

---

# Kísérletek a talajban élő mycobacteriumok izolálására és tenyésztésére

Szelényi Ferenc – Berencsi György –  
Helmeczi Balázs

A Debreceni Agrártudományi Főiskola Talajtani Tanszéke és  
a Szegedi Orvostudományi Egyetem Közegészségtani Intézete

(Korabeli publikáció)

## ÖSSZEFOGLALÁS

A kutatási témával kapcsolatban eddig végzett igen nagyszámú több ezer vizsgálati adat alapján az alábbi következtetések vonhatók le:

1. Rendkívül hézagosak a talajban élő mycobacteriumokra vonatkozó ismereteink és a vizsgálati adatok.
2. Az eddigi hasonló talajtípusokból izolált és tiszta tenyészetben báziskultúráként használható 77 törzs közül 47 morfológiai vonatkozásban, alaktani tekintetben megtevesztően hasonlít a klinikai anyagokból kitenyésztett mycobacteriumokhoz.
3. A talajból izolált látszólag homogén kultúrák általában társfertőzöttek, aminek következtében az izolált törzsek morfológiai, biokémiai és más élettani sajátosságai kizárólag tisztítás utáni báziskultúrákon vizsgálhatók!
4. A mycobacteriumoknak a talajból való izolálására az eddigi kísérleti tapasztalatok szerint a legjobbnak  $H_2SO_4$ -gyel közömbösített 4%-os, 1%-os NaOH valamint 1% NaOH és 1%  $Na_3PO_4$  kezelés bizonyult, lemezöntés és felülöntés mellett agaros Gottsacker táptalajon, 29-37 °C mellett, 1:500 – 1:5000-es véghígítású talajsuszpenzió sorozattal.
5. Az izolált és szubkultúrába vett mycobacteriumoknak Ziehl-Neelsen szerinti festését vizsgálati eredményeink szerint a legjobban nem az eddig alulról használt gázlánggal történő, hanem a felülről infravörös égővel való hevítés szolgálja.  
Az eddig izolált 77 tisztított törzs biokémiai vizsgálatainak ismétlése most van folyamatban, úgy hogy ezekről a következő tudományos közleményben adunk számot.

## SUMMARY

On grounds of the several thousand tests performed in the field of this topic, the following conclusions may be arrived at:

1. The informations available and the experimental data on soil mycobacteria are very incomplete.
2. Of the 77 strains isolated from similar soil types so far, and adaptable for pure basic culture, 47 strains are confusingly similar, from morphological aspects, to the mycobacteria isolated from clinical material.
3. The apparently homogeneous cultures isolated from the soil are generally co-infected and, therefore, the morphological, biochemical, and other physiological characteristics of the isolated strains can be studied only on base cultures after purification.
4. For the isolation of the soil mycobacteria experiments qualified hitherto as most suitable processes the 4 or 1 per cent NaOH neutralized with  $H_2SO_4$ , and the 1 per cent NaOH or 1 per cent  $Na_3PO_4$  treatments, on Gottsacker agar medium with plate or top pouring, at a temperature of 29 to 37 °C, in a soil suspension sequence of 1:500 to 1:5000 final dilution.

5. The Ziehl-Nielsen staining of the isolated mycobacteria composed to sub-cultures is best performed by heating with an infra red radiator from above, instead of the gas flame used so far to heat from below.

The repetition of the biochemical test of the hitherto isolated 77 purified strains is under progress, and will be reported on in our next scientific publication.

A Debreceni Agrártudományi Főiskola 1965. évi tudományos kiadványában „A mycobacteriumok a természetben. Kutatási terv a talajok és trágyák mycobacteriumaira vonatkozóan” című dolgozatban a mycobacteriosissal kapcsolatos kísérleti kutatómunka elméleti és gyakorlati jelentőségéről, valamint az ezzel kapcsolatos feladatokról és tervekről számoltunk be (9).

