

# Környezetvédelmi biotechnológia I

A környezetvédelem célja a természet megóvása, a természet szennyezésének megakadályozása, hulladékkezelés. Gyakran alkalmaznak biotechnológiai módszereket e cél eléréséhez.

## **Talajok, természetes vizek, szennyvizek állapotának felmérése, a szennyezett területek tisztulási folyamatának nyomonkövetése**

Talajok, vizek minőségének meghatározása fizikai, kémiai, biológiai vizsgálatok elvégzéséből és kielemezéséből áll. A kémiai minősítés a klasszikus komponensek, valamint mikroszennyezők, radioaktivitás meghatározása. Fizikai felmérések pl. a talaj porozitása, vizek sótartalma, hőmérséklet (pl. hőszennyezés esetén fontos).

A szennyvizek, szennyezett talajok igen sokféle szerves anyagot tartalmaznak, melyek egyenkénti mennyiségi meghatározása (sőt kimutatása is) rendkívül körülményes, ezért mennyiségüket közvetve mérve azzal az oxigénmennyiséggel jellemezzük, mely adott körülmények között oxidálásukra elhasználódik. Az oxigénigény meghatározására kétféle módszert alkalmazunk:

A természetben lejátszódó folyamatokat legjobban a **biokémiai oxigénigény (BOI)** közelíti meg, de időigényes. A BOI az az oxigénmennyiség, amely a vízben levő szerves anyagok aerob úton, meghatározott idő alatt történő (ált. 5 nap) biokémiai lebontása során elfogy.  $BOI_5 = \text{mg O}_2/\text{L}$ . A teljes biokémiai oxigénigény (TBOI) a szerves szennyezők teljes lebontásához szükséges oxigén mennyisége.

A BOI nagy időigénye miatt gyakrabban alkalmazzák a **kémiai oxigénigény (KOI)** meghatározást. A víz (talajminta) K-permanganáttal vagy K-dikromáttal (erélyesebb oxidálószer, így pontosabb eredményt ad) történő forralása során elhasznált vegyszerrel egyenértékű oxigénfogyasztással jellemezzük.

További mérhető paraméterek a szennyezettség illetve a tisztulás meghatározására a nitrogén-, foszfor-, szerves- és totál szén tartalom, a pH, valamint a mikroflóra összetétele, változása is információt nyújt a vizsgált minta állapotáról.

A biológiai vízminőség azon tulajdonságok összessége, melyek a vízi ökoszisztémák életében fontosak, létrehozzák, és fenntartják azokat: halobitás, trofitás, szaprofitás, toxicitás.

A **toxicitás** a víz „mérgezőképessége”, olyan anyagok jelenléte, melyek a vízi élőlények életműködését zavarják, csökkentik az öntisztulóképességet. Pl. toxinok, bomlástermékek, szintetikus anyagok. Mértékét biológiai tesztekkel állapítják meg, azzal a hígítással jellemzik, melyben adott idő alatt a kísérleti élőlények fele életben marad.

A gyakorlat első részében talajminták biológiai oxigénigényének meghatározását indítjuk el az öt napos BOI mérési módszer segítségével (Lásd később: A biológiai oxigénigény mérése).

## Szennyezett talajok, vizek mikrobiális tisztítása

Az elmúlt évtizedekben a növekvő gazdasági aktivitásnak köszönhetően egyre nagyobb mennyiségű szennyező anyag került ki a természetbe, melyek nagymértékben károsíthatják az élővilágot.

Az ipar egyre nagyobb mértékben használ szintetikus vegyszereket (jelenleg több, mint öt millió vegyi anyagot írtak le), melyek a természetes környezetben élő szervezetek számára ismeretlenek, így lebontásuk nem történik meg. A problémát fokozza, hogy a hulladékok általában összetettek, számos szennyező anyagot, és azok bomlástermékeit tartalmazzák. Ezek felhalmozódása egy-egy területen döntően befolyásolhatja a kialakult mikro- és makroflórát.

Szennyezett vizeket, talajokat először mechanikai úton tisztítják, pl. levegőztetés, szűrők alkalmazása, égetés, ioncserélő gyantákon történő megkötés, stb. A mechanikai úton tisztított talajok, vizek azonban még jelentős mennyiségű szerves anyagot tartalmazhatnak. Ezek további tisztítására biológiai módszereket használnak.

