzésmérő módszerrel. Jelen tanulmányban a biodegradáció mérésére fókuszálunk.

2.4.4 Biodegradálhatóság mérése zárt palack teszttel – a talaj mikroflórájának biodegradációs képessége

2.4.4.1 Zárt palack teszt alkalmazhatósága biodegradáció mérésére

Annak vizsgálatára, hogy a biodegradáció nyomon követhető-e ezzel a módszerrel, dízelolajt adagoltunk barna erdőtalajhoz. A dízelolaj magas energiataartalmú szerves vegyület, amit a talaj biodegradációs képessége következtében képes bontani és tápanyagként, szén- és energiaforrásként felhasználni az ilyen és ehhez hasonló vegyületeket. Természetesen időre van szüksége a mikroflórának az átállásra, de ez rövid idő alatt bekövetkezik (15. ábra).



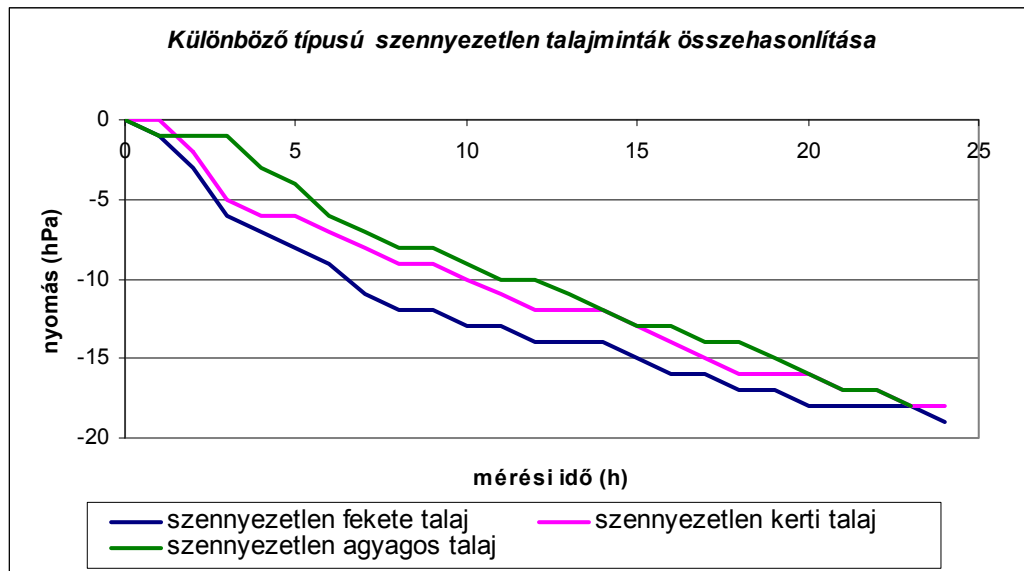
15. ábra: Dízelolaj biodegradációja

Az ábrából látszik, hogy két nappal a szennyezés után olyan mértékű adaptáció következett be, hogy az egy napos mérés nem is volt elegendő a végső érték eléréséhez, hiszen a biodegradációs görbe nem telítésbe, hanem növekvő értékek felé hajlik. Azt pedig, hogy a mikroorganizmusok a dízelolajt bontják, az bizonyítja, hogy a mintakezelés során nem történt tápanyag adagolása csak 10 ml tápsóoldatot kaptak a minták. A szennyezés napján végzett mérésnél nem mérhető a légzés, mert a dízelolaj az elején mérgezi a talajt.

A kísérlet eredményei alapján látszik, hogy a biodegradáció kimutatható a zárt palack teszttel, azért a kísérleteket tovább folytattuk, más talajokkal és más szennyezőanyagokkal egyaránt.