Első feladatnak tekintettük a mycobacteriumoknak a talajból történő kitenyésztéséhez szükséges megfelelő táptalaj kiválasztását, továbbá a technológia többi módozatának összeállítását. Igen nagy számú tájékoztató próbálkozás alapján kiderült, hogy a mycobacteriumoknak a talajból való kitenyésztésére a folyékony táptalajok egyáltalában nem alkalmasak a beszennyeződés nagy mérve és a telepizolálást lehetővé tevő kolónia morfológia hiánya miatt. Ugyancsak kiderült, hogy a gyakorlatban alkalmazott klinikai-bakteriológiai TBC. diagnosztikai tenyésztési eljárások a talajban élő mycobacteriumok izolálására nem alkalmasak szintén a nagyfokú beszennyeződés és a különálló és morfológiailag jól meghatározható telepek kinyerésének rendkívül nehézkes volta miatt. További problémát jelentett még az a körülmény is, hogy a talajok rendkívül dús, nagyon vegyes és igen ellenálló mikroflórát tartalmaznak, amely tény a telepizolálásra hagyományos kémcsőben merevített ferde szilárd táptalaj viszonylag kis felületét bizonytalanná tette. Vizsgálataink folyamán kiderült, hogy a szabatos telepizolálást csak lényegesen nagyobb táptalajfelület biztosítja. Ezért vizsgálatainkat petri csészében merevített relatíve nagy tenyészfelületet nyújtó táptalajon végeztük.

1. Vizsgálataink folyamán kerestük tehát, hogy melyek azok a fenti módon készített szilárd specifikus táptalajok, amelyek 37 °C-on 4-5 heti tenyésztést lehetővé tesznek repedezés és zavart okozó kiszáradás nélkül.
  2. A talajmikrobiológiai vizsgálati gyakorlatban alkalmazott hígítósos, lemezöntéses izolálási alapelvek figyelembe vételével tisztázásra szorult
-

- az a kérdés, hogy milyen hőmérsékleten, milyen higítási fokozatokkal és milyen dekontaminálási eljárások alkalmazásával tenyészthetők ki legjobb hatásfokkal a mycobacteriumok a talajokból.
3. Tudva, hogy nemcsak izolálási, hanem továbbtenyésztési szempontból is a kitenyészett törzsek jellemző telepmorfológiai, valamint fényhatásra indukált pigmentképző tulajdonságainak vizsgálata szempontjából kizárólag szilárd táptalajok alkalmazhatók, annak a kérdésnek a tisztázása vált szükségessé, vajon milyen egységes szilárd „standard” táptalaj használata a legalkalmasabb a szubkultúrák számára, továbbá vajon a talajokból kitenyészett kultúrák hogyan mentesíthetők az esetleges társfertőzéstől.
  4. Az előző pontban említett egységes táptalaj megválasztásakor azt a követelményt kellett alapelveként figyelembe venni, hogy a táptalajban az ásványi alkotórészek mellett a minimumra korlátozzuk a változó összetételű kiegészítő organikus komponenseket. További igény volt, hogy a táptalaj kiállja a szükséges hőmérsékleten való tartást, esetleg hosszú időn át is, alkalmas legyen a telep morfológiai tulajdonságok szabatos kifejlődésére, ne zavarja a színanyag pontos megállapítását, végül pedig tegye lehetővé különböző biokémiai tulajdonságok elemzését (niacin-teszt, Bönicke-féle amidsor, nitrátredukció, INH vagy Pas rezisztencia, katalázaktivitás stb.).
  5. Az egységes „standard alaptáptalajon” végzendő és az előző pontban felsorolt morfológiai és biokémiai tulajdonságok vizsgálata szempontjából önmagától érthetően szükséges volt a társfertőzés mentes „bázisszubkultúrák” készítését lehetővé tevő elvek és módszerek kidolgozása is.

A vázolt kérdésekkel kapcsolt igen nagyszámú vizsgálaton nyugvó kutatómunka eddigi eredményei a következők:

1. Igen nagy számú sorozatban az alábbi táptalajokat vizsgáltuk: 7 H-10-0-A agar, Sauton-szérumagar, Lockmann-agar, glicerinagar, Sahuyn-agar, agarral merevített Berencsi- és Malatinszky-féle szenes táptalaj, tojássárgával készített Löwenstein-Jensen-féle táptalajváltozat, végül 333. számú ásványi oldat hozzáadásával készített Gottsacker-féle módosított tojássárga táptalaj (a továbbiakban: Gottsacker táptalaj) (1, 2, 3, 6, 7, 8).

