

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar
Biológia Doktori Iskola
Evolúciógenetika, evolúciós ökológia, konzervációbiológia

BAKTERIÁLIS DIVERZITÁS VIZSGÁLÓ ELJÁRÁSOK ALKALMAZÁSA A SZENNYVÍZTISZTÍTÁS MIKROBIOLÓGIAI KUTATÁSÁBAN

Doktori értekezés tézisei

Készítette:

SZÉKELY ANNA J.

Témavezető:

MÁRIALIGETI KÁROLY

tanszékvez. egyetemi docens

Doktori iskola vezető:

ERDEI ANNA

tanszékvez. egyetemi tanár

Programvezető:

SZATHMÁRY EÖRS

egyetemi tanár

Készült az ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszékén



2008

„A táboron kívül valami helyed legyen
néked, és oda kimenj szükség tenni.

És legyen néked ásócskád a te fegyvered
mellett, és amikor le akarsz ülni, azzal
áss vermet: befedjed, ami tőled elment.”

Mózes V. könyve 23. 12-13.

(Károli Gáspár fordítása)

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Ezúton mondok köszönetet

Dr. Márialigeti Károlynak, témavezetőmnek, hogy a Mikrobiológiai Tanszéken lehetővé tette számomra disszertációm elkészítését, és munkámat értékes szakmai tanácsaival segítette,

Dr. Vida Gábornak és **Dr. Szathmáry Eörsnek**, hogy lehetővé tették számomra az Evolúciógenetika, evolúciós ökológia, konzervációbiológia doktori programban való részvételemet,

Dr. Záray Gyulának, hogy az ELTE Környezettudományi Kooperációs Kutató Központjának munkatársaként részt vehettem valós környezet-technológiai problémák megoldásában,

Dr. Barkács Katalinnak, aki nem csak beavatott a szennyvíztechnológia rejtelmeibe, hanem egy életre meg is szeretettete azt,

Segesdi Józsefné Marikának, aki húszéveseket meghazudtoló munkabíráásával biztosította, hogy mikrobiológiai eredményeinket mindig pontos vízkémiai adatokkal támaszthassuk alá,

Szaktervezőimnek, különösen **Felföldi Tamásnak** és **Gorál Róbertnek**, akikkel együtt küzdöttük le a molekuláris mikrobiális ökológia módszertani akadályait,

Révész Sárának és **Sipos Ritának** a sok-sok értékes szakmai és kevésbé szakmai bátorító eszmecserejét,

A **Mikrobiológiai Tanszék munkatársainak** munkámhoz adott összes segítséget, támogatást, és sokszor nem illatos kísérleteink iránt tanúsított toleranciát,

A **Dél-pesti Szennyvíztisztító Telep munkatársainak**, hogy lehetővé tették kutatómunkámat hazánk egyik legkorszerűbb szennyvíztisztító egységében,

Az **ISD Kokszoló Kft. munkatársainak**, hogy lehetővé tették munkámat, és minden adatukat megosztva, igazi partnereként segítették azt,

Végül pedig, de nem utolsó sorban **családomnak** a támogatásért, különösen **páromnak**, akinek hivatásom és egyben hobbim iránt tanúsított végtelen türelme nélkül e dolgozat nem jöhetett volna létre.

TARTALOMJEGYZÉK

| | | |
|-------------|---|-----------|
| I. | BEVEZETÉS | 6 |
| II. | IRODALMI ÁTTEKINTÉS | 7 |
| II.1. | A szennyvíztisztítás alapjai | 7 |
| II.1.1. | A szennyvízkezelés kezdetei | 7 |
| II.1.2. | Szennyvízkezelés napjaink Magyarországon | 8 |
| II.2. | A szennyvíztisztítás technológiája | 10 |
| II.2.1. | A kommunális szennyvíztisztítás | 10 |
| II.2.2. | Ipari szennyvizek | 17 |
| II.3. | A szennyvíztisztítás mikrobiológiai kutatása | 23 |
| II.3.1. | A modern mikrobiális ökológia története | 23 |
| II.3.2. | Nukleinsav alapú tenyésztés független mikrobiális diverzitás vizsgálati eljárások | 27 |
| II.4. | Szennyvízkezelésben előforduló Prokarióták | 35 |
| II.4.1. | <i>Bacteria</i> | 35 |
| II.4.2. | <i>Archaea</i> | 38 |
| II.5. | A biológiai szennyvíztisztítás színtere: a biofilmek és a flokkulumok | 39 |
| II.5.1. | Biofilmek és flokkulumok általános jellemzői | 39 |
| II.5.2. | Mikrokörnyezetek a biofilmekben és flokkulumokban | 43 |
| II.6. | Mikrobiológiai folyamatok a szennyvíztisztításban | 45 |
| II.6.1. | Szervesanyagok eltávolítása | 45 |
| II.6.2. | A foszfor eltávolítása | 48 |
| II.6.3. | A nitrogén eltávolítása | 50 |
| III. | CÉLKITŰZÉSEK | 61 |
| IV. | ANYAG ÉS MÓDSZER | 62 |
| IV.1. | A DpSzT nitrifikáló medencéinek monitorozása | 62 |
| IV.1.1. | Az adatbázis létrehozása | 64 |
| IV.1.2. | A mintavételek jellemzői | 64 |
| IV.1.3. | Minták közösségi TRFLP ujjlenyomata | 65 |
| IV.1.4. | Az adatbázis alapján történő azonosítás tesztelése | 67 |
| IV.2. | Az ISD-K eleveniszapos medencéinek monitorozása | 68 |
| IV.2.1. | A mintavételek jellemzői | 70 |
| IV.2.2. | Minták közösségi TRFLP ujjlenyomata | 72 |
| IV.2.3. | Közösségi TRFLP csúcsainak azonosítása klónkönyvtár segítségével | 73 |
| V. | EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK | 75 |
| V.1. | A DpSzT nitrifikáló medencéinek vizsgálata | 75 |
| V.1.1. | Az <i>amoA</i> gén TRF adatbázisa | 75 |
| V.1.2. | Az adatbázis alapján történő azonosítás tesztelése | 77 |

