

SZAKMAI ZÁRÓJELENTÉS

Témavezető: Dr. Anton Attila

Témacím: Szennyezett talajok mikrobiológiai jellemzése és monitorozása foszfolipid-zsírsavak analízisével

Nyilvántartási sz.: T-038280

Futamidő: 2002.02.1. - 2006.12.31.

A témapályázat megvalósítása során elért eredményeinket az alábbiakban altémák szerint ismertetjük. ~~ának első évében az alábbi eredményeket értük el.~~

A Magyar Tudományos Akadémia Talajtani és Agrokémiai Kutatóintézetében kialakítottunk egy korszerű szerves kémiai analitikai laboratóriumot, melyhez a rotációs bepárló készüléket és a vegyszer-és üvegáru egy részét e kutatási szerződés keretében szereztük be. OTKA műszerpályázat (2002. évi M 041669 ny. sz.) keretében GC-MS készülék vásárlására nyílt lehetőségünk, mellyel a korábbi intézeti GC-FID mérések helyett 2003-tól magasabb színvonalú, nagyobb kvalitatív biztonságú mintaelemzéseket végezhetünk. A készülék laborhelyének (áram-, gázellátás, gázelvezetés) kialakítása és a készülék beüzemelése után az MS nyújtotta kibővült lehetőségeknek megfelelően a foszfolipid-zsírsavanalízis preparálási menetét pontosabb meghatározást lehetővé tévő lépésekkel (pl. derivatizálásos funkcióscsoportjelölés) bővítettük. A Gazdasági Versenyképesség Operatív Programja keretében pályáztunk GC-MS készülékünk bővítésére. Az elnyert projekt (GVOP-3.2.1.-2004-04-0203/3.0) lehetőséget adott a következő fejlesztésekre:

- Vegyifülke beszerzése a preparálás helyben történő elvégzésének biztosítására.
- Kémiai ionizáció analitikai módszerfejlesztésre, bizonyos esetekben rutin vizsgálatok érzékenység-növelésére.
- Gőztér-mintavevő illékony (forráspont<300°C) komponensek talajból történő közvetlen analízisére.

A felsorolt fejlesztések révén befejeződött az Intézet szerves analitikai laborjának kiépülése.

Befejeztük a foszfolipidzsírsav-analízis nemzetközi szakirodalmának áttekintését, és eddigi tapasztalatainkra is támaszkodva a metodika hazai megismertetése céljából két magyar nyelvű szemlecikket írtunk (1-2. publikáció).

A foszfolipidzsírsav-analízis (PLFA) metodikáját sok módszertani akadály után sikeresen adaptáltuk. Első lépésben a legrövidebb preparálási menetet alkalmaztuk, melyet kipróbáltunk baktérium-izolátumok karakterizációjára és csoportosítására. A preparálás hatékonysága gyakorlatilag 100%-os volt, a törzsek csoportosítását repetitív PCR technikával ellenőrizve genus szint felett megfelelő taxonómiai feloldásúnak találtuk. Nagyobb felbontású (faji ill. ökotípus szintű) csoportosításhoz a repetitív (box-) PCR technika jó kiegészítőül kínálkozik, bár

itt a preparálási hatékonyság csak 60-70%-os (3. publikáció). [Azóta több intézeti kutatásban alkalmaztuk a módszert.](#)

A hosszabb preparálási metodika már nemcsak tiszta tenyészetek, hanem mikróba-közösségek (környezeti minták) vizsgálatára is alkalmas. A módszer validálása (kinyerési hatékonyság, kalibrálás, pontosság vizsgálata) és a gázkromatográfiás elválasztás finomítása lehetővé tette, hogy egy német kutatóintézetben más készülékre kifejlesztett zsírsav-adatbázist sikeresen illesszünk, felhasználhatóvá tegyünk. A metodikát magyar nyelvű szemleciikkben, az Intézet honlapján (www.taki.iif.hu/talajbio/modszerek.htm), illetve gázkromatográfiás fórumon (4. publikáció) is ismertettük.

