

OTKA K-75790

**A közösségi anyagcsere vizsgálata anaerob
deklorináció során**

Kutatási zárójelentés

2013. április 30.

ELTE Mikrobiológiai Tanszék

Budapest

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék	2
2. Rövidítések jegyzéke	3
3. A pályázat rövid összefoglalója	4
4. Az első munkaszakasz (2008. október 1. – 2009. szeptember 30.) eredményei	4
5. A második munkaszakasz (2009. október 1. – 2010. szeptember 30.) eredményei ..	4
6. A harmadik munkaszakasz (2010. október 1. – 2011. szeptember 30.) eredményei	7
7. A negyedik munkaszakasz (2011. október 1. – 2013. április 30.) eredményei	10
6.1 Kétfázisú mikrokozmoszok kémiai eredményei.....	10
6.2 Háromfázisú mikrokozmoszok kémiai eredményei.....	11
6.3 Új mikrokozmosz kísérletek kémiai eredményei.....	11
6.4 Kétfázisú mikrokozmoszok biológiai eredményei.....	13
6.5 Háromfázisú és az új mikrokozmoszok biológiai eredményei.....	18
8. Összefoglalás	21
9. Mellékletek	23

2. Rövidítések jegyzéke

BES	brómetán szulfonát
c-DCE	<i>cisz</i> -diklóretén
DHC	<i>Dehalococcoides ethenogenes</i>
DD	<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>
DR	<i>Dehalobacter restrictus</i>
DC	<i>Desulfuromonas chloroethenica</i>
DT	<i>Desulfomonile tiedjei</i>
FISH	fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció - módszer
TIC	total inorganic carbon – összes szervetlen szén
MDA	multiple displacement amplification - módszer
PAST	Paleontological Statistics Software Package - program
PCE	perklóretén
SEM	scanning electron microscope – pásztázó elektron mikroszkóp
SNuPE	single-nucleotide primer extension - módszer
TC	total carbon – összes szén
TCE	triklóretén
TOC	total organic carbon – összes szerves szén
T-REX	T-RFLP Analysis Expedited - program
T-RFLP	terminális restrikciós fragmenshossz polimorfizmus - módszer
VC	vinil-klorid
VOC	volatilis organic compound – illékony szerves anyagok

3. A pályázat rövid összefoglalója

A rövidszénláncú alifás klórozott szénhidrogének gyakori talajvízszennyezők Magyarországon. A perklóretén (PCE) és a triklóretén (TCE) biológiai bontása hatékony folyamat, de nagy sebességbeli különbségek adódhatnak a különböző szennyezett területeken.

A közvetlen anaerob reduktív deklorináció során a klórozott vegyületek elektron akceptorként szolgálnak, elektron donorként a hidrogén, vagy kis molekulatömegű szerves vegyületek szerepelnek. Ahhoz, hogy a folyamat végbemenjen, a deklorináló baktériumoknak sikeresen felül kell kerekedniük más, kompetitor mikrobákon, amelyek szintén hidrogént és más egyszerű szerves vegyületeket hasznosítanak.

A különböző szennyezett területekről származó mikrobaközösségek szerkezetét és tagjainak szerepét jól körülhatárolt laboratóriumi körülmények között (ökoszisztéma szelekciós kísérletek) vizsgáltuk, polifázikus módszerekkel, új, molekuláris biológiai technikák bevezetésével.

Célunk volt, a sikeres deklorináló közösség összetételének vizsgálata, a tagok szerepének meghatározása, a deklorináló baktériumok és a deklorináció folyamatában közvetett módon részt vevő szervezetek között kialakuló anyagcsere-kapcsolatok megértése. Szándékunkban állt nyomon követni a különböző elektron donorok és akceptorok hatására bekövetkező változásokat a deklorináló közösség szerkezetében és aktivitásában.

4. Az első munkaszakasz (2008. október 1. – 2009. szeptember 30.) eredményei

Öt eltérő fizikai-kémiai és geológiai paraméterekkel jellemezhető, klórozott szénhidrogének által szennyezett magyarországi területet vizsgáltunk. A kémiai elemzéssel a vízkémiai paramétereket és a halogénezett szénhidrogén koncentrációkat határoztuk meg, míg a biológiai vizsgálatokban mikrobiális közösségi elemzést végeztünk molekuláris ujjlenyomat módszerrel (T-RFLP: *terminális restrikciós fragmenshossz polimorfizmus*). Mind a kémiai, mind a biológiai paraméterek nagy változatosságot mutattak az egyes területek között. A kapott eredményekből adatbázist hoztunk létre.

Két kiválasztott minta (egy nagy szennyezettségű, kis szulfát koncentrációjú: J18/2 és egy kisebb szennyezettségű, nagy szulfát koncentrációjú minta: K/7) esetében részletes diverzitás vizsgálatokat végeztünk; a T-RFLP csúcsokat klónokkal azonosítottuk be. A J18/2 minta esetében egy *Acidovorax* sp. szervezet, míg a K/7 mintánál egy *Desulfuromonas* sp. (*Cytophaga*-rokon mikroba) volt a közösség-meghatározó eleme.

Két új molekuláris módszert optimaltunk sikeresen az első munkaszakasz során. Az elsőt teljes genom elemzés során szokták alkalmazni (MDA: *multiple displacement amplification*), míg a másodikat specifikus nukleinsav szakaszok gyors, egyszerű kimutatására dolgozták ki (SNuPE: *single-nucleotide primer extension*). Az MDA módszerrel ki tudtunk mutatni olyan dehalospirációra képes taxonokat (*Dehalococcoides* sp., *Dehalobacter restrictus* és *Sulfurospirillum halorespirans*), amelyek az előzetesen alkalmazott, „hagyományos” molekuláris módszerekkel nem voltak detektálhatóak. A SNuPE módszerrel a reduktív dehalogenáz (a reduktív deklorináció kulcsenzime) szekvencia variánsait detektálhattuk, gyorsan és nagy specifitással különböző szennyezett mintáinkban.

5. A második munkaszakasz (2009. október 1. – 2010. szeptember 30.) eredményei

Mesterséges ökoszisztéma szelekciós kísérleteket végeztünk az előzőleg részletes vizsgálatokhoz kiválasztott (J18/2) talajvízminta alkalmazásával. 42 db 120 ml térfogatú mikrokozmoszt állítottunk össze különböző elektron donorok alkalmazásával (*Donor-1 kísérlet-sorozat*: acetát [Ac], laktát [L], propionát [P], melasz [M], tejsavó [S] és olajemulzió [O]). Összehasonlításuképpen biotikus (donort nem tartalmazó [Bio]) és abiotikus (sem mikrobát, sem donort nem tartalmazó [AB]) kontrollokat is létrehoztunk. A szelekciós

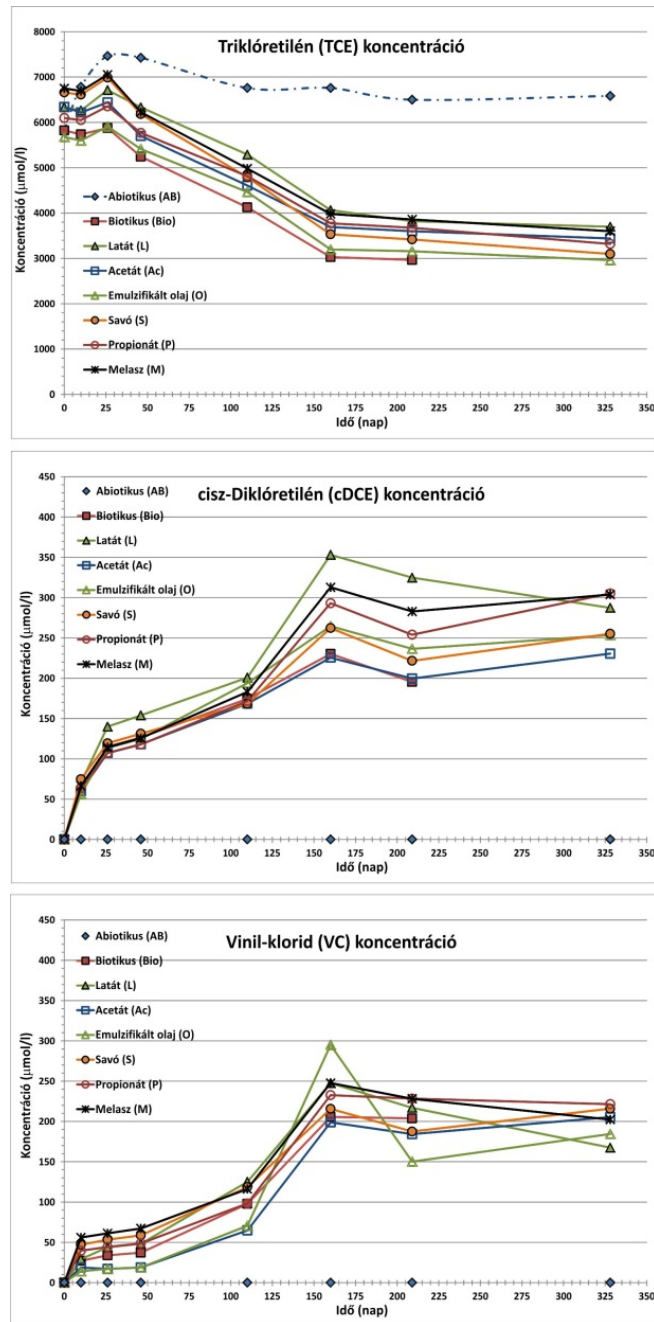
kísérletek során célunk volt a különböző adalékanyagok hatására változó mikroba közösség, illetve a szennyező anyagok koncentráció változásának követése.

A kiindulási TCE szennyezés koncentrációja ($6188 \pm 372 \mu\text{mol/l}$) az elektron donor adagolásoktól függetlenül, hasonló ütemben és mértékben csaknem a felére csökkent a 328. napra. Ezzel párhuzamosan a bomlástermékek közül a *cisz*-diklóretén (c-DCE) a 20. napra, míg a vinil-klorid (VC) az 50. napra jelent meg, majd mindkét bomlástermék koncentrációja nőtt a 160. napig, azonban a bomlástermékek moláris mennyiségben nem voltak megfeleltethetőek a TCE csökkenés mértékével. Etént (mint egészségre ártalmatlan bomlásterméket) a kísérlet végéig nem sikerült detektálni (1. ábra).

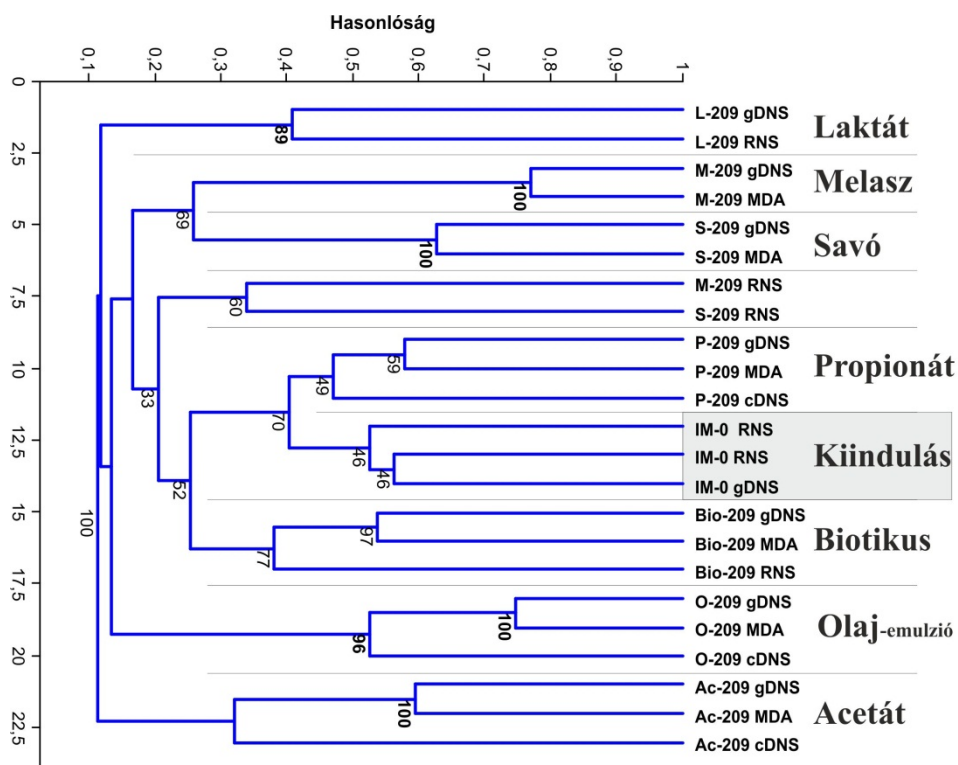
A legnagyobb mértékű szennyező anyag csökkenés alapján a 209. napos mikrokozmoszok közül kezelésként egy-egy mintát teljes körű kémiai és biológiai vizsgálatnak vetettünk alá, hogy elemezzük azokat a kémiai és biológiai paramétereket, amelyek a részleges szennyezőanyag bontást végző közösségekre jellemzőek. Az ujjlenyomat módszerekkel kapott RNS mintázatok jelezték a donor adagolás hatására bekövetkező közösségszerkezeti változásokat (2. ábra). Egyértelműen látszik, hogy markáns változások történtek a mikrobiális közösségekben az egyes kezelések hatására, annak ellenére, hogy a TCE degradáció és mértéke teljesen hasonló volt a különböző típusú mikrokozmoszokban (1. ábra).