| | | | |
|--------------|-----------|---|------------|
| | V.1.3. | Monitorozás – 2003-as minták | 87 |
| | V.1.4. | 2002-es minták újraértékelése | 88 |
| | V.1.5. | A szennyvíztisztító teljesítményének összevetése az AOB közösség-összetételével | 89 |
| | V.1.6. | A nitrifikáló medencék vizsgálatának az eredményeinek az összegzése | 91 |
| V.2. | | Az ISD-K biológiai vízkezelő egységének vizsgálata | 93 |
| | V.2.1. | Az üzemegység fizikai és kémiai jellemzői a vizsgált időszakban | 93 |
| | V.2.2. | Az eleveniszapos medencék TRFLP ujjlenyomatai | 96 |
| | V.2.3. | Klónozás eredményei | 99 |
| | V.2.4. | TRFLP csúcsok azonosítása | 109 |
| | V.2.5. | Rodanidbontás határfok-romlásának lehetséges okai | 114 |
| | V.2.6. | Az eleveniszapos medencék vizsgálatának az eredményeinek az összegzése | 115 |
| VI. | | EREDMÉNYEK ÖSSZEGRZÉSE | 117 |
| | VI.1.1. | Az alkalmazott módszerek értékelése | 117 |
| | VI.1.2. | A mikrobiális közösségek monitorozásának legfontosabb eredményei | 118 |
| | VI.1.3. | Legfontosabb eredményeink | 119 |
| | VI.1.4. | Továbbblépés lehetőségei | 119 |
| VII. | | IDÉZETT IRODALMAK | 120 |
| VIII. | | MELLÉKLETEK | 134 |
| VIII.1. | | Anyag és módszer kiegészítés | 134 |
| | VIII.1.1. | Alap protokollok | 134 |
| | VIII.1.2. | Prímerek és restriktációs endonukleázik jellemzői | 139 |
| | VIII.1.3. | Az alkalmazott molekuláris biológiai reakciók összetétele | 140 |
| | VIII.1.4. | Alkalmazott reakció hőprofilok | 141 |
| VIII.2. | | Az ISD-K szennyvízkezelő fizikai és vízkémiai paramétereinek az alakulása | 142 |
| | VIII.2.1. | KOI érték alakulása | 142 |
| | VIII.2.2. | Fenolindex alakulása | 142 |
| | VIII.2.3. | Szabad cianid koncentráció alakulása | 142 |
| | VIII.2.4. | Összes cianid koncentráció alakulása | 143 |
| | VIII.2.5. | Ammónium koncentráció alakulása | 143 |
| | VIII.2.6. | Rodanid-nitrogén koncentráció alakulása | 143 |
| | VIII.2.7. | Hőmérséklet | 144 |
| | VIII.2.8. | Száranyagtartalom | 144 |
| | VIII.2.9. | pH érték alakulása | 144 |
| VIII.3. | | Gyakran használt rövidítések jegyzéke | 145 |
| IX. | | ÖSSZEFOGLALÓ | 146 |
| X. | | SUMMARY | 147 |

I. BEVEZETÉS

Ahol az ember megtelepszik, ott szükség van ivóvízre, amelynek használatával folyamatosan szennyvíz termelődik. Az ivóvíz ellátás biztosítására az emberi civilizációk a történelem kezdete óta olyan lenyűgöző építményeket hoztak létre, mint az ókori Róma vízvezetékei vagy korunk gigantikus víztározói, bizonyítva ezzel fajunk természetmódosító erejét. A szennyvíztisztításért azonban a mikroorganizmusoké az elsődleges érdem. A legkülönbözőbb anyagok biodegradációjára való képességük, valamint az élet szempontjából legfontosabb elemek úgy, mint a szén, a nitrogén és a foszfor körforgásában való elengedhetetlen részvételük teszi a mikrobákat a szennyvízkezelés kulcsszereplőivé.

A mikrobiális világ potenciáljának a szennyvíztisztításban való kihasználása több mint száz éve vette kezdetét az első biológiai szennyvízkezelők létesülésével. Mára ezek az üzemek a biotechnológia egyik legfontosabb alkalmazásának tekinthetők, amelyek megóvják a környezetünket és természetes vizeinket a szennyezéstől, valamint meggátolják számtalan szennyvíz terjesztette kórokozó terjedését.

A szennyvíztisztítók egyben a mikrobiális ökológiai kutatások egyik legkiválóbb alanyai, hiszen kevés ilyen élőhely létezik, amelyben jól meghatározott és kontrolált körülmények között lehet komplex mikrobiális közösségeket vizsgálni. Az elmúlt évtizedekben kifejlesztett tenyésztés független eljárások segítségével a szennyvíz-mikrobiológusok olyan, részleteiben csak többsejtű szervezeteknél tanulmányozott jelenségeket vizsgálhatnak, amilyenek a környezeti eltérések következtében fellépő diverzitás változások, a kompetíció, a habitat felosztás vagy akár a predáció.

