

## A talaj-mikrobióta vizsgálata foszfolipidek alapján I. Szükségesség és alkalmazási lehetőségek

### A mikrobióta vizsgálatának szükségessége és nehézségei

A talajok termékenysége, anyagkörforgalmi transzformációs és tározó potenciálja, homeosztázisa, regenerációja, valamint Földünk biogeokémiai ciklusaiban betöltött szerepe – ma már tudjuk – nagyrészt mikroorganizmusok tevékenységén alapul. A mikroorganizmusok Földünk élő biomasszájának jelentős hányadát képviselik. A mikrobiális biomasszához köthető többek között a földi N-kötés és denitrifikáció jelentős hányada, a C-körforgalomban a mineralizáció szárazföldekre jutó részének kb. 80%-a. Ugyanakkor az immobilizált szén jelentős része is a mikroorganizmusok ellenőrzése alatt áll. A humusz (széntartalma globálisan 700–3000 Gt) – melynek keletkezésében és bomlásában is a mikrobáké a döntő szerep – becslések szerint a légkör széntartalmának (700 Gt) 1–4-szeresét teszi ki (WOODWELL et al., 1978), míg a tőzegé (165–862 Gt: HAMPICKE, 1979) is elérheti a légkör szénkészletének nagyságát. Nagyjából a mikrobák működésének köszönhető a talajok szerkezetét, vízháztartását, tápanyagmegkötő képességét befolyásoló lipidek (JANDL et al., 2004) és humuszanyagok képződése. Mikrobák végzik olyan anyagok eltávolítását, melyek felhalmozódása vagy tartós jelenléte átalakítaná a vizeket, a talajt és növényzetét (pl. holt biomassza, állati ürülék; növényvédő szerek és más humán eredetű szerves szennyezők). Mindezek mellett a mikroorganizmusok egy része különösen érzékeny a különböző környezeti hatásokra, melyekre adott válaszként a biomassza, a közösségi struktúra és különböző aktivitások, valamint különböző *biomarkerek* változása tükrözi (WHITE et al., 1998). Az *általános indikátor elv* (JUHÁSZ-NAGY, 1993) alapján biomarkerek alatt mérhető, az adott élő rendszer állapotát, hatásokra adott válaszait tükröző, anatómiai/sejtteni vagy biokémiai indikátorokat értjük.

Egy életközösség szerkezetvizsgálatának kiinduló megállapításaként írja JUHÁSZ-NAGY (1993): „semmilyen működő rendszerre nem tehető fel annál egyszerűbb kérdés, hogy *hány féle* komponens szerepel benne és *milyen mennyiségben*”. A „hány féle” kérdésre adott válasz lehet egy (taxon-, enzim- stb.) lista, a „milyen mennyiségben” kérdésre valamilyen tömegesség, *abundancia*. Míg a „hány féle” a Darwin előtti élettudományok fő kérdése volt, az *abundancia* problémája a florisztikai–faunisztikai művek ritka/gyakori megjelöléseiben merült ki. A tudománytörténet egyik első *abundancia*-becslésére Charles Darwin érzett készletet, amikor angliai legelők talajában a földgigiliszták biomasszáját mérte fel (DARWIN, 1881; JUHÁSZ-NAGY, 1993). Darwint talán a kihívás inspirálta: más élőhelytípusokhoz képest a talaj biótájának felmérése sajátos metodikai problémákkal jár. E megállapítás különösen igaz a talajok mikrobiótájára, amelynek tagjai közvetlenül csak mikroszkóppal figyelhetők meg. A talaj szemcsés

szerkezetéből adódó mikroheterogenitása a mikrobióta szerkezetét századmilliméteres térbeli léptékben formálja heterogénné, amihez gyakran órában mérhető időbeli változatlanság járul. A közösségeknek vannak metabolikusan aktív és „vegetáló” tagjai, melyek csak a környezeti változók adott irányú eltolódásával aktivizálódnak és töltenek be aktív szerepet. Számolni kell halott sejtek, mikrobiális „múmiák” jelenlétével is, melyek egyrészt elvi hibát okozhatnak (mivel egyes vizsgálati módszerek nem tudják elkülöníteni őket az élő sejtektől), másrészt valós szerepet is betölthetnek a talaj anyagforgalmában adszorpciós felületük, kiszabadult enzimeik és a sejtmaradványaikat felépítő elemek immobilizálása révén. A megismerés további gátja, hogy a mikrobafajok nagy részének jelenleg nem ismerjük a minimális tenyészkörülményeit. Talajból izolált DNS re-asszociációs kinetikája alapján egy 30 g-os talajmintában akár 4000 is lehet a különböző baktérium-genotípusok száma. Ilyen adatok alapján becsülve talajokban akár a 99%-ot is meghaladhatja a (megfelelő módszer hiányában) nem tenyésztendő baktériumfajok aránya (TORSVIK et al., 1990). Mindezen túl a mikrobióta genetikai készlete a mutáció, szelekció, DNS-hibajavítás, transzformáció, transzfúzió, transzdukció, konjugáció jelenségei, valamint a plazmidok révén állandóan változik, és ez szükségszerűen kihat az enzimmészlet tér- és időbeli dinamikájára. A kutató így e közösségek „fekete doboz” jellegével kénytelen szembesülni. Ugyanakkor a talaj-mikrobióta mennyiségi viszonyait, struktúráit és funkcióit célzó vizsgálatok komoly bioindikációs értékek lehetnek (DOMBOS & SZALKAI, 2004), jelentős gyakorlati segítséggel bírhatnak, ha egy talaj állapotát, egy kezelés vagy szennyezés hatását próbáljuk megismerni. Ilyen esetekben olyan könnyen kimutatható, jól követhető és lehetőleg kvantitatív mérhető markerekre, indikátorokra van szükség, melyekből a talaj belső történéseire, állapotára következtethetünk, és abból viselkedését megfelelő megbízhatósággal jósolni tudjuk. Mindebből két figyelembe veendő következtetés adódik:

1. fontos tisztázni, milyen céllal vizsgáljuk a mikrobiális közösségeket,
2. a feltett kérdésekhez különös megfontoltsággal kell kiválasztanunk a megfelelő megközelítési módot, vizsgálati módszert.

A mikrobióta közvetlen vizsgálata mikroszkópos technikák segítségével lehetséges. Ez a megközelítés azonban (különösen a csekély morfológiai változatosságot mutató baktériumflóra esetén) nem ad részletes választ a „hány féle” kérdésre. Az immunfluoreszcens (DAZZO & WRIGHT, 1995), ill. fluoreszcens *in situ* hibridizációs (AMANN, 1995) technikákkal lehetséges a mikroorganizmusok *taxon-specifikus* jelölése, de egy mintából már 8–10 különböző taxon-specifikus szondával végzett sejtszámlálásra is alig akad példa (ZARDA et al., 1997; MOGGE et al., 2000), mivel így gyakorlatilag lehetetlen a nagy taxonómiai változatosság feloldása.

Az elkülöníthető mikroorganizmus-csoportok (többnyire: baktériumok, ill. gombák) mikroszkópos sejtszámlálással történő abundancia-vizsgálatát a talajszemcsék és más mikroorganizmusok takaró hatása, a sejtfestékek agyagásványok és humuszanyagok felületén végbemenő aspecifikus adszorpciója nehezíti. A talaj térfogatának kis részét kitevő mikrobiótának a kivonására és tisztítására léteznek ugyan különböző eljárások (homogenizálás az adszorpcióban fontos kétértékű kationok ioncserés megkötése és detergensnek használata mellett; ülepités centrifugálással, ill. sűrűséggradiens-centrifugálás: TORSVIK, 1995), de a kinyerés hatékonysága gyakran nem haladja meg a 30%-ot, ráadásul még szelektív is (STEFFAN et al., 1988).

### A mikrobióta biomolekulákra alapozott közvetett vizsgálata

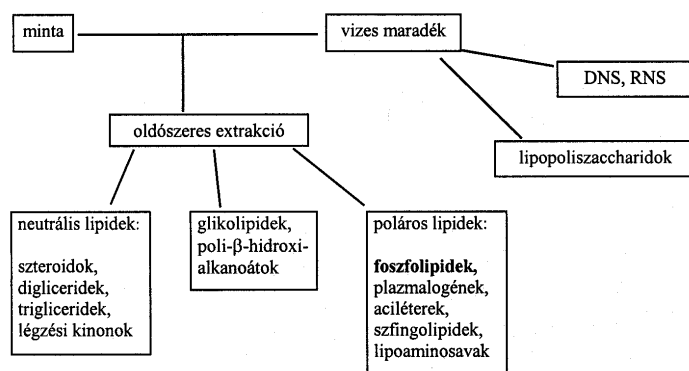
Közvetett vizsgálat esetén nincs szükség a sejtek és a talaj más részeinek elkülönítésére. Az abundancia-viszonyokra következtethetünk, például:

1. az enzimaktivitás alapján;
2. a mikrobióta fumigációs elpusztítása után felszabaduló biomassza-eredetű specifikus vegyületek mérésével;
3. a mikrobióta univerzális vagy valamilyen csoportjára specifikus biomolekuláinak közvetlen analízise alapján.