A fent említett táptalajokkal folytatott vizsgálatok során mi is annak a megállapításához jutottunk, hogy a tojásfehérje nehezíti a mycobacteriumok fejlődését, a peptonnak (5) és általunk fehérjeforrásként egyes táptalaj kombinációkban használt amparonnak fékező hatása van. Kiderült, hogy az agartartalmú táptalajok készítésekor az agart kivétel nélkül bidesztillált vízzel kell tisztítani és 50-55 °C hőmérsékleten óvatosan kell szárítani.

Vizsgálataink egyértelműen és szabatosan azt mutatták, hogy célprogramunk számára a legjobb a Gottsacker-féle táptalaj. Ez a táptalaj petri-csészében

merevítve különböző hőmérsékleteken rendkívül időállónak bizonyult, még 4 hét elteltével sem repedezett, és kiváló lehetőséget nyújtott ahhoz, hogy a különböző telepeket izoláltan különválaszthassuk, morfológiailag meghatározzuk és levehessük.

A vázolt adatok alapján további vizsgálatainkat tehát kivétel nélkül a Gottsacker táptalajon végeztük, és pedig az alábbi módon:

2. A tenyésztés menetében talajhigítási sorozatokból indultunk ki. A talajnak a homogenizáló oldatban rázógéppel történt egyenletes szuszpenzióvá való alakítása után 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000 higítást állítottunk elő, és ebből neutralizálva, vagy anélkül 1 ml-t használtunk fel lemezöntés céljaira, vagy a petri-csészékben megszilárdított táptalaj felületére.

Vizsgálataink során az alábbi dekontaminánsokat használtuk:

1. 6%-os  $H_2SO_4$  20-25 perc ráhatás után NaOH-val közömbösítve.
2. 4% NaOH 20-25 perc ráhatás után  $H_2SO_4$ -gyel közömbösítve.
3. 13%  $Na_3PO_4$  20-24 óra ráhatás után  $H_2SO_4$ -gyel közömbösítve.
4. 1% NaOH + 1%  $Na_3PO_4$  20-24 órás ráhatás után  $H_2SO_4$ -gyel közömbösítve.
5. 1% NaOH 20-24 óra ráhatás után  $H_2SO_4$ -gyel közömbösítve.
6. 1% sterogenol (4) 20-24 óra ráhatás után közömbösítés nélkül.

A különböző táptalajokon a fent felsorolt dekontaminánsokkal 27 és 37 °C-on fenti higítások szerint beállított kísérletek eredményei azt mutatták, hogy a kénsav, a trisó a tenyészetekben a talajban élő gombák fejlődését segítik elő. Miután a sterogenollal igen ritkán sikerül mycobacteriumokat a talajokból kitenyészteni, annak ellenére, hogy a primokultúrák társfertőzéstől való tisztítására gyakorlatilag kivétel nélkül 1-2%-os sterogenollal használunk, addigi tapasztalataink szerint a legjobb dekontaminánsnak a 4%-os NaOH és az 1%-os NaOH + 1%-os  $Na_3PO_4$  bizonyult  $H_2SO_4$ -gyel való közömbösítés mellett.

Fentiek szerint a mycobacteriumoknak a talajból való kitenyészéséhez 4%-os és 1%-os NaOH-t, továbbá 1% NaOH + 1%  $Na_3PO_4$ -et használunk közömbösítés mellett és az 1:500, 1:1000, 1:2500 és 1:5000-es végkoncentrációjú talajszuszpenziókból 1-1 ml-t használunk lemezöntésre, illetve adunk a táptalaj felszínére.