Mіндеzen kutatások eredményeként lehetőség nyílik arra, hogy a szennyvíztechnológusok reaktorokat leíró matematikai modelljeiben „fekete dobozként” kezelt biológiai rendszereket ne csak empirikusan, fizikai és kémiai tulajdonságaik alapján befolyásolhassuk, hanem a bennük lévő mikrobákat tudatosan szabályozzuk és szelektáljuk. Ahhoz, hogy ez a lehető leghatékonyabban történhessen, a szennyvíztisztítók mikrobiotájának összetételét részletesen feltérképezni, és változásait megfelelő módszerekkel hosszú távon monitorozni szükséges.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

II.1. A szennyvíztisztítás alapjai

II.1.1. A szennyvízkezelés kezdetei

II.1.1.1. A csatornázás története

A szennyvíztisztítás elsődleges lépése, a szennyvíz-elvezetés már több ókori kultúránál megjelent. Ezek közül kétségkívül a leghíresebb Róma i. e. 514-ben épített Cloaca Maxima nevű csatornája, amely a hozzá kapcsolódó csatornahálózattal Julius Caesar uralkodása alatt már nemcsak a talajvíz és a csapadékvíz elvezetésére szolgált, hanem a fekáliát is szállította. A római eredetű csatorna Spanyolországban, Franciaországban, sőt még Afrika több városában is elterjedt. Magyarországon Aquincum csatornáit őrzik e kor emlékét. A birodalom bukásával azonban a csatornázás fejlődése is megakadt.

A középkorban a meglevő hálózatokat is elhanyagolták. A szeméttel együtt a fekáliát a várakból a várakokba, a városokban pedig a csapadékvizet is elvezető árkokba vezették. Ahogy ezt egy 1372-ben kiadott párizsi rendeletről tudjuk, a szabályozás akkoriban annyiból állt, hogy a fekáliát csak előzetes figyelmeztető kiáltás után lehetett az utcára önteni. Mindez a szemét felhalmozódásához, bűzös rothadásához, legyek és patkányok elszaporodásához, és ennek következtében a járványok gyors terjedéséhez vezetett. Ezek okainak felismerése után olyan a rendeletek születtek, amelyek megtiltották a szemét utcákra való kidobálását, és a fekália kiöntését. Bevezették a szemét elszállítását, és a fekália gyűjtése céljából pócegödörket építettek. A kezdetben még nyitott, a csapadékvizet elvezető árkokat az idők folyamán fokozatosan lefedték, egyre mélyebbre kerültek, és ezzel megindult a tulajdonképpeni csatornázás (Élőduna, 2006).

Mivel a csatornahálózatok fejlesztése mindig is az egyik legköltségesebb közművesítés volt, a csatornázás lassan haladt. Ráadásul az ipari forradalommal járó urbanizáció következtében a városok rohamosan növekedtek, és a szennyvizeket befogadó élővizek, amelyek egyben a lakosság ivóvíz forrásai voltak, a természetes öntisztulás ellenére egyre szennyeződtek. Mindennek a következtében egyre gyakoribbá váltak a nagy járványok. Elsősorban a kolera és a hastífusz szedte áldozatait. A XIX. században utóbbi gyakorlatilag perzisztensen jelen volt, míg az előbbi nagy járványok során okozta Magyarországon közel egymillió ember halálát.

Lassan elfogadottá vált a rossz higiéniai viszonyok kapcsolata a közegészségügyi

problémákkal. A csatornázás fejlesztésével a tifuszos megbetegedések száma csökkenni kezdett. Budapest csatornahálózatának kiépítése is megindult a Fővárosi Csatornázási Művek (FCsM) 1873-as megalakulásával. Az akkori tervezők előrelátásról tanúskodik, hogy a főgyűjtőcsatornákat olyan szelvénymérettel tervezték, hogy azok vízzállító képessége még a mai igényeknek is megfeleljen (FCsM, 2008). Budapestet a nagyobb vidéki városok követték a század fordulón. 1908-ra a 28 törvényhatósági jogú város közül mindössze háromban nem volt közüzemi csatornázás (Juhász, 2004).

II.1.1.2. A szennyvíztisztítás története

A csatornahálózat fejlődése mellett azonban továbbra is problémát jelentett az ivóvízbázisok szennyezése, aminek megoldására 1842-ben a világon elsőként Hamburgban megépítették az első szennyvíztisztító telepet. A világ többi nagyvárosa mintegy 25 év késéssel követte Hamburg példáját (Seeger, 1999).

Kezdetben a szennyvíztisztítás célja csupán a szennyezett víz zavarosságának megszüntetése volt, amihez szűrőket és rácsokat építettek be a befogadóba való befolyásnál vagy a csatornahálózatba. A XIX. század második felében Angliában a szűrést már előleüleptéssel egészítették ki, megteremtve ezzel a modern mechanikai szennyvízkezelés alapjait.

Az első biológiai tisztítást is végző, ipari szennyvíz kezelésére kidolgozott csepegtetőtestes rendszerek az 1880-as években, Walesben jelentek meg. A XX. század első felében ezek a biológiai tisztítóegységek terjedtek el. Az eleveniszapos eljárás lényegét először 1913-ban, Angliában a Davyhulme Szennyvíztisztítómű mérnökei írták le. Az eleveniszapos műtárgyakat is tartalmazó telepek azonban csak az 1950-es évektől terjedtek el (Seeger, 1999). Magyarországon az 1960-as években helyezték üzembe az első három eleveniszapos szennyvíztisztító rendszert Sajószentpéteren, Budakeszin és Dél-Pesten. Ezekkel párhuzamosan készültek el az első anaerob iszaprothasztók is (Juhász, 2004).

