

# Mikrobaközösség szubsztrát- hasznosításának jellemzése Biolog Ecoplate™ teszttel



Készítette: Nagy Zsuzsanna

# Bevezetés

A talajban milliárdnyi mikroorganizmus él, szoros együttműködésben. A mikrobaközösségeket több mikroorganizmus faj alkotja. Ezeknek a fajoknak az egymáshoz viszonyított aránya (a fajeloszlás) megváltozhat a körülményektől (hőmérséklet, nedvességtartalom, oxigénellátottság, stb.), a talaj tápanyagtartalmától, a talajban lévő szennyezőanyagoktól függően. Ezeket a változásokat követhetjük a Biolog-rendszerrel.

# A Biolog mikrolemezek leírása

A Biolog mikrolemezek mind a 31 cellájába eltérő mikrobiális tápanyagot (szubsztrát) és tetrazólium-vörös indikátort helyeznek el a lemez gyártásakor. A környezetből származó és előkészített talaj- vagy vízminták cellákba bemérése után a lemezeket termosztátba helyezünk, hogy a talajban vagy a vízben lévő mikroorganizmusok jól tudjanak működni és szaporodni. A szaporodás során a cellákban működő mikroorganizmusok vagy fel tudják használni a cellába tett tápanyagot, vagy nem. Ezt színváltozás jelzi. Így különböző anyagcsere mintázatok alakulnak ki, melyek lehetővé teszik a mikrobaközösségek gyors jellemzését. A tesztben mérhető színváltozást a tetrazólium vörös indikátor redukciója szolgáltatja. Az indikátor elszíneződését a mikrobák légzése következtében keletkezett NADH váltja ki.



# A vizsgált szubsztrátok elhelyezkedése a Biolog EcoPlate™ mikrolemezen

A1 víz	A2 β-metil- D- glükózid	A3 D-galak- tónsav-γ- lakton	A4 L-arginin	A5 víz	A6 β-metil- D- glükózid	A7 D- galakton- sav-γ- lakton	A8 L-arginin	A9 víz	A10 β-metil- D- glükózid	A11 D- galakton- sav-γ- lakton	A12 L-arginin
B1 piruvát- sav metil- észter	B2 D-xilóz	B3 D-galak- turonsav	B4 L-aszpa- ragin	B5 piruvát- sav metil- észter	B6 D-xilóz	B7 D-galak- turonsav	B8 L-aszpa- ragin	B9 piruvát- sav metil- észter	B10 D-xilóz	B11 D-galak- turonsav	B12 L-aszpa- ragin
C1 Tween 40	C2 i-eritritol	C3 2-hidroxi- benzoe- sav	C4 L-fenil- alanin	C5 Tween 40	C6 i-eritritol	C7 2-hidroxi- benzoe- sav	C8 L-fenil- alanin	C9 Tween 40	C10 i-eritritol	C11 2-hidroxi- benzoe- sav	C12 L-fenil- alanin
D1 Tween 80	D2 D- mannitol	D3 4-hidroxi- benzoe- sav	D4 L-szerin	D5 Tween 80	D6 D- mannitol	D7 4-hidroxi- benzoe- sav	D8 L-szerin	D9 Tween 80	D10 D- mannitol	D11 4-hidroxi- benzoe- sav	D12 L-szerin
E1 α-ciklo- dextrin	E2 N-acetil- D-glü- kózamin	E3 γ-hidroxi- vajsav	E4 L-treonin	E5 α-ciklo- dextrin	E6 N-acetil- D-glü- kózamin	E7 γ-hidroxi- vajsav	E8 L-treonin	E9 α-ciklo- dextrin	E10 N-acetil- D-glü- kózamin	E11 γ-hidroxi- vajsav	E12 L-treonin
F1 glikogén	F2 D- glükóz- aminsav	F3 itakonsav	F4 glicil-L- glutamin- sav	F5 glikogén	F6 D- glükóz- aminsav	F7 itakonsav	F8 glicil-L- glutamin- sav	F9 glikogén	F10 D- glükóz- aminsav	F11 itakonsav	F12 glicil-L- glutamin- sav
G1 D- cellobióz	G2 glükóz-1- foszfát	G3 α- ketovaj- sav	G4 fenil- etilamin	G5 D- cellobióz	G6 glükóz-1- foszfát	G7 α- ketovaj- sav	G8 fenil- etilamin	G9 D- cellobióz	G10 glükóz-1- foszfát	G11 α- ketovaj- sav	G12 fenil- etilamin
H1 α-D- laktóz	H2 D,L-α- glicerol- foszfát	H3 D- almasav	H4 putresz- cin	H5 α-D- laktóz	H6 D,L-α- glicerol- foszfát	H7 D- almasav	H8 putresz- cin	H9 α-D- laktóz	H10 D,L-α- glicerol- foszfát	H11 D- almasav	H12 putresz- cin