A szennyeződések általában többkomponensűek, egyrészt a szennyező anyag(ok), másrészt bomlástermékei(k) is jelen vannak. Ezek az anyagok bizonyos élő szervezetek számára tápanyagként szolgálhatnak, és kialakulhat egy természetes mikrobiológiai ökoszisztéma. Az egyedi fajok ritkán élnek túl a többkomponensű (legtöbbször) toxikus környezetet. Az egymással szimbiotikusan együttélő mikrobák azonban képesek fennmaradni és felhasználni tápanyagként a környezetben jelenlévő vegyületeket. Ezt felismerve a mikrobiális eljárások nagy részében irányított tiszta kultúrák keverékét alkalmazzák a nagyobb tisztulás elérése érdekében. Aerob és anaerob eljárások egyaránt alkalmazhatók.

Az aerob mikroorganizmusok a szerves vegyületek oxidatív lebontásakor felszabaduló energiát saját életműködésükhöz használják fel. A szerves anyagnak az energiatermeléshez használt része bonyolult biokémiai reakciókban szén-dioxiddá, vízzé, stb., azaz szervesetlen anyaggá, a szerves anyag fennmaradó része pedig legtöbb esetben sejtanyagga alakul.

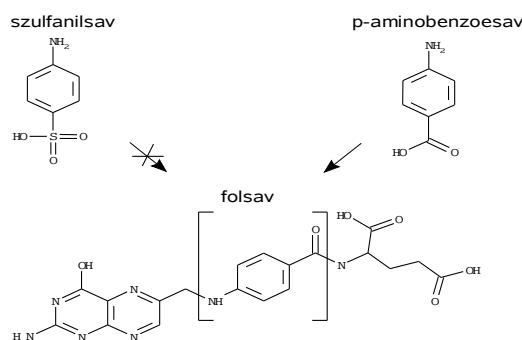
A gyakorlaton egyféle mikroorganizmus segítségével mutatjuk be egy aromás vegyület mikrobiális lebontását, melyet három paraméter párhuzamos mérésével ellenőrzünk.

### Szulfanilsav bontása *Sphingomonas sp*-vel

#### A szulfanilsav

A szulfonált aromás vegyületek egyik tipikus képviselője a szulfanilsav. Gyakorlati jelentősége igen nagy, mert azofestékek, növényvédőszernek előállításában nagy mennyiségben használják, komoly jelentőségűek a gyógyászatban alkalmazott származékai, a szulfonamid készítmények. A szulfonamidok (pl a szulfanilamid, mely a szulfanilsav amidja) erős baktericid hatást mutatnak. Úgy bénítják a mikroorganizmusok szaporodását, hogy a

folsav bioszintézishez szükséges para-amino benzoosavat kiszorítják az enzim komplexéből, és ily módon blokkolják a reakciót [Bruckner 1979].



A szulfanilsav (M=173,19) szintetikus vegyület, az anilin közvetlen szulfonálásával nyerhető úgy, hogy az anilint tömény kénsavval 200°C-ra hevítik [Bruckner 1979]. Hideg vízben igen rosszul, alkoholban nem oldódó vegyület. Ásványi savakkal nem képez sókat, mivel erősen savas szulfonsavcsoportja intramolekulárisan közömbösíti a gyengén bázisos aminocsoportot. Xenobiotikus szulfoncsoportja és erős negatív töltése miatt sok baktérium sejtfalán nem vagy alig tud átjutni. Bár a szulfon-csoportot hordozó aromás vegyületek általában mikrobiális módszerekkel nehezen bonthatóak, több baktérium törzset is sikeresen használtak ilyen típusú toxikus anyagok semlegesítésére.

### *Sphingomonas subarctica*

A biológiai lebontó folyamatokban a *Pseudomonas*, *Sphingomonas* nemzetségek komoly szerepet játszanak. Talajban és természetes vizekben gyakran előfordulnak, ami e baktériumok fiziológiai változékonyságának, és széles táplálkozási szubsztrát spektrumának köszönhető.

A *Sphingomonas* fajok közismert baktériumok a környezetvédelemmel foglalkozó kutatók körében. 1990 óta azokat a fajokat, melyek membránja szfingolipideket tartalmaz átcsoportosították új, *Sphingomonas* nemzetséggé (régebben főleg *Pseudomonas*-okként írták le őket). A legtöbb eddig izolált, degradációs képességéről nevezetes faj ebbe a csoportba sorolható. Pl. xilol, toluol, klórozott aromás vegyületeket, lignint bontó változatai ismertek e fajoknak.

