

HIGIÉNÉS TALAJBAKTERIOLÓGIAI, ÉS TALAJMIKROBIOLÓGIAI VIZSGÁLATOK

Készítette: Tolner Mária



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék
2015.

A TALAJ MIKROBIOLÓGIÁJA

A mikroorganizmusok igen nagy része természetes körülmények között megtalálható a talajban. A talaj mikroorganizmusai számos nélkülözhetetlen folyamat hordozói, nélkülük a bioszféra fennmaradása és evolúciója nem volna lehetséges. Például a légköri nitrogén megkötésére kizárólag a talaj mikroorganizmusai képesek. Jelentős szerepet játszanak a hidrogén, kén, foszfor és szén körforgalmában. Az élő anyag-reprodukciónak is fontos láncszemei, hiszen olyan szerves anyagok felhasználásával készülnek, melyeket más szervezetek hasznosítani nem tudnak, így azok az anyagkörforgalom számára elvesznének.

A talajminta vételénél az eredmények értékelhetőségéhez és más mintavételi helyekről származó minták adataival való összehasonlíthatóságához fel kell jegyezni a talaj szerkezetét, típusát, a borító növénytársulást.

A minták nedvesség-, humusz-, nitrogén-, nyomelem-, ásvány tartalma és szemcsenagysága is befolyásolja a mikroorganizmusok számát így célszerű ezen adatokat is megállapítani a minták feldolgozása során. A talaj általános állapotáról ad felvilágosítást a heterotróf sejtek száma. Jó minőségű talajban a talaj típusától használatától, szezonális változásoktól függően tág határok között mozoghat a sejtszám, abszolút értéke azonban felvilágosítást ad a talaj biológiai állapotáról, aktivitásáról esetleges károsodásáról. Az élőcsíraszám változásának időbeli követése több információt szolgáltat, különösen egy szennyezést követően illetve remediáció során a sejtszámok változásából következtethetünk a talaj állapotának, toxicitásának változására.



Az évszakoktól függően, a talajban periodikusan változik a mikroorganizmusok száma, és az egy élőhelyen található mikroorganizmus közösség százalékos összetétele. Ősszel nagy mennyiségű levél kerül a talajba, ekkor a cellulózbontók száma ugrásszerűen megnő, majd a tápanyag lebomlása után számuk ismét csökken.

A talajokat mint egységes, komplex rendszereket (melyek magukba foglalnak szerves- és szervetlen anyagokat, élőlényeket) is vizsgálhatjuk, a talaj ilyenkor élő anyagnak tekinthető. Így a talajok a bennük élő lények tevékenysége folytán meghatározott enzimaktivitással rendelkeznek, melynek következtében a talajba kerülő szerves anyagok, makromolekulák lebomlanak és a molekulákat alkotó elemek hozzáférhetővé válnak.

A talajok jellemzésére a szén-dioxid termelés és az egyes enzimek (dehidrogenáz, ureáz, amiláz, proteáz stb.) aktivitásának mérése során kapott adatokat használják fel.

A talaj pufferként működik a belekerülő szerves anyagokkal és a civilizációs hulladékkal szemben, de csupán egy bizonyos határig képes a lebontásra és tárolásra.

Ha a talajban fennálló egyensúly megbomlik visszafordíthatatlanul megváltozhat az adott talajtípusra és élőhelyre jellemző mikroorganizmus összetétel. Nagyobb mennyiségű mutagén, toxikus szennyező anyag talajba jutása a mikroflóra teljes kipusztulását okozhatja. Egyes organizmusok nem tudnak alkalmazkodni és kipusztulnak, mások adaptálódnak és elszaporodnak. A szennyeződést követően általában új mikróbapopuláció alakul ki, mely rezisztens és a szennyeződést bontó, ezt táplálékként felhasználó mikroorganizmusokból tevődik össze.

A talaj mikroorganizmusainak fontosságát az egyre nagyobb mértékű környezetszennyezés is növeli. A szilárd hulladékok mikrobiális bontása csökkentheti a környezetet szennyező kommunális és (élelmiszer) ipari hulladék mennyiségét. A kommunális hulladéklerakókra kerülő hulladék igen nagy százaléka szerves, konyhai hulladék és egyre nagyobb mennyiségű a biológiailag szintén igen jól bontható papírhulladék. A szerves hulladékok nagy része mikrobiológiai úton lebontható.