A kiindulási mikrobiota megváltozásában úgy tűnik, hogy nem játszott szerepet a közösségen belül az aktív deklorináló szervezetek stimulálása. Ezt támasztja alá az a tény, hogy egyik donor hatására sem sikerült nagy számban deklorináló szervezeteket felszaporítani. A 209-napos cDNS klónkönyvtárakból a biotikus (donor adagolás-mentes) mintából sikerült egy *Dehalococcoides ethenogenes* klónt (ez a szervezet képes a TCE-t VC-on át eténig bontani) detektálni, illetve két klón esetében (elektron donor: tejsavó és olajemulzió) tudtunk részlegesen dehalogénező mikrobákat kimutatni (*Sulfurospirillum halorespirans*; *Dechloromonas denitrificans*) (M/1. ábra). Ezek az eredmények összhangban voltak a halogénezett szénhidrogén koncentrációk hasonló alakulásával a különböző mikrokozmoszokban, illetve a specifikus kimutatások eredményeivel, melyek szerint csak a komplex donor adagolások esetében maradt pozitív a *Dehalococcoides* sp.-teszt. A vinil-klorid reduktáz gének is csak a komplex donorok esetében adtak pozitív eredményt DNS alapon. A cDNS klónkönyvtárak összetétele a tejsavós és a laktátos kezelések esetében a fermentáló szervezetek egyértelmű dominanciáját mutatta, ezt alátámasztják a kémiai eredmények is. Továbbá az összes adagolás esetében kometabolikus lebontásban résztvevő mikrobák (*Acidovorax* sp. és *Pseudomonas* sp.) adták a klónkönyvtárak legnépesebb táborát (M/1. ábra).

Összességében elmondható, hogy a kiindulási dehalogénező potenciál, amit több molekuláris mikrobiológiai teszttel is bizonyítottunk, teljesen lecsökkent illetve néhány esetben eltűnt a 209. napra.



1. ábra. A TCE és bomlástermékeinek koncentrációváltozása a Donor-1 mikrokozmosz kísérlet-sorozatban a 0-328 napos időintervallumban.



2. ábra A kiindulási mikrobiota (IM-0) közösség szerkezet változása a különböző donor adagolások hatására a 209. napi mikrobiális közösségek molekuláris ujjlenyomat mintázata alapján. A dendrogram a T-RFLP elektroferogramok adatai alapján, 2 restrikciós enzim együttes elemzésével, *Bray-Curtis* hasonlósági index felhasználásával 1000 ismétléssel (*bootstrap*) készült.

6. A harmadik munkaszakasz (2010. október 1. – 2011. szeptember 30.) eredményei

A korábbi kísérletek során csupán a TCE részleges és kismértékű bontását tapasztaltuk. Ennek egyik lehetséges magyarázata lehet, hogy a körültekintő talajvíz mintavétel, illetve a mikrokozmoszok összeállításánál alkalmazott gondos kezelés ellenére is a szigorúan anaerob körülmények „sérülhettek”. Azért, hogy kizárjuk ennek a problémának az eshetőségét, más anaerob technika alkalmazásával új kétfázisú mikrokozmoszokat állítottunk össze.

A korábbi mikrokozmoszok összeállításánál ún. *Mininert* szeptumokat használtunk, amelyeket a Donor-2 kísérlet-sorozatban teflon borítású gumidugókra cseréltük. Ezek többszöri szűrt mintavétel alkalmazása mellett is megőrizték gázzáró képességüket. Felmerült ugyanis annak a lehetősége is, hogy a *Mininert* szeptumok enyhén ereszhettek a mintavételek során, és anaerob helyett „mikroaerob” környezet stabilizálódott. A közösségekben a donor típusától függetlenül jelentkező fakultatív anaerob *Pseudomonas-Acidovorax* dominancia is ezt a teóriát látszik alátámasztani. Ebből adódhatott, hogy a kiindulási mintában jelenlévő szigorúan anaerob deklorináló szervezetek elszaporodását nem sikerült a donor adagolásokkal elősegíteni.

A részleges bontás egy másik magyarázata lehet, hogy a kiindulási minta nem tartalmazta megfelelő sejtszámban a lebontáshoz szükséges összes mikroorganizmust. Erre a problémára a talajvízminta koncentráálásával próbáltunk megoldást találni.

Egy harmadik lehetséges magyarázata a részleges bontásnak lehet az is, hogy a deklorináló baktériumoknak nem biztosítottuk a biofilm képzéséhez megfelelő feltételeket („tapadási” felületet), ezért háromfázisú (víz-, talaj- és gázfázis) mikrokozmoszokat is összeállítottunk.

A kétfázisú mikrokozmosz kísérletek során az előző mesterséges ökoszisztéma szelekciós kísérletekre alapozva egyszerű (hidrogén [H₂], acetát [Ac], propionát [P], laktát [L] és butirát [B]) és összetett (savó [S] és melasz [M]) elektron donorokat alkalmaztunk. Utóbbiak szénforrásként is szolgáltak a mikrobák számára. Hasonlóan az első kísérletsorozathoz, a korábban kiválasztott (J18/2) talajvízminta felhasználásával állítottunk össze 45 db 120 ml térfogatú mikrokozmoszt (*Donor-2 kísérlet-sorozat*). Az előzőektől eltérően szintetikus közeget alkalmaztunk és a talajvízminta koncentráálásával mikrobiális inokulumot juttattunk az üvegekbe. Összehasonlításképpen biotikus, illetve abiotikus kontrollok szolgáltak.

A háromfázisú mikrokozmoszok esetében is szintetikus közeget alkalmaztunk, szilárd fázisként 5 g steril, szitált talaj szolgált. Ebben az esetben az elektron donor acetát volt. Mivel a metanogén mikroszervezetek szerepe a reduktív deklorinációban egyelőre vitatott, ezért egy specifikus metanogén gátló anyagot (BES: brómetán szulfonát) is jutattunk egy sorozat mikrokozmoszba, hogy ilyen mód vizsgáljuk részvételüket a deklorinációs folyamatokban. Összehasonlításképpen itt is alkalmaztunk abiotikus és biotikus kontrollokat.

A kétfázisú mikrokozmosz kísérletekben a 200. napos T-RFLP ujjlenyomat eredményeket a kémiai eredményekkel vetettük össze. A T-RFLP eredmények statisztikai értékelésével kapott biplot ábrán a különböző típusú mikrokozmoszok bakteriális közösségének hasonlósági alapon történő csoportosulása mutatkozik meg a csoportosulásokat meghatározó T-RF csúcsok jelölésével (3. ábra).

A biotikus mintákban a beadagolt TCE csak nagyon kis hányada alakult át c-DCE-né, az ujjlenyomat elemzések alapján e minták mikrobaközössége változott legkevésbé a kiindulásihoz képest. Ebben szerepet játszik a kiindulási inokulumban RNS alapon kb. 11%-ban jelenlévő *Pseudomonas* sp.¹, ami a 200. napos kezeletlen biotikus mintában hasonló mennyiségben maradt. Ez a szervezet megegyezik a *Donor-1 kísérletsorozatban* a kezelésektől függetlenül végig domináns közösségalkotóként jelentkező szervezettel (M/1. ábra).

A hidrogén- és a butirát-kezelésű mikrokozmoszokban a TCE minimális degradációja történt meg a kísérlet elején. A propionátos kezelésű mikrokozmoszokban nem történt TCE degradáció. Ezek a minták a részleges deklorinációra képes *Sulfurospirillum halorespirans*-ként azonosított csúcsok², illetve két, korábban *Desulfovibrio* sp.-ként azonosított csúcs³ alapján válnak el a többi mintától.

A laktát-kezelésű mikrokozmoszokban a TCE teljes mértékben lebomlott c-DCE-né. A párhuzamos mikrokozmoszok azonban eltérő közösségek alakultak ki. Az egyik párhuzamos mintában (L-1) a 117. napra VC is megjelent, amely kémiai eredmények összhangban vannak a taxon- és katabolikus gén-specifikus vizsgálatok eredményével. Az L-1 minták a *Dehalococcoides* genusnak megfelelő csúcsok⁴ alapján váltak el a többi mintától az ujjlenyomat vizsgálatok során. Az egyik acetátos (Ac-3) mintában a TCE teljesen átalakult c-DCE-né, de VC felszabadulás nem történt. Ez a minta egyértelműen a *Sulfurospirillum dehalogenans*-nak megfelelő csúcsok alapján különült el a többi mintától, mivel ennek a taxonnak a közösségen belüli hányada RNS alapon a 200. napra a kiindulási mennyiség csaknem háromszorosa nőtt (ca. 64%). Ez a szervezet azonban csupán részleges dehalogénezésre képes.

Az egyik melaszos (M-3) és savós (S-3) minta esetében a TCE teljes bontását detektáltuk a 20. napon, viszont az újonnan beadagolt TCE mennyisége nem csökkent a kísérlet során. Ezzel szemben egy másik melaszos minta (M-2) esetében az újonnan beadagolt

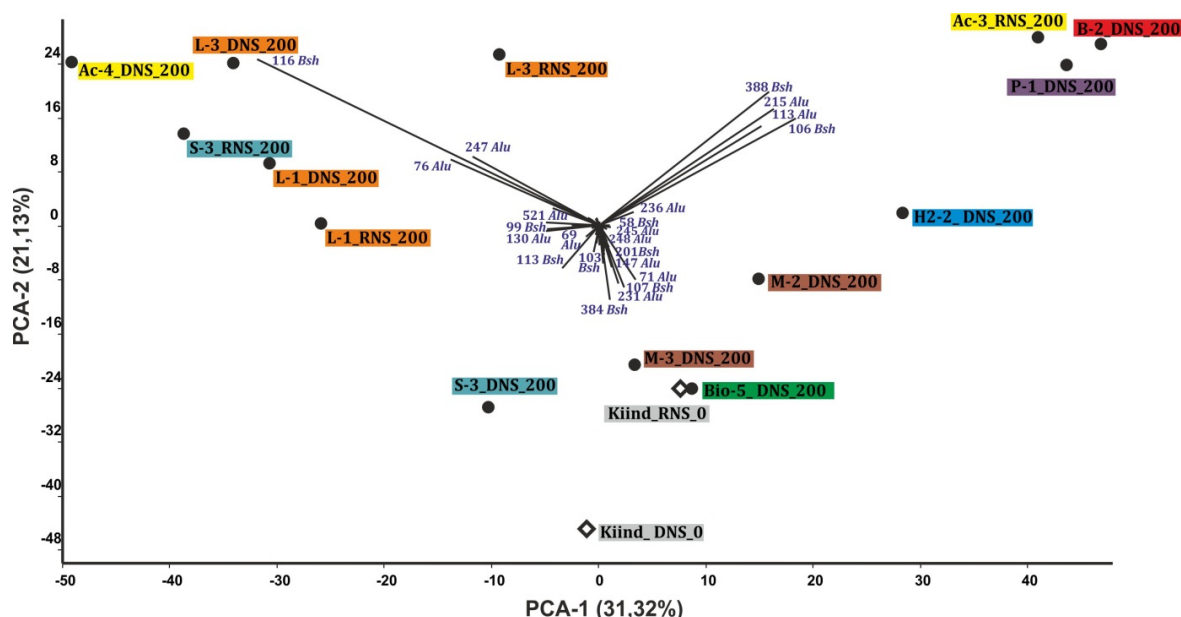
¹ T-RF csúcsok: *Alu*-231 bp és *Bsh*-384 bp; klón R1_B9 (M/1. ábra).

² T-RF csúcsok: *Alu*-113 bp és *Bsh*-388 bp; klón R1_A10

³ T-RF csúcsok: *Alu*-215 bp és *Bsh*-106 bp; klón P-24; (M/1. ábra)

⁴ T-RF csúcsok: *Alu*-130 bp és *Bsh*-99 bp; klón R1_F10

TCE is teljesen lebomlott c-DCE-né. A biológiai elemzések a két különböző típusú lebontás esetén teljesen eltérő mikrobiális közösséget mutattak.



3. ábra A kiindulási és a 200 napos mikrokozmosz minták *AluI* és *Bsh1236I* enzimmel emésztett T-RFLP futásainak együttes főkomponens elemzése biplot funkció alkalmazásával (Kiind – kiindulási minta, Bio – biotikus kontroll, Ac – acetátos kezelés, H2-hidrogénes kezelés, S-savós kezelés, P-propionátos kezelés, L-laktátos kezelés, B-butirátos kezelés, M-melaszos kezelés).

A háromfázisú mikrokozmoszoknál a kémiai eredmények azt mutatták, hogy az abiotikus kontrollokban a kezdeti beoldódási folyamat után nem történt jelentős változás a TCE koncentrációban, nem jelentek meg bomlástermékek sem, míg a biotikus mintáknál a 220. napra megtörtént a teljes redukív deklorináció, azaz a TCE egészen eténig bomlott. Az acetátos mintáknál a TCE bontás a 220. napig VC-ig, míg az acetát+BES-es minták esetében c-DCE-ig történt meg.