3. A standard táptalaj kérdésével kapcsolatos ismertett vizsgálati eredmények alapján tértünk tehát rá egységesen a Gottsacker használatára. A talajból való izolálás céljaira egy lemezöntésre alkalmas Gottsacker agaros táptalajt dolgoztunk ki. A primokultúrákat s azok továbboltását agar nélküli Gottsacker táptalajon végezzük. Azok a kísérleti megfigyelések, miszerint látszólag telepmorfológiai vonatkozásban homogén telepek festés során társfertőzést mutattak s ezzel kapcsolatban igen gyakran azotobacterek voltak kimutathatók

indokolták, hogy a Gottsacker agaron kitenyészett primkultúrákat agarmentes Gottsacker táptalajra való továbboltás előtt 1-2%-os sterogenollal tisztítottuk. Az azotobacterekkel való társfertőzés csökkentése érdekében az agaros Gottsacker táptalajhoz 0,5 gamma/ml tetránt adagoltunk a petri-csészébe merevítés előtt. A tetrános agaros Gottsacker táptalajon kitenyészett mycobacteriumoknak sterogenollal történő további tisztítása révén sikerült eddig 77 törzset tiszta tenyészetbe előállítani. Ezek közül 47 törzs szintelen, nonchromogen, amely mind telepmorfológiai, mind Zichl-Neelsen festés után a klinikai anyagból származó patogén mycobacteriumokhoz hasonlítható. A többi törzs különböző színárnyalatú skotochromogen jellegű, mikroszkóposan polimorf.

A primkultúrák izolálása és azoknak szükség szerint a szubkultúrákban sterogenollal történő többszöri tisztítása és Gottsacker táptalajra való átoltása után a tenyészetek egy részét sötétben, a párhuzamos sorozatokat pedig 5-5 naponkénti megvilágítás mellett tenyésztettük. A színanyag képződése érdekében a párhuzamos sorozatokban a kémcsövek gumidugója és fala közé steril sebészeti selymet helyeztünk el. Így bizonyos mértékű légsere lehetősége is adott volt.

A mycobacteriumoknak a talajokból való kitenyésztesére az alábbi agaros Gottsacker táptalajt használjuk:

I. 250 ml vízhez

|   |        |
|---|--------|
| 1. Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 12 H <sub>2</sub> O   | 1,0 g  |
| 2. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 1,5 g  |
| 3. MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O   | 0,3 g  |
| 4. Nátriumcitrát  | 1,5 g  |
| 5. L-asparagin  | 1,5 g  |
| 6. NH <sub>4</sub> Cl   | 2,5 g  |
| 7. 1% Fe-ammonsulfát oldat<br>[Fe(NH <sub>4</sub> )(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> × 12 H <sub>2</sub> O] | 0,5 ml |
| 8. Glicerín   | 7,5 ml |

II. 250 ml tojássárga.

III. 500 ml-hez 15 g deszt. vízzel tisztított agar.

A csírántlanított 250 ml I. számú és a 250 ml II. számú tojássárga táptalaj összekeverése után a keveréket 30-45 percig 55 °C-on tartjuk. Ezt követően az I+II. keverékhez hozzáadjuk a 60-55 °C-ra hűtött szűrt, steril 500 ml-es agaroldatot s az I+II+III-hoz 7,5 ml 2%-os malachitzöld oldatot adunk.

Táptalaj összesen: 1000 ml

A további tisztítás stb. vizsgálatokhoz szükséges Gottsacker standard táptalaj a következő:

I. 500 ml vízhez

|   |       |
|---|-------|
| 1. Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 12 H <sub>2</sub> O | 1,0 g |
| 2. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                        | 1,5 g |
| 3. MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O                 | 0,3 g |
| 4. Nátriumcitrát  | 1,5 g |
| 5. L-asparagin  | 1,5 g |
| 6. NH <sub>4</sub> Cl                                     | 2,5 g |

|   |        |
|---|--------|
| 7. 1% Fe-ammonsulfát oldat<br>[Fe(NH <sub>4</sub> )(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> × 12 H <sub>2</sub> O] oldat | 0,5 ml |
| 8. Glicerín   | 7,5 ml |

II. 500 ml tojássárga

I + II-höz összesen 7,5 ml 2%-os malachitzöld oldat.

Táptalaj összesen 1000 ml

A táptalajt áramló gőzben 83 °C-on koaguláljuk 30-45 percig.