TALAJBAN ÉLŐ MIKROORGANIZMUSOK MENNYISÉGI VIZSGÁLATA

A talaj mikroorganizmusainak mennyiségi vizsgálata két módszerrel lehetséges:

- talajszuszpenzió közvetlen mikroszkópos vizsgálata,
- szilárd vagy folyékony tápközegen való tenyésztés.

A különböző módszerekkel kapott eredmények egymással össze nem hasonlíthatók, nem abszolút eredmények (mikroszkópos sejtszámlálásnál a már elpusztult sejtek is megfestődnek).

A talajban előforduló mikroorganizmusok:

- | | |
|------------------|-----------------------|
| - baktériumok, | - kék-, és zöldalgák, |
| - gombák, | - kovamoszatok |
| - aktinomyceták, | |

Minden csoport kitenyésztéséhez más-más tápközeg szükséges.

Fekáliás eredetű baktériumszennyeződések kimutatása

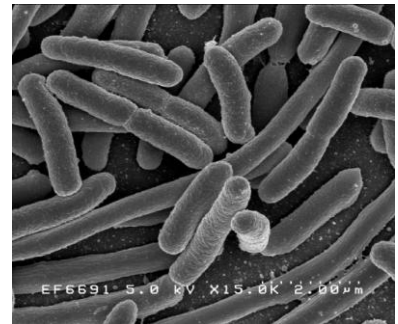
Szennyvíz iszappal történő trágyázás illetve szennyvízzel való öntözés eredményeként a talaj különböző patogén fajokkal szennyeződhet (Salmonella, Shigella, stb.) E fajok hosszabb-rövidebb idő elteltével elpusztulnak, mivel nem tartoznak a talaj természetes mikroflórájához. Ez az idő néhány nap, illetve hónap lehet.

Fekáliás eredetű baktériumszennyeződésre általában a kóliszám vagy a kólititer meghatározásával deríthetünk fényt. Az *Escherichia coli* és a többi coliform baktérium az emlősök, így az ember bélcsatornájában élnek. E baktériumokat jelzőflórának tekintjük, amennyiben a mintában coliformok találhatók, más enterális eredetű baktériumszennyeződés is feltételezhető.

Kóliszám: 1 g (1 cm³) mintában található coliform baktériumok száma.

Kólititer: Az a legkisebb mintamennyiség, melyből coliform még kimutatható.

Az *Escherichia coli* az Enterobacteriaceae családba tartozó, Gram-negatív, spórát nem tartalmazó fakultatív anaerob pálcá. A laktózt gáztermelés közben fermentálja, epét vagy epesót tartalmazó táptalajon aerob módon növekszik. Indolt képez a triptofánból, a metilvörös próba eredménye pozitív, a Voges-Proskauer próba pedig negatív.



Kép forrása: http://en.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli#mediaviewer/File:EscherichiaColi_NIAID.jpg

A coliform baktériumok Gram negatív, spórátlan pálcák, melyek a laktóztartalmú tápoldatban aerob módon növekednek és 48 órán belül, 35±0,5 °C-on vagy , 37±0,5 °C-on savat és gázt termelnek.

Termotoleráns coliform baktériumok azon coliform baktériumok, melyeknek 24 órá belül 44±0,25 °C-on vagy , 44,5±0,25 °C-on ugyanolyan fermentatív tulajdonságaik vannak.

Feltételezhetően Escherichia coli az a termotoleráns coliform baktérium, mely triptofánból 24 órán belül, 44±0,25 °C-on vagy , 44,5±0,25 °C-on indolt képeznek. (MSZ ISO 9308-2:1993)

Coliformok az Enterobacter és Klebsiella családba tartozó fajok.

Az *Escherichia coli* jelenléte minden esetben friss fekáliás szennyeződésre utal, míg a többi coliform régebbi fekáliás szennyeződésből is visszamaradhat. A Klebsiella fajok jelenléte önmagában nem feltétlenül utal fekáliás szennyeződésre.

Coliformszám meghatározására az **Eijkmann próbát** végezzük el, mely a laktózbontást (37 és 44°C-on), és az IMViC (metilvörös, Voges-Proskauer, Indol és citrát) próbát tartalmazza.

Fekáliás eredetű *E. coli*-nak tekintjük azokat a törzseket, melyek 44°C-on sav és gázképzést mutatnak és a következő (II. típusú) reakciókat adják:

.	<i>E. coli I</i>	<i>E. coli II.</i>
Indol	+	-
Metilvörös	+	+
Voges-Proskauer	-	-
Citrát	-	-

A laktózlevesben 44°C-on sav és gázképzést mutató csövekből Endo-agarra majd ferde agarra oltással tiszta tenyészetet készítünk és az IMViC próba elvégzésével identifikáljuk a kitenyésztett törzset.