A biológiai eredmények minden minta esetében azt mutatták, hogy a kiindulási közösséghez képest diverzitás csökkenés történt a 220. napra, ami a megfelelő szénforrás és elektron-donor megválasztásának hatására a bontásban résztvevő mikrobák szelektálódására utal. A részletesebb RNS-alapú ujjlenyomat vizsgálatok azt mutatták, hogy az egyes donorok adagolásának megfelelően eltérő közösségi ujjlenyomat mintázatot kaptunk. A biotikus mintáknál a domináns csúcs a *Dehalococcoides* genusnak, míg az acetátos és az acetát+BES-es mintáknál a *Sulfurospirillum* genusnak volt megfeleltethető.

Pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) vizsgálatokat végeztünk az adagolt talaj szerkezetének vizsgálatára (M/2. ábra). Biofilm képződés és különböző méretű, illetve morfológiájú baktériumok voltak megfigyelhetőek. FISH (*fluoreszcens in situ hibridizáció*) módszerrel sikerült egyidejűleg vizsgálnunk a Bacteria és az Archaea csoportok jelenlétét a *Dehalococcoides* nemzetséggel. A vártan megfelelően, a BES kezelt mikrokozmoszoknál az Archaea csoport kisebb abundanciáját tapasztaltuk. A Bacteria csoport és a *Dehalococcoides* genus egyidejű vizsgálatából kiderült, hogy az alacsony sejtszám mellett a *Dehalococcoides* spp. nagy abundanciával volt jelen a mintákban (M/3-6. ábrák).

7. A negyedik munkaszakasz (2011. október 1. – 2013. április 30.) eredményei

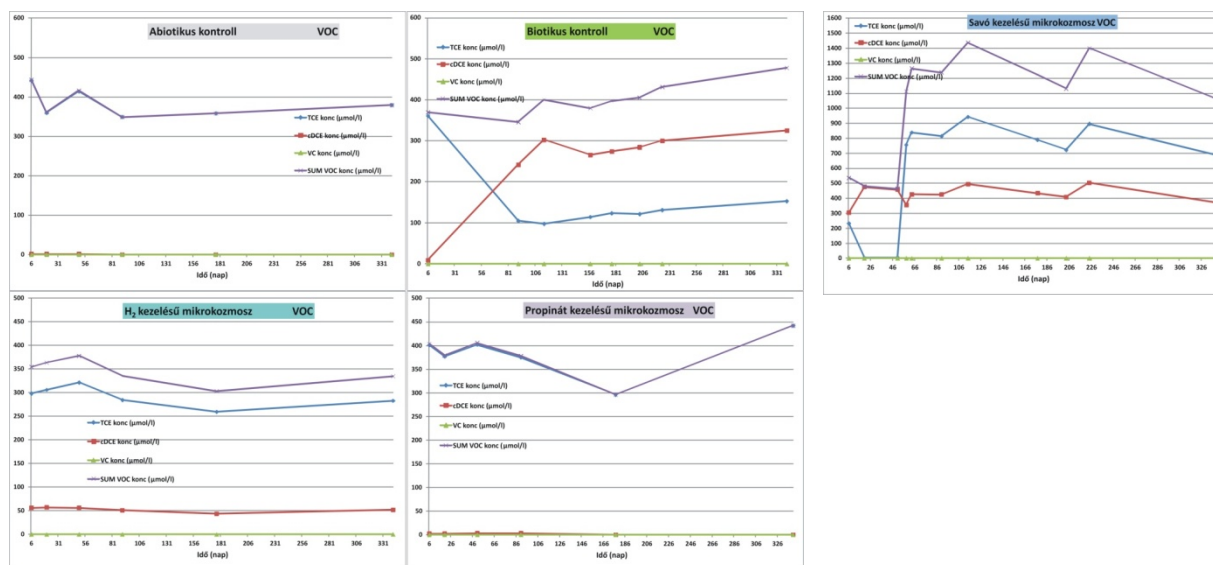
A negyedik munkaszakasz során az előzőekben összeállított két- és háromfázisú mikrokozmoszok kémiai és biológiai elemzését folytattuk tovább, illetve új mikrokozmoszokat is összeállítottunk. Ezúttal arra kerestük a választ, hogy a háromfázisú mikrokozmoszok teljes redukív deklorinációs sikeressége vajon a harmadik (talaj-) fázis meglétének köszönhető-e vagy valami egyéb tényezőnek. Három különböző típusú mikrokozmoszt (plusz minden típushoz kontroll mikrokozmoszokat) állítottunk össze az 1. táblázat szerint. Inokulumként a kétfázisú mikrokozmoszok egyik biotikus mintája szolgált, mivel az ujjlenyomat vizsgálatok alapján ennek a mintának a mikroba közössége hasonlított legjobban a kiindulásihoz. Kémiai méréseket (VOC analízis) végeztünk a 0., 4., 25., 51., 68., 99. és 184. napon, illetve molekuláris biológiai (T-RFLP) vizsgálatokat a 184. napon.

1. táblázat. A negyedik munkaszakaszban összeállított mikrokozmoszok összetétele.

Jelölés	Szilárd fázis	Folyadék fázis	Gáz fázis	Inokulum	Elektron donor
Ac_talaj	talaj	szintetikus médium	✓	✓	acetát
Ac_talaj_kontroll	talaj	szintetikus médium	✓	-	acetát
Üveggy	üveggyöngy	szintetikus médium	✓	✓	acetát
Üveggy_kontroll	üveggyöngy	szintetikus médium	✓	-	acetát
Ac	-	szintetikus médium	✓	✓	acetát
Ac_kontroll	-	szintetikus médium	✓	-	acetát

7.1 Kétfázisú mikrokozmoszok kémiai eredményei

A biotikus kontrollban, illetve a hidrogén, propionát és savó kezelésű mikrokozmoszokban nem történt jelentős változás a halogénezett szénhidrogének koncentrációjában a 200. napi mérésekhez képest a 340. napra sem. A biotikus kontrollban, illetve a savó és a hidrogén kezelésű mikrokozmoszban a TCE bontása nem ment tovább c-DCE-nél, míg a propionátos kezelésű mikrokozmoszban továbbra sem történt meg a TCE degradációja, nem tudunk bomlásterméket detektálni (4. ábra).



4. ábra. TCE és bomlástermékeinek koncentrációváltozása a kétfázisú mikrokozmoszokban - I.

Az acetát, laktát, butirát és melasz-kezelésű mikrokozmoszoknál (az előző vizsgálatokhoz hasonlóan) azt tapasztaltuk, hogy az egyes párhuzamosok eltérő bontási potenciállal és ennek megfelelően eltérő mikrobiális közösséggel voltak jellemezhetőek.

Az egyik acetátos (Ac-3) és laktátos (L-3) mintánál nem történt jelentős változás a

kémiai paraméterekben az utolsó mérési napig. A 114. napon beadagolt TCE ugyan teljesen lebomlott c-DCE-né, további bomlástermékeket viszont nem detektáltunk a kísérlet során. Ezzel szemben az Ac-4 és a L-1 mintáknál az utolsó méréseknél erőteljes c-DCE csökkenést és ezzel párhuzamosan nagymértékű VC felszabadulást tapasztaltunk (5. ábra).

A butirátos kezelésű mikrokozmoszok esetében az egyik párhuzamos mintánál (B-2) nem tapasztaltunk változást a kémiai paraméterekben a 200. napi mérésekhez képest, míg a másik párhuzamosban (B-3) jelentős TCE csökkenés és ezzel párhuzamosan c-DCE koncentrációnövekedés volt megfigyelhető, de további bomlástermékeket nem tudtunk kimutatni. A melaszos kezelésű mikrokozmoszoknál is hasonló folyamatokat tapasztaltunk: míg az M-2 minta esetében nem történt jelentős változás a VOC koncentrációkban, addig az M-3 mintában csökkent a TCE koncentrációja (5. ábra).

Összességében elmondható, hogy a kétfázisú mikrokozmoszok esetében minden egyes kezelés során a TCE részleges bontását tapasztaltuk az utolsó mintavételi időpontig, teljes - eténig történő - lebontást sehol sem detektáltunk. Az acetátos, a laktátos, a butirátos és a melaszos-kezelésű mikrokozmoszoknál a párhuzamosok különböző bontási potenciállal voltak jellemezhetőek.

7.2. Háromfázisú mikrokozmoszok kémiai eredményei

A háromfázisú mikrokozmoszok esetében a biotikus kontrolloknál – ahol előzetesen a teljes reduktív deklorináció végbement – azt tapasztaltuk, hogy az összes c-DCE lebomlott a 336. napra, ezzel párhuzamosan a felszabaduló VC és etén koncentrációja nőtt (6. ábra), tehát továbbra is aktív maradt a deklorinációban résztvevő mikroba közösség.

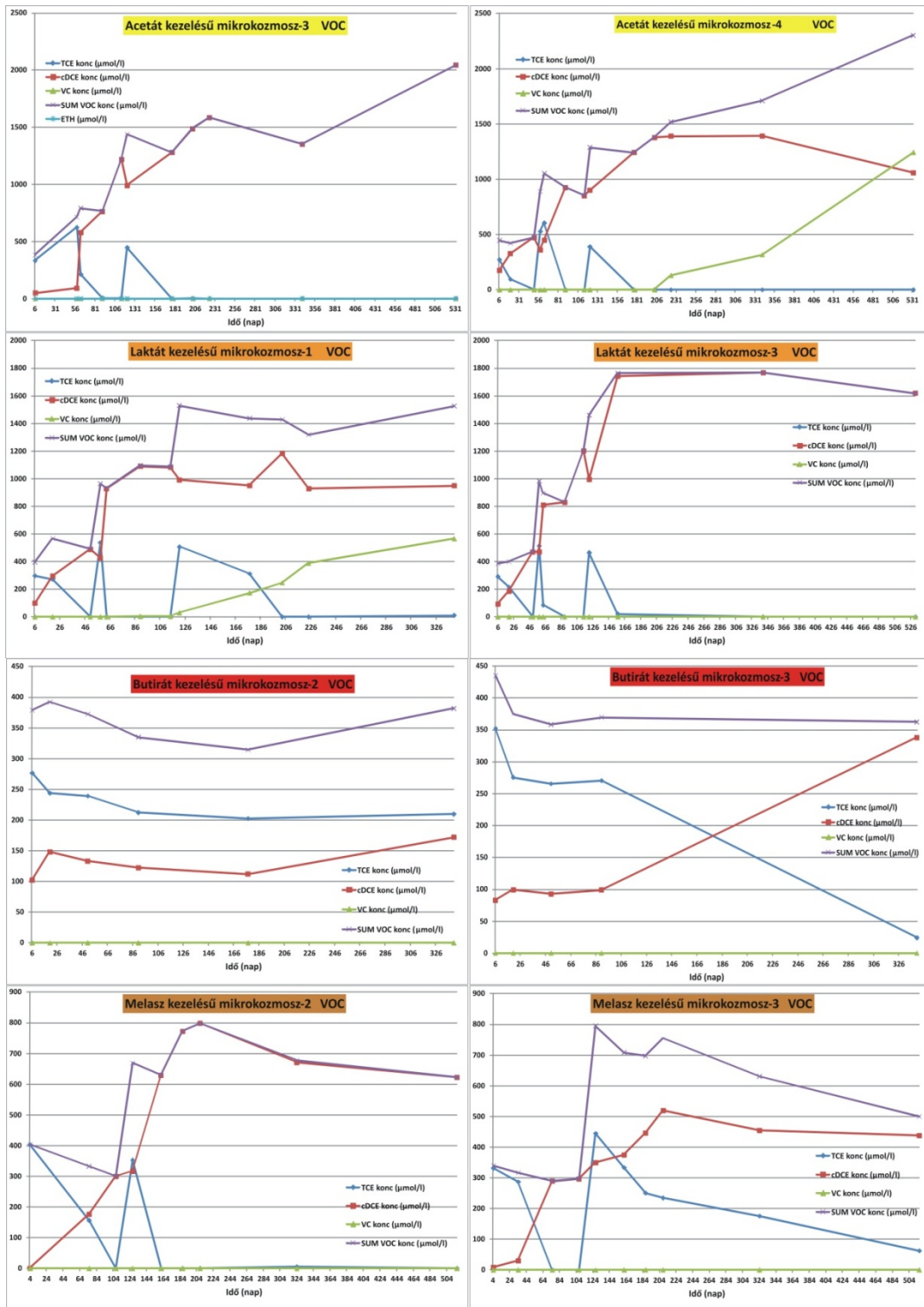
Az acetátos kezelésű mikrokozmoszokban is megjelent az etén az utolsó mintavételi időpontra (tehát itt is végbement a teljes reduktív deklorináció), emellett csökkent a c-DCE és nőtt a VC koncentrációja. Az acetát+BES kezelésű mintáknál is elindult a c-DCE bontása VC felszabadulással (6. ábra).

Tehát a VOC eredményekből az látszott, hogy a 336. napra nemcsak a biotikus kontrollban, de a kezelt mikrokozmoszokban is aktivizálódtak azok a mikroba csoportok, amelyek a TCE teljes lebontásáért felelősek, csak időben eltolódva.