A magas nitrát- és foszfát-tartalmú szennyvíztisztító-kifolyóvízzel, valamint a talajvizen keresztül szennyezett láptalajok kiemelkedően nagy mikrobiális aktivitással és biomasszával rendelkeznek. A láptőzegtől a növényi gyökerek jól elkülöníthetők. Ezek miatt a Csepel-szigeti láptalajok jó modellrendszerül kínálkoztak, és elsőként e területekről származó talaj- és gyökérmintákat preparáltunk és analizáltunk. Kimutattuk, hogy a magas növényi-tápanyagtartalommal terhelt vizek tisztulásában hatékonyan működő lápi talajokban a mikrobiális biomassza – és így valószínűsíthetően az öntisztulási funkció is – jelentős mértékben a növényi gyökerekhez, a rhizoszférához köthető. A láptalajból illetve a rhizoszférából sikerült kimutatni az öntisztulásban fontos szerepet játszó metanotróf illetve szulfátredukáló szervezeteket, felbecsültük az aerobok és anaerobok arányát. A módszer-együtttest elsőként alkalmaztuk a teljes rhizoszféra (exo- és endorhizoszféra, rhizoplán) vizsgálatára, a tapasztalatok alapján felmértük az alkalmazás lehetőségeit és korlátait. Kiindulási alapként szolgáló eredményeinket nemzetközi konferencián és szakfolyóiratban (5-6. publikáció) is ismertettük.

A Cseh Akadémia Talajbiológiai Intézetével közösen vizsgáltuk Észak-Csehország egy külszíni szénbányájának frissen, illetve 10, 20 és 42 éve rekultivált területeit. Az egyes területek talajainak felszíni (0-5 cm) középső (10-15 cm) rétegeiből vettünk talajmintákat, és az azokból kitenyészthető talaj-baktériumok diverzitását vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy a kitenyészthető baktériumok fajszáma a rekultiváció és a szukcesszió előrehaladtával csökken, melynek oka a talaj tápanyag-limitáltsága következtében a talajbióta visszaszorulása, és az erősen limitált állapotban való stabilizálódása lehet (7. publikáció). A törzsek karakterizációja részben celluláris zsírsav-összetételük alapján történt, GC-FID, GC-MS analízisekkel. A baktériumtörzsek karakterizációjakor kapott zsírsav-spektrumok a későbbi, közvetlenül talajból történő foszfolipidzsírsav-analízis eredményeinek értelmezéséhez szolgáltatnak értékes háttér-információt (ez utóbbi munkát a cseh partnerintézmény végezte).

A foszfolipidzsírsav-analízis metodika alkalmasságának vizsgálatát, alkalmazását különböző, potenciális remediációs és környezet-technológiai kezelések hatásának vizsgálatával folytattuk. Alkalmaztuk a talajok szennyezőanyag-tartalmának, a mikrobióta közösségi szerkezetében és biomasszájában beállt változásoknak felmérésére, értelmezésére, a bioremediációs kezelés mechanizmusának modellezésére.

A 2004. évi előkísérletek tapasztalatait felhasználva multifaktoriális ortogonális kísérleti terv alapján laboratóriumi modellkísérletet állítottunk be a gyöngyösvisontai lignitnek, mint kémiai stabilizáló anyagnak a vizsgálatára. Nehézfémekkel szennyezett talajok esetén a többi környezeti elem elérési kockázatának és a tápláléklánc terhelésének csökkentésére sokszor az egyetlen megvalósítható út a nehézfémek nehezen felvehető, kötött formában való *stabilizációja*, a talajoldatba kerülésük veszélyének csökkentése (*immobilizáció*). Az egyes kémiai *stabilizálószer*ek (foszfáttartalmú ércek, oldható foszfátsók, pernye, lignit, alginit, mészhidrát, ivóvíztisztítási vas-mangán-hidroxid-csapadék, vörösiszap stb.) különbözhetnek egymástól hatásmechanizmusukban, hatékonyságukban és a talaj egyéb tulajdonságaira, köztük a talajéletre gyakorolt hatásukban is. A lignit a biomassza bomlása során, redukzív körülmények között kialakuló, 65-70% szenet tartalmazó szervesanyag. Szén és humusztartalmából eredően elsősorban szorpcióval vagy komplexképződéssel történő immobilizálásra képes. Már évtizedekkel ezelőtt történtek agrokémiai vizsgálatok a bányászott lignit tisztításakor kapott alacsony kalóriatartalmú frakció talajjavításra való felhasználását célozva. A gyöngyösvisontai lignitnek, mint kémiai stabilizálószernek nehézfém-megkötő képességéről viszonylag kevés adat áll rendelkezésre.