# Talajszuszpenzió készítése

45 ml steril 0,85%-os NaCl oldatot mérünk hozzá 5 g talajhoz egy 100 ml-es mérőedényben, majd 30 percen át rázatjuk.





# A talajszuszpenzió hígítása

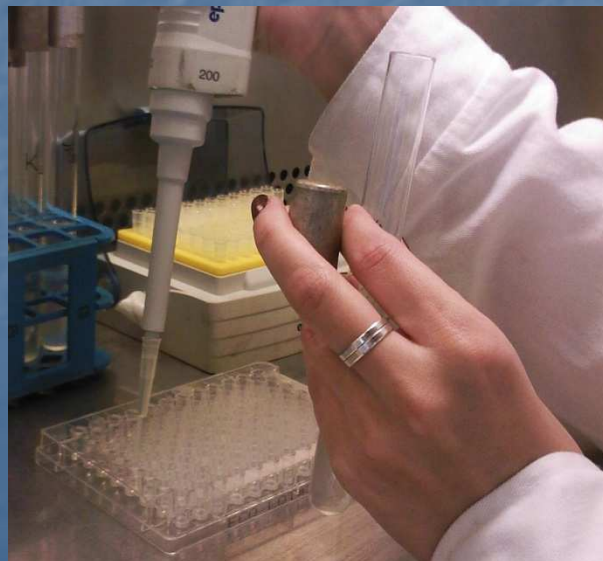
10 perces  
ülepedési idő  
elteltével 1 ml-t  
pipettázunk át 9  
ml steril 0,85%-os  
NaCl oldatba.



# A hígított talajszuszpenzió bemérése a mikrolemmez celláiba



A Biolog mikrolemmez kialakítása 3 párhuzamos mérést tesz lehetővé. A hígított szuszpenziókból 125  $\mu$ l-t mértünk be az egyes cellákba, majd a módszer fényérzékenysége miatt fóliába csomagolva 25 °C-on inkubáljuk a lemezt.





# A cellák színváltozásának mérése

A cellák  
színváltozását  
Dialab EL800  
Microplate Reader  
műszerrel olvassuk  
le 24, 48, 72, 96,  
120, 144 és 168  
óra elteltével.





# Kiértékelés 1

A kiértékelés során a különböző szubsztrátok idő függvényében mért OD adataira görbét illesztünk, majd kiszámoljuk az egyes szubsztrátok görbe alatti területét (T) és a cellák átlagos színfejlődési értékét (AWCD).