Az (1)-re példa a szubsztrát-indukált respiráció (SIR) (ANDERSON & DOMSCH, 1978) mérése. [E módszer 25 éves alkalmazásának tapasztalatait foglalja össze és értékeli SZILI-KOVÁCS (2004).] Az enzimaktivitás-vizsgálatokra általánosan érvényes, hogy a szubsztrát hozzáadása önmagában zavaró tényezőnek számít (WHITE, 1995). A (2)-ben jelzett módszerek a kloroform-fumigációs inkubáció (JENKINSON & POWLSON, 1976), ill. a kloroform-fumigációs extrakció (VANCE et al., 1987) elvén működnek. [Kritikai áttekintés: JENKINSON et al., 2004.] A (3)-ban említett biomolekulák a nukleinsavak (biomasszára: ATP, taxongazdagságra: DNS, RNS), valamint a légzési láncban (kino-nok), a sejtfalban (muraminsav, hexózaminok), a sejtmembránban (foszfolipidek, éter-lipidek, ergoszterin) jelen lévő vegyületek. Szerves oldószeres extrakció során több családjukat (1. ábra) egy talajmintából, egymástól elkülönítve vonhatjuk ki (WHITE et al., 1998). A DNS, RNS alapján történő kimutatás mellett a lipidanalízissel kapott spektrum is használható az adott mikroba „ujjlenyomataként”, speciális lipidek talajból, vizekből stb. való kimutatásával egyes mikrobák jelenlétére következtethetünk. Az ilyen lipideket WHITE (1995) *signature lipid biomarker*-nek (SLB), az erre alapozott megközelítést *SLB-analízisnek* nevezi.

A közvetett abundancia-bebecslésre alkalmazható biomolekuláknak a következő kritériumoknak kell megfelelni:

1. csak élő mikroorganizmusokban lehetnek jelen (a sejt halála után, ill. az élő sejtől kikerülve gyors bomlást kell elszenvedniük);
2. kvantitatívan kivonhatók és megfelelő érzékenységgel mérhetőek legyenek;



1. ábra

Oldószeres extrakció során a talajokból kinyerhető biomolekulák (WHITE et al., 1998)

3. nagyjából azonos koncentrációban legyenek jelen különböző mikroorganizmus-sejteknél (TUNLID & WHITE, 1992), azaz mennyiségük arányos legyen a jelezni kívánt biomasszával;

4. specifikusak legyenek a vizsgálni kívánt csoportra.

E kritériumokkal szemben a fent felsorolt biomolekulák egyike sem tekinthető ideálisnak. Abundancia-becslés céljára elméleti problémákkal a legkevésbé terhelt és a gyakorlatban is egyre terjedő választás a foszfolipidekre irányul, melyek a mikrobióta szerkezetére vonatkozó információt is nyújtanak.

### Foszfolipidek, zsírsavak

A biomolekulák különleges csoportját alkotják a *lipidek*. E vegyületek szerkezetileg nem olyan egységesek, mint a nukleinsavak, a fehérjék vagy a szénhidrátok. A különféle lipidek egyetlen közös vonása, hogy vízben rosszul, *zsiroldószerekben* (apoláris oldószerekben, pl. kloroform, éter, benzol stb.) jól oldódnak, ezekkel a különféle szövetekből, mátrixokból kivonhatók. E meglehetősen gyakorlatias meghatározás biokémiai szemléletű alternatívája szerint a lipidek csoportjába (1. táblázat) a zsírsavak és származékaik, valamint a velük bioszintézisük vagy a szerkezetben betöltött szerepük révén kapcsolatban álló vegyületek tartoznak („Lipids are fatty acids and their derivatives, and substances related biosynthetically or functionally to these compounds”: CHRISTIE, 2003).

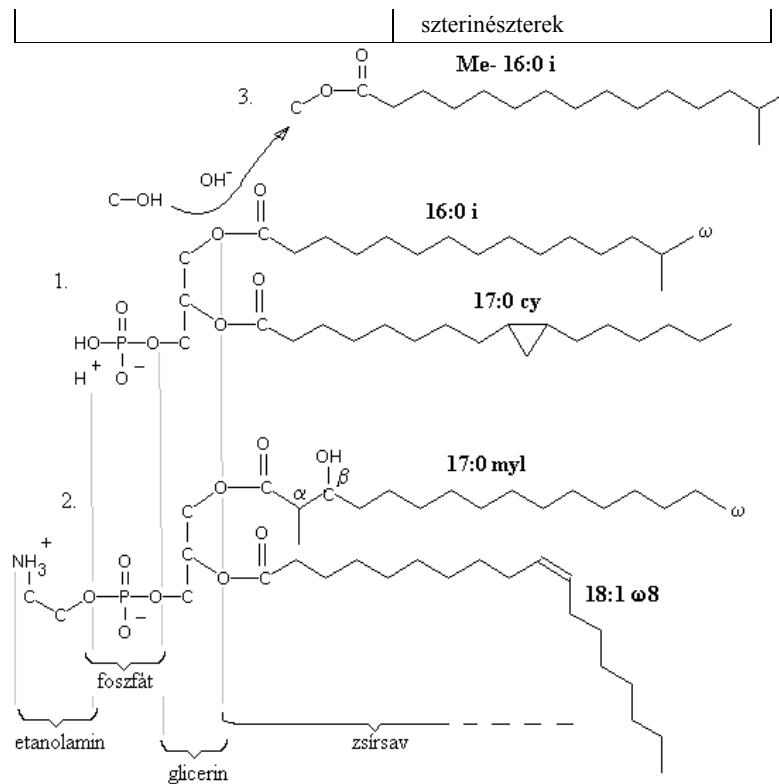
A foszfolipidek az összetett lipidek csoportjába tartoznak, bennük glicerín, karbonsav (zsírsav) és foszforsav kapcsolódik össze (2. ábra), a foszfátcsoporthoz a glicerín mellett szerin, etanolamin, kolin, másik glicerín stb. kapcsolódhat (2. ábra: *R-csoport*). Így az egy molekulán belül jelenlévő két különböző polárosságú rész miatt apoláros/poláros határfelületekhez kötődnek, és a biológiai membránok fő alkotórészeit képezik.

Az élő sejt pusztulásával a membránok integritása viszonylag hamar megszűnik, a különböző miliókben jelenlévő foszfátok a foszfolipidek foszfátészter-kötéseit intenzíven hasítják, és így gyors lebomlásukat okozzák (WHITE et al., 1979; TOLLEFSON & MCKERCHER, 1983). Az általánosan alkalmazott izolálási–tisztítási módszerek hatékonyan különítik el a foszfolipideket bomlástermékeiktől, így az abundancia-becslésre való alkalmasság 1. kritériumának e molekulák megfelelnek. A 2. kritériumra általános megoldás az ún. módosított Bligh–Dyer-féle extrakció (BLIGH & DYER, 1959; WHITE et al.,

1. táblázat

A lipidek osztályozása, a főbb lipidtípusok

Egyszerű lipidek (nem szappanosíthatók)	Összetett lipidek (szappanosíthatók)
szabad zsírsavak izoprenoid lipidek (szterinek, karotinoidek, monoterpének, kinonok stb.) tokoferolok	mono-, di- és triacil-gliceridek <i>foszfolipidek</i> (foszfátidok) glikolipidek diollipidek viaszok



2. ábra

A foszfolipidek szerkezete. 1. molekula: *isohexadekanoil-cycloheptadekanoil-glicero-foszfát*,  
 2. molekula: (2-metil-3-hidroxi-heptadekanoil)-(ω8-oktadekanoil)-glicero-foszfóetanolamin,  
 3. molekula: az 1. molekulából lúgos metanolízissel keletkező metil-*isohexadekanoát*. A képlet-  
 ken csak az O- és N-kötött szénatomokat jelöltük betűvel is, a C-kötött H-atomokat nem jeleztük