A gyakorlat során szulfanilsavat tartalmazó "minimál" tápoldaton (foszfátot, kalciumot, magnéziumot, nyomelemeket tartalmaz) szaporított *S. subarctica* tenyészet szulfanilsav bontó képességét követjük nyomon úgy, hogy mérjük a tápoldat szulfanilsav, szulfáttartalmának és szerves széntartalmának időbeli változását.

## **Talaj ill. szennyvízminták szerves-C tartalmának meghatározása (módosított Mebius módszer)**

*A módszer elve:*

A talajban, szennyvízben lévő szervesanyag oxidációja tömény savas közegben K-bikromát oxidálószer segítségével. A folyamat során a 'szerves' szén CO<sub>2</sub>-á alakul (ez alapján is lehet mérni IR vagy hővezetőképességi detektorral), a Cr(VI) pedig Cr(III)-á redukálódik. A K-bikromátot feleslegben alkalmazzuk, és a nem redukálódott bikromátot vas-ammónium-szulfáttal (Mohr-só) visszatitráljuk. Az elfogyott titráló oldat mennyiségéből következtetni tudunk a vizsgált minta szerves széntartalmára. Létezik olyan módszer is, ahol titrálás helyett fotometriásan mérik a redukciót, de ez kevésbé pontos. A reakciót a klorid ionok zavarhatják, ebben az esetben kismennyiségű Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-t kell a talajhoz keverni. Problémát okozhat, ha sok redukált mangán és vas van a talajban.

A módszer nem alkalmas nagy szerves anyag-tartalmú talajok, (>8%) tözegek, komposztok, kertészeti földkeverékek vizsgálatára. Ezekben az esetekben az izzítási veszteség alapján célszerű a szervesanyag meghatározása.

***A módszer során óvatosan kell dolgozni, jó huzatú vegyi fülke és védőfelszerelés szükséges a tömény savak használata miatt, és a K-bikromát is mérég.***

**Laboreszközök:** analitikai mérleg, 100 és 250 cm<sup>3</sup> Erlenmeyer lombikok, 25 ml-es buretta, 2 db savadagoló diszpenzer, 1 db dikromát-adagoló diszpenzer

**Biztonsági eszközök:** vegyi fülke, gumikesztyű, köpeny, üveggyöngy

**Vegyszerek, oldatok:**

- desztillált v. ioncserélt víz
- koncentrált kénsav, legalább 96%-os
- K-dikromát oldat: Analitikai mérlegen bemérünk 2,4515 g K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> -t óvatosan beleszórjuk egy 100 cm<sup>3</sup>-es főzőpohárba, desztillált vízben feloldjuk, majd pontosan kiegészítjük 400 ml-re.
- Titráló oldat (Mohr-só): Bemérünk (legalább 0,01 g pontossággal) 7,8390 g Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O-t 200 cm<sup>3</sup> főzőpohárban lévő desztillált vízbe. Óvatosan hozzáadagolunk 1 cm<sup>3</sup> koncentrált kénsavat. Átöntjük, majd maradéktalanul átöblítjük egy 1 literes mérőlombikba, és kiegészítjük 1 L-re.
- Ferroin indikátor (készben kapható, 1/40 N oldata)
- (Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - alkalmazása akkor szükséges, ha a talaj Cl-ionokat tartalmaz)
- Szulfanilsav (SA) standard: 0,118 g SA 100 ml desztillált vízben oldva (6,94mM).  
(1g SA 0,416 g szén tartalmaz, tehát 1 ml SA stanard = 0,5 mg C)

**A gyakorlat során nem talajmintával fogunk dolgozni !** (csak azt szeretnénk szemléltetni, hogy talajra is alkalmazható, sőt elsősorban arra alkalmazzák)

**Eljárás talajminták esetén**

Talajminta előkészítése: A légszáraz talajt jól összekeverjük, kiveszünk belőle kb. 20-30 g-ot, a szemmel látható szerves anyag (gyökérmaradvány, rovar stb.) maradványokat csipesszel kiszedjük, és dörzsmozsárban lisztfinomságúra őröljük és 0,5 mm-es szitán átszítáljuk. A porítás azért fontos, hogy a szerves anyag oxidációja minél tökéletesebb legyen.