# Kiértékelés 2

- Szubsztrátok görbe alatti területének ( $T$ ) kiszámolásához használt képlet

$$T = \sum_{i=1}^n \frac{v_i - v_{i-1}}{2} \cdot (t_i - t_{i-1})$$

ahol  $v$  az OD érték  $t_i$  időpontban

- Az AWCD érték kiszámításához használt képlet

$$AWCD = \sum (C - R) / n$$

ahol  $C$  a szubsztrátot tartalmazó cella OD értéke,  $R$  a kontroll cella OD értéke és  $n$  pedig a szubsztrátok száma



# Példa

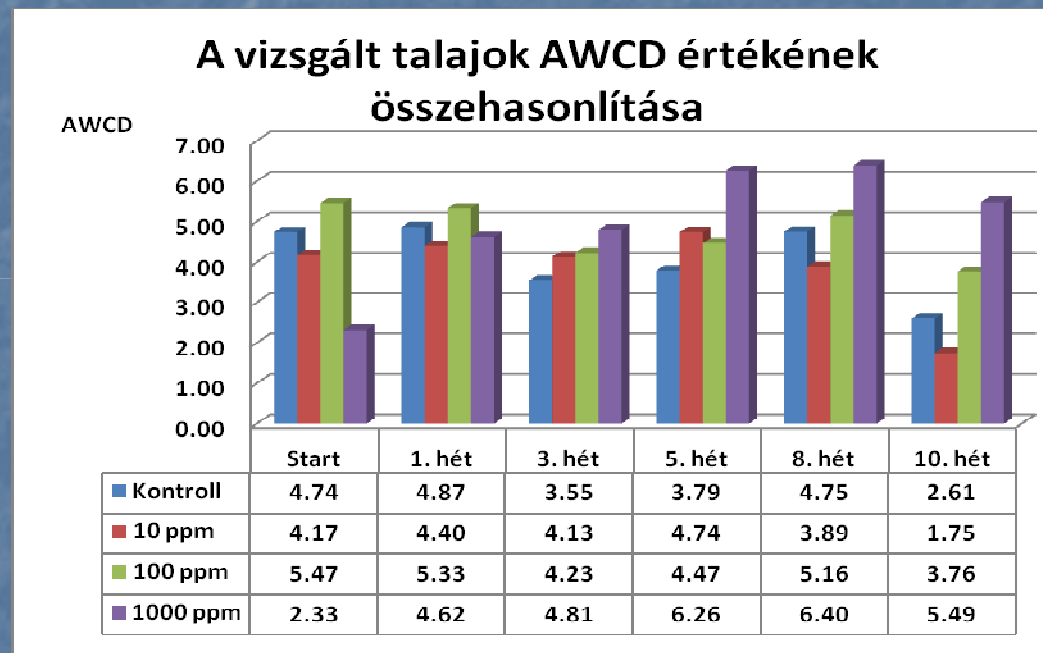
- 10, 100 és 1000 ppm (mg/kg) koncentrációban 4-klórfenollal szennyezett talajszuszpenziók mikrolemezekre mérése után kapott eredmények