1979). A foszfolipidek raktározva nem fordulnak elő, így e sejtalkotó molekulák össz-  
 mennyisége a sejtfelülettől függ, arányos a biomasszával. A sejtfelület betüremkedései  
 módosítják a foszfolipid-mennyiség biomassza-függését. Figyelembe véve azonban azt  
 a tényt, hogy a mikroorganizmusok adszorptív táplálkozása, anyagcseréjének jelentős  
 része a membránhoz kötött, a sejtfelület közvetlenebb kapcsolatban állhat az adott mik-  
 roorganizmus ökológiai jelentőségével, mint a sejttérfogat. A foszfolipidek mennyiségét  
 foszfolipid-foszfát (L-PO<sub>4</sub>, ill. PLP, nmol/g), ill. foszfolipid-zsírsv (PLFA, nmol/g)  
*anyagmennyiség per száraztömeg* formában adják meg, a *zsírsvtömeg per száraztömeg*  
 formában kifejezett érték értelmezésében ugyanis problémát okoz az egyes zsírsvtípu-  
 sok akár jelentősen is eltérő móltömege. Mindezek alapján a foszfolipidek a 3. kritéri-  
 umnak is elég jól megfelelnek. A legtöbb elvi és gyakorlati korlátot a 4. kritérium  
 okozza. A foszfolipidek (gyűjtőfogalomként) ugyanis a baktériumok és eukarióták  
 körében univerzálisak. (A metanogének és más archaebaktériumok membránjában éter-  
 lipidek szerepelnek helyettük.) A talaj-mikrobióta pontos biomasszabecsléséhez tehát  
 elengedhetetlen a „makrobióta”: a gyökerek, talajállatok szitálással, aprólékos kézi

válogatással stb. való eltávolítása. A foszfolipideket alkotó zsírsavak (PLFA) azonban változatosak, előfordulásukat az adott taxon zsírsav-anyagcserében aktív enzimatikus működése szabja meg. Ez egyrészt a genotípus által meghatározott enzimkészlet, másrészt környezeti adaptáció függvénye, ugyanis az élő sejtek foszfolipidjeik zsírsav-összetételének szabályozása által tartják megfelelő szinten membránjaik fiziko-kémiai paramétereit (fluiditását). Egy sejt membránjának fő zsírsavai általában univerzálisak, a taxon-specifikusak pedig *minor komponensek*: általában csak kis részét alkotják az össz-PLFA-mennyiségnek, és arányuk változó, erősen függ például a hőmérséklettől.

Az egyes PLFA-k tehát – bár utalhatnak egyes taxonok jelenlétére, részarányának tér- és időbeli dinamikájára – adott taxon biomasszabecslésére kevésbé alkalmasak.

A zsírsav-taxonspecifitás megismerésének elvi korlátját adja, hogy csak tiszta tenyészetből tudjuk egy adott faj PLFA-összetételét meghatározni. Ezzel a korláttal számolni kell, jóllehet tudjuk, hogy a nagyobb csoportok szintje (Actinobacteria,  $\delta$ -Proteobacteria) alatt a PLFA-típusok eléggé általánosak, így egy jelenleg nem tenyészhető faj PLFA-típusaira a DNS-alapon megállapított a taxonómiai helye alapján következtethetünk.

A talajból kivont foszfolipidek a foszfolipid-foszfátban, ill. -zsírsavban kifejezett össz-mennyiségük (L-PO<sub>4</sub>, ill. PLFA) alapján lehetőséget adnak a talaj-mikrobióta *baktérium* + *mikroeuکاریóta* biomasszájának jellemzésére, foszfolipidzsírsav-spektrum alapján pedig egyes tágabb taxoncsoportok jelenlétének, tér- és időbeli dinamikájának megállapítására; ezáltal az életközösség szintjén történő érzékeny bioindikációra. A foszfolipidek alapján számolt biomassza jól egyezik a direkt sejtszámlálással és más biomolekulák (ATP, muraminsav: BALKWILL et al., 1988) valamint a kloroform-fumigációs extrakció alapján (LECKIE et al., 2004) kapott adatokkal, ugyanakkor a foszfolipid-analízis eredményei rendszerint kisebb szórással bírnak. Az össz-PLFA-mennyiség értékelésénél segíthet, ha figyelembe vesszük, hogy a baktériumok átlagosan 100  $\mu$ mol PLFA-t tartalmaznak 1 g száraztömegre vetítve, ami átlagosan  $2,0 \times 10^{12}$  sejtnek felel meg (BALKWILL et al., 1988).

#### *A zsírsavak szerkezete, típusai, elnevezései*

A zsírsavak karbonsavak, melyek a zsírsavszintetáz-komplex segítségével a malonil-CoA-ból, mint kiindulási anyagból szintetizálódnak. Szabadon is előfordulnak, mint a membránlipidek komponensei, valamint az anyagcsere köztermékei, különböző lipidek prekursorai vagy lebontási köztermékei. Általában páros szénatomszámú alifás vegyületek, de előfordulnak páratlan szénatomszámú elágazó komponensek is.

A zsírsavak elnevezésénél itt az általános gyakorlatot követjük (ZELLES, 1999; CHRISTIE, 2003). Számmal adjuk meg a teljes szénatomszámot a láncvégi karboxilcsoportot és az oldalláncokat is beleértve. A teljes szénatomszám után kettősponttal elválasztva adjuk meg a kettős kötések számát. Ezt követően a kettős kötések helyzetét számmal adjuk meg a karboxilcsoporttól számolva, ill.  $\omega$  jelzést követően az alifás láncvégtől ( $\omega$ ) számolva. (A főlánc szénatomjait a görög ABC betűivel jelöljük úgy, hogy a karboxilcsoport melletti szénatom  $\alpha$ , majd tovább az alifás vég felé haladva  $\beta$ ,  $\gamma$  stb. jelölést kapnak. A alifás lánc „utolsó szénatomja”  $\omega$  jelzésű.) Ez utóbbi mód elmentmond annak a szabálynak, hogy a funkciós csoportok helyzetét a karboxilcsoporttól

számítjuk, de a láncvégtől számítva jobban előtűnik, milyen anyagcsereúton jöhetett létre az adott zsírsav, jobban látszanak az azonos prekursorok (a zsírsavak láncossza gyakran változik  $\beta$ -oxidációval, ill. láncosszabbítással, mindkettő a karboxilcsoportnál megy végbe). A kettős kötés helyzete után annak cisz/transz helyzetét (ha ismerjük) *c*, ill. *tr* jel mutatja. Az utolsó előtti szénatomon metilcsoportot tartalmazó zsírsavakat *iso*, a kettővel előtti szénatomon metilcsoportot tartalmazókat *anteiso*, a ciklopropilcsoportot tartalmazókat *cyclo*, az -OH-csoportot tartalmazókat *hidroxil-*(szubsztituált) névvel, ill. a kettős kötések száma utáni „i”, „a”, ill. a pozíció számát követő „cy”, „OH” rövidítésekkel jelöljük. Az eddigiektől eltérő pozícióban elágazódó alkilcsoportot a pozíció számát (ha ismerjük) követő metil, etil, propil stb. nevet és „Me”, „Et”, „Prop” stb. jelölést kap. Az  $\alpha$ -elágazó,  $\beta$ -hidroxil-zsírsavakat *mikolsavak*nak nevezzük és (tekintet nélkül az elágazás szénatomszámára) „myl”-lel jelöljük. A zsírsav-metilészterek esetében a metil-észterre „Me-” előtag utal. A 2. ábrán jelzett modell-foszfolipidek mutatnak négy példát a felsorolt zsírsavtípusokra.

#### Foszfolipid-zsírsavak, mint biomarkerek

A nagyfokú molekulaszervezeti változékonysággal rendelkező foszfolipidek és az ezeket alkotó foszfolipid-zsírsavak spektruma alkalmas mikroorganizmusok taxonómiai meghatározásához (SASSER, 1990). A taxonómiai célú PLFA-kutatás folyamatosan bővíti azokat az ismereteket, melyek alapján talajok, vizek stb. PLFA-spektruma bioindikátorként használható (PARKES, 1987). (A gyakoribb mikrobacsoportokra jellemző főbb foszfolipid-zsírsavakat a 2. táblázat tartalmazza.) Az alábbiakban néhány példával világítjuk meg a PLFA-analízis bioindikációs lehetőségeit.

#### 2. táblázat

A gyakoribb mikrobacsoportokra jellemző foszfolipid-zsírsavak

Jelölés	Elnevezés	Előfordulás, indikációs lehetőség
<i>PLFA</i>	foszfolipid-zsírsavak	biomassza
<i>SATFA</i>	Telített észterkötésű zsírsavak	Bacteria, Eucarya
-	egyenesláncú	Bacteria, Eucarya
i, a, Me	elágazó láncú	Gram-pozitív baktériumok
cy	ciklopropil	Gram-negatívok, <i>Clostridium</i> , <i>Bifidobacterium</i>
<i>MUFA</i>	egyszeresen telítetlen észterkötésű zsírsavak	
16:1 $\omega$ 6	16-os láncossz, 1 kettős kötés az $\omega$ 6. helyen	I-es típusú metanotrófok
18:1 $\omega$ 8	18-as láncossz, 1 kettős kötés az $\omega$ 6. helyen	II-es típusú metanotrófok
<i>PUFA</i>	többszörösen telítetlen észterkötésű zsírsavak	Eucarya, cianobaktériumok
<i>PLOH</i>	észterkötésű hidroxil-szubsztituált zsírsavak	
$\alpha$	-OH a karboxilcsoport melletti 1. szénatomon	Gram-negatívok, <i>Actinobacteria</i>
$\beta$	-OH a karboxilcsoport melletti 2. szénatomon	<i>Mycobacterium</i>
$\omega$	-OH az $\omega$ -szénatomon	gombák
<i>UNSF</i>	nem észterkötésű zsírsavak	Anaerob baktériumok
<i>UNOH</i>	nem észterkötésű hidroxil-szubsztituált zsírsavak	Anaerob baktériumok
$\alpha$	-OH a karboxilcsoport melletti 1. szénatomon	<i>Sphingomonas</i> , <i>Candida</i>
$\beta$	-OH a karboxilcsoport melletti 2. szénatomon	<i>Bacteroides/Flavobacterium</i>

myl	mikolsavak ( $\beta$ -hidroxi-, $\alpha$ -elágazás)	<i>Mycobacterium, Nocardia</i>
-----	---	--------------------------------

Az egyszerűen telítetlen zsírsavak (MUFA) a mikroeukarióták (eukarióta mikrobák), a Gram-negatív, ill. Gram-pozitív baktériumok körében előfordulnak, de az utóbbi csoportban (az előbbi kettővel szemben) rendkívül kis mennyiségben. Így az egyszerűen telített zsírsavakat a mikroeukarióták és a Gram-negatív baktérium bioindikációjára használják (RATLEDGE & WILKINSON, 1988).