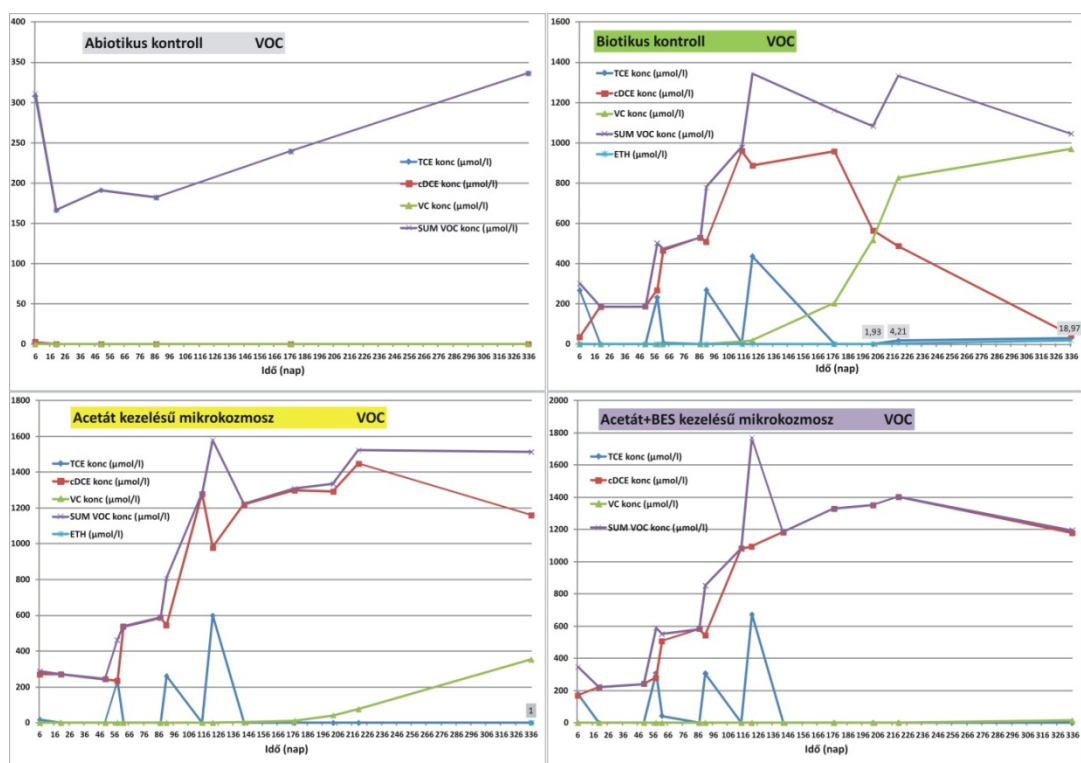
7.3. Új mikrokozmosz kísérletek kémiai eredményei

A kétfázisú mikrokozmoszoknál tapasztalt részleges, illetve a háromfázisú mikrokozmoszoknál megfigyelt teljes reduktív deklorináció végbemenetele felvetette azt a kérdést, hogy a mikrokozmoszok sikeressége vajon a harmadik (talaj-) fázis meglétének köszönhető-e, vagy valami egyéb tényezőnek (pl. az alkalmazott talaj geokémiai, illetve fizikai-kémiai paramétereit). Erre a kérdésre keresve a választ három különböző típusú mikrokozmoszt állítottunk össze a hozzájuk tartozó, inokulumot nem tartalmazó, kontrollokkal együtt:

- 1) egy már eddig is alkalmazott talaj-víz-gáz fázis típusút;
- 2) egy üvegyöngy-víz-gáz fázis típusút (itt az üvegyöngy inert hordozóként szolgált);
- 3) kontrollként egy víz-gáz fázis típusú mikrokozmoszt.



5. ábra. TCE és bomlástermékeinek koncentrációváltozása a kétfázisú mikrokozmoszokban - II.



6. ábra. A TCE és bomlástermékeinek koncentrációváltozása a háromfázisú mikrokozmoszokban.

A 184. napi VOC mérésekből kiderült, hogy minden mikrokozmoszban beindult a TCE bontása c-DCE-né, viszont a talajos mintáknál a TCE bontása már az 51. napon elkezdődött, míg a másik két típusú mintánál csak a 99. napon. Ugyanolyan trend figyelhető meg a VOC adatokban a kétfázisú és az üveggyöngyös mintáknál (7. ábra). Ebből arra következtettünk, hogy a talajnak nemcsak az a szerepe a mikrokozmoszokban, hogy megfelelő felület biztosítson a biofilm képződéshez, hanem valószínűleg magas szerves anyag tartalmával (M/1. táblázat) is hozzájárul a mikrobaközösség sikerességéhez.

7.4. Kétfázisú mikrokozmoszok biológiai eredményei

A biológiai elemzés során vizsgáltuk a dehalogénezésben résztvevő mikrobák jelenlétét és aktivitását (DNS és rRNS alapon), illetve a lebontásban fontos funkciógéneket (DNS és mRNS alapon) az előzőek során kidolgozott molekuláris biológiai tesztekkel. A kapott eredményeket táblázatosan ábrázoltuk (2. és 3. táblázat).

A taxon-specifikus kimutatások eredményéből látható, hogy a kiindulási mintában több különböző, aktív (RNS eredmények) dehalogénező mikrobát: *Dehalococcoides ethenogenes*, *Dehalobacter restrictus* és *Desulfuromonas chloroethenica* is kimutattunk (2. táblázat). A *Dehalobacter restrictus* képes a TCE-t c-DCE-ig bontani, míg a *Desulfuromonas chloroethenica* a PCE és a TCE bontására képes. A katabolikus gén kimutatások közül a vinil-klorid redukáz (*vcrA*) teszt adott pozitív eredményt mind DNS, mind mRNS alapon. A *vcrA* gén a VC bontását végző egyik fehérjét kódolja.

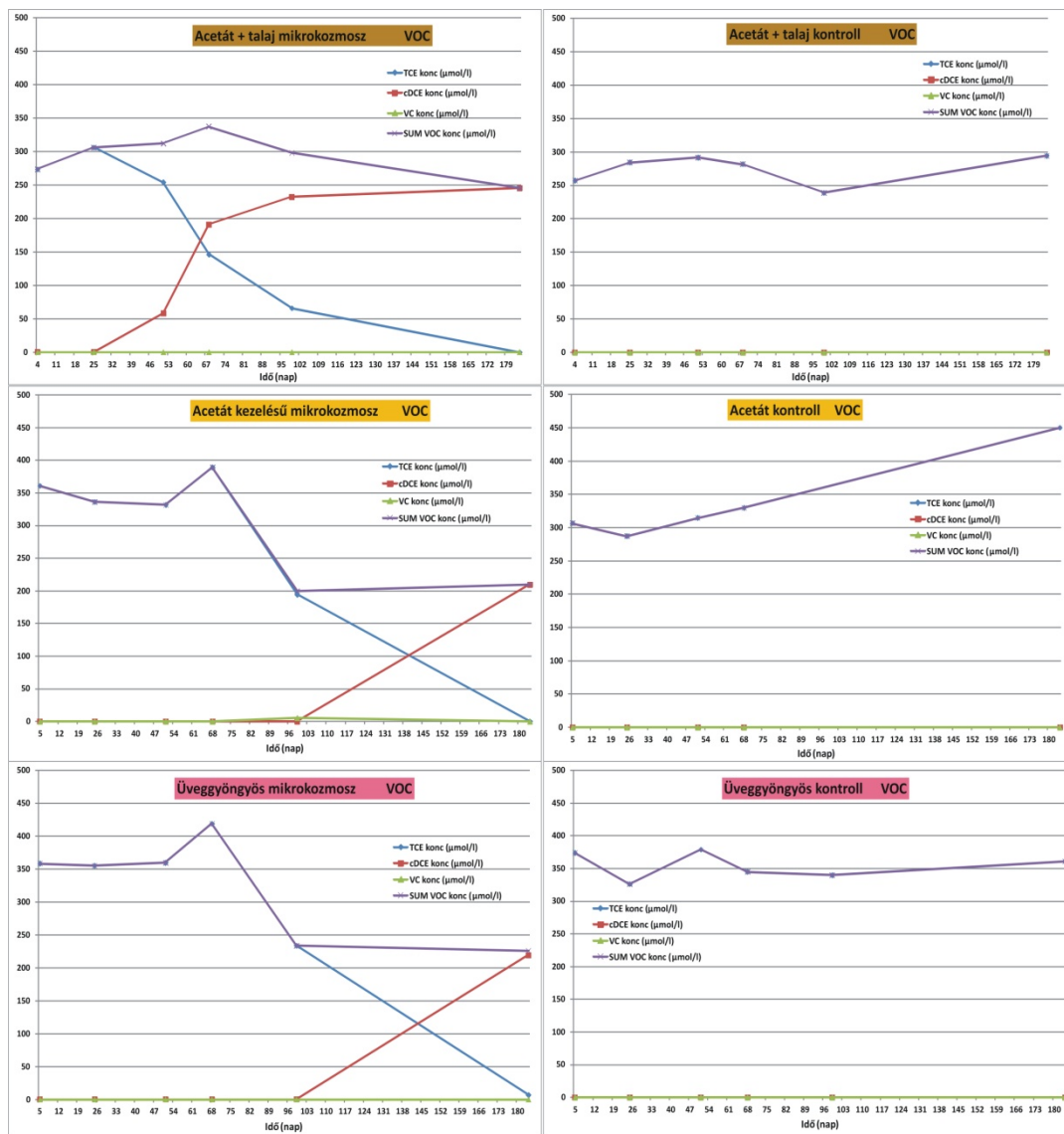
A különböző elektron donorok adagolása során a 200. napra változás történt az egyes taxonok jelenlétében és aktivitásában is. Egyedül az egyik melaszos minta (M-3) őrizte meg a kiindulási állapotra jellemző mikrobiális „mintázatot”, azzal a különbséggel, hogy a *Desulfuromonas chloroethenica*-t nem tudtuk kimutatni, viszont a *Desulfomonile tiedjei*-t igen. Ez a szervezet (többek között) a PCE bontásában vesz részt.

A 200. napos kémiai eredményekkel összhangban egyedül az egyik laktátos (L-1), illetve a két melaszos minta (M-2 illetve M-3) adott pozitív eredményt rRNS alapon a

Dehalococcoides tesztre. *Desulfitobacterium dehalogenans*-t, ami a PCE TCE-ig történő bontására képes egyik mintából sem tudtunk kimutatni.

A 340. napi tesztek (3. táblázat) során minden mintából kimutattunk *Dehalococcoides ethenogenes*-t (igaz, csak kis kópia számban – DHC-2 teszt), illetve *Desulfomonas chloroethenica*-t. A *Desulfitobacterium dehalogenans* teszt csak a savós és a butirátos kezelés esetén adott pozitív eredményt. *Desulfomonile tiedjei*-t egyik mintában sem detektáltunk.

A katabolikus gén kimutatások (*vcrA* pozitív minták) összhangban vannak a VOC mérések eredményével, ugyanis az L-1 mintánál VC növekedést, az M-3 mintánál TCE csökkenést, míg a B-3 mintánál TCE csökkenést és ezzel párhuzamosan jelentős c-DCE koncentrációnövekedést tapasztaltunk.



7. ábra. A TCE és bomlástermékeinek koncentrációváltozása az acetát + talaj, az acetátos és az üveggyöngyös mikrokozmoszokban.

2. táblázat. Taxon- és gén-specifikus kimutatások eredménye a kétfázisú mikrokozmoszokban – kiindulás és 200. nap.

		DHC-1	DHC-2	DD	DR	DC	DT	tceA	bvcA	vcrA
Kiindulási minta	DNS	+++	+	-	+++	+++	-	-	-	+
	RNS	-	+	-	+++	+++	nd.*	-	-	+
Biotikus kontroll	DNS	+	+	-	+++	-	+++	-	-	+
	RNS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ kezelés	DNS	+	+	-	+++	-	+	-	-	+
	RNS	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*
Propionát kezelés	DNS	+	+	-	+++	-	+++	-	-	+
	RNS	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*
Savó kezelés	DNS	+	+	-	+++	-	+	-	+	+
	RNS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetát kezelés-3	DNS	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*
	RNS	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
Acetát kezelés-4	DNS	+	+	-	+++	-	+++	-	+	++
	RNS	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*
Laktát kezelés-1	DNS	+++	+	-	+++	-	+	+++	+++	+
	RNS	+	+	-	+++	-	-	-	-	-
Laktát kezelés-3	DNS	+	+	-	+++	-	+++	nd.*	nd.*	+
	RNS	-	-	-	+++	-	+++	-	-	-
Butirát kezelés-2	DNS	+	+	-	+++	-	+	-	-	+
	RNS	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*
Butirát kezelés-3	DNS	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*
	RNS	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*
Melasz kezelés-2	DNS	+	+	-	+++	-	+	-	-	+
	RNS	-	+	-	-	-	+	-	-	+
Melasz kezelés-3	DNS	+	+	-	+++	-	+	-	-	+
	RNS	-	+	-	+++	-	+	-	-	+

nd.* = nincs adat, DHC-1 ill. -2: *Dehalococcoides ethenogenes*, DD: *Desulfitobacterium dehalogenans*, DR: *Dehalobacter restrictus*, DC: *Desulfuromonas chloroethenica*, DT: *Desulfomonile tiedjei*

3. táblázat. Taxon- és génspecifikus kimutatások eredménye a kétfázisú mikrokozmoszokban - 340. nap.