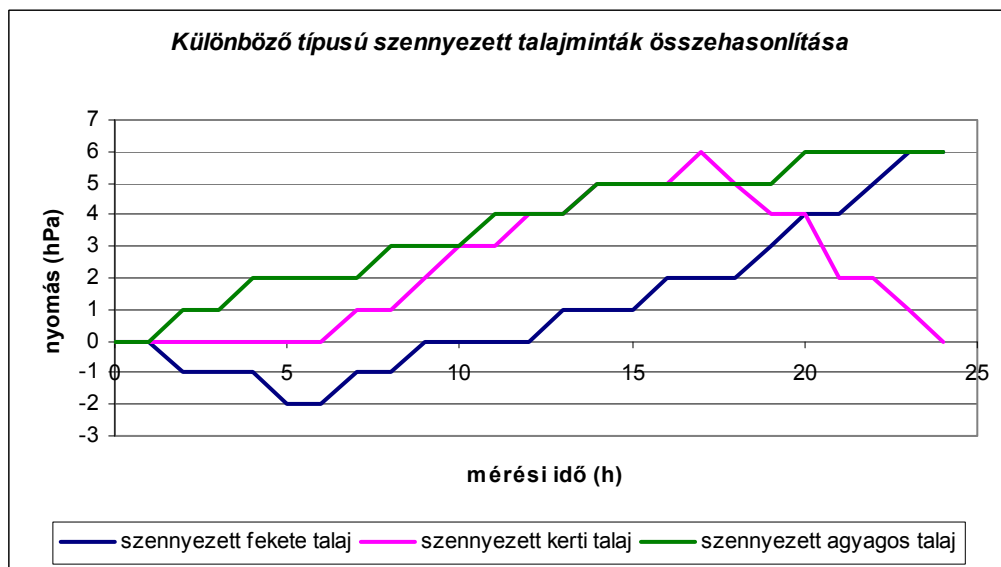
2.4.4.2 Eltérő típusú talajok biodegradációs képessége

Vizsgálataink során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy zárt palack teszt alkalmazásával kimutatható-e a különbség a fekete, agyagos, illetve a kerti talajok légzése között. Minden mérő palackba 100 g, 500 ppm fenantrénnel szennyezett talajt raktunk, majd ehhez 100 g szennyezetlen talajt kevertünk. 10 cm³ tápsó és 10 cm³ nyomelem oldat hozzáadása után elindítottuk a 24 órás méréseket. Kontroll mintának a 200 g szennyezetlen talajt tekintettünk.



16. ábra: Különböző típusú, szennyezetlen talajok légzésének összehasonlítása

A különböző típusú talajok szennyezetlen mintáinak görbéi azonos lefutásúnak mondhatóak (16. ábra). Az megfigyelhető, hogy a legnagyobb intenzitással, hasonló körülmények között a fekete talaj lélegzik.



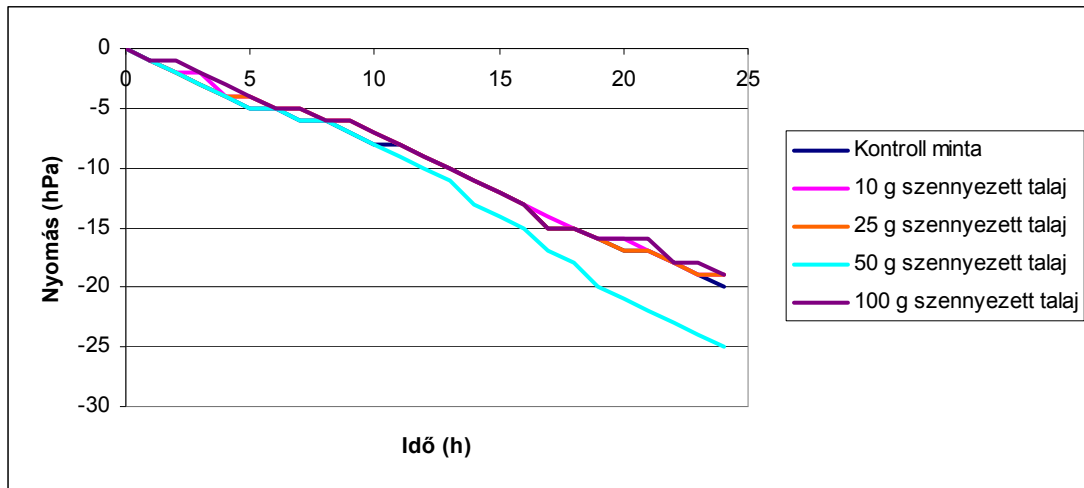
17. ábra: Különböző típusú, szennyezett talajok légzésének összehasonlítása 250 ppm fenantrén szennyezés esetén

250 ppm fenantrénnel szennyezett minták esetén az eredményekből azt mutatták, hogy a légzés intenzitása mind a három talaj típusnál csökkent, de legkisebb mértékben a fekete talajnál mutatkozott mérgező hatás, a talajban az adaptáció már rövidebb idő alatt megindult.