A kétszeresen telítetlen linolsav (18:2 $\omega$ 6,9) egyes vizsgálati eredmények szerint a gombák jó biomarkere. FEDERLE (1986) számos talajban élő gombában megtalálta e jellegzetes zsírsavat. FROSTEGÅRD és BAÁTH (1996) különböző művelésű területek PLFA-vizsgálatakor pozitív korrelációt tapasztalt e komponens és számos más gomba-biomarker között (pl. ergoszterin). SUNDH és munkatársai (1997) ezzel ellentétes eredményt kaptak egy tőzegláp tanulmányozásakor: nem találtak szoros összefüggést a linolsav, valamint más gomba-biomarkerek között. Azt a következtetést vonták le, hogy ez a zsírsav nem minden életközösség esetében használható gomba-biomarkerként. ZELLES (1999) különböző baktérium-, gomba-, valamint növényfajok PLFA-vizsgálata során azt tapasztalta, hogy a linolsav a növényekben is nagy koncentrációban megtalálható, nem csupán a gombákban. Következtetésként ez a zsírsav akkor jó indikátora a gombáknak, ha növényi sejt biztosan nincs jelen a vizsgálandó objektumban.

A zsírsavakban a lánchossznál általában jelentősebb taxonómiai információ a szubsztituens vagy a telítetlen kötés láncvégtől számított helyzete. Tükrözi ugyanis, hogy milyen anyagcsereúton jöhetett létre az adott zsírsav. A zsírsavak lánchossza ezzel szemben gyakran változik  $\beta$ -oxidációval, ill. lánchosszabbítással. Példa erre a 16:0 10-Me, a 17:0 10-Me és a 18:0 10-Me zsírsavak sora, amely gyakori az aktinobaktériumok („sugárgombák”) körében (KROPPENSTEDT, 1992). Ez okból kifolyólag az adatok értékelése és értelmezése során egyetlen zsírsav megjelölése helyett sokszor szerencsésebb a zsírsavsor, zsírsavcsoport megnevezése, együttes kezelése.

Esetenként egyes zsírsavcsoportok egymáshoz viszonyított aránya lehet karakterisztikus, például az észterkötésű és nem-észterkötésű zsírsavak aránya az aerob és anaerob szervezetek arányára és így a talaj tartós oxigén-ellátottságára ad információt.

A PLFA-spektrum diverzitása jelzi a mikrobióta faji diverzitását is. A makroökológiában használt faj/abundancia típusú információval a mikrobióta már ismertett módszertani okokból nem jellemezhető. A mikrobióta taxondiverzitásának indikációjára, ill. gyakorlati helyettesítésére a PLFA-spektrum diverzitási mutatói a következő okok miatt lehetnek alkalmasak:

- a mikrobióta PLFA-spektruma az archaebaktériumokat nem tekintve a teljes élő mikrobiótára jellemző;
- a baktériumok és a mikroeukarióták PLFA-spektrumuk alapján egymástól elkülöníthetőek;
- a mikrobióta minden tagja saját biomasszájával arányosan járul hozzá a mikrobióta PLFA-profiljához.

A PLFA-spektrum diverzitásának jellemzésére a faji diverzitáshoz hasonlóan három mutató használható (HEDRICK et al., 2000). Az első a (fajszámnak megfelelő) talált PLFA-féleségek száma ( $S_{PLFA}$ ), amely mutató függ a minta mennyiségétől, így különböző mennyiségű minták precíz összehasonlításának elvi akadályja van. A *Shannon-* (H) (SHANNON & WEAVER, 1949) és a *Simpson-index* ( $\lambda$ ) (SIMPSON, 1949) kiküszöböli a mintamennyiségből eredő problémákat:



$$H = -\sum [p_i \cdot \ln(p_i)], \text{ illetve}$$

$\lambda = \sum p_i^2$ , helyette gyakrabban használt  $D = 1 - \lambda = 1 - \sum p_i^2$ , ahol  $p_i$  az  $i$  PLFA relatív mennyisége.

A PLFA adatok megfelelő normalizálásával az eltérő analitikai érzékenységből fakadó problémák csökkenthetők voltak. Baktériumfajok publikált PLFA-spektrumaiból *in silico* képzett közösségek faji és PLFA-alapú diverzitási mutatói, ill. talajok DNS-alapú denaturáló gélelektroforézises és PLFA-alapú diverzitási mutatói között szoros összefüggés mutatkozott (HEDRICK et al., 2000). A kis biomasszával jellemezhető fajok jellegzetes zsírsavainak mennyiségei nem érik el az analitikai kimutatási határt, ill. a normalizálás során kiesnek. Ezért a PLFA-diverzitási mutatók a mikrobióta nagyobb abundanciával jelenlévő (nem archaeobaktérium) részének diverzitására vonatkoznak és eszerint értelmezendők (HEDRICK et al., 2000). A taxondiverzitás jelezhetőségének további elvi problémája, hogy minden faj egyenként több PLFA-val járul hozzá a mikrobióta PLFA-spektrumához, ill. sok fajnak egymáshoz nagyon hasonló a PLFA-spektruma. Mindezek miatt HEDRICK és munkatársai (2000) tanulmányuk zárszavaként a kémiai adatokra használható új diverzitási mutatók és/vagy abundancia-eloszlási modellek szükségességét emelik ki.

#### *A PLFA-analízis előnyei, hátrányai*

A módszer előnyei a mennyiségi meghatározás és a specifikus mikrobacsoportok kimutatásának kombinációjából fakadnak, valamint abból, hogy a zsírsavak a talajban gyorsan lebomlanak, így a zsírsavanalízis mindig az aktuális mikrobaközösségről ad információt. Ezzel szemben minden molekuláris módszernél számolni kell azzal, hogy egy elhalt sejt DNS-fragmentjei agyagásványok felületén adszorbeálódva tartósan fennmaradhatnak. Ezért a foszfolipid-zsírsav alapú megközelítéssel gyors közösségi szukcessziók is nyomon követhetők, például egy komposztálási folyamat kezdetének napos skálán bekövetkező változásai. Más biomasszabecslésektől eltérően a tartaléktápanyagok, a genetikai redundancia stb. nem zavarja, hogy a becsült biomassza-értékből az aktivitás szintjére következtessünk. A nukleinsavak amiatt sem tükrözik híven az abundancia-viszonyokat, mert különböző sejtek DNS-, ill. RNS-tartalma, egyes gének kópia-száma erősen eltérő lehet (LECKIE et al., 2004). A foszfolipid-zsírsavak össz mennyisége jelenleg a mikrobiális biomassza legjobb becsülésének tekinthető. A kloroform-fumi-gációs biomasszabecslési módszerekkel való összehasonlítása érdekes eredményeket hozott. ZELLES és munkatársai (1997) kloroform-fumigáció történéseit követte zsírsavanalízissel. Kimutatták, hogy a kloroformkezelés egyetlen mikrobacsoportot sem ölt el teljes hatékonysággal, a Gram-pozitívokat pedig csak 30%-ban érintette. A nem eliminált mikrobacsoportok, így a Gram-pozitívok 70%-a nem jelent meg a fumigációval mért biomasszában.

A foszfolipid-zsírsav analízis hátránya eszközigényén túl egyes membránlipid-zsírsavak és a biomassza nem egyértelmű összefüggésében keresendő, ugyanis az egyes zsírsavak mennyisége környezeti tényezők hatására fajon belül is eltérhet (ez azonban az össz-zsírsavmennyiség biomasszabecslésre vonatkozó értékét nem befolyásolja). Jelentős hátrány továbbá, hogy nagy az átfedés a különböző zsírsavak előfordulása között, és viszonylag kevés a kellő mértékben specifikus zsírsav. Megemlítjük még, hogy megfelelő érzékenységu PLFA-analízishez analitikai okok miatt legalább  $10^7$  sejt szükséges (WHITE, 1994).