		DHC-1	DHC-2	DD	DR	DC	DT	tceA	bvcA	vcrA
Biotikus kontroll	DNS	+	+++	-	+++	+++	-	-	-	-
	RNS	-	+++	-	-	+++	-	-	-	-
H ₂ kezelés	DNS	+/-	+++	-	+++	+++	-	-	-	-
	RNS	-	+++	-	-	+	-	-	-	-
Propionát kezelés	DNS	+	+++	-	+++	+++	-	-	-	-
	RNS	-	+++	-	-	+++	-	-	-	-
Savó kezelés	DNS	+	+++	-	+++	+++	-	-	-	-
	RNS	+/-	+++	+	++	+++	-	-	-	-
Acetát kezelés-3	DNS	+/-	+++	-	+++	+++	-	-	-	-
	RNS	-	+++	-	+++	+++	-	-	-	-
Acetát kezelés-4	DNS	+++	+++	-	+++	+++	-	-	-	-
	RNS	+++	+++	-	+++	+++	-	-	-	-
Laktát kezelés-1	DNS	+++	+++	-	+++	++	-	-	-	-
	RNS	+++	+++	-	+++	+++	-	-	-	-
Laktát kezelés-3	DNS	+	+++	-	+++	++	-	-	-	+
	RNS	-	+++	-	+++	+++	-	-	-	-
Butirát kezelés-2	DNS	+	+++	-	+++	+++	-	-	-	++
	RNS	-	+++	+/-	+++	+++	-	-	+	-
Butirát kezelés-3	DNS	+/-	+++	-	+++	+++	-	-	-	+
	RNS	-	+++	+/-	-	+++	-	-	-	-
Melasz kezelés-2	DNS	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*
	RNS	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*	nd.*
Melasz kezelés-3	DNS	+	+++	-	+++	-	-	-	-	+
	RNS	+/-	+++	-	+++	+++	-	-	-	-

nd.* = nincs adat, DHC-1 ill. -2: *Dehalococcoides ethenogenes*, DD: *Desulfitobacterium dehalogenans*, DR: *Dehalobacter restrictus*, DC: *Desulfuromonas chloroethenica*, DT: *Desulfomonile tiedjei*

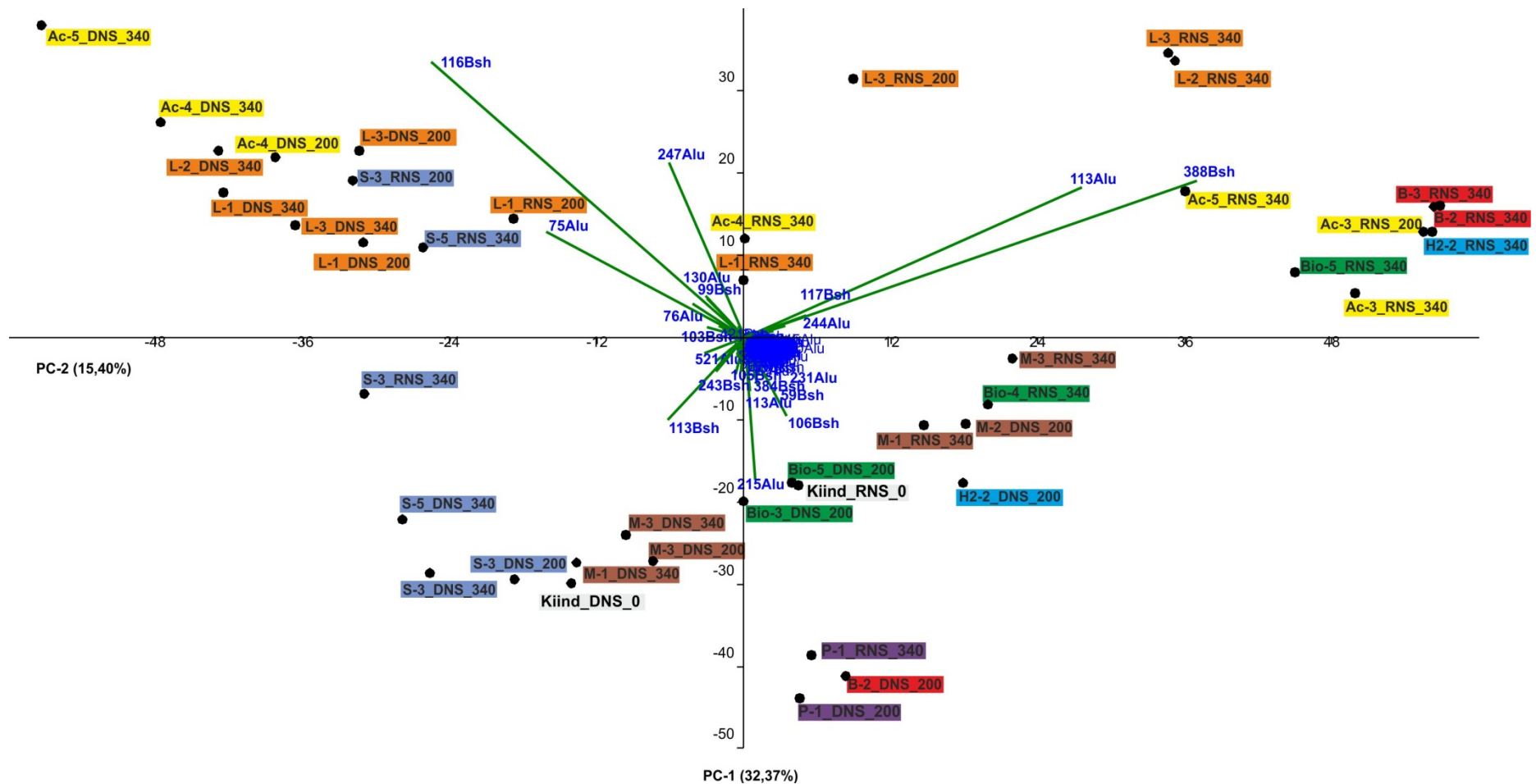
A taxon- és katabolikus génspecifikus kimutatások mellett megvizsgáltuk az adalékanyagok hatására bekövetkezett mikrobiális közösségszerkezet változásokat a T-RFLP módszerrel kapott ujjlenyomatok statisztikai kiértékelésével (8. ábra).

Nagyon eltérő az egyes mikrokozmoszok DNS- és RNS-alapú közösségszerkezeti ujjlenyomata. Sok esetben megfigyelhető, hogy a 340. napos DNS alapú T-RFLP feldolgozások csupán csekély mértékű változást jeleztek a 200. napos állapotokhoz képest, míg az RNS alapú T-RFLP ujjlenyomatok jobban követték a kémiai mérésekkel alátámasztott TCE degradációs folyamatokat. Ez legszembetűnőbb pl. a L-1 mikrokozmosz esetében (8. ábra). A közösségi DNS alapú vizsgálatok a DNS feldolgozás és a DNS tárolásának egyszerűsége miatt igen elterjedt, azonban a jelen eredmények is a valós aktivitással jobban korreláló RNS alapú vizsgálatok fontosságát jelzik.

A TCE degradációt 340. napon sem mutató propionátos minta a kiindulási mintához közel a 200. napos butirátos mikrokozmoszsal csoportosult. A részleges TCE \rightarrow c-DCE transzformációt mutató biotikus, H₂ és butirát-kezelésű mikrokozmoszok időben elmozdultak és a 340. napra a *Sulfurospirillum halorespirans*-t definiáló csúcsok körül csoportosultak. Ez a B-2 és B-3 mikrokozmosz esetében egyértelmű összefüggésbe hozható az acetátos és laktátos mintákhoz képest időben jóval később jelentkező TCE koncentráció csökkenés és ezzel egyidejű c-DCE koncentráció növekedésével.

A TCE degradáció mértéke alapján legsikeresebbnek mutató acetát-, és laktát-adagolású kétfázisú mikrokozmoszok, amelyek a többszöri TCE újraadagolást követően is teljes TCE \rightarrow c-DCE transzformációt értek el, hasonló közösségszerkezettel jellemezhetőek. RNS alapon abszolút *Sulfurospirillum halorespirans* (Alu-113 bp és Bsh-388 bp) dominancia figyelhető meg, míg DNS alapon mindkét típus esetében a Alu-75-76, Bsh-116 és az Alu-247 bp csúcsok a meghatározóak. Ezen fragmensek között szerepelnek egy, a korábbi Donor-1 kísérlet laktát RNS klónkönyvtárából azonosított *Acetobacterium carbinolicum* T-RF csúcsai (L-43 klón: Alu-247 bp és Bsh-116 bp; M/1. ábra). Erről az anaerob homoacetogén baktériumról feltételezik, hogy laktát fermentáción keresztül, feltételezhetően acetáttal és hidrogénnel látja el a *Dehalococcoides* szervezeteket.

Egy-egy párhuzamos a laktátos és az acetátos mikrokozmoszok közül (L-1 és Ac-4) a többitől igen eltérő mikrobiotát takar. Ezekben a mikrokozmoszokban, amelyekben a c-DCE a 340. napra tovább alakult jelentős mennyiségű VC-dá, a T-RFLP mintázat alapján is elkülönült a többi mintától. Ezt az elhatárolódást a *Dehalococcoides ethenogenes* (Alu-130 bp és Bsh-99 bp) csúcsok határozták meg. Ez teljes összhangban van a 340. napos taxon-specifikus kimutatásokkal, amely csak az L-1 és Ac-4 esetében adott rRNS alapon pozitív DHC-1 teszt eredményt. A laktát és acetát-kezelésű mikrokozmoszok párhuzamos mintáinak eltérő mértékű részleges redukív deklorinációja egyértelműen összefügg RNS alapon a közösségeken belüli százalékban kifejezett arány-eltolódásokkal (4. táblázat). Csupán azokban a mikrokozmoszokban sikerült a 340. napra a c-DCE mennyiség csökkenésével ekvimoláris mennyiségben VC felszabadulást tapasztalni, ahol a kiindulási inokulumhoz képest a *Dehalococcoides* genus feldúsult. Ezekben a mintákban azonban a részleges bontásra képes *Sulfurospirillum halorespirans* közösségen belüli aránya sem csökkent a kiindulási értékhez képest. Azokban a mikrokozmoszokban, amelyekben a többszörös TCE transzformációt c-DCE deklorináció nem követte csupán a *Sulfurospirillum halorespirans* taxon dúsult fel (4. táblázat).



8. ábra. A kétfázisú mikrokozmosz minták *AluI* és *Bsh1236I* enzimmel emésztett T-RFLP futásainak együttes főkomponens elemzése a kiindulási mintákkal együtt biplot funkció alkalmazásával. A minták jelölésének végén a 200 és 340 az egyes mintavételi időpontokat jelöli napokban kifejezve (Kiind – kiindulási minta, Bio – biotikus kontroll, Ac – acetátos kezelés, H2-hidrogénes kezelés, S-savós kezelés, P-propionátos kezelés, L-laktátos kezelés, B-butirátos kezelés, M-melaszos kezelés).

4. táblázat. A *Dehalococcoides ethenogenes* és a *Sulfurospirillum halorespirans* taxonoknak megfelelő T-RF csúcsok mikrokozmosz közösségeken belüli százalékos arányának időbeli változása DNS és RNS alapon.

	<i>Dehalococcoides ethenogenes</i>		<i>Sulfurospirillum halorespirans</i>	
	130-Alu	99-Bsh	113-Alu	388-Bsh
Kiind_DNS_0	2,4	2,5	5,8	0,8
Kiind_RNS_0	4,3	5,9	15,9	24,4
Ac-3_RNS_200	0	0	60,6	67,3
Ac-3_RNS_340	0	0	46,6	66,7
Ac-4_DNS_200	0	0,2	12,7	8,8
Ac-4_DNS_340	13,7	11,8	6,7	7,9
Ac-4_RNS_340	38,8	37,5	20,3	31,1
Ac-5_DNS_340	0	0,3	4,1	9,2
Ac-5_RNS_340	0	0	32,9	58,8
L-1_DNS_200	9,6	13,6	9,7	11,2
L-1_RNS_200	43,3	40,0	10,9	19,1
L-1_DNS_340	17,0	14,4	5,9	8,1
L-1_RNS_340	49,6	50,0	18,9	29,2
L-2_DNS_340	0	0	4,2	6,6
L-2_RNS_340	0	0	53,4	60,8
L-3_DNS_200	0	0	15,7	18,6
L-3_RNS_200	0	0	31,4	46,0
L-3_DNS_340	0	0	6,2	9,2
L-3_RNS_340	0	0	49,2	64,1

7.5. Háromfázisú és az új mikrokozmoszok biológiai eredményei

A kétfázisú mikrokozmosz vizsgálatokhoz hasonlóan a háromfázisú mikrokozmoszoknál is elvégeztük a taxon- és katabolikus génspecifikus kimutatásokat (5. és 6. táblázat). A 220. napra az acetát+BES kezelésű mintában rRNS alapon nem tudtuk kimutatni a *Dehalococcoides ethenogenes*-t, míg az összes többi mintában igen. Ez összhangban van a VOC mérésekkel, miszerint ennél az egy fajta mikrokozmosznál tapasztaltuk a TCE c-DCE-ig történő bontását, a másik két esetben VC, illetve etén volt a végtermék erre az időpontra. A részlegesen halogénező baktériumok kimutatásának (DR-, DC-teszt) esetében is a VOC mérésekkel összhangban álló eredményeket kaptunk, *Desulfuromonas chloroethenica* rRNS alapon az acetátos és az acetát + BES minták esetében adott pozitív eredményt (5. táblázat).