II.1.2. Szennyvízkezelés napjaink Magyarországon

Magyarország felszíni vizeinek 96 %-a az ország határain kívülről érkezik, így azok mennyisége és minősége jelentősen függ a felvízi országoktól. Az élővizeink szennyezettségéhez azonban döntően hozzájárulnak a hazai ipari, mezőgazdasági és a háztartási, avagy kommunális szennyezők. Mivel az ivóvízellátás több mint 90 %-a a felszín alatti vízkészletre támaszkodik, ezek védelme is stratégiai feladat. A felszín alatti vizeket elsősorban a mezőgazdasági tevékenység, és a csatornázatlan lakóterületeken elszikkasztott szennyvíz fenyegeti (KvVM, 2007).

II.1.2.1. Az EU Víz Keretirányelve Magyarországon

Európai Unió tagországunk óta hazánk szennyvíz-elvezetési és –tisztítási fejlesztéseinek megvalósítása az EU Víz Keretirányelvnek (VKI) megfelelően történik. A VKI az agglomerációkat a lakosegyenértékben (LE) kifejezett összes szennyezőanyag-terhelésük alapján osztályozza. A LE a szennyvíz szennyezőanyag-tartalmának nemzetközileg elfogadott mértékegysége. Egy LE azt a szennyvízben lévő, szerves, biológiailag bontható szennyezőanyag-mennyiséget jelenti, amelynek napi biológiai oxigénigénye (BOI₅, II.2.1.1.1.B. pont) értéke 60 g. Ez a megközelítés abból indul ki, hogy egy lakos egy nap alatt körülbelül 60 g BOI₅-nek megfelelő mennyiségű szerves szennyezőanyagot bocsát ki a szennyvizébe. Az agglomerációk LE értékének megadásánál a lakosok számához hozzáadják az egyéb szennyezőanyag-terhelést úgy, mint a közcatornába vezetett ipari szennyvizet, valamint a közintézmények, turizmus és szezonális ingadozásokból származó terhelést.

A VKI alapján 2015-ig minden 2000 LE feletti település szennyvizének gyűjtését és tisztítását meg kell oldani legalább második fokozatú biológiai szennyvíztisztító teleppel. Továbbá azoknál a 2000 LE alatti településeknél is meg kell ezt oldani, amelyek rendelkeznek közműves szennyvízelvezetéssel és a befogadójuk felszíni víz. Amennyiben egy 10 000 LE feletti település érzékeny területen fekszik, vagyis szennyvizének befogadója eutrofizációra különösen érzékeny felszíni víz (Balaton, Velencei-tó, Fertő-tó), akkor a III. fokozatú, nitrogén- és foszforeltávolítást biztosító egységekről is gondoskodni kell (KvVM, 2007).

II.1.2.2. A hazai helyzet

Az 1990-es évek elején hazánk csatornázottsága messze elmaradt a fejlett európai országokétól, alig haladta meg a 40 %-ot. Ekkor a szennyvízgyűjtő hálózat hossza még csak 11 700 km volt. 2006-ban már 35 000 km csatorna állt rendelkezésre, 2015-re pedig a tervek szerint 65 900 km lesz, ami már megfelel a fejlett országok közel 90 %-os csatornázottságának.

A szennyvíztisztítás tekintetében még a csatornázottságnál is nagyobb az elmaradás. Ennek oka egyrészt, hogy a csatornán összegyűjtött szennyvizek 26 %-a még mindig tisztítatlanul, illetve csak mechanikai tisztítást követően kerül a befogadóba. Másrészt a létező biológiai szennyvíztisztítók sem működnek minden esetben megfelelően (KvVM, 2007).

Budapest jelenleg 5300 km-es csatornahálózata napi 500-600 ezer m³ szennyvizet szállít naponta a Dunába. Ennek a szennyvíznek mindössze 51 %-át tisztítják az Észak-pesti és a Dél-pesti Szennyvíztisztító Telepeken (FCsM, 2008). A kiépítés alatt álló Fővárosi Központi Szennyvíztisztító befejezésével ez arány 95 %-ra fog emelkedni (Élőduna, 2006).

II.2. A szennyvíztisztítás technológiája

A szennyvíztisztítás célja, hogy a vizet olyan állapotban juttassuk a befogadóba, hogy az már ne jelentsen terhelést az élővilágra. Az ideális az lenne, ha a vizet a befogadó természetes vízminőségének megfelelően juttatnánk oda vissza, ennek azonban technikai és gazdasági korlátai vannak. A szennyvíz származása szerint külön tárgyaljuk a kommunális, avagy háztartási szennyvíz tisztítását, és az ipari szennyvizek kezelését.

II.2.1. A kommunális szennyvíztisztítás

II.2.1.1. A kommunális szennyvíz

A háztartásokban keletkező kommunális szennyvíz elsősorban a konyhából és a fürdőszobából származik. Összetételét befolyásolja a lakóhely domborzata, az időszakos nagyobb esőzések, a lakosság életszínvonala és vízfogyasztásának mértéke (nagyobb vízfogyasztáshoz higabb szennyvíz tartozik).

Általános összetétele az 1. táblázatban látható.