### A foszfolipid-analízis eredményei a talajbiológiában

A talajbiológiában általános gyakorlat, hogy a talajhorizontnak csupán a vélhetően nagyobb biomassájú felszíni rétegeit vizsgálják, és a mélyebb rétegeket figyelmen kívül hagyják. Két talajszelvény rétegeinek PLFA-analízise pontosította a talajmikrobióta függőleges eloszlásáról alkotott képet: a felszíntől 2 m mélységig becsült biomassza 35%-a található a 25 cm-nél mélyebben fekvő rétegekben. A talajmikrobióta szerkezete is jelentősen változott a mélységgel, lefelé csökkenő diverzitás mellett (FIERER et al., 2003).

Talajok mikrobiológiai vizsgálatánál általános – és szinte általánosan kritizált – gyakorlat a talajminták vizsgálat előtti tárolása, szárítása, szitálása. PLFA-alapú vizsgálatok szerint téli, de fagymentes talajból vett minták hűtött (4,5 °C, 10 °C), nyitott tálcákon való (szárító hatású) tárolása nem okozott szignifikáns eltérést a talajmikrobióta összetételében, míg az első szitálás (<4 mm) csökkentette a gombákra jellemző 18:2ω6,9 zsírsav mennyiségét, feltehetően a hifák tördelése következtében. A 25 °C-on történő tárolás nemcsak jelentős eltéréseket okozott a zsírsavspektrumban, melyeket a mikrobióta hőmérsékleti adaptációjával is magyarázni lehet, hanem az össz-zsírsavmennyiséget is csökkentette (PETERSEN & KLUG, 1994).

A PLFA-analízis alkalmas lebontási folyamatok követésére. Komposztálás során a mikrobióta szukcessziója követhető, struktúrája, biomasszája a folyamat előrehaladottabb állapotában (mikor a növényi, állati eredetű PLFA eltűnik) jelezhető volt. A 10-Me PLFA-k mennyiségén keresztül az aktinobaktériumok abundancia-növekedése a komposzt érettségének indikátora lehet (STEGER et al., 2003). A komposztálás során egyes mikrobacsoportok abundanciájának változásaihoz egyértelműen kapcsolódtak egyes üvegházhatásért felelős gázok (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O) emissziós görbéinek alakulása (HELLMANN et al., 1997). Lehetséges a mikrobiális oltóanyag „sorsának” követése is: növényi hulladék komposztálása kezdetén adott inokulum a termofil szakasztól kezdődően nem volt hatással sem a lebontó folyamatokra, sem a mikrobióta PLFA-spektrumára. A kezdetben beállított pH ugyanakkor mindkettőt befolyásolta, feltehetően a termofil szakasz hosszának befolyásolásán keresztül (LEI & VAN DER GHEYNST, 2000).

PLFA-analízist a teljes rizoszférán (nem csak a külső rizoszférán, a gyökérfelületen tapadó talajrétegen) TUNLID és munkatársai (1985) végeztek, mégpedig steril és ismert baktériumokkal inokulált repcenövényeken. Sikerült pozitív rizoszféra-effektust, valamint a rizoszféra-habitatnak a talajéhoz képest kiegyensúlyozottabb tápanyag-ellátottságát kimutatniuk, de módszertani munkájukból baktériumközösségekre vonatkozó következtetéseket nem vontak le. Tőzegben, ahol a gyökerek könnyen elválaszthatók a tőzegmátrixtól, természetes körülmények között is sikerült pozitív rizoszféra-effektust kimutatni, valamint különböző lápi növények és a tőzeg baktériumbiótáját összehasonlítani a baktérium-specifikus PLFA-k kizárólagos figyelembe vételével (HALBRITTER & MOGYORÓSSY, 2002).

Tőzeglápokban vízszintes (a vegetációnak megfelelő, BORGA et al., 1994) és függőleges (a redoxpotenciál által befolyásolt, SUNDH et al., 1997) mikrobióta-szerkezeti változásokat mutattak ki PLFA-analízis alapján.

Az alapkőzet mikrobiótájának vizsgálata érzékeny módszereket követel. Új-Mexikó üledékeiben a felszíntől 300 m mélységig feltérképezték a főbb élő mikrobacsoportokat,

s a közeli tengeri üledékek jellemző fajait is megtalálták, melyek feltehetően az üledék képződésekor kerültek oda (RINGELBERG et al., 1997).

#### *Izotópos nyomjelzés foszfolipid-vizsgálatokkal*

Az első életközösségi szintű foszfolipid-analízist KING és munkatársai (1977) végezték. Üledékekben  $^{14}\text{C}$ -jelölt szubsztrát hozzáadása után mérték a kinyert, majd vékonyrétegen kromatográfiásan elválasztott foszfolipidek radioaktivitását, és ezáltal az adott mikrobióta aktivitására következtettek.

Lehetőség van stabil izotópos ( $^{13}\text{C}$ ) nyomkövetésre is. E módszer során a gázkromatográfion elválasztott komponensek egy oxidatív reaktorba jutnak, ahol a széntartalom szén-dioxidá alakul, amiből egy nagyfelbontású MS segítségével a 45/44 m/z arány alapján megállapítható a  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  arány. Ezt egy referenciaanyaghoz („Pee Dee belemnite”: a dél-karolinai Pee Dee-ben található, a lábasfejűek kihalt Belemnoida csoportjától származó fosszília) viszonyítva minden komponensről egy  $\delta^{13}\text{C}$ -értéket számítanak az alábbi képlet szerint (PANCOST & DAMSTÉ, 2003):

$$\delta^{13}\text{C} = (R_{\text{mk}}/R_{\text{PDB}} - 1) \cdot 10^3,$$

ahol:  $^{13}\text{R}$ :  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , mk: mintakomponens, PDB: „Pee Dee belemnite” standard.

Antarktisz talajok biodegradációs vizsgálatok  $^{13}\text{C}$ -jelölt növényi anyaggal történt inkubálás után a PLFA-frakció tömegspektrometriás elemzése során nem volt kimutatható a jelölt szubsztrát beépülése, szemben a gombákra jellemző ergoszterinnel. E kis diverzitású, extrém hőmérséklet mellett létező mikrobióta biodegradációs működéséért tehát gombák felelősek (MALOSSO et al., 2004). Szénhidrogén-szennyezett altalajban  $^{13}\text{C}$ -jelölt toluol hozzáadása után kimutatható volt, hogy a toluol degradációjáért és asszimilációjáért a *Desulfobacter* és a *Desulfobacula* nemzetségekhez tartozó szulfát-redukáló baktériumok voltak felelősek (PELZ et al., 2001). LU és munkatársai (2004) a rizs külső rizoszféra (a gyökérről lemosott talaj) baktériumközösségének gyökérexudátum-függését vizsgálták.  $^{13}\text{CO}_2$ -dal dúsított légkörben 6 órán át inkubált rizsnövényeken az inkubációt követő első órában megjelent a  $^{13}\text{C}$  a rizoszféra PLFA-tartalmában. A PLFA- $^{13}\text{C}$  tartalma nagyrészt az aspecifikus 16:0, 18:1 $\omega$ 7 és 18:1 $\omega$ 9 zsírsavakban jelent meg (ezek egy része a gyökér levált sejtjeiből is származhat), míg a Gram-pozitívokra jellemző *iso* és *anteiso* PLFA-k  $\delta^{13}\text{C}$ -értékei ( $^{13}\text{C}$ -tartalma) kicsik maradtak, aminek feltételezett oka, hogy az *iso* és *anteiso* zsírsavakat tartalmazó *Bacillus*ok és az aktinobaktériumok kevésbé vesznek részt a könnyen hozzáférhető gyökérexudátum-komponensek hasznosításában.

A  $^{13}\text{C}$  különböző arányban természetesen is előfordul, így jelölés nélkül is lehetséges nyomkövetés. Bár a lipidek  $\delta^{13}\text{C}$ -értékeinek kialakulása kevésbé ismert, általánosságban alkalmazható az az elv, hogy az organizmus asszimilált szénforrásának  $\delta^{13}\text{C}$ -értéke a meghatározó tényező. Kis  $\delta^{13}\text{C}$ -értékű lipidek jellemzőek például aerob metilotrófiára, metanogenezisre.  $^{13}\text{C}$ -vel jelölt szubsztrát alkalmazásával következtethetünk a szubsztrát asszimilációjában közreműködő szervezetekre, a szubsztrát útjára a közösségi anyagcsere-hálózatban (PANCOST & DAMSTÉ, 2003). Rekalitráns, degradációnak ellenálló biomarker-lipidek, pl. hopanoidok, arhaeolok vizsgálatával mikrobafossziliákat vizsgálhatunk, következtethetünk egy fosszilis életközösség ökoló-

giai változásaira (paleo-ökológia). PANCOST és DAMSTÉ (2003) egy jégkori eredetű tőzeglápából származó fosszilis tőzeg különböző korú rétegeinek hopanoid- és archaeol- $\delta^{13}\text{C}$ -értékeiből következtetett a szerves-szén-lebontási utak változásaira, ezáltal közvetten az egykori lápterület klímaváltozásaira.