A katabolikus gén kimutatásoknál csak DNS alapon kaptunk pozitív eredményeket (holott a biológiai aktivitást bizonyítják a kémiai vizsgálatok), ami az alacsony mRNS koncentrációkkal illetve az amplikonok koncentrációjának a kimutathatósági szint alatti értékével magyarázható (6. táblázat).

5. táblázat. Taxon- és génspecifikus kimutatások eredménye a háromfázisú mikrokozmoszokban – kiindulás és 220. nap.

		DHC-1	DHC-2	DD	DR	DC	DT	<i>tceA</i>	<i>bvcA</i>	<i>vcrA</i>
Kiindulási minta	DNS	+++	+	-	+++	+++	-	-	-	+
	RNS	-	+	-	+++	+++	nd.*	-	-	+
Biotikus kontroll	DNS	+++	+	-	+	+++	-	+	+++	+
	RNS	+	+	-	-	-	nd.*	-	-	-
Acetát kezelés	DNS	+	+	-	+++	+++	-	+	+	+
	RNS	-	+	-	-	+++	nd.*	-	-	-
Acetát+BES kezelés	DNS	+	+	-	+	+++	-	-	-	+
	RNS	-	-	-	-	+++	-	-	-	-

nd.* = nincs adat, DHC-1 ill. -2: *Dehalococcoides ethenogenes*, DD: *Desulfitobacterium dehalogenans*, DR: *Dehalobacter restrictus*, DC: *Desulfuromonas chloroethenica*, DT: *Desulfomonile tiedjei*

A 336. napi vizsgálatok során egyedül a *Dehalococcoides ethenogenes* teszt bizonyult pozitívnak rRNS alapon minden mikrokozmosz esetében. A részleges dehalogénezésre képes

mikrobákra irányuló tesztek kizárólag DNS alapon adtak pozitív eredményt. Ez a biotikus és az acetátos minta esetében összefüggésbe hozható a kémiai eredményekkel, mivel ezeknél a mintáknál teljes reduktív deklorináció végbement a 336. napra, illetve az acetát+BES kezelésű mikrokozmoszban is továbbment a bontás VC-ig (6. táblázat).

A katabolikus gén vizsgálatoknál egyik esetben sem kaptunk egyértelmű eredményt, amit a nem megfelelő mennyiségű illetve minőségű nukleinsav kinyerésével magyarázhatunk.

6. táblázat. Taxon- és génspecifikus kimutatások eredménye a háromfázisú mikrokozmoszokban – 336. nap.

		DHC-1	DHC-2	DD	DR	DC	DT	<i>tceA</i>	<i>bvcA</i>	<i>vcrA</i>
Biotikus kontroll	DNS	+++	+++	-	+++	+++	-	-	-	-
	RNS	+/-	+++	-	-	-	-	-	-	-
Acetát kezelés	DNS	+++	+++	-	+++	+++	-	-	-	-
	RNS	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
Acetát+BES kezelés	DNS	+	+++	-	+++	+++	-	-	-	-
	RNS	-	+++	-	-	-	-	-	-	-

nd.* = nincs adat, DHC-1 ill. -2: *Dehalococcoides ethenogenes*, DD: *Desulfotobacterium dehalogenans*, DR: *Dehalobacter restrictus*, DC: *Desulfuromonas chloroethenica*, DT: *Desulfomonile tiedjei*

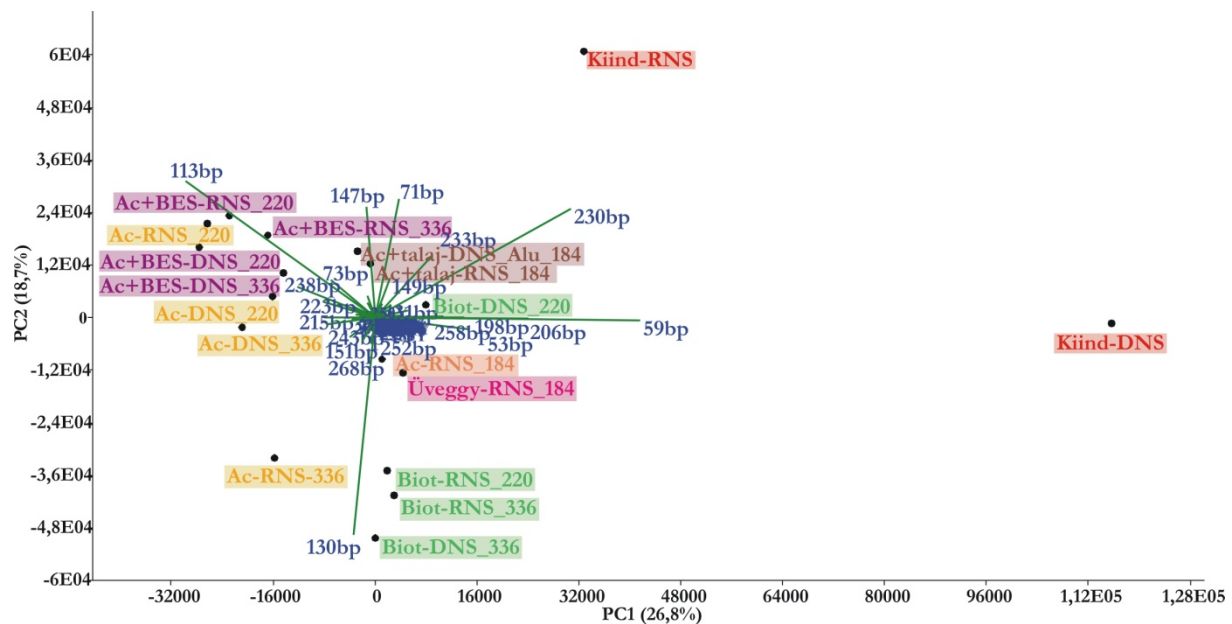
A háromfázisú mikrokozmoszoknál is megvizsgáltuk az adalékanyagok hatására, időben bekövetkező mikrobiális közösségszerkezet változást T-RFLP módszerrel. A kapott ujjlenyomat mintázatokat összehasonlítottunk az újonnan összeállított mikrokozmoszok mintázataival T-REX (T-RFLP Analysis Expedited) program segítségével. A kapott adatmátrixot statisztikailag vizsgáltuk, kétdimenziós főkomponens analízisnek vetettük alá PAST (Paleontological Statistics Software Package) programot alkalmazva. A főkomponens analízis során biplot funkciót alkalmaztunk, így egy ábrán láthatóvá téve a mintákat és az elválásukat okozó paramétereket (ebben az esetben T-RFLP csúcsok).

A 9. ábrán az összes minta *AluI* enzimmel emésztett futásait hasonlítottuk össze. A diagramon a két kiindulási minta teljesen elkülönül a többi elemzett mintától, egészen más bakteriális közösséget feltételezve, ahogyan ez a T-RFLP elektroferogramokból (M/7. ábra) is látható. Az elektroferogramok erőteljes mikrobiális diverzitás csökkenést mutattak a különböző adagolások hatására. Mivel vizsgálataink során célunk volt nyomon követni az adagolások hatására bekövetkező változásokat a „sikeres” és a „sikertelen” deklorináló közösség szerkezetében és aktivitásában, ezért a „kilógó” kiindulási mintákat kihagytuk a további vizsgálatokból.

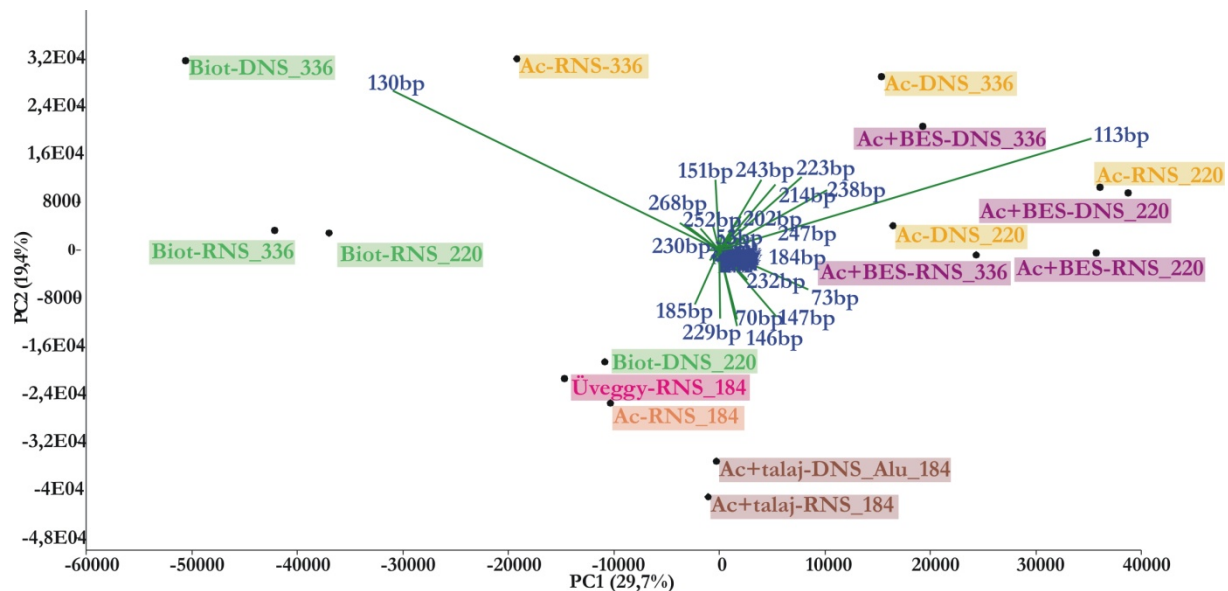
A 10. ábrán látható, hogy az egyes elválásokat leginkább két T-RFLP csúcs határozza meg. A sikeres, teljes deklorinációt végző közösségek meghatározó csúcsa a 130 bp-os, ami klónokkal történő beazonosítás után a *Dehalococcoides ethenogenes*-nek bizonyult. A részleges (c-DCE-ig illetve VC-ig történő) deklorinációt végző közösségek meghatározó csúcsa a 113 bp-os, amit *Sulfurospirillum halorespirans*-ként azonosítottunk. Ha az időbeli változásokat is figyelembe vesszük, látható az eltolódás az acetátos minta esetében a 220. és a 336. nap között: amint végbement a teljes deklorináció ebben a mintában (336. nap, lásd még 6. ábra), a 130 bp-os csúcs vált meghatározónak a 113 bp-ossal szemben rRNS alapon. Az acetát + BES minta esetében még a 336. napon is a 113 bp-os csúcs a meghatározó és ennek megfelelően még erre az időpontra sem történt meg a teljes reduktív deklorináció ebben a mintában (lásd még 6. ábra).

Hogyha megvizsgáljuk az elválásokat befolyásoló csúcsok (és a klónok alapján hozzájuk tartozó szervezetek) arányát az egyes mintában, akkor azt tapasztaljuk, hogy a kiindulási mintában a *Sulfurospirillum halorespirans* : *Dehalococcoides ethenogenes* arány 15,8 : 4,3%, a 220. napos acetátos mintában 32,5 : 0,3%, míg a 220. napos biotikus kontrollban ez az arány 2,4 : 0,3%. Időben (a VOC paraméterekkel összhangban) az arányok is eltolódtak, ugyanis a 336. napos acetátos mintában a *Sulfurospirillum halorespirans*

: *Dehalococcoides ethenogenes* arány 18,9 : 27,2% arányra változott, míg a biotikus mintánál 0 : 44,9% a két szervezet aránya. Ezek az adatok is alátámasztják, hogy a különböző szerkezetű bakteriális közösségek teljesen különböző dehalogenációs potenciállal rendelkeznek.



9. ábra. A háromfázisú mikrokozmosz minták *AluI* enzimmel emésztett futásainak főkomponens elemzése a kiindulási mintákkal együtt biplot funkció alkalmazásával (Kiind – kiindulási minta, Biot – biotikus kontroll, Ac – acetátos kezelés, Ac+BES – Acetát és BES együttes kezelése, Ac+talaj – második átoltás, harmadik fázis: talaj, acetát kezelése, Üveggy – második átoltás, harmadik fázis: üveggyöngy, 184, 220, 336 – az egyes mintavételi időpontokat jelöli napokban kifejezve).