A szennyvíz és a tisztított vizek összetételét különböző paraméterekkel jellemzik, amelyek a szén, nitrogén és foszfor vegyületekről adnak információt. A legáltalánosabban a következő paramétereket mérik (Bátorfi, 2000):

1. Táblázat. 1 LE szennyvíz jellemző paraméterei Élöduna (2006) nyomán [g/nap].

| Paraméter | Mennyiség |
|-------------|-----------|
| Vízhozam | 150 |
| Lebegőanyag | 100 |
| KOI | 110 |
| BOI | 54-60 |
| Nitrogén | 10-12 |
| Foszfor | 2 |

II.2.1.1.1. Szerves széntartalom mérése

II.2.1.1.1.A. Kémiai oxigénigény (KOI, mg/l)

A vízben levő anyagok térfogategységre vonatkoztatott redukálóképessége, amelyet az oxigénfogyasztás mérésével, oxidálóanyagokkal (pl. kromát, kálium-permanganát) állapítanak meg. Értéke egyenesen arányos a szervesanyag-tartalommal.

II.2.1.1.1.B. Biológiai oxigénigény (BOI, mg/l)

A vízben levő szervesanyagok mikroorganizmusok általi adott hőmérsékleten és idő alatt történő oxidációjához szükséges oxigén mennyisége. Általánosan 20°C-on végzik a mérést 1, 5, 7 vagy 20 napig, ez utóbbi paramétert jelzik a névben (pl. BOI₅). Értéke a biodegradálható szervesanyag mennyiségével arányos, értelemszerűen sosem nagyobb a KOI-nál.

II.2.1.1.2. Nitrogénformák mérés

A leggyakoribb szervesetlen nitrogénformákat vizsgálják, úgymint az ammóniumot, nitrátot és nitritet, ill. az összes nitrogént, amit általában Kjeldahl-szerint mérnek.

II.2.1.1.3. Foszforformák mérése

A bioszférában a foszfor szinte kizárólag a legoxidáltabb formájában, foszfátként (PO_4^{3-}) van jelen. A növények is csak ilyen formában képesek felvenni, ezért nevezik reaktív foszfátnak is. A szennyvizekben az összes foszfort és a reaktív foszfátokat is mérik.

II.2.1.2. Kommunális szennyvíztisztítás technológiája

A szennyvíztisztítás alapvetően három lépcsőben történhet (Barótfi, 2000).

II.2.1.2.1. I. fokozat

Az első fokozat a mechanikai tisztítás, amelynek célja a durva szennyeződések, az ülephető és a lebegő anyagok egy részének, valamint a zsírok, olajok eltávolítása. Ezt a célt szolgálják a tisztítóművek elején található különböző rácsok, szűrők, kő-, homok- és zsírfogó műtárgyak, valamint az előülepítők. Utóbbiakban kiülepített iszap további kezelés céljából az iszapvonalra kerül.

II.2.1.2.2. II. fokozat

A második fokozat célja a szervesanyagok bontása. Ehhez általánosan biológiai tisztítóegységeket alkalmaznak, amelyekben a bióta (baktériumok és protozoák) anyagcseréje folyamán szubsztrátként hasznosítja a szennyezőanyagokat. A másodlagos szennyvíztisztító-műtárgyak lehetnek fix ágyasak vagy szuszpendált rendszerek.

II.2.1.2.2.A. Fixágyas rendszerek

A fixágyas, avagy fixfilmes kezelési módok lényege, hogy a biológiai tisztítás a hordozón kialakuló biofilmben megy végbe. A hordozók lehetnek inerte (kőtörmelék, kavics, homok, poliuretán hab) vagy ioncsere kapacitással bíró anyagok (pl. zeolitok, aktív szén). Utóbbiak esetében a biodegradáción kívül a szorpció folyamatok révén is szűrődnek ki szennyezők.

A fixágyas rendszerek legismertebb változatai a folyamatosan mozgatott tárcsás rendszerek (rotáló kontaktorok), a felülről betáplált csepegtető testek és a töltött ágyas reaktorok, amelyeknél általában a betáplálás és a levegőztetés is alulról történik.

Az utóbbi két reaktor típus legáltalánosabb problémája az eltömődés, amit általában a nyomásesés (pressure drop) paraméter változása révén észlelnek az üzemeltetők. Ennek elkerülésére időnként mosásra van szükség, ami azonban plusz költséget jelent, valamint szintén kezelendő mosóvizet eredményez.

A fixágyas biofilmes reaktorokról általánosságban elmondható, hogy bár a szuszpendált rendszereknél rosszabbul birkóznak meg a lökészerű terhelésekkel, mégis kevésbé érzékenyek a túlterhelésre és a toxikus anyagokra. Nagyobb biomassa érhető el bennük, átlagosan 30-40

g/L, de előfordul 74 g/L is, aminek köszönhetően nagyobb tisztító teljesítményre képesek (Qureshi és mtsi, 2005). Régebbi kommunális szennyvíztisztítóknál találkozhatunk velük, vagy speciális feladatokra használják őket, mint pl. a Dél-pesti Szennyvíztisztító Telep harmadik fokozatként használt nitrifikáló és denitrifikáló bioszűrők.

II.2.1.2.2.B. Szuszpendált rendszerek, az eleveniszapos eljárás

Bár a fixágyas reaktorok nagyobb hatékonyságra képesek, mégis a kisebb helyigényű és gazdaságosabban üzemeltethető eleveniszapos rendszerek terjedtek inkább el a biológiai szennyvíztisztítás második fokozataként. Ezekben a mikroorganizmusokat a szennyvízzel keverik, és a biodegradáció elsődleges szintere a bioflokuláció révén képződött pelyhek (II.5.1.1.2. pont), amelyek által az átlagos biomassa koncentráció 3-8 g/L körül alakul (Qureshi és mtsi, 2005). Ilyen módon körülbelül 90 %-os szervesanyag csökkenést lehet elérni, ami arányos biomassa növekményként jelentkezik.