#### *A mezőgazdasági talajhasználat hatásainak vizsgálata*

A fenntartható mezőgazdálkodás elengedhetetlen része a talajok kizsigerelését elkerülő növénytermesztés, a kemikáliák túlzott használatának mérséklése és a talajélet biodiverzitásának a megőrzése. A talaj biodiverzitásának csökkenését talajdegradációs folyamatként ismeri el az Európai Környezetvédelmi Ügynökség, mely európai léptékű talajmonitoring stratégiájában kitüntetett szerepet szán a biodiverzitás monitorozásának (EEA, 2001).

A különféle agrotechnikai eljárások alkalmazása drasztikus beavatkozást jelenthet a talajra, ill. a talajéletre nézve, így a mezőgazdasági termelés maga után vonja a talaj mikrobiális biomasszájának és a mikrobiális közösség struktúrájának módosulását. E változásokat vizsgálták ZELLES és munkatársai (1992) különféle mezőgazdasági művelés alatt álló tartamkísérleti parcellákon (fekete ugar, zöld ugar, burgonya monokultúra, búza monokultúra, vetésforgó, legelő). Jó korreláció volt tapasztalható a PLFA-csoportok mennyisége, a SIR és különböző enzimaktivitások között. A szántók közül a vetésforgó biomasszája volt legnagyobb, míg nem műtrágyázott legelőn a mikrobiális biomassza több mint kétszerese volt a vetésforgóban művelt talajénak. Más vizsgálatok is megerősítik a szántásnak a mikrobiótára gyakorolt hatását. JACKSON és munkatársai (2003) vizsgálatai szerint a szántás azonnali változást okoz a mikrobióta PLFA-profiljában, bár az össz-PLFA-mennyiséget kevéssé érinti; miközben az üvegházhatást erősítő gázok emisszióját, a nitrát kimosódását növeli.

Monokulturás, öntözött rizsföldek mikrobiális biomasszáját és a mikrobaközösség struktúráját tanulmányozták PLFA-analízissel REICHARDT és munkatársai (1997). A mikrobiális biomassza mennyisége a vegetáció második felétől csökkent. A Gram-negatív és a Gram-pozitív baktériumok, valamint a metanotrófok (18:1 ω8) mennyisége a termésérés közeledtével növekedett.

Különböző fenológiai fázisban lévő növényekkel borított rizsföldek talajait vizsgálták BAI és munkatársai (2000) PLFA, lipopoliszaccharid-hidroxi-zsírsavak és éterlipidek alapján. A bokrosodás és a virágzás kezdete közötti fenológiai fázisú növények talajának vizsgálatakor az észterkötött PLFA mennyisége drasztikusan csökkent, ellentétben a nem észterkötött PLFA, a lipopoliszaccharid-hidroxi-zsírsavak, valamint az éterkötésű lipidek mennyiségével, amely nem változott, vagy növekedett. Eszerint a bokrosodás és a virágzás fenológiai fázisa között az aerob baktériumok biomasszája csökkent, viszont az anaerob baktériumok és az archaeobaktériumok mennyisége növekedett. A terméséréshez közeledve – megerősítve REICHARDT és munkatársai (1997) eredményeit – a közösségi szerkezet ismét változott, a Gram-negatív baktériumok és a metanotrófok mennyisége növekedett. Egy, a rizsszalma légszennyezéssel járó tarlóégetésének beszántással való helyettesítését vizsgáló kísérletben az elárasztás és a szalma beszántása mind jelentős változásokat indukált a mikrobiális közösségekben, összefüggésben a metán-emisszióval és a lebontó folyamatokkal (BOSSIO & SCOW, 1997).

BARDGETT és munkatársainak (1997) eredményei szerint a PLFA-analízissel megkülönböztethetőek a legeltetett és nem legeltetett területek talajai.

BOSSIO és munkatársainak (1998) kutatásai alapján úgy tűnik, a szerves, környezetkímélő és hagyományos tápanyagpótlás hatására a talajok mikrobaközösségei egymástól jól elkülöníthetőek e műveléstípusok szerint, bár a vizsgált területeken a művelés hatása a talajtípus és a vegetációs periódus hatásánál kisebb volt.

HEDLUND (2002) természetes vagy mesterséges szukcesszió folyamata alatt lévő, mezőgazdálkodási művelés alól kivett területek mikrobiótáját vizsgálta. (A mesterséges szukcesszió során 15 növényfaj magkeverékét használta.) A mikrobiális közösség szerkezete a művelés felhagyásától számított második évtől megváltozott, a bevetett és a természetes úton megtelepedett vegetációjú terület között eltérések voltak kimutathatók.

#### *Talajszennyezés hatásának vizsgálata, ökotoxikológiai alkalmazások*

Az első írásos feljegyzések a nehézfémek talajmikrobákra gyakorolt hatásáról a XX. század elejéről származnak (LIPMAN & BURGESS, 1914; BROWN & MINGES, 1916). A fémek közvetlenül vagy közvetve, légköri ülepedéssel a talajba kerülhetnek és akumulálódhatnak. A szennyezett talajban általában csökken a mikrobiális aktivitás, a biomassa mennyisége, valamint a biodiverzitás. Ma már a talajszennyezés vizsgálatához elengedhetetlen a mikrobiális háttér feltérképezése.

FROSTEGÅRD és munkatársai (1993) két eltérő eredetű (erdei és szántóföldi) talajt kadmium, réz, nikkkel, ólom, ill. cink különböző koncentrációjával felülszennyeztek. Mindkét talajféleségnél a szennyezés hatására csökkent a 15:0 i és a 17:0 i (Gram-pozitív baktériumok), valamint az egyszeresen telített 16:1 $\omega$ 5c és a 16:1 $\omega$ 7c zsírsavak koncentrációja, viszont a 16:0 i, az elágazó 17:0 és 18:0 és a 17:0 cy (Gram-negatív baktériumok) zsírsavak mennyisége növekedett. Az erdőtalajon az aktinobaktériumokra jellemző PLFA-k koncentrációja szintén magasabb volt a kezelt területen a kontrollhoz képest (16:0 10-Me, 17:0 10-Me, 18:0 10-Me), míg a szántóföldön ezeknek a zsírsavaknak a mennyisége csökkent. A baktériumokra jellemző 15:0 és 17:0 PLFA csupán a szántóföldi talajban mutatott növekedést. A szántóföldnél a réz kivételével mindegyik alkalmazott nehézfém hatására a gombák abundanciája a 18:2 $\omega$ 6,9 PLFA alapján megnövekedett. A mikrobiális biomassa egyértelmű csökkenést mutatott mind a PLFA, az ATP, valamint a talajrespiráció alapú vizsgálatoknál.

Hasonló eredményre jutottak más skandináv kutatók is, amikor a mikrobiális struktúra szintén nehézfémek hatására bekövetkezett változását vizsgálták (BÁÁTH et al., 1992; PENNANEN et al., 1996; FRITZE et al., 1997). Eredményeik alapján a nehézfém-szennyezés mind a mikrobiális aktivitást, mind a mikrobiális biomasszát csökkentette, valamint a mikrobiális közösség szerkezetében is módosulás következett be. A 18:0 10-Me nagymértékben, a 17:0 cy, 14:0 i, 16:1 $\omega$ 5, 18:1 $\omega$ 7 és a 19:1 PLFA mérsékeltebben növekedett, míg a 15:0, 15:0 i, 16:0 10-Me, 16:1 $\omega$ 7t, 18:1 $\omega$ 9 és a 19:0 cy a szennyezett területen a kontrollhoz képest csökkenést mutatott.

ZELLES és munkatársai (1994) komlóültetvényeken (a Cu-tartalmú fungicidek alkalmazása miatti) Cu-szennyezés hatására bekövetkezett PLFA-mintázati változásokat tanulmányozták. A Cu-szennyezés következtében megnövekedett a Gram-negatív baktériumokra jellemző zsírsavak mennyisége, a Gram-pozitív baktériumok jelenlétére utaló elágazó láncú zsírsavak, valamint az aktinobaktériumokra (nehézfém-érzékeny

csoport) jellemző 10-Me zsírsavak (SCHLOTTER et al., 1998) koncentrációja viszont csökkent.

Szántóföldi talajok mikrobiális struktúrájának nehézfémek hatására bekövetkező változásának vizsgálatakor DAHLIN és munkatársai (1997) az egyik vizsgált területet nehéz-fémekkel, a másikat szennyvíziszappal (kontroll, alacsony, közepes, nagy dózis) kezelték. Az nehézfém-kezelés esetében nem történt szignifikáns változás a kezelések hatására, ellentétben a másik területtel, ahol a közepes és nagy dózisú szennyvíziszap alkal-mazásakor megnövekedett a 18:2ω6,9 (gomba-biomarker) zsírsav mennyisége. Szignifikáns különbség volt tapasztalható a nagydózisú szennyvíziszap-kezelésnek alávetett és a kontrolltalajok PLFA-mintázataiban, valamint a baktériumközösségek C<sub>u</sub>-tolerancia-jában.