2.4.4.3 Szerves szennyezőanyagok hatására a talajlégzésre

A kísérletek kivitelezése a következő módon történt: 10, 25, 50 és 100 g, mesterségesen szennyezett fekete talajt mértünk az edényekbe, majd ezeket kezeletlen talajjal 200 g-ra egészítettük ki, vizsgálva ezzel a szennyező anyag mennyiségének hatását a légzés intenzitásának változására és a talaj biodegradációs képességére.

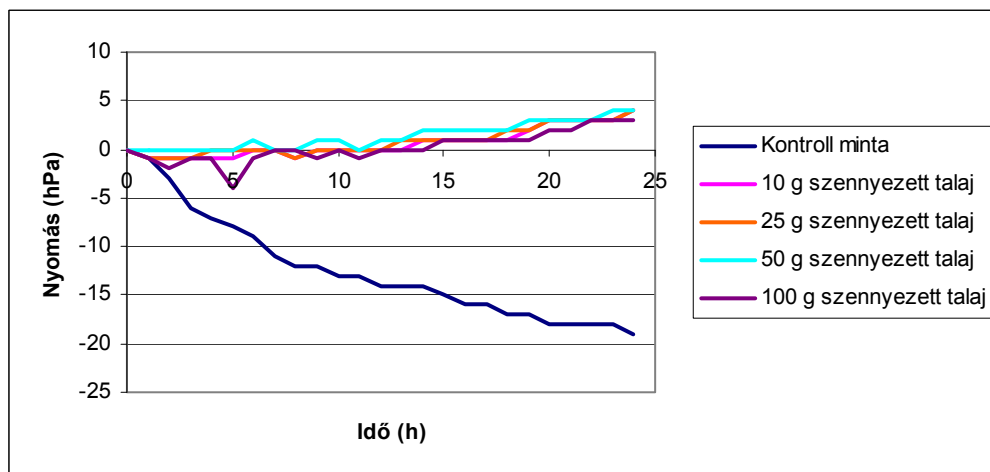
Első megközelítésben 25 000 ppm dízel olaj szennyezés hatását vizsgáltuk a tesztalajon.



18. ábra A talajlégzés változása különböző dízel-olaj szennyezőanyag koncentrációk hatására

A görbék lefutása azonosnak mondható, van némi légzés intenzitás gátlás a dízel-olaj hatására, de ez nem arányos a növekvő koncentrációval. A legnagyobb nyomáscsökkenést a 6250 ppm dízelolaj okozta (50 g-os minta), feltehetően ezt a mennyiséget energiaforrássul képesek felhasználni a talaj élőlényei. Ugyanakkor a 10-, 25- és 100 g-os minták (1250, 3125 és 12500 ppm dízelolaj) a kontrollal azonos lefutást mutatnak, se a gátló hatás, sem a biodegradáció nem mutatható ki egyértelműen. Feltételezhető, hogy a kismértékű szennyezés (1250 és 3125 ppm dízelolaj) még nem elég az adaptáció és biodegradáció megindulásához, a nagy mennyiségű szennyezőanyag (12500 ppm dízelolaj) pedig már gátló, toxikus hatást fejt ki a talajra.

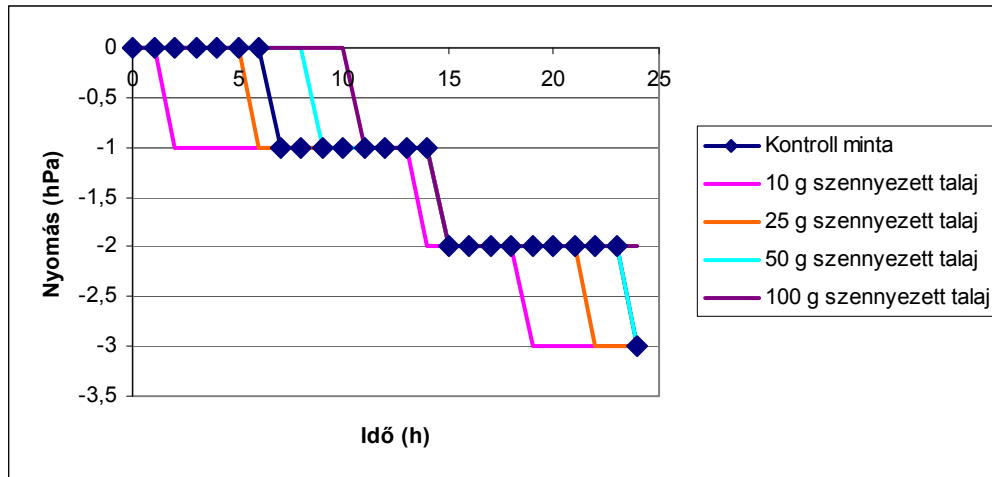
A továbbiakban vizsgáltuk a fenantrén hatását a talaj légzésére. A mesterséges szennyezés 500 ppm volt.