Bár eredetileg az eleveniszapos eljárást szakaszos üzem mellett írták le, ma már minden nagyobb kapacitású szennyvíztisztítóban folyamatos üzemű rendszereket találunk. Ezeknek a lényege, hogy a beérkező előülepített nyers szennyvízhez folyamatosan keverik az utóülepítőből visszakeringetett biodegradációért felelős eleveniszapot. A levegőztetett medencékben zajlik a szervesanyagok bontása, majd a keverék az utóülepítőbe kerül, ahol az eleveniszap ideális szerkezete esetén a biomassa kiülepszik a tisztított vízből. Utóbbit továbbvezetik a befogadóba vagy a harmadik fokozatra. A leülepedett iszap egy részét visszakeringetik a levegőztetett medencékbe, ez a recirkulált iszap (RI), míg a biomassa szaporulatként keletkezett többletet, az úgynevezett fölösiszapot az iszapvonalra szállítják.

Az eleveniszapos rendszereknek nagyon sokféle változata létezik. A levegőztetés módja szerint megkülönböztetünk felszíni, felszínközeli és fenék levegőztetőket, sűrített levegős és tiszta oxigénes rendszereket. Utóbbiakat csak ritkán, nagy szennyezőanyag-tartalmú ipari szennyvizeknél alkalmazzák. Nehezen bontható ipari szennyvizek kezelésére elterjedtek még a teljes oxidációs rendszerek, amelyekben hosszú levegőztetést alkalmaznak viszonylag kis terhelés mellett.

Gyakori az eleveniszapos medencék választófalak segítségével történő szétválasztása úgynevezett szelektorokra (1. ábra). A szelektorok lehetnek



1. ábra. Orbál-típusú anoxikus-oxikus szelektoros eleveniszapos medence

levegőztetettek, azaz aerobok, vagy anoxikusak. Utóbbi esetben csak a kiüledést és a tovább áramlást biztosító minimális keverést végeznek, így az oldott oxigén a biológiai folyamatok révén szinte teljesen elfogy. Az ilyen rendszereket elsősorban a denitrifikáció és a biológiai foszforeltávolítás elősegítése végett használják (II.6.3.4. és II.6.2. pont).

Az eleveniszapos rendszerek lehetnek két- ill. többlépcsősök is. Ilyenkor két vagy több teljes, levegőztetőből és üleptetőből álló rendszert kötnek egymás után. Az első lépcsőt általában úgy üzemeltetik, hogy abban a könnyen bontható anyagok biodegradációja menjen végbe (nagy terhelés, rövidebb tartózkodási idő). A második lépcsőt pedig általában a nehezebben bontható szennyezők eliminálására optimálják (kis terhelés, hosszabb tartózkodási idő). Ezzel a megoldással inkább ipari szennyvíztisztítóknál találkozhatunk (Princz és Oláh, 2005).

II.2.1.2.3. III. fokozat

A felszíni vizeket egyre több mikroszennyező (pl. peszticidek, gyógyszermaradványok, stb.) és eutrofizációt okozó tápanyag (nitrogén és foszfor vegyületek) terheli. Ezeknek az anyagoknak az eltávolítására fejlesztették ki a háromfokozatú rendszereket, melyeket azonban költségességük illetve helyigényük miatt csak indokolt esetben, érzékeny befogadóknál alkalmaznak. A harmadlagos kezelés sokszor több lépcsőből áll, amelyek közül a fertőtlenítés (amennyiben ilyet végeznek) mindig az utolsó. A harmadik fokozat leggyakoribb fajtái a következők:

1. **Szűrés:** Történhet a maradék lebegőanyag (homokszűrés), toxikus vegyületek (aktív szén szűrés), vagy nitrogén (nitrifikációs-denitrifikációs biofilmes szűrők) eltávolítása céljából.
2. **Tavas rendszerek:** Mesterséges tavak, gyakran makrofitákkal betelepítve, amelyek a természetes öntisztulási folyamatokat használják ki. Lehetővé teszik a lebegő anyagok kiüledését és a biológiai tisztítás folytatását.
3. **Mesterséges lápok:** Telepített gyékényes, nádas vagy egyéb növényes lápok, amelyek önmagukban is végezhetik kisebb települések, üzemek szennyvíztisztítását.
4. **Fertőtlenítés:** Célja a befogadóba jutó mikrobák, elsősorban patogének számának csökkentése. A leggyakrabban klórral, ózonnal vagy UV sugárással történik.

II.2.1.2.4. Iszapkezelés

Az elő- és utüleptetőkről származó szennyvíziszap kezelése egy többlépcsős folyamat, amely az iszap sűrítésével kezdődik. Ez történhet gravitációsan, centrifugálással, sűrítő szűréssel stb. Ezt követi leggyakrabban az anaerob rothasztás, amely több hétig is eltart, és biogáz termelődésével jár, amit energiaforrásként hasznosíthatnak. A kirothasztott iszapot további víztelenítő eljárások után elégetik, komposztálják, vagy egyéb módon hasznosítják.