10. ábra. A háromfázisú mikrokozmosz minták *AluI* enzimmel emésztett futásainak főkomponens elemzése a kiindulási minták nélkül biplot funkció alkalmazásával (Biot – biotikus kontroll, Ac – acetátos kezelés, Ac+BES – Acetát és BES együttes kezelése, Ac+talaj – második átoltás, harmadik fázis: talaj, acetát kezelése, Üveggy – második átoltás, harmadik fázis: üveggyöngy, 184, 220, 336 – az egyes mintavételi időpontokat jelöli napokban kifejezve).

Az egyéb, minor csúcsokat (pl. 185 bp, 229 bp, 70 bp, 146 bp, 147 bp, 73 bp), amelyek az újonnan összeállított (talajos, üvegyöngyös, acetátos) mikrokozmoszok elkülönülését határozzák meg, még nem sikerült klónokkal beazonosítani. Annyi látszik egyelőre az elemzésekből, hogy ezek a minták a biotikus kontroll 220. napos DNS mintájával alkotnak egy csoportot és sem a 130, sem a 113 bp-os csúcs nem határozza meg az elválásukat a többi mintától.

8. Összefoglalás

A 2008-ban kezdődő kísérleteink során célunk volt a sikeres deklorináló közösségek összetételének vizsgálata, a lebontásban résztvevő szervezetek meghatározása mind *in situ*, mind pedig jól körülhatárolt, laboratóriumi körülmények között polifázikus módszerekkel. Vizsgálni kívántuk továbbá a különböző adalékanyagok hatására bekövetkező változásokat a mikrobiális közösség szerkezetében és aktivitásában.

Az első munkaszakaszban adatbázist hoztunk létre a különböző szennyezett területekről származó minták kémiai és biológiai paramétereit felhasználva. Optimáltunk már eddig is alkalmazott molekuláris biológiai módszereket, illetve új módszereket is fejlesztettünk a deklorináló közösségek minél alaposabb vizsgálatához és a területeken végbemenő mikrobiológiai folyamatok jobb megértéséhez.

A második munkaszakaszban mesterséges ökoszisztéma szelekciós kísérleteket állítottunk be különböző (egyszerű és összetett) adalékanyagok alkalmazásával. Ezen kísérletek során a TCE részleges, VC-ig történő lebontását detektáltuk. A kiindulási degradációs potenciál minden kezelés esetében lecsökkent a kísérlet végére, a biotikus mintából sikerült egy *Dehalococcoides ethenogenes* klónt detektálni, illetve két klón esetében tudtunk csak részlegesen dehalogénező mikrobákat kimutatni (*Sulfurospirillum halorespirans*, *Dechloromonas denitrificans*). Az rRNS klónkönyvtárak összetétele a donor típusától függetlenül fakultatív anaerob *Pseudomonas-Acidovorax*, a tejsavós és a laktátos kezelés esetében fermentáló szervezetek dominanciáját mutatta, míg az összes adagolás esetében kometabolikus lebontásban résztvevő mikrobák domináltak.

A harmadik munkaszakaszban új mikrokozmosz kísérleteket állítottunk össze, különböző elektron donorok adagolásával, új anaerob technika (többek között *Mininert* szeptumok teflon borítású gumidugókra való lecserélése) és a kiindulási talajvíz minta koncentráálásával előállított inokulum alkalmazásával. Háromfázisú (szilárd-, víz- és gázfázis) mikrokozmoszokat is létrehoztunk. Ezzel a kísérlettel arról szerettünk volna megbizonyosodni, hogy a sikeres deklorinációhoz vajon szükséges-e „tapadási felületet” biztosítani a mikrobák számára. A kétfázisú mikrokozmoszok esetében gyors, azonban továbbra is csupán részleges deklorinációt tapasztaltunk. DNS és RNS alapon is meghatároztuk az ebben a folyamatban résztvevő mikrobiális közösségek összetételét. A háromfázisú mikrokozmoszok esetében a biotikus kontrollokban teljes reduktív deklorinációt és ezzel összhangban, a bakteriális közösségben *Dehalococcoides ethenogenes* dominanciát tapasztaltunk. Az acetátos és az acetát+BES kezelés esetében részleges deklorinációt és emellett *Sulfurospirillum halorespirans* dominanciát detektáltunk. Vizsgálati eredményeinket két új módszer alkalmazásával is megerősítettük.

A negyedik munkaszakaszban folytattuk a két- és háromfázisú mikrokozmoszok vizsgálatát, illetve új mikrokozmosz kísérleteket is összeállítottunk, a talaj helyett, üvegyöngyöt, mint inert hordozót alkalmazva.

A kétfázisú mikrokozmosz vizsgálatok során a propionát kezelésű mikrokozmoszok kivételével mindenhol részleges deklorinációt tapasztaltunk. Az acetát, a laktát, a butirát és a melasz kezelésű mikrokozmoszoknál jelentős eltérést tapasztaltunk az egyes párhuzamosok kémiai és biológiai eredményeiben. A laktátos és az acetátos kezelés tűnik a legígéretesebbnek, mivel itt megjelent és fokozatosan nőtt a VC felszabadulás, itt idővel akár

teljes dehalogenáció is végbemehet.

A háromfázisú mikrokozmoszok esetében a biotikus mintáknál, ahol nem történt sem szénforrás, sem elektrondonor adagolás, csak a megfelelő felületet biztosítottuk a kiindulási mikrobaközösségnek, már a 220. napra gyors és teljes degradáció ment végbe. Az acetátos kezelésű mikrokozmoszok esetében az acetát, mint szénforrás adagolásával kompetíció jöhetett létre a dehalogenáló és fermentáló szervezetek között és így csak a 336. napra tudunk teljes – eténig történő – reduktív deklorinációt detektálni. Az acetát és BES egyidejű adagolása a metanogén szervezeteket gátolhatta, előidézve ezzel a degradációban résztvevő kometabolikus partner gátlását, így a 220. napra c-DCE-ig, a 336. napra pedig VC-ig történő lebontás történt ezekben a mintákban.

Az új mikrokozmoszok vizsgálatokból kiderült, hogy a talaj nemcsak a biofilm képzéshez volt elengedhetetlen, de valószínűleg nagy szerves anyag tartalmával is hozzájárult a sikeres deklorináló közösség működéséhez.

A kísérletsorozat végén meghatároztuk, hogy a sikeres deklorináló közösségre jellemző:

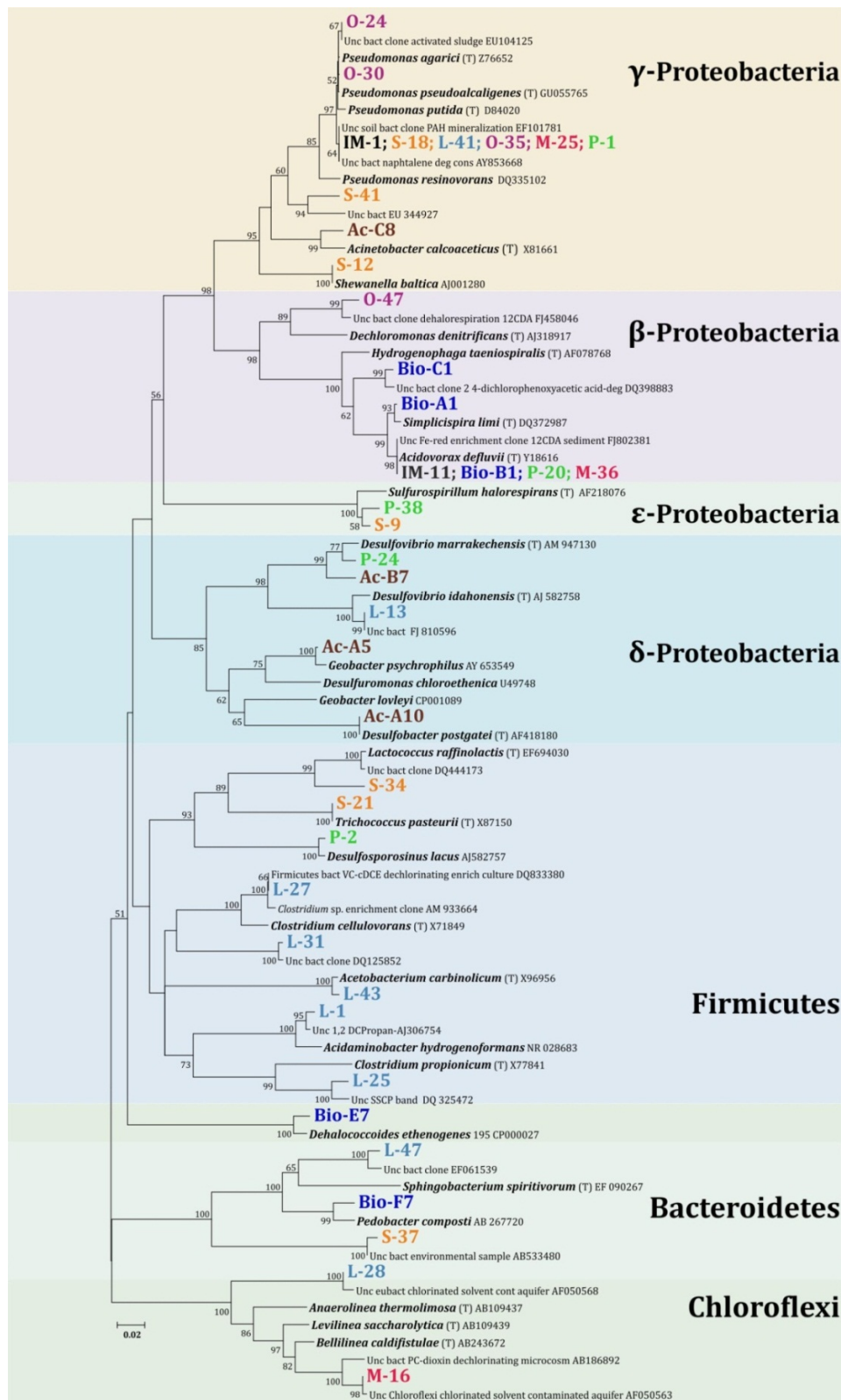
- a *Dehalococcoides ethenogenes* dominanciája, más, részleges lebontásban résztvevő baktériumokkal (pl. *Sulfurospirillum halorespirans*) szemben;
- a mikrobiális diverzitás csökkenés – a lebontásban résztvevő szervezetek szelektálódása;
- hogy, ha fermentáló szervezetek is jelen vannak (pl. komplex szerves vegyületek adagolásakor), a kialakuló kompetíciós viszonyok miatt a lebontás folyamata lassabb;
- hogy szintén lassíthatja a lebontás folyamatát, ha a lebontásban résztvevő kometabolikus partnereket gátoljuk (BES adagolás);
- hogy szükséges szilárd fázis megléte a biofilm képzéshez;
- hogy elengedhetetlen megfelelő mennyiségű hozzáférhető szerves anyag jelenléte.

Négy új, az eddigiek során általunk még nem alkalmazott módszert (MDA, SNUPE, SEM és FISH) optimaltunk a deklorináló mikrobiális közösség vizsgálatára.

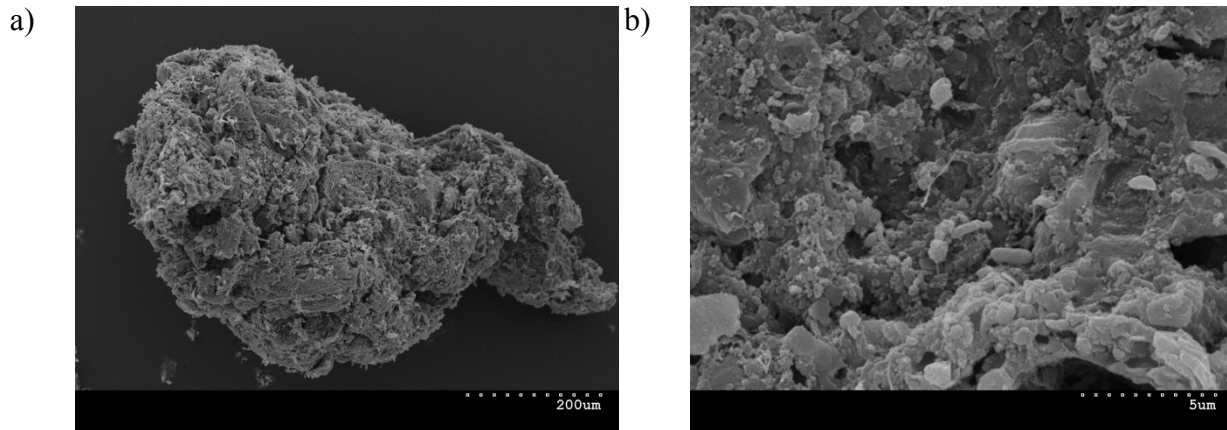
Megállapítottuk, hogy a közösségi DNS alapú vizsgálatokkal szemben, illetve azokkal együttesen alkalmazva a valós aktivitással jobban korreláló RNS alapú vizsgálatok szükségesek a deklorinációban résztvevő mikrobiális kapcsolatok feltárásához.