Roncsolás: Az analízishez 0,2 - 2,0 g-ot lemérünk (szervesanyag tartalomtól függően) analitikai mérlegen és 100 cm<sup>3</sup>-es Erlenmeyer edénybe helyezzük. 5 cm<sup>3</sup> (4x töményebb törzsoldatból, mint a törzsoldatoknál megadott érték) K-bikromát oldatot öntünk a talajhoz. Vegyi fülke alatt 7 cm<sup>3</sup> tömény kénsavat adagolunk diszpenzer segítségével a lombikba, (**vigyázat, azonnal forrni kezd!**) gyengén összerázzuk, majd az elektromos főzőlapra helyezzük, és 1-5 percig forraljuk. **15-20 db üvegyöngyöt kell hozzáadni a kénsav bemérése előtt!!!!**

Vak oldat készítése: kétfajta vak oldatot készítünk 5 cm<sup>3</sup> 4x K-bikromát + 7 cm<sup>3</sup> kénsav hozzáadásával, legalább 2-2 ismétlésben. Az egyik a forralás nélküli vak, a másikat pedig 1-5 percig forraljuk. **FONTOS !** hogy a forralásra készített vakhoz **tiszta** üvegyöngyöket rakjunk előzetesen, mert különben hirtelen kifuthat forralás közben. A forralás nélküli vak oldat a Mohr-só faktorozásához kell, a forralt vak pedig annak a megállapítására, hogy a forralás hatására mennyi K-bikromát bomlik el.

A forralás után, kb. 20 perc múlva az oldatok kihűlnek. A mintákhoz és a vak oldatokhoz 2.5 ml tömény foszforsavat adunk, majd óvatosan, 25 cm<sup>3</sup> desztillált vizet tartalmazó 200 cm<sup>3</sup>-es Erlenmeyer lombikokba áttöltjük, és még kétszer kb. 10 cm<sup>3</sup> desztillált vízzel átöblítjük. Megvárjuk míg kihül (kb.20 perc) majd hozzákezdhetünk a titráláshoz.

### **A gyakorlat menete:**

SA törzsoldatot használva hígítási sort készítünk (kalibráció): 0-0,1-0,2-0,3-0,4-0,5 mg C.

A SA standard törzsoldatból a megfelelő mennyiségeket pipettával 100 ml-s erlenmeyer lombikokba mérjük, és 2-2 ml-re kiegészítjük őket desztillált vízzel.

Az ismeretlen mintákból (gyakorlat második napján) 1 ml-t mérünk szintén 100 ml-s lombikokba (a végtérfogat 2 ml, magas C koncentráció esetén a mintát hígítanunk kell desztillált vízzel). Vegyi fülke alatt 2 ml K-bikromát oldatot adagolunk a folyadékmintához, majd **lassan!** 5 cm<sup>3</sup> tömény kénsavat csepegtetünk diszpenzer segítségével a lombikokba, (**vigyázat, azonnal forrni kezdhet!**) gyengén összerázzuk, és a fülke alatt 10 percig inkubáljuk, időnként megrázzuk. Ha az oldatok kihűlnek a lombikok tartalmát maradéktalanul, **óvatosan**, 10 cm<sup>3</sup> desztillált vizet tartalmazó 200 cm<sup>3</sup>-es Erlenmeyer lombikokba áttöltjük, és még kétszer kb. 5-5 cm<sup>3</sup> desztillált vízzel átöblítjük. Megvárjuk amíg ismét kihül (kb.10 perc) majd hozzákezdhetünk a titráláshoz az **indikátor** (60µl) hozzáadása után. Az indikátor magas hőmérsékleten elbomlik, ezért csak a már lehűlt oldatba szabad belemérni!

Titrálás: Az Erlenmeyer lombikokba 0.06 ml Ferroin indikátort csepegtetünk és Mohr só oldattal 25 cm<sup>3</sup>-es bürettából megtitráljuk. A fogyott ml értékeket feljegyezzük. A vak mintára (mely színt nem tartalmaz) 12-13 cm<sup>3</sup> körüli lesz a fogyás. Ha a K-bikromátnak több mint 70 %-a redukálódott a roncsolás során akkor meg kell ismételni, kevesebb minta beméréssel.



Színátcsapás: halvány kék(eszöld)      barnás(rózsaszín).