A laboratóriumi modellkísérlet célkitűzései között szerepelt olyan, a talaj mikrobiális életét jellemző mutatók keresése, melyek érzékeny indikátorokként alkalmasak a szennyező nehézfémek hatásának, valamint a mobilitásviszonyaikban történt változásoknak a kimutatására. A kísérlet tervezése és eredményeinek értékelése a *DISITOB*I modell alapján történt. E modellrendszer alapja az a megfigyelés, hogy több hatás esetén a legtöbb modellezett agrokémiai és talajbiológiai jelenség lineáris-, párkölcsön-, kvadratikus hatások által meghatározottnak bizonyult. A modell szerint a vizsgált függő változó (mért talajkémiai, talajbiológiai jellemző) viselkedése a kísérletben beállított faktoroktól függ, esetünkben a három nehézfém és a lignit koncentrációjától. A komplex talaj-inkubációs kísérleti rendszerben lehetőség nyílt az országban pontszerű és diffúz szennyeződésként jellemzően előforduló, széles koncentráció-tartományban alkalmazott három nehézfém (króm, cink, ólom) megkötődésének vizsgálatára az ugyancsak változóan adagolt ligniten.

A kísérletben a vizsgált tényezők a következők voltak:

1. Három, szennyezésekben gyakori nehézfém (só formában: $ZnSO_4 \cdot 6H_2O$, $Pb(NO_3)_2$, $Cr(NO_3)_3$)
2. Stabilizálószer (lignit)
3. Inkubációs idő

A többváltozós modellrendszer lehetővé teszi az előbbi változók lineáris, kvadratikus és párkölcsönhatásainak vizsgálatát a kezelt modell-talaj (savanyú homok) királyvíz-, víz-, acetátpufferes és Lakanen-Erviö oldható nehézfém-tartalmára. Vizsgáltuk továbbá a három nehézfém és a lignites kémiai stabilizáció talajbiológiai, talajbiokémiai sajátosságokra (FDA, DHA, szacharáz-aktivitás, mikrobiális biomassza meghatározása fumigációs és PLFA analízissel) gyakorolt hatását is ugyanezen kísérleti rendszerben.

A nehézfém-szennyezések és a lignites kémiai stabilizáció talajkémiai és talajbiológiai hatásai több esetben a *DISITOB*I-moddellel leírhatónak bizonyultak. A lignit leginkább a króm megkötődését növelte, az ólom esetében csak a vizes kivonatban volt igazolható a mobilitáscsökkenés, míg a cinkre nem gyakorolt szignifikáns stabilizáló hatást. A lignit hatása a króm esetében három kivonatban (köztük a növényi gyökerek felvételét legjobban modellező

Lakanen-Erviö kivonatban) lineáris és króm-lignit párkölcsönhatásban is szignifikáns volt. A króm hatott az ólom és a cink kivonhatóságára is. A lignit stabilizáló-képességét a talaj kémhatása erősen befolyásolta, különösen a króm esetében.

A talaj-mikrobióta állapotát indikációs módszerekkel: kloroform-fumigációs extrakcióval, a mikrobióta foszfolipid-zsírsavainak, észteráz-, dehidrogenáz- és szacharáz-enzimaktivitásainak analízisével követtük. A nehézfémek mobilis frakciói által a mikrobiális közösségek méretében és anyagcsere-intenzitásában okozott változások csökkenő sorrendben alkalmas mutatóknak bizonyultak: a talaj foszfolipid-zsírsav-összetétele és szacharáz-enzimaktivitása; a mikrobiális biomassza nagyságát és általános anyagcsere-aktivitását mutató fumigációs és észteráz-aktivitási (FDA) értékek.