A pályázat egy előre nem tervezett pozitív eredménnyel is zárult, ugyanis a teljes lebontást végző kultúrák (egy dúsítást követően, folyamatos monitorozással) akár *in situ* bioaugmentációnál (oltóanyag bejuttatása) is használhatóak, azon a területen, ahonnan a kiindulási minták származtak. A bioaugmentációs technológiák fő problémája, hogy a beadagolás során alkalmazott baktérium kultúrát kiszoríthatják az autochton mikroorganizmusok. A mi esetünkben azonban az autochton közösség TCE lebontásban résztvevő tagjait sikerült feldúsítanunk, így elkerülhető, hogy a honos közösség eliminálja a beadagolt mikrobákat és ezzel sikeres bioremediáció hajtható végre a szennyezett területen.

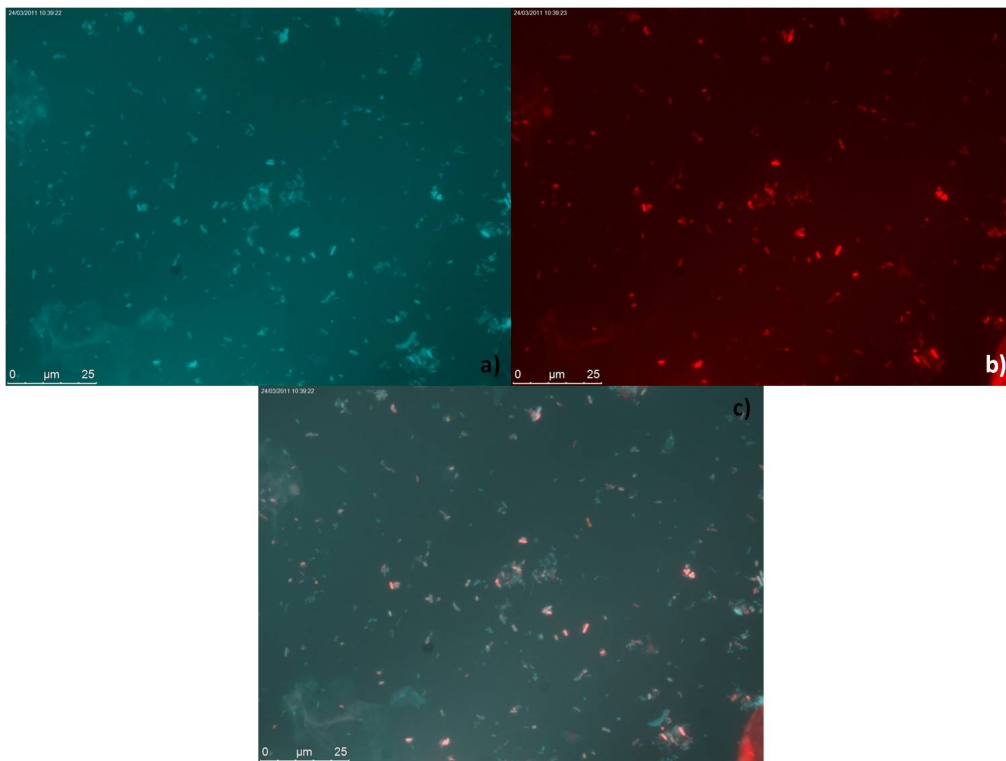
9. Mellékletek



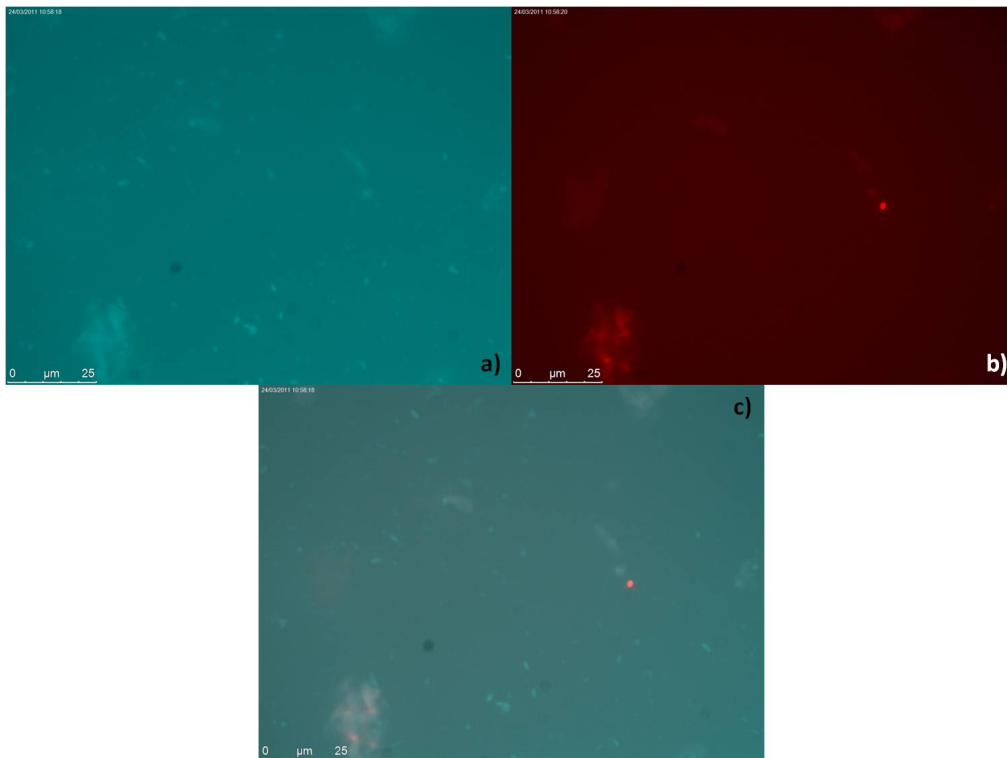
M/1. ábra. A 209 napos mikrokozmoszok 16S rRNS klónkönyvtáraiból nyert klón szekvenciák a különböző donor adagolások függvényében (IM – kiindulási minta, Bio – biotikus kontroll, Ac – acetátos kezelés, S-savós kezelés, P-propionátos kezelés, L-laktátos kezelés, M-melaszos kezelés, O-emulzifikált olajos kezelés).



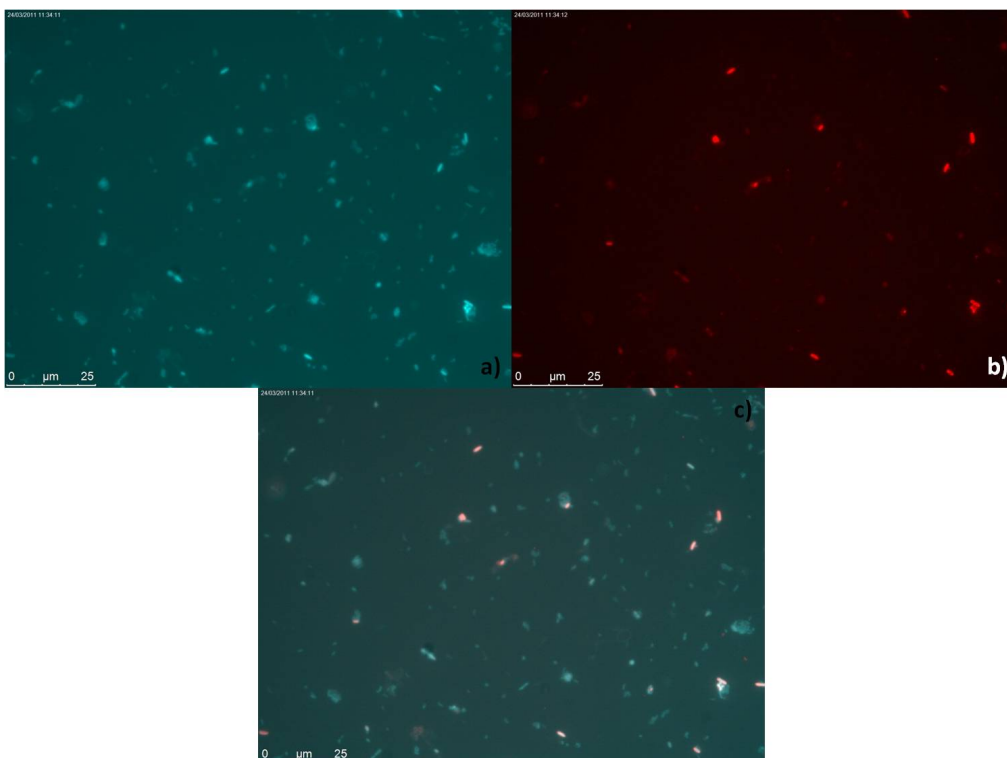
M/2. ábra. Pásztázó elektronmikroszkópos képek – acetát kezelésű mikrokozmoszokból származó fagyasztva szárított talajminták. A vizsgálatok során biofilm képződés volt megfigyelhető; a) különálló talajszemcse képe (skála 200 μm) és b) a talajszemcsén kialakult biofilm felszíni képe (skála 5 μm). A mintákat HITACHI S-2600N pásztázó elektronmikroszkóppal vizsgáltuk (SEM) 15 kV gyorsító feszültséget alkalmazva.



M/3. ábra. Fluoreszcens *in situ* hibridizációs képek – acetát + BES kezelésű mikrokozmoszokból származó vízminták; a) DAPI festéssel jelölt sejtek, b) Eubacteria specifikus próbával (EUB-338-Cy3) történt hibridizáció, c) a DAPI festés és az Eubacteria specifikus próba hibridizációs képe egymásra fektetve.



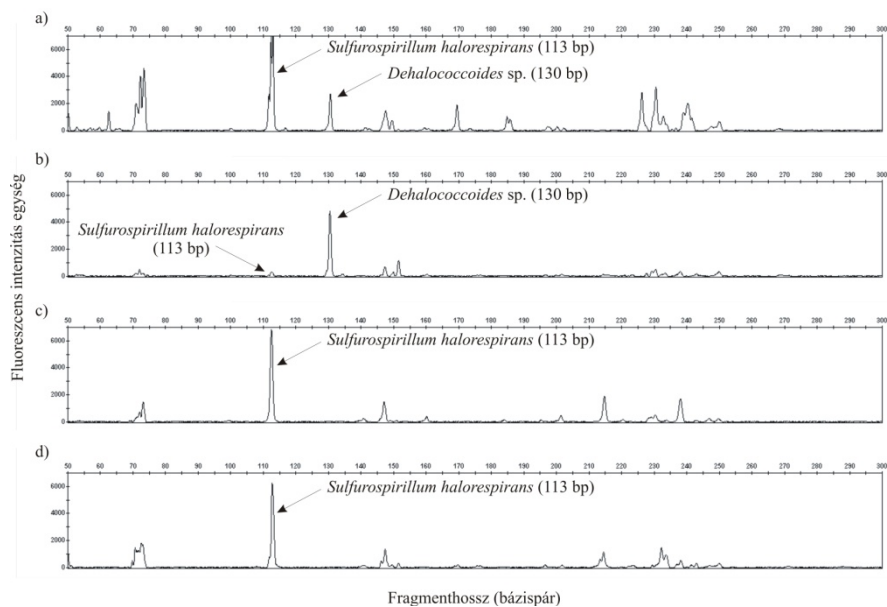
M/4. ábra. Fluoreszcens *in situ* hibridizációs képek – acetát kezelésű mikrokozmoszokból származó vízminták; a) DAPI festékekkel jelölt sejtek, b) *Dehalococcoides* genus specifikus próbával (DHE-537-Cy3) történt hibridizáció, c) a DAPI festés és a *Dehalococcoides* genus specifikus próba hibridizációs képe egymásra fektetve.



M/5. ábra. Fluoreszcens *in situ* hibridizációs képek – acetát kezelésű mikrokozmoszokból származó vízminták; a) DAPI festékekkel jelölt sejtek, b) Archaea specifikus próbával (ARCH 915-Cy3) történt hibridizáció, c) a DAPI festés és a Archaea specifikus próba hibridizációs képe egymásra fektetve.



M/6. ábra. Fluoreszcens *in situ* hibridizációs képek – acetát+BES kezelésű mikrokozmoszokból származó vízminták; a) DAPI festéssel jelölt sejtek, b) Archaea specifikus próbával (ARCH 915-Cy3) történt hibridizáció, c) a DAPI festés és a Archaea specifikus próba hibridizációs képe egymásra fektetve.



M/7. ábra. Közösségi T-RFLP elemzés eredményei. *AluI* endonukleázzal emésztett rRNS minták közösségi elektroferogramjai a (a) kiindulási mintában, (b) biotikus kontrollban, (c) acetát és (d) acetát+BES kezelésű mikrokozmoszokban.

M/1. táblázat A háromfázisú mikrokozmoszokba adagolt talaj kémiai paramétereit.

Kémiai paraméter	Mértékegység	Érték	Módszer
pH	-	6.8	EPA Method 9045B
Foszfor	mg kg ⁻¹	694	EPA Method 3051:1996, EPA Method 6010B:1996
Összes nitrogén	mg l ⁻¹	160	MSZ EN 12260:2004
TOC (összes szerves szén)	% (m m ⁻¹)	21	
TIC (összes szervesetlen szén)	% (m m ⁻¹)	14	DIN ISO 10694
TC (összes szén)	% (m m ⁻¹)	34	
Szerves anyag (izzítás)	% (m m ⁻¹)	61.75	MSZ 08-0012-6:1987