IMViC próba

	értékelés	pozitív reakció
Indol	+Kovács reagens	triptofán → indol (piros gyűrű)
Metilvörös	+metilvörös	glükóz → savtermelés (piros szín)
Voges-Proskauer	+αnaftol+KOH	acetoin termelés → rózsásvörös
Citrát		citrát → lúg termelés (kék szín)

Indol meghatározása

Az indol a triptofán anaerob lebontásának terméke. A mikroorganizmusok egy csoportja képes erre a lebontásra. A meghatározásnál ez a képesség jellemző sajátosság. Ezt jól fel lehet használni a kólicsoport tagjainak elkülönítésére. A triptofán az egyetlen természetes aminosav, amely indolgyűrűt tartalmaz. Ha a táptalajban szénhidrát van jelen akkor negatív lesz a teszt eredménye, mert a törzs inkább azt hasznosítja. Ezért az indol teszthez szénhidrátmentes táptalajt használunk.

Beoltunk egy kémcső peptonvizet, inkubáljuk 37°C-on, majd **Kovács reagenst** adunk hozzá (para-dimetil-amino-benzaldehyd butanolos oldata). Ha a tetején levő gyűrű piros, akkor a reakció pozitív.



Metilvörös teszt

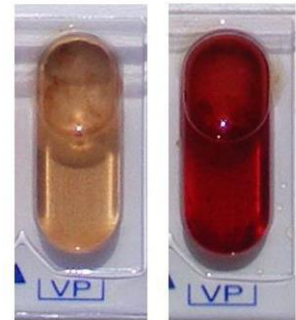
Az *Escherichia* kultúra laktóz erjesztése közben a táptalaj pH-ját pH 5-ig leszállítja. A növekedés e pH-nál megáll, ez a pH minimum.

A metilvörös táptalajt beoltás után 30 °C-on inkubáljuk, majd 1 indikátort cseppentünk hozzá. Metilvörös pozitív a teszt akkor, ha a táptalaj vörös, negatív, ha a táptalaj sárga színű.

A Voges-Proskauer teszt

Az acetoin kimutatására szolgáló teszt.

Beoltunk egy metilvörös táplevest, inkubáljuk 37°C-on. Vegyünk ki egy üres kémcsőbe 1-1 cm³. Adjunk hozzá 0.6 cm³ α-naftolt és 0.2 cm³ KOH-t. Pozitív reakció esetén a kivett minta színe rózsásvörös lesz. Az acetoin a lúg és a levegő jelenlétében diacetillé oxidálódik. A diacetil α-naftol és arginin (peptonból) jelenlétében adja a vörös színt.



Citrát teszt

Ha Na- vagy K-citrátot teszünk egyedüli szénforrásként a táptalajba, akkor az *E. coli* törzsek ezen képtelenek növekedni, míg az *Aerobacter* törzsei jól növekednek. Ha a riboflavint adunk a táptalajhoz, (mely az *E. coli* növekedéséhez szükséges), akkor az *E. coli* is növekedésnek indul. A termelőző lúg hatására a táptalajban található brómtimolkék indikátor színe kékre változik.



TALAJ HIGIÉNÉS MIKROBIOLÓGIAI VIZSGÁLATOK

1. Talaj előkészítése, szuszpenzió készítése

Mintavétel: A mintát steril eszközökkel, steril edénybe töltjük. Tárolása +4°C-on, hűtőszekrényben történik. A minták feldolgozását 48 órán belül meg kell kezdeni.

A mikrobiológiai vizsgálatokat különböző hígítású talajszuszpenziókból végezzük. Ezeket homogenizált, eredeti nedvességtartalmú talajból készítjük, melyből a nagyobb, nem aprítható darabokat (kövek, üveg, stb.) külön választjuk.

2. Általános talajmikrobiológiai vizsgálatok

2.1. Összcíraszám meghatározása

2.1.1. Csőhígításos (MPN) módszer: A vizsgálandó mintát addig hígítjuk, míg az utolsó hígításba már nagy valószínűséggel nem kerül sejt. Tízszeres hígítási sort készítünk a talajszuszpenzióból. A Hoskins táblázat alapján való értékeléshez legalább három párhuzamos hígítási sor készítésére van szükség. Az alapsuszpenzió: 0,5 g talaj 4,5 cm³ tápoldatban.