# A Biolog mikrolemezeken mért abszorbancia értékekből számított görbe alatti terület és az AWCD értékek

	Start				1. hét				3. hét				5. hét				8. hét				10. hét			
	K	10	100	1000	K	10	100	1000	K	10	100	1000	K	10	100	1000	K	10	100	1000	K	10	100	1000
β-metil-D-glükózid	3.84	6.69	7.20	0.08	7.38	6.75	4.78	1.66	1.77	5.41	3.95	1.79	5.47	8.10	3.48	7.14	3.86	3.75	5.06	6.68	1.50	1.63	2.74	7.47
D-galaktónsav-γ-lakton	8.37	4.49	7.26	3.37	6.12	4.52	6.16	4.34	3.27	5.40	6.22	4.19	4.03	6.61	5.33	6.67	5.89	5.14	6.15	6.55	3.65	3.09	3.64	6.29
L-arginin	5.81	4.67	4.99	4.70	6.77	4.64	8.01	8.50	4.17	4.68	6.09	8.65	6.03	4.22	7.39	9.60	7.48	7.27	7.90	9.12	2.94	2.22	5.81	6.99
piruvátsav metilészter	5.92	7.58	7.90	3.10	6.85	5.46	6.41	4.66	4.76	5.89	6.51	7.32	5.08	6.74	6.09	6.57	6.74	3.72	6.28	6.87	4.08	3.39	5.83	7.25
D-xilóz	0.02	2.14	6.99	0.00	0.03	1.43	5.71	5.56	1.28	4.51	4.07	7.68	1.51	4.71	4.06	9.23	1.38	1.49	6.00	9.18	0.17	0.12	1.50	3.97
D-galakturonsav	7.59	6.35	6.76	2.13	7.19	6.66	6.47	5.82	7.74	6.54	5.62	6.92	6.17	7.78	6.23	6.22	7.23	6.71	6.25	5.84	6.49	4.18	5.76	6.16
L-aszparagin	8.38	8.54	9.40	6.79	9.67	8.44	10.17	9.73	8.30	7.01	7.86	10.22	7.43	7.76	10.23	10.22	9.51	8.05	10.47	11.14	5.70	3.41	8.11	9.43
Tween 40	7.56	8.08	8.81	6.67	8.37	8.09	8.62	8.58	7.65	7.80	8.24	9.35	7.41	8.24	7.18	9.54	7.91	6.74	8.10	8.14	6.51	5.47	7.03	8.61
i-eritritol	2.68	1.77	2.88	0.13	1.30	1.20	2.09	1.68	2.68	0.48	1.46	1.40	1.29	1.23	1.87	2.61	1.98	1.32	3.03	3.09	0.98	0.69	2.22	1.66
2-hidroxi-benzoészav	2.58	1.64	2.38	0.00	1.57	1.39	3.48	4.80	2.10	0.73	3.39	5.84	1.28	3.04	3.71	7.72	2.04	1.48	3.75	6.53	0.00	0.00	2.67	7.25
L-fenilalanin	4.88	1.50	4.56	0.89	1.45	3.66	4.54	1.48	1.98	2.26	2.26	1.85	2.03	4.02	3.36	3.81	3.17	2.78	3.80	6.25	0.49	0.17	1.31	2.07
Tween 80	5.40	8.70	8.58	6.06	8.67	8.11	9.05	10.37	7.49	8.18	8.54	8.73	8.15	7.33	8.46	10.73	7.74	6.81	8.12	9.08	6.99	5.18	7.84	10.42
D-mannitol	3.86	8.72	8.88	6.83	11.09	7.09	9.47	10.17	6.61	10.88	7.78	10.11	5.18	11.48	6.94	11.91	9.19	9.10	8.98	11.89	3.85	4.55	5.35	12.61
4-hidroxi-benzoészav	4.94	5.94	7.84	4.03	7.61	6.78	8.56	7.62	4.33	4.46	6.82	8.35	4.62	6.39	6.45	8.74	7.12	3.36	6.97	9.11	4.36	0.35	5.77	7.93
L-szerin	8.12	3.97	7.55	3.99	4.90	5.28	7.62	7.40	6.15	4.62	6.24	7.16	5.95	4.70	6.50	7.43	6.95	6.19	7.94	9.96	3.67	2.20	4.78	6.22
α-ciklodextrin	3.43	2.26	4.28	0.00	2.05	2.61	3.77	0.05	1.52	2.73	2.47	0.05	0.95	1.09	1.65	2.41	5.84	1.85	2.01	4.37	0.00	0.00	0.02	1.10