II.2.1.3. A Dél-pesti Szennyvíztisztító Telep (DpSzT)

A főváros négy délpesti kerületének (XVIII, XIX, XX. és XXIII. kerület) csatornahálózata a domborzati viszonyoknak megfelelően a Ráckevei-Soroksári Dunaág felé lejt. A főmedernél sekélyebb és jóval keskenyebb oldalág vízhozamát a főág vízszintje mellett a kiágazásra épített Kvassay szilip határozza meg. Mivel a Ráckevei-Soroksári Dunaág a főághoz képest lényegesen kisebb vízhozamú (Budapestnél a főág átlagos vízhozama $2500 \text{ m}^3/\text{s}$, az oldalágé $35 \text{ m}^3/\text{s}$), ezért vize sokkal érzékenyebb a bejutó szennyeződésekre, amiért hazai viszonylatban az elsők közt, már az 1950-es években megkezdtek a terület szennyvizét tisztító üzem építését. A biológiai tisztítást is végző telep 1966-ban kezdett üzemszerűen működni, és egy évvel később az iszapkezelés is megvalósult. 1989 óta az iszapágon képződő biogázt gázmotor segítségével hasznosítják, amivel mára a szennyvíztisztító energiaigényének jelentős részét fedezi. 1999-ben harmadik fokozatként üzembe helyezték a nitrogén- és foszforeltávolítást végző Biofor egységeket. A szennyvíztisztító kapacitása jelenleg napi $80\,000 \text{ m}^3$, ami körülbelül $300\,000$ lakos szennyvizét jelenti (FCsM, 2008).

II.2.1.3.1. A Dél-pesti Szennyvíztisztító Telep felépítése és működése

A Telepen háromfokozatú szennyvízkezelés zajlik. A tisztítómű felépítése a követi a hagyományos felépítést. A szennyvizet és csapadékvizet egyaránt magába foglaló víz (2. ábra, piros nyíl) gravitációsan érkezik a telepre, és először mechanikai előtisztításon esik át. Kőfogókban felfogják a csatorna fenekéről származó gőrgötett anyagokat, rácsokon kiszűrik a nagyobb lebegő anyagokat, a homokfogó medencékben kiülepítik a homokot, a zsírfogókban pedig leválasztják a zsírokat és olajokat (2. ábra, 1). Ezt követően a víz a Dorr típusú előülepítőkhöz kerül (2. ábra, 2), amelyek gépi kotróberendezéssel



2. ábra. A DpSzT felülnézeti képe. Piros nyíl: befolyó víz; 1: kő-, homok- és zsírfogó rácsok; 2: előülepítők; 3: eleven-iszapos medencék; 4: ütülepítők; 5: Biofor-NP; 6: Biofor-DN; 7: klórozó; 8: iszaprohasztók; kék nyíl: elfolyó víz.

ellátott sugárirányú átfolyású ülepítők. Itt eltávolítják a könnyebb üleplehető szervesanyagokat, így keletkezik a nyersiszap. Ez utóbbi további feldolgozásra az iszapvonalra kerül (2 ábra, 8), míg a vízfázis az eleveniszapos medencékbe folyik (2 ábra, 3).

Az eleveniszapos medencékben történik az elsődleges szervesanyag-eltávolítás, amit jelentős KOI csökkenés jelez (a telepi befolyó 450-650 O₂ mg/L-es érték 30-80 O₂ mg/L-re csökken). A sorosan kapcsolt nyolc medence közül az első kettőt nem levegőztetik, vagyis anoxikus szelektorként működnek, amivel elősegítik a biológiai foszforeltávolítást, ill. a denitrifikációt. A szintén Dorr típusú utóülepítőekben (2 ábra, 4) kiülepedett eleveniszap egy részét recirkulációs iszapként visszakeringetik az eleveniszapos medencékbe, a fölösiszap pedig az iszapvonalra kerül.

Az iszapágon (2 ábra, 8) az iszapot először sűrítik, majd az anaerob rothasztókban több hetes rothasztás során biogázt fejlesztenek, amit gázmotor segítségével elektromos áram termelésre használnak. A kirohadt iszapot centrifugálással víztelenítik, majd a mezőgazdaságban hasznosítják, vagy a lerakókban ártalmatlanítják.

Az utóülepítőkről összegyűlő víz a tápanyag mentesítő harmadik fokozatra, a Biofor bioszűrő rendszerre kerül (2 ábra, 5 és 6), ahol a foszfor, a nitrogén és az utóülepítőkről visszamaradó szerves szennyeződések eltávolítása zajlik. Ezekben a töltött ágyas reaktorokban egy speciális kerámiagyóls töltet, a Biolite (Deront és mtsi, 1998) található. A nitrogén-eltávolítás két lépcsőben történik. A víz először a hat párhuzamosan üzemelő, alsó légbefúvós NP medencébe kerül (2 ábra, 5), ahol a nitrifikáció és a maradék reaktív foszfát eltávolítása történik. Utóbbiit kémiai úton valósítják meg, vasszulfátot (Fe₂(SO₄)₃) adagolnak a medencékbe, ami a foszfát ionokkal kiülepedő oldhatatlan csapadékot képez. A denitrifikáció a négy nem levegőztetett, anoxikus denitrifikáló (DN) medencében megy végbe (2 ábra, 6), amelybe szénforrásként metanolt adagolnak. Az eltömődés elkerülése végett az előregedett biofilmet nagy nyomású mosóvízzel (tisztított víz) időnként lemossák, ez a nitrifikáló medencék esetében átlagosan 24, a denitrifikáló medencéknél pedig 20 üzemóra. A nitrifikáló és denitrifikáló szervezetekben gazdag mosóvíz az eleveniszapos medencékbe kerül vissza.