### **Szulfát tartalom mérése**

A szulfát (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) a természetben mindenhol megtalálható, előfordul természetes vizekben, bányászati hulladékban, kőzetekben. Mérésére többféle megoldás létezik, ion kromatográfiás (0.1 mg SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> /L), gravimetriás (10 mg SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> /L), turbidimetriás (1-40 mg SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> /L) módszer.

A gyakorlat során a turbidimetriás módszer segítségével mérjük a tápoldat szulfát tartalmát.

**A mérés elve:** A szulfát ionok acetátos környezetben bárium kloriddal csapadékot képeznek, miközben bárium szulfát kristályok keletkeznek. Fotometriásan mérjük a Ba-szulfát szuszpenzió fényelnyelését, és a szulfát koncentrációt standard kalibrációs görbe segítségével határozzuk meg. (A pontos mérést befolyásolhatja, ha a mérendő minta színes vagy csapadékos. Ha nagy mennyiségű szerves anyagot tartalmaz a minta, előfordulhat, hogy a Ba-szulfát nem csapódik ki megfelelően).

**A módszer érzékenysége:** a minimális detektálható koncentráció, 1 mg  $\text{SO}_4^{2-}/\text{L}$ .

**Kellékek:** mágneses keverő, spektrofotométer (420 nm), stopperóra, bemérő kanál, köpeny.

**Vegyszerek, oldatok:**

1. Bárium klorid ( $\text{BaCl}_2$ ) 20-30 mesh kristályokkal
2. Puffer oldat: oldj fel 30 g  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ , 5 g Na-acetát ( $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3 \text{H}_2\text{O}$ ), 1 g  $\text{KNO}_3$  és 20 ml ecetsavat (99%) 500 ml desztillált vízben, majd egészítsd ki 1000 ml-re.
3. Standard szulfát oldat: 0.1479 g vízmentes  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -ot oldj fel desztillált vízben, és hígítsd 100 ml-re (1.00 ml = 1000  $\mu\text{g SO}_4^{2-}$ ).

**A gyakorlat menete:**

Kalibrációs egyenes készítése: 0-50-100-200-400-600  $\mu\text{g SO}_4^{2-}/\text{ml}$  hígítási sort készítünk a szulfát törzsoldatból, kémcsövekbe mérjük (desztillált vízzel hígítunk), majd kiegészítjük azokat 10 ml-re desztillált vízzel.

/Az ismeretlen mintákból (gyakorlat második napján) 1-1 ml-t mérünk a kémcsövekbe, és ezeket is kiegészítjük desztillált vízzel 10 ml-re./

**Ba  $\text{SO}_4$  csapadék képzése:** 10 ml mintát 25 ml-s lombikba mérünk. Hozzáadunk 2 ml puffer oldatot, és mágneses keverőn kevertetjük. Keverés közben hozzáadunk egy spatula  $\text{BaCl}_2$ -ot, és azonnal indítjuk a stoppert. Egy percig tovább kevertetjük állandó sebességgel (fontos, hogy minden mintát azonos sebességgel keverjünk!!).

**Turbiditás mérés:** az egy perc keverés eltelte után az oldatból öntsünk műanyag küvettába, és mérjük meg az oldat zavarosságát 420 nm-en. Mindig ugyanazt a küvettát használjuk.

(A mintáink mérése során - különösen színes, zavaros oldatok esetén - használjunk olyan kontrollt is, mely a szulfátot tartalmazza, de a  $\text{BaCl}_2$ -ot nem, mely azért fontos, hogy a minta önmagában való zavarosságát megmérve, a kapott értéket le kell vonni a  $\text{BaCl}_2$ -dal kapott értékből!!)

### Szulfanilsav tartalom mérése

Az aromás vegyületeknek van fényelnyelése az ultraviola tartományban. Általában 254 nm-en jól mérhetőek, ettől eltérő lehet az elnyelési maximumuk a funkciós csoportoktól függően. A szulfanilsav (SA) fényelnyelési maximuma 248 nm-en mérhető, a méréshatár 100  $\mu\text{M SA}$ .

**A mérés menete:**

Kalibráció sort készítünk 1 mM SA törzsoldatból 0-100  $\mu$ M tartományban. A hígításhoz desztillált vizet használunk. Majd **kvarcküvetében** megmérjük az egyes hígítási pontok fényelnyelését 248 nm-en.

Az ismeretlen mintákat (gyakorlat 2. napján) 100x hígítjuk desztillált vízzel, jól összekeverjük, és a hígított mintáknak megmérjük a fényelnyelését 248 nm-en.