N-acetil-D-glükózamin	8.91	4.63	7.89	3.01	8.41	4.64	5.75	5.99	7.39	9.43	5.51	4.36	6.46	5.23	4.88	8.44	7.38	5.03	5.34	8.58	1.95	2.46	3.66	7.26
γ-hidroxi-ivajsav	2.53	3.12	2.52	2.36	3.54	2.42	2.67	4.23	1.93	1.85	3.20	4.23	2.97	3.87	3.60	4.87	3.20	3.77	3.15	4.14	1.23	0.09	3.05	3.84
L-treonin	1.14	0.62	1.17	0.23	0.88	1.29	1.04	0.31	0.35	0.60	0.41	0.36	0.50	0.70	0.60	0.76	0.26	0.75	0.27	1.40	0.34	0.50	0.80	0.78
glikogén	5.22	2.94	6.43	0.19	6.83	5.73	5.37	0.24	2.11	1.74	2.05	0.21	5.29	3.66	0.68	0.31	4.71	1.62	4.46	0.29	1.28	1.22	0.62	0.28
D-glükózaminsav	4.81	3.12	2.81	1.97	3.22	2.29	3.25	3.51	2.48	1.89	2.33	3.33	3.57	2.69	3.31	3.91	4.00	3.47	3.51	4.25	3.09	1.78	3.11	3.83
itakonsav	1.97	3.89	4.96	1.91	4.92	4.31	4.54	4.23	3.88	1.95	2.09	5.75	3.44	2.05	3.25	6.46	3.92	5.53	4.51	8.07	2.70	0.67	3.26	5.39
glicil-L-glutaminsav	3.64	1.36	2.28	0.73	1.88	1.92	2.51	1.23	1.72	1.29	1.55	1.24	1.50	2.28	2.09	1.95	2.00	1.91	2.31	3.02	0.78	0.44	1.43	1.40
D-cellobióz	8.19	3.42	6.46	0.18	5.72	4.63	5.28	3.50	3.11	7.83	3.70	3.32	2.89	5.99	4.59	10.53	4.77	3.50	7.27	10.23	2.81	2.46	4.04	8.30
glükóz-β-foszfát	4.64	2.68	2.43	0.00	4.34	2.18	3.05	1.96	0.85	2.61	2.39	1.95	1.65	4.76	2.25	3.27	2.14	0.80	2.84	3.40	0.32	0.30	1.96	3.23
α-ketovajsav	0.50	0.51	0.35	1.08	0.03	0.29	0.30	0.02	0.22	0.09	0.04	0.06	0.63	0.40	0.24	0.72	0.05	0.00	0.37	0.27	0.10	0.00	0.06	0.04
fenil-etilamin	4.63	4.31	7.40	2.90	5.01	8.00	9.33	7.94	2.29	3.96	4.94	9.75	2.63	6.61	8.30	10.24	5.33	4.62	8.10	9.79	4.07	1.36	8.88	9.44
α-D-laktóz	6.07	4.35	7.31	0.20	4.42	2.86	3.36	2.88	2.48	4.26	3.87	2.50	2.75	4.05	3.93	6.67	3.00	3.20	4.81	6.23	1.65	0.63	4.08	6.06
D,L-α-glicerol-foszfát	2.05	0.75	0.86	0.73	1.01	1.42	1.47	0.94	1.15	1.25	0.85	0.57	0.96	0.93	0.82	1.19	1.15	1.04	0.88	0.77	0.96	0.82	0.95	1.17
D-almasav	4.71	6.18	5.56	2.99	4.13	7.54	7.04	8.63	3.86	3.50	5.99	6.79	4.17	5.40	6.13	8.35	6.32	4.81	6.29	8.32	4.49	1.75	6.17	8.33
putreszcin	4.53	4.25	4.77	4.95	5.57	4.69	5.50	5.17	4.39	4.20	4.76	4.97	5.37	4.93	4.93	5.83	5.07	4.67	4.96	5.86	3.83	3.20	4.16	5.45
Átlag (AWCD)	4.74	4.17	5.47	2.33	4.87	4.40	5.33	4.62	3.55	4.13	4.23	4.81	3.79	4.74	4.47	6.26	4.75	3.89	5.16	6.40	2.61	1.75	3.76	5.49



# AWCD értékek összehasonlítása



# Forrás

Biolog Inc. Bacterial Identification Microbial  
Identification Phenotype MicroArray

<http://www.biolog.com/>

Nagy Zsuzsanna (2009) Biodegradáció  
jellemzése integrált metodikával klórozott  
szénhidrogénekkal szennyezett talajban,  
Diplomamunka, Budapesti Műszaki és  
Gazdaságtudományi Egyetem