Értékelés: 24-48 óra múlva a zavaros tápoldat jelzi a baktériumok növekedését, ha a tápoldat zavaros a cső pozitívnak tekintendő. A teszt végpontja lehet a szaporodás, valamely életfunkció, enzimaktivitás. (pl. A talajban található coliformok számának meghatározásánál a Durham csővel ellátott laktózlevesekben készített hígítási sor tagjaiban a sav és gáztermelés vizsgáljuk.)

2.1.2. Telepképződés alapján, aerob heterotróf sejtek számának meghatározása: a vizsgálandó talajból alapsuszpenziót készítünk 1 g talajmintát 9 cm³ steril vízben szuszpendálunk fel, majd az így elkészített talajszuszpenzióból tízszeres hígítási sort készítünk. A várható sejtszámnak megfelelő hígításokból 0,1 cm³-t Petri-csészébe, illetve Petri csészébe öntött és megszilárdult tápagar lemezre pipettázunk. 24-48 óra múlva az agarlemezen kinőtt telepeket megszámloljuk. Ezt a módszert nevezik telepképző sejtszám meghatározásnak is (colony forming units (CFU)/ ml).

- **Szélesztés:** a felmelegített, Petri-csészébe kiöntött, majd megdermedt szilárd tápagar felületére a várható sejtszámnak megfelelően, általában 3 különböző talajhígításból 0,1 cm³-t pipettázunk. A Petri csészéket fordított helyzetben (hogy a csésze tetejéről a kondenzált pára ne csepegjen vissza az agarlemez felületére) termosztátba helyezük és 30 °C-on 24-48 órán át termosztáljuk.

- **Lemezöntéses módszer:** a talajból hígítási sort készítünk (a várható baktériumszámnak megfelelően). Petri-csészébe pipetázunk $0,1 \text{ cm}^3$ -t, majd felmelegített és kb. 50°C -ra lehűtött tápagart mérünk rá, alaposan homogenizáljuk. Az agarlemezek lehülés után megdermednek, majd a Petri csészéket fordított helyzetben (hogy a csésze tetejéről a kondenzált pára ne csepegjen vissza az agarlemez felületére) termosztátba helyezzük és 30°C -on 24-48 órán át termosztáljuk.



Lemezöntéses telepszámlálás Nutrient agaron

2.2. Streptomycesek számának meghatározása: Hígítási sort készítünk, majd a hígításokból szélesztéses módszerrel Küster-Williams agarlemezre oltunk. A Petri-csészéket 28°C -on 5 napon át inkubáljuk, majd számoljuk a jellegzetes, enyhén bolyhos felszínű telepeket.

2.3. Gombaszám meghatározása: Martin vagy Czapek-Dox agarlemezre oltunk az elkészített hígítási sor tagjaiból. Az agarlemezeket 28°C -on 3-5 napon át inkubáljuk, majd számoljuk a tápagaron kinőtt telepek számát.

3. Higiénés talajbakteriológiai vizsgálatok

3.1. Coliformszám, fekálicoliformszám meghatározás erjesztési próbával MPN módszerrel: a talajból tízszeres hígítási sort készítünk steril vízben, a hígítási sor tagjait Durham csövet tartalmazó laktózlevesbe oltjuk majd 24 órán át 37°C illetve 44°C inkubáljuk. (3-3 párhuzamost készítünk az egyes hígításokból.) A 37°C -on inkubált tápoldatokban minden coliform baktérium képes szaporodni, míg 44°C -on csak a fekálicoliformok szaporodnak.



Pozitív és negatív laktózbontási próba

Értékelés: egy laktózbontás meghatározására szolgáló csövet akkor tekintünk pozitívnak, ha van sav és gáztermelés. A laktóz tartalmú táptalajba brómtimolkék indikátort teszünk, ha a törzs savat termel, a táptalaj színe sárga, a gáztermelés a gázbetétsövekben (Durham cső) követhető nyomon.

Az MPN táblázat segítségével meghatározzuk a kiindulási minta coliform illetve fekálcoliform számát.

3.2. Salmonella kimutatás: 10-10 g talajt 50-50 cm³ Preuss-féle kálium-tetratioátos, szelenites és Rappaport-féle dúsítóba bemérünk. Homogenizálás után 24 órán át 37°C-on inkubáljuk azután brillantzöld-agarra és bizmut-szulfitos agarra oltunk. A szilárd tápagarokat 24 órán át 37°C-on inkubáljuk, majd értékeljük. A szalmonella telepekről Russel-féle tápagarra szűrt kultúrát készítünk, majd szerológiai és biokémiai azonosítást végzünk.

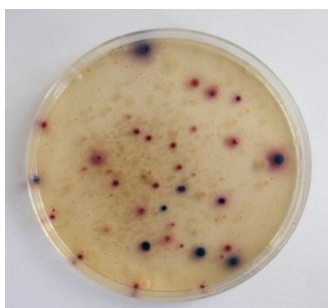
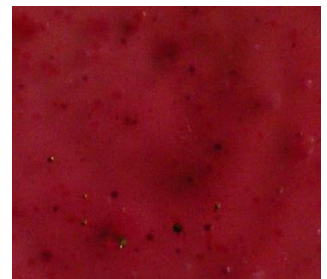
3.3. Fekálsreptococcus-szám meghatározása MPN módszerrel: Hígítási sort készítünk, majd MPN módszerrel elvégezzük a Litsky-Mallmann-dúsítók beoltását a talajminta hígításaival. A beoltott Litsky-Mallmann-dúsítókat 37°C-on 48 óráig inkubáljuk, majd a kémcsövekből Slanecz-agarra oltunk ki. A Petri-csészéket 37°C-on 48 óráig inkubáljuk, majd a pirosas árnyalatú telepeket megszámloljuk. Az MPN táblázat segítségével meghatározzuk a kiindulási minta fekálsreptococcus számát.

3.4. A Clostridiumszám meghatározása: Hígítási sort készítünk, majd lemezöntéssel módszerrel beoltjuk a Wilson-féle bizmutmentes táptalajt. A talajhígításokból 1-1 cm³-t Petri-csészébe pipettázunk, majd 40 cm³ Wilson-féle agarral lemezt öntünk. Megszilárdulás után a táptalaj felületére további 40 cm³ Wilson-féle agart rétegezzük. A lemezeket 24 órán át 46°C-on termosztáljuk. A 3 mm-nél nagyobb fekete telepeket számloljuk meg.

3.5. A *Pseudomonas aeruginosa*-szám meghatározása: Hígítási sort készítünk, majd MPN módszerrel elvégezzük az asparaginos-dúsítók beoltását a talajminta hígításaival. A beoltott asparaginos dúsítókat 42°C-on 48 óráig inkubáljuk, majd a kémcsövekből Cetrimid-agarra oltunk ki. A Petri-csészéket 37°C-on 24 óráig inkubáljuk, majd a kékes-zöldes elszíneződésű pigmentet termelő telepeket továbboltjuk acetamid tápoldatba. Ezután 37°C-on 24 óráig inkubáljuk. *Pseudomonas aeruginosa* jelenléte esetén a kémcsövekben Nessler reagens adagolása esetén sárga, barna elszíneződés ill. barna csapadékkiválás jelzi az acetamid bontás során felszabaduló ammónia jelenlétét. Kétes esetekben további reakciókat is elvégzünk (oxidatív glükózbontás, piocianrin termelés, nitrát redukció). A pozitív reakciót adó csövek alapján az MPN táblázat segítségével meghatározzuk a kiindulási minta *Pseudomonas aeruginosa* számát.

Táptalajok csoportosítása a felhasználás célja szerint

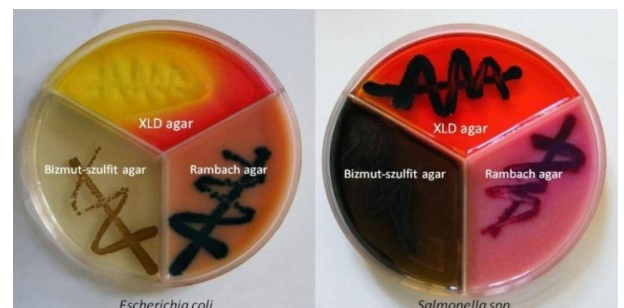
- **Alaptáptalajok**, tartalmazzák mindazokat az anyagokat, melyek lehetővé teszik, hogy a mikroorganizmusok nagy része jól növekedjen rajtuk (vizet, tápanyagokat tartalmaznak, optimális PH). Például élesztő és fonalas gombák számára a maláta kivonatot tartalmazó táptalajok (pl. Czapek-Dox agar, PDA tápagar) baktériumok számára a bouillon/bouillon jellegű táptalajok (pl. húslé agar, Nutrient agar, L B agar).
- Az **Elektív táptalajok** összetételüknél fogva alkalmasak arra, hogy bizonyos mikroorganizmusokat -speciális tápanyaghasznosítási képességüket kihasználva- a többi mikroorganizmus közül kiemeljünk. Ezen táptalajok alkalmasak a mikroorganizmusok izolálás előtti dúsítására (például a Pseudomonas Agar P, melyen a *Ps. aeruginosa* zöld, kékeszöld pigmentet képez)
- **Szelektív táptalajok** olyan táptalajok, melyek egyes mikroorganizmusok ill. mikroorganizmus-csoportok növekedését másokhoz viszonyítva lassítják vagy teljesen megakadályozzák (tartalmazhatnak pl. antibiotikumot). Rendszerint az élőhelyükről kiemelt mikroorganizmus-csoportok szétválasztására szolgálnak. Tiszta tenyészetek készítésénél nélkülözhetetlenek. (például Rappaport-Vassiliadis (RV) dúsító a Salmonellák esetén vagy az Endo agar, melyen az *Escherichia coli* fémes fényű, piros telepeket képez.) *Escherichia coli* telepek Endo agaron
- **Differenciál táptalajok** összetételüknél fogva különböző mikroorganizmusok differenciálására és azonosítására alkalmasak. Jellemzőjük, hogy szabad szemmel is látható reakciót adnak a növekvő baktériumok anyagcseretermékeivel. (Például az *Escherichia coli* telepei Endo-agaron sötétvörös színűek, Chromocult agaron a coliformok lazacrózsaszínűek, az *Escherichia coli* telepek lilák, Wilson agaron a *Clostridium* telepek fekete színűek.)



Lazacrózsaszín coliform és lila *Escherichia coli* telepek Chromocult agaron



Clostridium telepek Wilson agaron



Differenciáló táptalajok

- **Speciális táptalajok**: ezek különleges eljárások, vagy vizsgálatok céljára kifejlesztett táptalajok.

Irodalom

MSZ 21470/77-1988 Környezetvédelmi talajvizsgálatok, Mikrobiológiai vizsgálatok

MSZ 448/44-1990 Ivóvízvizsgálat, Bakteriológiai vizsgálat

MSZ ISO 9308-2:1993 A coliform, a termotoleráns coliform baktériumok és a feltételezhetően *Escherichia coli* kimutatása és számlálása vízben

Colome, Jaime S. & Cano, Raul J. & Kubinski, A. Mark & Grady, David V: (1986) Laboratory Exercises in Microbiology. West Publishing Company/St. Paul, Minnesota

Gruiz Katalin, Horváth Beáta, Molnár Mónika: Környezettoxikológia

Dr. Horváth Sándor (1980) Mikrobiológiai praktikum Tankönyvkiadó, Budapest, 1980.

Járványügyi és klinikai bakteriológia Szerk: Lányi Béla Országos Közegészségügyi Intézet, Budapest

Kassem Alef and Paolo Nannipierri (1995) Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry, Academic Press, London, UK

Lányi Béla (szerk) (1980) Járványügyi és klinikai bakteriológia Országos Közegészségügyi Intézet, Budapest

Puskás Aurél Szerk. (1990) Ipari mikrobiológiai gyakorlatok Műegyetemi Kiadó

Szegi József (1979) Talajmikrobiológiai vizsgálati módszerek, Mezőgazdasági Könyvkiadó. Budapest

A laboratóriumi gyakorlat menete

- Talajszuszpenzió készítése: 1 g nedves talajt 9 cm³ steril csapvízzel 28°C-on 30 percig rázatunk.
- - talajban található aerob heterotróf sejtek számának meghatározása Nutrient-agaron hígítós lemezöntéssel.
 - Gombaszám meghatározása Czapek-Dox tápagon hígítós lemezöntéssel.
 - *Escherichia coli* ill. coliformok izolálása Chromocult agaron szélesztéssel.
 - Clostridiumszám meghatározása Wilson-agaron.
 - *Escherichia coli* izolálása taljhígításokból Endo-agaron
- Coliform-szám ill. fekáliás eredetű coliform-szám meghatározása laktózlevesbe oltással, kiértékelés MPN módszerrel.

24 (48) óra elteltével értékelés, a tápagonokon különböző taljhígításokból kinőtt telepek számlálása.

Beadandó: Sejtszámok db/ g talaj