A foszfolipid-zsírsav-spektrumok 48 változóra elvégzett statisztikai elemzése nyomán 11 zsírsavat és 4 zsírsav-csoportot találtunk, melyek specifikus illetve általános módon jó indikátorai az egyes nehézfémek talajszennyező hatásának. A kezelésekkel elsősorban az elágazó láncú zsírsavak mutattak a modell szerinti összefüggést: esetükben különösen erősen mutatkozott a króm toxikus hatása. E zsírsavak a Gram-pozitívokra, ezen belül a nehézfém-érzékenyként ismert Actinobacteria (sugárgombák) csoportra jellemzőek. E mikrobák jellemzően a nehezen hozzáférhető, összetett bontó enzimek-szintet igénylő makromolekulákat hasznosítva jutnak szén-és energiaforráshoz. Ennek megfelelően a lignit négyzetes összefüggésben növelte mennyiségüket. Az elágazó láncúaknál, valamint a 16:1 c9 zsírsav esetében jól látszik a lignitnek a króm toxicitását csökkentő hatása: utóbbi esetben emellett, hogy a lignit önmagában (nehézfémek hozzáadása nélkül) gátló hatásúnak mutatkozott. Egyes páratlan szénatomszámú, normál láncú zsírsavak az elágazóakkal fordított hatásgörbe-mintázatot mutattak (pl. 17:0): ennek oka az elágazó láncú zsírsavakkal képviselt Gram-pozitívok visszaszorulása következtében csökkenő versengés lehet. A lignit talajéletre gyakorolt összehatásában több esetben jelentős volt a lignit-króm párkölcsönhatás. Megfigyelhetők voltak fém-fém kombinált hatások is. A foszfolipid-zsírsav-analízis eredményei alapján a lignit jelenlétében a nehézfémek nem csak nehezebben felvehetőek a növények számára, de a talajéletre gyakorolt toxikus hatásuk is kisebb (8. publikáció).

A 2003-2006 közötti időszakra elnyert T 042930. Sz. OTKA szerződés *“Felhagyott alföldi homoktalajok mikrobiális közösség összetételének, biomaszájának és aktivitásának vizsgálata”* keretében folytatunk szabadföldi kísérleteket a Kiskunsági Nemzeti Park fülöpházi homokpuszta területén. Az 1998-ban elkezdett munka célja a nitrogén mikrobiális immobilizációjának fokozása, és ezen keresztül a növényzet szekunder szukcessziójának a gyorsítása, és ezáltal a gyomnövényzet visszaszorítása volt. A kísérlet kezeléseiben a talajok kémiai és mikrobiológiai tulajdonságait vizsgáltuk. A kísérletekben partner az MTA Ökológiai Kutatóintézete. Eredményeink szerint a legnagyobb szénforrás-hozzáadást kapott réti terület esetében csökkent a felvehető nitrogén-formák mennyisége a legnagyobb mértékben. Mindhárom területen kimutattuk a mikrobiális biomassza növekedését. A talajbióta szerkezetében kimutattunk a kezelésekre hatására beállt változásokat. A szárazabb buckaközi és buckatetői területeken növekedett a Gram-pozitív baktériumokra jellemző zsírsavak aránya. A nedvesebb réti területen az eukariotákra jellemző 23:0 valamint a 24:0 zsírsavak mennyisége jelentős mértékben növekedett, a Gram-pozitív baktériumok biomarkerei, az elágazó láncú zsírsavak (iso, anteiso) mennyisége viszont csökkent (9. publikáció)

A „Dolomitnövényzet stabilitása és regenerálódása” T037732 sz. OTKA szerződéshez kapcsolódóan vizsgáltuk a feketefenyves-telepítés talajtani, talajbiológiai hatásait, ahol a feltételezett, erdészeti szempontú talajjavító hatást nem lehetett kimutatni (10-12. publikációk).

NKFP és Környezetvédelmi Minisztériumi projektek keretében felmértük a hazai talajok peszticid-szennyezettségét, ahol kimutattuk, hogy a magyarországi talajok, talajvizek leggyakoribb perzisztens szerves szennyezője az atrazin (13. publikáció). Ezt figyelembe véve terveztük e pályázat keretében az atrazin talajbiológiai hatásainak vizsgálatát, de erre a pályázati forrás csökkentése miatt nem volt módunk.

~~1. OTKA műszerpályázat (2002. évi M-041669 ny. sz.) keretében gázkro~~

Egyéb megjegyzések:

A metodika nemzetközi fejlődésének követését célozva részt vettünk két, európai kutatói hálózat létrehozását és a mobilitást lehetővé tevő pályázatban, melyek sikertelenek voltak.