### **Szennyvizekben, szennyezett talajokban az oxigénfogyasztás mérése**

Szennyvizek, szennyezett talajok vizsgálata során hasznos információt nyújthat a szennyezettség fokáról, és a mikroflóra jelenlétéről vagy hiányáról az oxigénfogyasztási ráta mérése. Mélni lehet oxigén szenzitív elektróddal a minta oldott oxigén szintjét, a legjobb megoldás erre a membrán-elektrod módszer, melynek lényege, hogy az elektród egy oxigén-permeabilis membránnal védett, ami védi az elektródot a szennyeződésektől, de az oxigén számára átjárható. Állandó feltételek mellett a mért áram (kiíron megjeleníthető, és a ráillesztett egyenes meredekségéből számolható az oldott oxigén konc. változása) egyenesen arányos az oldott oxigén koncentrációval.

A biológiai oxigénigény meghatározására alkalmazott öt napos mérési módszer egyszerű, bár hosszadalmas. A mérendő minta szervesanyagainak biokémiai elbontásához felhasznált oxigén koncentrációt határozhatjuk meg (figyelembe kell venni azonban, hogy a szulfidok,  $\text{Fe}^{2+}$  ionok, valamint a nitrogén redukált formáinak oxidálására elhasznált oxigént is mérjük ebben a tesztben. Az utóbbi inhibitorokkal gátolható). Amennyiben egy mikroorganizmus képes felhasználni a talajban található szennyeződéseket, az ehhez szükséges oxigén fogyasztás mértéke az alábbi módszerrel egyszerűen detektálható.

#### **BOI<sub>5</sub> mérése:**

**Kellékek:** BOI üvegek tartozékokkal, inkubátor (20°C), mérleg

**Anyagok:** erősen szennyezett talaj, vagy szennyvíz minta

5 x M9 törzsoldat: 15 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 64 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,5 g NaCl (pH=7,0)

M9 minimál tápoldat: 200 ml 5 x M9, 2 ml 1 M  $\text{MgSO}_4$ , 0,1 ml 1 M  $\text{CaCl}_2$

felhasznált mikroorganizmusok: pl. *Sphingomonas sp.*, *Bacillus* fajok, *Streptomyces sp.*,  
*talajizolátumok*, *Pseudomonas* fajok, *Enterobacter sp.*,

#### **A gyakorlat menete:**

Mérleglen lemérünk 5-5 g talajt, vagy 10 ml szennyvizet, majd M9 tápoldattal belemossuk a BOI üvegekbe (a végtérfogat 97 ml legyen). A negatív kontroll üveg kivételével az üvegekbe 5-5 ml mikroorganizmus kultúrát mérünk, keverőbotot dobunk bele, a „kosárba” két-két NaOH szemcsét ejtünk, majd lezárjuk a speciális mérőfejjel az üvegeket (A NaOH szerepe, hogy a keletkező  $\text{CO}_2$ -ot megkösse. A mérőfej az oxigén fogyasztás által kialakult nyomásváltozást méri, amit a keletkező széndioxid pontatlanná tenne). Az indításhoz

nyomjuk le egyszerre a fejen lévő két fekete gombot, és lenyomva tartjuk a 00 megjelenéséig. Az üvegeket 20°C-os inkubátorban lévő keverőlapra tesszük. Öt nap elteltével az üvegek fejében tárolt adatokat leolvassuk, kiértékeljük. Az M gomb megnyomásával megjelenítjük a számokat, léptetni az S gomb megnyomásával lehet. Az S gombot kétszer kell megnyomni, hogy megjelenjen az I., mely az első napot jelenti, rögtön megjelenik a hozzátartozó érték is, majd az S megnyomásával lépünk tovább a 2. napra. A leolvasott adatokat 97ml térfogat esetén 20-al megszorozva kapjuk meg az oxigén igény értékeket mg O<sub>2</sub>/L –ben.

Feladat: a kapott értékek elemzése, értékelése a kontroll(ok) figyelembevételével.

### **A talajminta mikroflórájának vizsgálata**

A talajok, természetes-, és szennyvizek minőségéről információt nyerhetünk, ha megvizsgáljuk azok mikroflóráját. Erősen szennyezett minták esetén, a természetes mikroflóra elpusztul, és csak olyan mikrobiális élőlényeket találunk, melyek képesek voltak a rendkívül toxikus környezethez adaptálódni, a fellelhető szervesanyagot tápanyagként felhasználni.