19. ábra A talajlégzés változása különböző fenantrén szennyezőanyag koncentrációk hatására

A 19. ábrán látható, hogy a szennyezett minták viselkedése teljesen eltért a kontroll mintáétól. A jelenség mögött két ellentétes folyamatot sejtünk: a fenantrén szennyezés gátló hatása miatti légzéseszkökenést és gáztermeléssel járó anaerob folyamatok megindulását a zárt palackban, melyek együttes hatását érzékelte a mérőműszer.

Szintén vizsgáltuk a cypermetrin hatását is, a mesterséges szennyezés 5 ppm volt.



20. ábra A talajlégzés változása különböző cypermetrin szennyezőanyag koncentrációk hatására

A diagramon látszik, hogy a görbék eltérő lefutásúak és a kontrollhoz képest a 0,25 ppm és a 0,625 ppm cypermetrint tartalmazó (10g-os, illetve 25 g-os) minták légzése indul meg a leghamarabb. A gátlás mértéke a 2,5 ppm cypermetrines (100 g szennyezett talaj) mintában a legnagyobb. A görbék alakjából látható, hogy ugyanaz a talaj más időpontban más lefutást mutat, továbbá a gáztermelés is zavarja a mérési eredmények kiértékelhetőségét.

A légzés megindulásának időpontja láthatóan összefüggésben van a cypermetrin koncentrációjával, azaz minél kisebb a koncentráció, annál hamarabb indul meg a légzés. A két paraméter között azonban egyértelmű összefüggés nem írható föl. A cypermetrin esetén először főként a gátló hatás érzékelhető, de idővel megindul a biodegradáció.

2.4.4.4 Zárt palack teszt alkalmazhatósága biodegradáció mérésére – az eredmények összefoglalása, a módszer előnye

Összefoglalva az eredményeket elmondható, hogy a friss szennyezés eleinte mérgezi a talaj élőlényeit, de két nappal később megindult a szennyezőanyag degradációja és folyamatosan növekvő nyomáscsökkenés volt tapasztalható. A szennyezőanyag koncentrációja és a nyomáscsökkenés közötti pontos összefüggés kimutatásához további kísérleteket folytatunk.

Az eredetileg BOI mérésre használt készüléssel tehát kidolgoztunk egy olyan protokollt, amellyel talajok légzésintenzitásának változása mérhető. A módszer előnye, hogy gyors, egyszerűen kivitelezhető, a készülék kis helyigényű, az adatok a nyomásváltozást mérő fejről közvetlenül lekérhetőek és a mérés adatai a hozzá tartozó programmal könnyen kiértékelhetőek.

Alkalmazási lehetőségek:

1. Kontroll, jó minőségű talaj plussz bármilyen szennyezőanyag. Vizsgálat, adaptálódik-e mennyi idő alatt, milyen intenzitással bont.
2. Szennyezett talajban (bizonyítottan szennyezett, felmért) folyik-e légzés és biodegradáció, milyen mértékű
3. Jó minőségű talajhoz adott szennyezett talaj mit okoz?
4. Adalékok növelik-e a biodegradációt? Sajnos pont a levegő mennyiségét nem lehet növelni, hacsak nem szakaszos méréssel levegőztetés, majd lezárni.
5. 5. stb.. ezekt kellene az Eszternek/Júliának kimérnie.

Irodalom:

Bózvári Eszter: Szennyezett talaj toxicitásának mérése állati tesztorganizmusokkal – Diplomamunka, Budapest, 2006

Gruiz K., Horváth B., Molnár M.: Környezettoxikológia, Budapest, Műegyetemi Kiadó, 2001

LKB Bromma: Bioactivity Monitoring Seminar Notes

Harald Platen, Anna Wirtz: Analitikai alkalmazások 1. sz.: Talajok lélegzési aktivitásának mérése az OxiTop-Control mérőrendszerrel, 1999, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH

Thermometric AB: TAMTM, Thermal Activity Monitor for highly sensitive isothermal analysis

Tibiássy Béla: Talajminták mikrobiológiai aktivitásának vizsgálata Sensomat légzésmérő készülékkel – Diplomamunka, Budapest, 2002