Kérjük, hogy a jelentésben foglaltak alapján születendő minősítést az OTKA kiegészítő eljárásban később módosítsa, figyelembe véve a következő években várható közleményeket. ~~A metodika hazai megismertetése céljából két magyar nyelvű szemleciikket írtunk, melyeket az Agrokémia és Talajtan c. folyóirat 2006. évi közlésre elfogadott. (1. 2. publikáció)~~

Publikációk:

- Halbritter A., Uzinger N.: A talaj-mikrobióta vizsgálata foszfolipidek alapján (1): Szükségesség és alkalmazási lehetőségek. Agrokémia és Talajtan, 54.(2006):517-534.
- Uzinger N., Halbritter A.: A talaj-mikrobióta vizsgálata foszfolipidek alapján (2):A foszfolipidek kémiai analízise. Agrokémia és Talajtan, 55.(2006) 531-538.
- Mogyoróssy T., Halbritter A., Kovács G.: Lápi növények rhizoszférájából izolált, nitrogénkötő és oligonitrofil baktériumtörzsek azonosítása zsírsavspektrum, box-PCR-mintázat és 16S rDNS szekvencia alapján. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2002.évi nagygyűlése, Balatonfüred
- Halbritter A. Zsírsavak és illóolajok (HS-)GC-MS vizsgálatának néhány talajbiológiai alkalmazása. Előadás a PerkinElmer gázkromatográfiás szemináriumon, 2007. február 7. Budapest
- Halbritter A., Mogyoróssy T.: Rhizosphere effect in a Peat Soil demonstrated via Phospholipid Fatty Acid (PLFA) Indication. Proc. COST Action 831, Biotechnology of Soil: Monitoring, Conservation and Remediation Workshop „Managing Soil Quality - Using Microbial Resources” (ed. Szili-Kovács T) MTA TAKI, Budapest 2003 pp. 87-91.
- Halbritter A., Mogyoróssy T.: Phospholipid fatty acid (PLFA) analysis of rhizosphere bacterial communities in a peat soil. Agrokémia és Talajtan, 51.(2002):123-128.
- Chroňáková, A, Elhottová, D, Halbritter A, Křišťůfek V, Biró B.: Analyses (box-PCR, FAME) of heterotrophic bacterial communities from different stages of primary succession process. 23rd Congress of Czechoslovak Society for Microbiology, Brno 2004
- Anton A.; Uzinger N.; Szili-Kovács T.; Halbritter A.: Kémiai nehézfém-stabilizációs eljárás hatásainak vizsgálata laboratóriumi modellkísérletben. Talajvédelem, 2007. évi közlésre elfogadva.

9. Uzinger Nikolett, Szili-Kovács Tibor, Anton Attila, Török Katalin (2004) Homokpusztagyeppek természetvédelmi restaurációjának értékelése PLFA analízissel. Előadás, Magyar Tudományos Akadémia Szabolcs-Szatmár Bereg megyei Tudományos Testületének és a Magyar Professzorok Világtanácsának 13. Tudományos Ülése, Nyíregyháza, 2004 október 2.
10. [Halbritter A., Csontos P., Tamás J., Anton A.: Dolomitsziklagyeppek és feketefenyvesek talajainak összehasonlító vizsgálata. Természetvédelmi Közlemények, 10.\(2002\): 19-35.](#)
11. [Halbritter A., Csontos P., Tamás J., Anton A.: Van-e a feketefenyves-telepítésnek hatása a dolomit-váztalajok minőségére? pp. 250-258. In: Talajtani Vándorgyűlés, Kecskemét \(a Talajvédelem különszáma, 2005\) \(Ed. Antal K., Michéli E., Szabóné Kele G.\) Talajvédelmi Alapítvány, Budapest](#)
12. Halbritter A., Tamás J., Anton A., Uzinger N.: Mikroelemtartalom-vizsgálatok dolomitsziklagyep és feketefenyves talaján. Tájökológiai Lapok 3(1) (2005): 63-73.
13. Oldal B., Maloschik E., Uzinger N., Anton A., Székács A.: Pesticide residues in Hungarian soils. Geoderma 135. (2006): 163–178.