4. A sterogenollal történt többszöri dekontaminálás és átoltás után nyert tiszta tenyészetek további vizsgálatához szükséges 4 hetes báziskultúrákat 22, 29, 37, 45 °C-on párhuzamosan vizsgáltuk Gottsacker táptalajon sötétben és megvilágítással a szükséges légsere feltételeinek biztosítása mellett, a törzsek hőmérséklet igényének és színanyag képződésének vizsgálata céljából.

5. Az előző pontban foglalt társfertőzésmentes 4 hetes báziskultúrák biokémiai vizsgálatait a következő táptalajokon végeztük 37 °C hőmérséklet mellett:

- Gottsacker standard táptalaj
- Gottsacker standard táptalaj + 100 gamma/ml PAS
- Gottsacker standard táptalaj + 10 gamma/ml INH
- Malachitzöld és NH<sub>4</sub>Cl mentes 0,5% NaNO<sub>3</sub>-N tartalmú Gottsacker táptalaj
- Gottsacker bázis táptalaj + 2% Ferri-ammonium citráttal
- Gottsacker bázis táptalaj glicerín és L-asparagin nélkül, 0,75% glükóz mellett.

Az 1 és 4-es táptalajon fejlődött kultúrákon vizsgáljuk a NIACIN-tesztet, Bönicke sorát, nitrátredukcióját, valamint kataláz aktivitását.

A fenti vizsgálati eredmények arra utalnak, hogy a talajokból számos olyan mycobacterium izolálható, illetve tenyészhető ki, amelyek sav-alkoholállóság, tehát festődőképesség és telepmorfológiai vonatkozásban megtévesztően hasonlítanak azokhoz a klinikai tenyészetekhez, amelyeket fertőző betegek váladékának vizsgálata során nyertek.

Az eddigi vizsgálatok lényegében a főiskola gazdaságának kertészeti és szántóföldi hasznosítása alatt álló csernozjom típusú talajokból izolált chromogén és achromogén mycobacterium törzsekre vonatkoznak.

Miután a fent vázolt kísérletek során számtalan telep vizsgálatára került sor, a festődőképesség szempontjából mi a klasszikus Ziehl-Neelsen festési eljárásnál használt gázlángos, alulról történő melegítést igen eredményesen infravörös égők használatával helyettesítettük. Ezzel kapcsolatban a keneteket infravörös égővel felülről hevítettük, ami lehetővé teszi sorozatvizsgálatoknál a festésnek kihúzó fülkében való elvégzését a fenológzők káros elhárítása érdekében.

---

### *IRODALOM*

- Attz, N.-Hettche, H. O. (1935): Nährböden und Farben in der Bakteriologie. Berlin
- Berencsi, G.-Malatinszky, St. (1957): Über die Wirkung der aktiven Kohle auf die Entwicklung der Kultur des Mykobakterium tuberculosis. Zbl. Bakter. I. Orig. 171. 63-70.
- Berencsi, Gy.-Malatinszky, I.: Személyes közlés
- Berencsi, G.-Hideg, K.-Vecsey, Z. (1960): Über die technische Verwendung des Cetyl-pyridiniumbromid zur Homogenisierung in der bakteriologischen Diagnose der Tuberkulose. Zbl. Bakter. I. Orig. 178. 332-336.
- Berencsi, G.-Malatinszky, St. (1966): Über die toxische Wirkung der Peptonlösungen auf das Mykobakterium tuberculosis. Zbl. Bakter. I. Orig. 201. 413-416.
- Handbook of Tuberculosis Laboratory Methods (1962): Veterans Administration. Washington. U.S.A.
- Krebs, A. (1964): Leitfaden für bakteriologische Untersuchungen bei Tuberkulose. Jena
- Marks, J.-Path, F. C. (1965): Culture Media for Mycobacteria. Laboratory Practice. Vol. 14. No. 6.
- Szelényi, F.-Berencsi, Gy.-Helmecci, B. (1965): A mycobacterium a természetben. Kutatási terv a talajok és trágyák mycobacteriumaira vonatkozóan. Debreceni Agrártudományi Főiskola Közleményei