**Kellékek:** mérleg, szűrőpapír, tölcsér, 100 ml-s Er. lombik, rázógép, (centrifuga)

**Anyagok:** szennyezett talajminta, 0.85 % NaCl (fiziológiás sóoldat), LB tápagar lemez (mely élesztőkivonatot, triptont, NaCl-ot és agart tartalmaz)

#### **A gyakorlat menete:**

Mérlegen lemérünk 1 g talajt, majd a lombikba mossuk 10 ml fiziológiás sóoldattal. Két órán át rázógépen kevertetjük közepesen erős keveréssel, szobahőmérsékleten. Az elegyet leszűrjük, (ha nagyon kevés mikroorganizmusra számítunk a szűrletet le lehet centrifugálni, és a csapadékot 1 ml fiziológiás sóoldatban felszuszpendálni, így kisebb térfogatban kapjuk meg a talajmikrobákat) és 10 µL-t tápagra kikenünk, 30°C-on inkubáljuk. Egy nap, illetve egy hét után vizsgáljuk a telepkepződést.



## Jegyzőkönyv

SVM, 3. éves biológusoknak, Biotechnológiai Tanszék 2004-2005. I félév

Dátum:

Név:

-----

### 1. $\text{BOI}_5$

leolvasott érték x 20 (97 ml esetén) = mg  $\text{O}_2$ /L

	<b>mikroorganizmus</b>	<b>leolvasott értékek alapján számolt oxigénigény (mg <math>\text{O}_2</math>/L)</b>				
talaj:		1. nap	2. nap	3. nap	4. nap	5. nap
1	Ø					
2						
3						
4						
5						
6						

Az adatok alapján a kísérlet értékelése:

### 2. Talaj mikroflóra vizsgálatának eredménye

**3. A tápoldatban oldott szerves széntartalom változása a szulfanilsav mikrobiális bontása során**

a, Kalibrációs egyenest készítünk 0,5 mg C/ml szulfanilsav (SA) standardból készült hígítási sorozat segítségével. (A kapott értékeket ábrázoljuk milliméter papíron)

	mg C	μL SA standard	titráló oldat fogyása (ml)
1	0.0		
2	0,1		
3	0,2		
4	0,3		
5	0,4		
6	0,5		

b, A szulfanilsav tartalom változásának nyomonkövetése a szulfanilsavas tápoldat (felülúszó) szerves széntartalmának mérésével a fenti adatokból elkészített kalibrációs egyenes alapján:

mintavétel ideje	titráló oldat fogyása (ml)	a számolt koncentráció (mg C/ml tápoldat)
0		
1 óra		
1,5 óra		
2 óra		

**4. A tápoldat szulfát-, és szulfanilsavtartalmának változása a szulfanilsav mikrobiális bontása során**

a, A szulfát kalibráció pontjai:

	μg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> / ml	μl Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> törzsoldat (1000 μg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> / ml)	OD <sub>420</sub>
1	0		
2	50		
3	100		

4	200		
5	400		
6	600		

**b, Szulfanilsav (M=173,19) kalibráció:**

	SA konc. (mM)	µl szulfanilsav törzso. (1 mM)	OD <sub>248</sub>
1	0		
2	0,01		
3	0,02		
4	0,04		
5	0,06		
6	0,08		
7	0,10		

**c, A szulfát-, és szulfanilsav tartalom változásának nyomonkövetése a szulfanilsav (SA) bontó baktérium tápoldatának felülúszójában:**

mintavétel ideje	OD <sub>420</sub>	a minta szulfát konc. (µg/ml)	OD <sub>248</sub>	a minta SA konc.		
				mM SA	mgSA/ml	mgC/ml
0						
1 óra						
1,5 óra						
2 óra						

**Feladatok:**

- 3 kalibrációs egyenes készítése;
- a szerves szén mérésből kapott C tartalom összehasonlítása a szulfanilsav tartalom mérésből számolt C tartalommal grafikonon az idő függvényében;
- az időben változó, a tápoldatban feldúsult szulfát tartalomból ki kell számolni a kén tartalmat, valamint az „elfogyott” szulfanilsav tartalomból is ki kell számolni a kén tartalmat, és a kettőt együtt szintén ábrázolni kell az idő függvényében.

**Eredmények összefoglalása, következtetések:**