

Higiénés taljbakteriológiai-, és talajmikrobiológiai vizsgálatok

Készítette: Tolner Mária



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

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 növénytakarót.

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. Az évszakoktól függően, a talajban periodikusan változik a mikroorganizmusok száma, és az egy élőhelyen található mikroorganizmus közösség százalékos összetétele. Például 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 mikrobapopuláció 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,
- gombák,
- aktinomyceták,
- kék-, és zöldalgák,
- kovamoszatok

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 ez ember bélsatornájában élnek. E baktériumokat jelzőflórának tekintjük, amennyiben a mintában coliformok találhatóak, 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, spórárt 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.

A coliform baktériumok Gram negatív, spórártlan 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.

Fekális 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 kémcsô peptonvizet, inkubáljuk 37°C-on, majd **Kovács reagenst** adunk hozzá(para-dimetil-amino-benzaldehid butanolos oldata). Ha a tetején levô gyûrû 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 kémcsôbe 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 lûg és a levegô jelenlétében diacetillé oxidálódik. A diacetil α -naftol és arginin (peptonból) jelenlétében adja a vörös színt.

Citrát teszt

Ha Na- vagy K-citrátot teszünk egyedûli 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.

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

Összecsíraszám meghatározása (1 g talajra számítjuk át az eredményt)

1. Csőhígításos (MPN) módszer: 3 ill. 5 párhuzamos 10-szeres hígítási sort készítünk. Az alapoldat: 0,5 g talaj 4,5 cm³ tápoldatban. Értékelés: 24 óra múlva a zavaros tápoldat jelzi a baktériumok növekedését, ha a tápoldat zavaros a cső pozitívnak tekintendő.

2. Szélesztéssel: a felmelegített, Petri-csészébe kiöntött majd megdermedt szilárd tápagar felületére különböző talajhígításokból 0,1 cm³-t pipettázunk.

3. Lemezöntéses módszer: a talajból hígítási sort készítünk (a várható baktériumszámnak megfelelően). Petri-csészébe pipettázunk 0,1 cm³-t, majd felmelegített és kb. 40°C-ra lehűtött tápagarba keverjük, alaposan homogenizáljuk. 24 óra múlva az agarlemezen kinőtt telepeket megszámloljuk.

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

2.c Gombaszám meghatározása: Martin vagy Czapek-Dox agarlemezekre 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.a Coliformszám, fekálcoliformszám 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 illetve 44°C inkubáljuk. (3-3 párhuzamos oltást készítünk az egyes hígításokból.) A 37 °C-on inkubált tápoldatokban minden coliform baktérium képes szaporodni, míg 44 °C-on csak a fekálcoliformok szaporodnak. **Értékelés:** pozitív, 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 követhető nyomon. Az MPN táblázat segítségével meghatározzuk a kiindulási minta coliform illetve fekálcoliform számát számát.

3.b 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.c Fekálstreptococcus-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 fekálstreptococcus számát.

3.d A Clostridiumszám meghatározása : Hígítási sort készítünk, majd lemezöntéses 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. A 3 mm-nél nagyobb fekete telepeket számloljuk meg.

3.e 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 elvégezzünk (oxidatív glükózbontás, piocianin termelés, nitrát redukció). A pozitív reakciót adó csövek alapján az MPN táblázat segítségével meghatározzuk a kiindulási minta *Pseudomonas aeruginosa* számát.

A táptalajok csoportosítása a felhasználás célja szerint

a. Alaptáptalajok, melyek tartalmazzák mindazokat az anyagokat, melyek lehetővé teszik, hogy a mikroorganizmusok nagy része jól növekedjen rajtuk. pl. gombák számára a malátás táptalajok, baktériumok számára a bouillon ill. bouillon jellegű táptalajok.

b. Elektív táptalajok, melyek összetételüknél fogva alkalmasak arra, hogy bizonyos mikroorganizmusokat- speciális tápanyaghasznosítási képességüket kihasználva- a többi mikroorganizmus közül kiemeljünk. Ezen táptalajok alkalmasak a mikroorganizmusok izolálás előtti dúsítására.

c. Szelektív táptalajok olyan táptalajok, melyek egyes mikroorganizmusok ill. mikroorganizmus-csoportok növekedését másokhoz viszonyítva lassítják vagy teljesen megakadályozzák. Rendszerint az élőhelyükről kiemelt mikroorganizmus-csoportok szétválasztására szolgálnak. Tiszta tenyészetek készítésénél nélkülözhetetlenek.

d. Differenciál táptalajok összetételüknél fogva különböző mikroorganizmusok differenciálására és azonosítására alkalmasak. Jellemzőjük, hogy szabad szemmel is látható reakciót adnak a növekvő baktériumok anyagcseretermékeivel. Ilyen pl. az Endo-agar.

e. Speciális táptalajok, ezek különleges eljárások, vagy vizsgálatok céljára kifejlesztett táptalajok.

Ajánlott 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

Szegi József : Talajmikrobiológiai vizsgálati módszerek, Mezőgazdasági Könyvkiadó. Budapest, 1979.

Dr. Horváth Sándor: Mikrobiológiai praktikum Tankönyvkiadó, Budapest, 1980.

Járványügyi és klinikai bakteriológia Szerk: Lányi Béla Országos Közegészségügyi Intézet, Budapest, 1980.

A laboratóriumi gyakorlat menete

- I. Talajkivonat készítése: 1 g nedves talajt 9 cm³ csapvízzel 28°C-on 30 percig rázatunk.

- II.
 - a. Talajok élősejtszámának meghatározása Nutrient-agaron hígításos lemezöntéssel.
 - b. Streptomyces szám meghatározása Küster-Wiliams agaron hígításos lemezöntéssel.
 - c. Gombaszám meghatározása Czapek-Dox tápagon hígításos lemezöntéssel.
 - d. Chromocult agarra szélesztéssel *E. coli* ill. coliformok izolálása.
 - e. Clostridiumszám meghatározása Wilson-agaron szélesztéssel.
 - f. *E. coli* izolálása talajhígításokból Endo-agarra szélesztéssel

- III. Coliform-szám ill. fekáliás eredetű coliform-szám meghatározása MPN módszerrel laktózlevesbe oltással.

48 óra elteltével értékelés, a tápagonokon különböző talaj hígításokból kinőtt telepek számlálása, eredmények visszaszámolása 1 g talajra.

Beadandó: Sejtszámok db/ g-ban