KHAN és SCULLION (2000) különböző agyag- és szervesanyag-tartalmú talajok szennyvíziszap-kezelés hatására bekövetkező mikrobiális válaszreakcióit figyelték meg. A kezelés hatására a kontrollhoz képest csökkent a baktérium/gomba arány, ami első sorban a gombák mennyiségi növekedése eredményezett, amit az ergoszterin – mint gomba biomarker – növekedése is alátámasztott.

Trinitro-toluolos talajszennyezés hatására a PLFA-analízis alapján a Gram-pozitív baktériumok, gombák és protozoonok mennyisége csökkent (WILKE et al., 2004), majd a szervesanyag-kezeléssel járó talajremediáció hatására lényegesen megnövekedett.

Az egy-egy faj válaszára korlátozódó, redukcionista ökotoxikológiai tesztekkel szemben a lipidanalízis lehetőséget nyújt életközösségi, sőt ökoszisztéma-szintű toxikológiai vizsgálatokra („multi-species, multitrophic level toxicity assessment”), ahol a biomassza, a mikrobióta-szerkezet és a tápláltsági állapot változásai korán jelezhetnek toxikus hatásokat. Egy felületaktív anyagokat gyártó üzem már így teszteli termékeit (WHITE et al., 1998) egy ún. perifiton-biomonitorral, ahol a tesztelendő anyagok oldatába mikrobiális biofilmmel (perifiton) fedett üveglapot helyeznek, és e perifiton SLB-változásait követik (GUCKERT et al., 1991). A megfigyelhető hatást nem okozó legnagyobb koncentráció (NOEC: no-observed-effect-concentration) megadásával lehetséges a toxikológiai vizsgálatok eredményeinek legegyszerűbb megvilágítása, döntéshozók számára közlés (GUCKERT, 1996). Lipid-biomarkerek alapján szakaszosan táplált biogázreaktorban a szabályozáshoz kellő időben jelezhető a mikrobióta tápanyag-ellátottsági állapota (az alul-, ill. túltápláltság), valamint az esetleges zavaró hatások (HEDRICK et al., 1991).

### Összefoglalás

A talaj-mikrobióta mennyiségi viszonyait, struktúráját és funkcióit célzó vizsgálatok komoly bioindikációs értékűek lehetnek, jelentős gyakorlati segítséggel bírhatnak, ha egy talaj állapotát, egy kezelés vagy szennyezés hatását próbáljuk megismerni. Ilyen esetekben olyan könnyen kimutatható, jól követhető és lehetőleg kvantitatív mérhető markerekre, indikátorokra van szükség, melyekből a talaj belső történéseire, állapotára következtethetünk, és abból viselkedését megfelelő megbízhatósággal jósolni tudjuk.

A mikrobióta közvetett vizsgálatára elméleti problémákkal a legkevésbé terhelt és a gyakorlatban is egyre terjedő választás a foszfolipidekre irányul. A foszfolipid-zsírsav-(PLFA-) alapú mikrobióta-vizsgálat előnyei a mennyiségi meghatározás és a specifikus mikroba-csoportok kimutatásának kombinációjából fakadnak, valamint abból, hogy a

foszfolipidek a talajban gyorsan lebomlanak, így a PLFA-analízis mindig az aktuális mikrobaközösségről ad információt. Hátránya, hogy az egyes zsírsavak mennyisége környezeti tényezők hatására fajon belül is eltérhet, továbbá, hogy nagy az átfedés a különböző zsírsavak előfordulása között, és viszonylag kevés a kellő mértékben specifikus zsírsav.

Az első életközösségi szintű foszfolipid-analízist KING és munkatársai végezték 1977-ben. Azóta számos kutató alkalmazta és alkalmazza a talaj mikrobiális biomassájának becslésére, valamint a mikrobióta struktúrájának meghatározásához a PLFA-analízist, például mezőgazdasági talajhasználat, talajszennyezés hatásainak vizsgálatára, ökotoxikológiai tesztekhez, jelölt szubsztrátok beépülésének vizsgálatára.

A dolgozat az OTKA (T 038280 és M 041669 sz.) támogatásával készült.

### Irodalom

- AMANN, R. I., 1995. In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. In: *Molecular Microbial Ecology Manual* (Eds.: AKKERMANS, A. D. L., ELSAS, J. D. & DE BRUIJN, F. J.) 3.3.6: 1–15. Kluwer Acad. Publ. Dordrecht.
- ANDERSON, J. P. E. & DOMSCH, K. H., 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil. *Soil Biol. Biochem.* **10**. 215–221.
- BÄÄTH, E., FROSTEGÅRD, Å. & FRITZE, H., 1992. Soil bacterial biomass, activity phospholipid fatty acid pattern, and pH tolerance in an area polluted with alkaline dust deposition. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**. 4026–4031.
- BAI, Q., GATTINGER, A. & ZELLES, L., 2000. Characterisation of microbial consortia in paddy soil by analysis of phospholipid fatty acid. *Microb. Ecol.* **39**. 273–281.
- BALKWILL, D. L. et al., 1988. Equivalence of microbial biomass measures based on membrane lipid and cell wall components, adenosine triphosphate, and direct counts in subsurface sediments. *Microb. Ecol.* **16**. 73–84.
- BARDGETT, R. D. et al., 1997. Seasonality of the soil biota of grazed and ungrazed hill grasslands. *Soil Biol. Biochem.* **29**. 1285–1294.
- BLIGH, E. G. & DYER, W. J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**. 911–917.
- BORGA, P., NILSSON, M. & TUNLID, A., 1994. Bacterial communities in peat in relation to botanical composition as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biol. Biochem.* **26**. 841–848.
- BOSSIO, D. A. & SCOW, K. M., 1997. Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. *Microb. Ecol.* **35**. 265–278.
- BOSSIO, D. A. et al., 1998. Determinants of soil microbial communities: effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microb. Ecol.* **36**. 1–12.
- BROWN, P. E. & MINGES, G. A., 1916. The effect of some manganese salts on ammonification and nitrification. *Soil Sci.* **1**. 67–85.
- CHRISTIE, W. W., 2003. *Lipid Analysis. Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*. 3<sup>rd</sup> ed. The Oily Press. Bridgwater.
- DAHLIN, S. et al., 1997. Where's the limit? Changes in the microbiological properties of agricultural soils at low levels of metal contamination. *Soil Biol. Biochem.* **29**. 1405–1415.
- DARWIN, C., 1881. *The Formation of Vegetable Mould Through the Action of Worm*. John Murray. London.

- DAZZO, F. B. & WRIGHT, S. F., 1995. Production of anti-microbial antibodies and their use in immunofluorescence microscopy. In: *Molecular Microbial Ecology Manual* (Eds.: AKKERMANS, A. D. L., ELSAS, J. D. & DE BRUIJN, F. J.) 4.1.2: 1–27. Kluwer Acad. Publ. Dordrecht.
- DOMBOS M. & SZALKAI T., 2004. Indikációs modellek és alkalmazásuk a talajökológiában. *Agrokémia és Talajtan*. **53**. 181–194.
- EEA, 2001. Proposal for a European Soil Monitoring and Assessment Framework. Technical Report No. 61. EEA. Koppenhága.
- FEDERLE, T. W., 1986. Microbial distribution in soil – new techniques. In: *Perspectives in Microbial Ecology*. (Eds.: MEGUSAR, F. & GANTHAR, M.) 493–498. Slovenian Society for Microbiology. Ljubljana.
- FIERER, N., SCHIMEL, J. P. & HOLDEN, P. A., 2003. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biol. Biochem.* **35**. 167–176.
- FRITZE, H., PENNANEN, T. & VANHALA, P., 1997. Impact of fertilizer on the humus layer microbial community of Scots Pine stands growing along a gradient of heavy metal pollution. In: *Microbial Communities – Functional versus Structural Approaches*. (Eds.: INSAM, H. & RANGGER, A.) 68–83. Springer. New York.
- FROSTEGÅRD, Å. & BÅÅTH, E., 1996. The use of phospholipids analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biol. Fertil. Soils*. **22**. 59–65.
- FROSTEGÅRD, Å., TUNLIND, A. & BÅÅTH, E., 1993. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**. 3605–3617.
- GUCKERT, J. B. 1996. Toxicity assessment by community analysis. *J. Microbiol. Methods*. **25**. 101–112.
- GUCKERT, J. B. et al., 1991. Periphyton response along an industrial effluent gradient: lipid-based physiological stress analysis and pattern recognition of microbial community structure. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **49**. 2579–2587.
- HALBRITTER, A. & MOGYORÓSSY, T., 2002. Phospholipid fatty acid (PLFA) analysis of rhizosphere bacterial communities in a peat soil. *Agrokémia és Talajtan*. **51**. 123–128.
- HAMPICKE, U., 1979. Sources and sinks of carbon dioxide in terrestrial ecosystems: Is the land's carbon budget balanced under the influence of man? *Environment International*. **2**. 301–315.
- HEDLUND, K., 2002. Soil microbial community structure in relation to vegetation management on former agricultural land. *Soil Biol. Biochem.* **34**. 1299–1307.
- HEDRICK, B. D. et al., 1991. Starvation and overfeeding stress on microbial activities in high-solids high-yield methanogenic digesters. *Biomass and Bioenergy*. **1**. 75–82.
- HEDRICK, B. D. et al., 2000. Measuring soil microbial community diversity using polar lipid fatty acid and denaturing gradient gel electrophoresis data. *J. Microbiol. Methods*. **41**. 235–248.
- HELLMANN, B. et al., 1997. Emission of climate-relevant trace gases and succession of microbial communities during open-window composting. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**. 1011–1018.
- JACKSON, L. E. et al., 2003. Responses of soil microbial processes and community structure to tillage events and implications for soil quality. *Geoderma*. **114**. 305–317.
- JANDL, G. et al., 2004. The concentration of fatty acids in organo-mineral particle-size fractions of a Chernozem. *European J. Soil Sci.* **55**. 459–469.
- JENKINSON, D. S. & POWLSON, D. S., 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. *Soil Biol. Biochem.* **8**. 209–213.
- JENKINSON, D. S., BROOKES, P. C. & POWLSON, D. S., 2004. Measuring soil microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.* **36**. 5–7.
- JUHÁSZ-NAGY P., 1993. *Az eltűnő sokféleség*. Scientia Kiadó. Budapest.
- KHAN, M., & SCULLION, J., 2000. Effect of soil on microbial responses to metal contamination. *Environmental Pollution*. **110**. 115–125.