A Biofor egységnek köszönhetően a DpSzT tisztított vízének a lebegőanyag-tartalma 20 mg/L alá, az összes nitrogén harmadára (31 mg/L helyett 11 mg/L), az összes foszfor mennyisége pedig kétharmadára (1,9 mg/L helyett 1,3 mg/L) csökkent. A legjelentősebb eredmény azonban az, hogy az ammónium-nitrogén átlagosan a korábbi 30 mg/L-es értékről a 2 mg/L-es határérték alá esett vissza (2. táblázat).

A tisztított szennyvizet a Ráckevei-Soroksári Dunaágba való engedés előtt szükség esetén, elsősorban nyáron klórgázzal fertőtlenítik (2 ábra, 7).

II.2.1.3.2. A Dél-pesti Szennyvíztisztító Telep hatásfoka

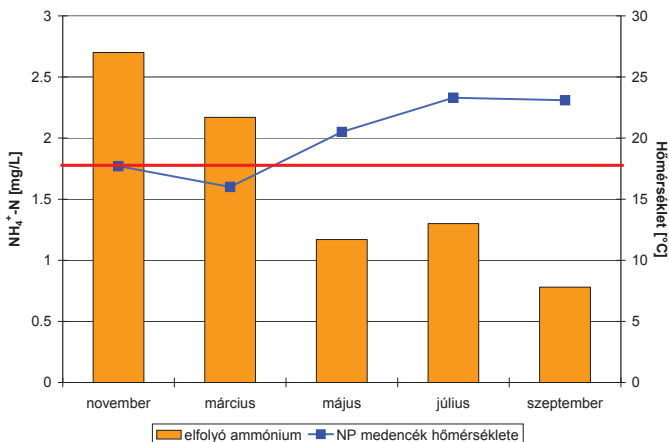
A DpSZT technológiájában, műszerezettségében és tisztítási komplexitásában az európai élvonalba tartozik, aminek az eredményeként az európai normáknál jobb paraméterekkel kerül a befogadóba a tisztított víz (2. táblázat).

Ennek ellenére szélsőséesebb körülmények közt, mint például téli

nagy hidegekben, nyári kánikulákban, nagy esőzésekkor, előfordul, hogy a biológiai egységek (eleveniszapos medencék, Biofor) nem megfelelő hatásfokkal működnek. Különösen igaz ez a nitrifikációs bioszűrő egységre (NP medencék), amelyek a téli időszakban gyakran nem kepesek határérték alatti ammónium-nitrogén koncentrációkat elérni (3. ábra).

2. Táblázat. A befolyó és elfolyó vízminőségi adatok FCsM (2008) nyomán [mg/L].

| Vízminőségi paraméter | Befolyó víz | Elfolyó víz | DpSZT előírása | EU határértékek |
|---------------------------------|-------------|-------------|----------------|-----------------|
| KOI | 633 | 46 | 50 | 125 |
| BOI ₅ | 344 | 11 | 10 | 25 |
| Lebegőanyag | 267 | 6 | 35 | 35 |
| NH ₄ ⁺ -N | 47 | 1,2 | 2 | - |
| NO ₃ ⁻ -N | 0,2 | 5 | 9 | - |
| Összes N | 44 | 11 | - | 10-15 |
| Összes P | 13 | 1,3 | 1,8 | 1-2 |



3. ábra. NP-Biofor medencék hőmérséklete és az elfolyó víz ammónium-nitrogén koncentrációja.

Az ammónium-nitrogén határértéke pirossal jelölve.

II.2.2. Ipari szennyvizek

A legtöbb ipari tevékenység során keletkező szennyvíz összetétele, hőmérséklete jelentősen eltér a kommunális szennyvizétől, ezért a befogadóba vagy a csatornahálózatba engedése, illetve esetleges újrahazsnosítása előtt külön kezelést igényel. Az alkalmazott tisztítási eljárások nagyban függenek a szennyezőktől, amelyek iparáganként, sőt üzemként változhatnak. A tisztító telepek sokszor alkalmaznak a kommunális szennyvíztisztításból ismert rendszereket vagy azok módosított változatait (pl. eleveniszapos eljárás, biofilmes reaktorok). Emellett gyakran találkozhatunk kémiai (semlegesítés, kicsapatás) és fizikai (reverz ozmózis) eljárásokkal is. Nagy általánosságban iparáganként a következők összegezhetők a keletkező szennyvizekről (Barótfi, 2000):

1. **Nehézipar:** Változatos szennyezőkkel találkozhatunk. Így például a villamos erőművekben, alumínium iparban a befogadók hőszennyezésének elkerülése jelenti a legfőbb kihívást, amit hűtőtornyokkal oldanak meg. A bányászatban az erősen savas, nehézfémekkel, lebegő anyagokkal terhelt szennyvizeket kell megtisztítani általában komplex kémiai, fizikai és esetleg biológiai eljárásokkal. A galvanizáló üzemek elektrolitokkal szennyezett vizét fizikai-kémiai eljárásokkal tisztítják. Az acélgyártásban az olvasztás során keletkező hűtőfolyadék hőszennyezése mellett a kokszyártás során keletkező vizek tisztítása érdemel külön figyelmet.
2. **Vegyipar:** Nagyon sokféle nehezen bontható vegyülettel szennyezett vizek képződnek, amelyek változatos kezelési eljárásokat igényelnek, sokféle különleges biológiai tisztítást végző reaktorral. