

Veszélyes hulladékok vizsgálata – Mikrobiológiai vizsgálatok

A *Pseudomonas aeruginosa*-szám meghatározása

Az MSZ 21978-53 számú szabvány alapján

Mintavételi előírások:

A mintákat a helyszínen 250 cm³-es, előre sterilizált porüvegekbe töltjük sterilizált fémkanállal vagy fémlapáttal. A minta mennyisége 150-250 g legyen.

A mintákat tartalmazó porüvegeket fémtokba helyezzük és hűtőtáskában tárolva szállítjuk a vizsgáló laboratóriumba, és ott hűtőszekrényben +4 °C-on tároljuk. A minták feldolgozását 48 órán belül el kell kezdeni.

A kvantitatív mikrobiológiai vizsgálatok eredményeit 1 g hulladékra átszámítva adjuk meg.

Szükséges eszközök, anyagok:

Porüveg, 250 cm³-es, alumíniumfóliával borított üveg dugóval; fémtok, a 250 cm³-es porüveg befogadására; fémkanál, leégethető kivitelben; fémlapát, leégethető kivitelben; turista gázpalack vagy azzal egyenértékű berendezés az eszközök leégetéséhez; hűtőtáska

Vizsgálati körülmények:

A hulladékminták vétele és laboratóriumi feldolgozása során a hulladékokkal és a mikroorganizmusok tenyésztésére használt táptalajokkal érintkező üvegeket, eszközöket, készülékeket, műszereket és azok tartozékait sterilizálni kell.

Szükséges eszközök, készülékek:

Erlenmeyer-lombik, botpipetta, automata pipetta, Petri-csésze, kémcső, szintelen porüveg, lombikok (táptalajkészítéshez), Durham-cső (gázbetétső), üvegbot (hajlított)

Szükséges készülékek:

Termosztátok, hűtőszekrények, autoklávok, arnold-szekrény (az áramló gőzben való sterilizáláshoz), vízfürdő, rázógép kémcsőrázó, telepszámláló készülék, hűtőtáska jégakkival, hőmérők (tizedes beosztással), UV-fényforrás

Csőhígításos (MPN) módszer - mikroorganizmusok számlálására

A vizsgálat során a hulladékmintával és hígításaival párhuzamosan, tápoldatot tartalmazó kémcsöveket oltunk be. Az egyes kémcsövekben pozitív eredményt a tápoldatnak a mikroorganizmusok szaporodása miatti zavarosodása, illetve a vizsgált mikroorganizmuscsoportra az adott tápoldatban jellemző speciális reakciója jelzi. Mikroorganizmust nem tartalmazó hígításokkal beoltott kémcsövekben a tápoldat semmilyen változást nem mutat (negatív eredmény). A kiindulási mintában levő mikroorganizmusok legvalószínűbb száma az adott hígítási fokra és a párhuzamos kémcsövek számára kidolgozott statisztikai táblázatból (ld. lentebb) határozható meg (MPN-szám).

Az eljárás:

- I. Ötször 1-1 g hulladékot 5 db, 5 cm³ tápoldatot tartalmazó kémcsőbe mérünk (alap).
- II. 5 g hulladékot 45 cm³ steril hígítófolyadékot tartalmazó Erlenmeyer-lombikba mérünk, majd kémcsőrázóval vagy mágneses keverővel elegyítjük és 1-1 cm³ 5 db, 5 cm³ tápoldatot tartalmazó kémcsőbe mérünk (tízszerez hígítás).

- III. II-es elegyből rázás után 1 cm³-t 1 db 9 cm³ steril hígítófolyadékot tartalmazó kémcsőbe mérünk, majd ennek rázása után 1-1 cm³-t mérünk be 5 db, 5cm³ táplodatot tartalmazó kémcsőbe (százszoros hígítás).
- IV. A III-as elegyből rázás után 1 cm³-t 1 db 9 cm³ steril hígítófolyadékot tartalmazó kémcsőbe mérünk, majd ennek rázása után 1-1 cm³-t mérünk be 5 db, 5cm³ táplodatot tartalmazó kémcsőbe (tízezerszeres hígítás).
- V. A IV-es elegyből rázás után 1 cm³-t 1 db 9 cm³ steril hígítófolyadékot tartalmazó kémcsőbe mérünk, majd ennek rázása után 1-1 cm³-t mérünk be 5 db, 5cm³ táplodatot tartalmazó kémcsőbe (tízszeres hígítás).
- VI. Az V-ös elegyből rázás után 1 cm³-t 1 db 9 cm³ steril hígítófolyadékot tartalmazó kémcsőbe mérünk, majd ennek rázása után 1-1 cm³-t mérünk be 5 db, 5cm³ táplodatot tartalmazó kémcsőbe (százszoros hígítás).
- VII. A VI-os elegyből rázás után 1 cm³-t 1 db 9 cm³ steril hígítófolyadékot tartalmazó kémcsőbe mérünk, majd ennek rázása után 1-1 cm³-t mérünk be 5 db, 5cm³ táplodatot tartalmazó kémcsőbe (egymilliószoros hígítás).

Az egyes hígításokat és a táplodatokba való beméréseket minden esetben steril pipettával kell végezni.

A hulladékminta várható mikroorganizmustartalma alapján csökkenthető, illetve növelhető a vizsgált hígítások száma.

Az inkubációs időtartam lejártá után a kémcsövekben a szaporodást értékeljük. Az utolsó 3 pozitív kémcsövet tartalmazó hígítás eredményei alapján az MPN-táblázatból kikeressük az 1 g kiindulási hulladékminta mikroorganizmusszámát.

A Pseudomonas aeruginosa-szám meghatározása

Szükséges táptalajok és reagens:

- Asparagion dúsító táplodtat
- Cetrimid-agar táptalaj
- Acetamid táplodtat
- Nessler-reagens

Vizsgálat menete:

- a hígítási sorozat készítése
- az asparaginos dúsítók beoltása a talajmintával és a hígításaival
- inkubáció
- kioltás cetrimid-agarra
- megerősítő vizsgálat acetamid táplodtatban értékelés
- a Pseudomonas aeruginosa-szám megállapítása MPN-táblázat segítségével (ld lentebb).

A hígítási sorozat elkészítése után MPN-módszer szerint (ld. fent) elvégezzük az asparaginos dúsítók beoltását a hulladékmintával és a hígításaival.

A beoltott asparaginos dúsítókat 42 °C-on inkubáljuk 48 óráig, majd a kémcsövekből a kémcsőrázóval való keverés után cetrimid-agarra oltunk ki.

A Petri-csészéket 37 °C-on 24 óráig inkubáljuk, majd a típusos - sárgás, illetve kékeszöldes elszíneződésű, diffúz pigmentet termelő - telepeket megerősítés céljából tovább oltjuk acetamid tápoldatba 24 órás, 37 °C-on végzett inkubáció után a pozitív kémcsövekben Nessler-reagens adagolásakor sárga, barna elszíneződés, illetve barna csapadékkiválás jelzi az acitamidbontás során felszabaduló ammónia jelenlétét. Kétes esetekben a Pseudomonas aeruginosa meghatározásához további megerősítő reakciókat kell végezni az oxidatív glukózbontás, a piocianintermelés és a nitrátredukció kimutatására.

A pozitív kémcsövek száma alapján az alábbi MPN-táblázat segítségével meghatározzuk a kiindulási minta 1 g-jára számított Pseudomonas aeruginosa-számot.

Hoskins-féle táblázat a vizsgált minta MPN értékének meghatározásához 5-5 párhuzamos leoltás esetén

Kulcsszámok	A kulcsszámok megfelelő alapértékek	Kulcsszámok	A kulcsszámok megfelelő alapértékek	Kulcsszámok	A kulcsszámok megfelelő alapértékek
000		100	0,2	200	0,45
001	0,18	101	0,4	201	0,68
002	0,36	102	0,6	202	0,91
003	0,54	103	0,8	203	1,2
004	0,72	104	1,0	204	1,4
005	0,9	105	1,2	205	1,6
010	0,18	110	0,4	210	0,68
011	0,36	111	0,61	211	0,92
012	0,35	112	0,81	212	1,2
013	0,73	113	1,0	213	1,4
014	0,91	114	1,2	214	1,7
015	1,1	115	1,4	215	1,9
020	0,37	120	0,61	220	0,93
021	0,55	121	0,82	221	1,2
022	0,72	122	1,0	222	1,4
023	0,92	123	1,2	223	1,7
024	1,1	124	1,5	224	1,9
025	1,3	125	1,7	225	2,2
030	0,56	130	0,83	230	1,2
031	0,74	131	1,0	231	1,4
032	0,93	132	1,3	232	1,7
033	1,1	133	1,5	233	2,0
034	1,3	134	1,7	234	2,2
035	1,5	135	1,9	235	2,5
040	0,75	140	1,1	240	1,5
041	0,94	141	1,3	241	1,7
042	1,1	142	1,5	242	2,0
043	1,3	143	1,7	243	2,3
044	1,5	144	1,9	244	2,5
045	1,7	145	2,2	245	2,8
050	0,94	150	1,3	250	1,7
051	1,1	151	1,5	251	2,0
052	1,3	152	1,7	252	2,3
053	1,5	153	1,9	253	2,6
054	1,7	154	2,2	254	2,9
055	1,9	155	2,4	255	3,2

Kulcsszámok	A kulcsszámok megfelelő alapértékek	Kulcsszámok	A kulcsszámok megfelelő alapértékek	Kulcsszámok	A kulcsszámok megfelelő alapértékek
300	0,78	400	1,4	500	2,3
301	1,1	401	1,7	501	3,1
302	1,3	402	2,1	502	4,3
303	1,6	403	2,5	503	5,8
304	2,0	404	3,0	504	7,6
305	2,3	405	3,6	505	9,5
310	1,1	410	1,5	510	3,3
311	1,4	411	2,1	511	4,6
312	1,7	412	2,6	512	6,4
313	2,0	413	3,1	513	8,4
314	2,3	414	3,6	514	11,0
315	2,7	415	4,2	515	13,0
320	1,4	420	2,2	520	4,9
321	1,7	421	2,6	521	7,0
322	2,0	422	3,2	522	9,5
323	2,3	423	3,8	523	12,0
324	2,7	424	4,4	524	15,0
325	3,1	425	5,0	525	18,0
330	1,7	430	2,7	530	7,9
331	2,1	431	3,3	531	11,0
332	2,4	432	3,9	532	14,0
333	2,8	433	4,5	533	18,0
334	3,1	434	5,2	534	21,0
335	3,5	435	5,9	535	25,0
340	2,1	440	3,4	540	13,0
341	2,4	441	4,0	541	17,0
342	2,8	442	4,7	542	22,0
343	3,2	443	5,4	543	28,0
344	3,6	444	6,2	544	35,0
345	4,0	445	6,9	545	43,0
350	2,5	450	4,1	550	24,0
351	2,9	451	4,8	551	35,0
352	3,2	452	5,6	552	54,0
353	3,7	453	6,4	553	92,0
354	4,1	454	7,2	554	160,0
355	4,5	455	8,1	555	160,0 felett