- KING, J. D., WHITE, D. C. & TAYLOR, C. W., 1977. Use of lipid composition and metabolism to examine structure and activity of estuarine detrital microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**. 1177–1183.
- KROPPESTEDT, R. M., 1992. The genus *Nocardioopsis*. In: *The Prokaryotes 2* (Eds.: BALOWS, A. et al.) 1139–1156. Springer. New York.
- LECKIE, S. E. et al., 2004. Comparison of chloroform fumigation-extraction, phospholipid fatty acid, and DNA methods to determine microbial biomass in forest humus. *Soil Biol. Biochem.* **36**. 529–532.
- LEI, F. & VAN DER GHEYNST, J. S., 2000. The effect of microbial inoculation and pH on microbial community structure changes during composting. *Process Biochemistry*. **35**. 923–929.
- LIPMAN, C. B. & BURGESS P. S., 1914. The effects of copper, zinc, iron and lead salts on ammonification and nitrification in soil. *Univ. California Pub. in Agric. Sci.* **1**. 127–139.
- LU, Y. et al., 2004. Linking microbial community dynamics to rhizosphere carbon flow in a wetland rice soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **48**. 179–186.
- MALOSSO, E. et al., 2004. Use of <sup>13</sup>C-labelled plant materials and ergosterol, PLFA and NLFA analyses to investigate organic matter decomposition in Antarctic soil. *Soil Biol. Biochem.* **36**. 165–175.
- MOGGE, B. et al., 2000. Bacterial community structure and colonization patterns of *Fagus sylvatica* L. ectomycorrhizospheres as determined by fluorescence *in situ* hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Mycorrhiza*. **9**. 271–278.
- PANCOST, R. D. & DAMSTÉ, J. S. S., 2003. Carbon isotopic compositions of prokaryotic lipids as tracers of carbon cycling in diverse settings. *Chemical Geology*. **195**. 29–58.
- PARKES, R. J., 1987. Analysis of microbial communities within sediments using biomarkers. In: *Ecology of Microbial Communities*. (Eds.: FLATSCHER, M., GRAY, T. M. G. & JOHNS, G.) 147–177. Cambridge University Press. London.
- PELZ, O. et al., 2001. Tracing toluene-assimilating sulfate-reducing bacteria using <sup>13</sup>C-incorporation in fatty acids and whole-cell hybridization. *FEMS Microbiol. Ecol.* **38**. 123–131.
- PENNANEN, T. et al., 1996. Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients in coniferous forests. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**. 420–428.
- PETERSEN, S. O. & KLUG, M. J., 1994. Effects of sieving, storage, and incubation temperature on the phospholipid fatty acid profile of soil microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**. 2421–2430.
- RATLEDGE, C. & WILKINSON, S. G., 1988. *Microbial Lipids*. Academic Press. London.
- REICHARDT, W. et al., 1997. Microbial communities of continuously cropped, irrigated rice fields. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**. 233–238.
- RINGELBERG, D. B., SUTTON, S. & WHITE, D. C., 1997. Biomass, bioactivity and biodiversity: microbial ecology of the deep subsurface: analysis of ester-linked phospholipid fatty acids. *FEMS Microbiology Reviews*. **20**. 371–377.
- SASSER, M., 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. In: *Methods in Phytobacteriology*. (Eds.: KLEMENT Z., RUDOLPH, K. & SANDS, D. C.) 199–204. Akad. Kiadó. Bp.
- SCHLOTTER, M. et al., 1998. New quality of assessment of microbial diversity in arable soils using molecular and biochemical methods. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* **161**. 425–431.
- SHANNON, C. E. & WEAVER, W., 1949. *The mathematical theory of communication*. Univ. Illinois Press. Urbana.
- SIMPSON, E. H., 1949. Measurement of diversity. *Nature*. **163**. 688.
- STEFFAN, R. J. et al., 1988. Recovery of DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**. 2908–2915.
- STEGER, K. et al., 2003. Comparison of signature lipid methods to determine microbial community structure in compost. *J. Microbiol. Methods*. **55**. 371–382.

- SUNDH, I., NILSSON, M. & BORGA, P., 1997. Variation in microbial community structure in two boreal peatlands as determined by analysis of phospholipid fatty acid profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**. 1476–1482.
- SZILI-KOVÁCS T., 2004. Szubsztrát indukált respiráció a talajban. *Agrokémia és Talajtan.* **53**. 195–214.
- TOLLEFSON, T. S. & MCKERCHER, R. B., 1983. The degradation of <sup>14</sup>C-labelled phosphatidyl choline in soil. *Soil Biol. Biochem.* **15**. 145–148.
- TORSVIK, V., 1995. Cell extraction method. In: *Molecular Microbial Ecology Manual* (Eds.: AKKERMANS, A. D. L., ELSAS, J. D. & DE BRUIJN, F. J.) 1.3.1: 1–15. Kluwer. Dordrecht.
- TORSVIK, V., GOKSOYR, J. & DAAE, F. L., 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**. 782–787.
- TUNLID, A. & WHITE, D. C., 1992. Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial communities in soil. In: *Soil Biochemistry*. Vol. 7. (Eds: STOTZKY, G & BOLLAG, J. M.) 229–262. Marcel Dekker. New York.
- TUNLID, A. et al., 1985. Determination of phospholipid ester-linked fatty acids and poly-β-hydroxybutyrate for the estimation of bacterial biomass and activity in the rhizosphere of the rape plant *Brassica napus* (L.). *Can. J. Microbiol.* **31**. 1113–1119.
- VANCE, E. D., BROOKES, P. C. & JENKINSON, D. S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* **19**. 703–707.
- WHITE, D. C. 1994. Is there anything else you need to understand about the microbiota that cannot be derived from analysis of nucleic acids? *Microb. Ecol.* **28**. 163–166.
- WHITE, D. C. 1995. Chemical ecology: possible linkage between macro- and microbial ecology. *Oikos*. **74**. 177–184.
- WHITE, D. C. et al., 1979. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia*. **40**. 51–62.
- WHITE, D. C. et al., 1998. In situ microbial ecology for quantitative appraisal, monitoring, and risk assessment of pollution remediation in soils, the subsurface, the rhizosphere and in biofilms. *J. Microbiol. Methods*. **32**. 93–105.
- WILKE, B. M. et al., 2004. Phospholipid fatty acid composition of 2,4,6-trinitrotoluene contaminated soil and an uncontaminated soil as affected by a humification remediation process. *Soil Biol. Biochem.* **36**. 725–729.
- WOODWELL, G. M. et al., 1978. The biota and the worlds carbon budget. *Science*. **199**. 141–146.
- ZARDA, B. et al., 1997. Analysis of bacterial community structure in bulk soil by *in situ* hybridization. *Arch. Microbiol.* **168**. 185–192.
- ZELLES, L., 1997. Phospholipid fatty acid profiles in selected members of soil microbial communities. *Chemosphere*. **35**. 275–294.
- ZELLES, L., 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol. Fertil. Soils*. **29**. 111–129.
- ZELLES, L. et al., 1992. Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.* **24**. 317–323.
- ZELLES, L. et al., 1994. Microbial biomass, metabolic activity and nutritional status determined from fatty acid patterns and poly-hydroxybutyrate in agriculturally-managed soils. *Soil Biol. Biochem.* **26**. 439–446.
- ZELLES, L. et al., 1997. Changes in soil microbial properties and phospholipid fatty acid fractions after chloroform fumigation. *Soil. Biol. Biochem.* **29**. 1325–1336.

Érkezett: 2005. március 18.

HALBRITTER ANDRÁS és UZINGER NIKOLETT  
MTA Talajtani és Agrokémiai Kutatóintézet, Budapest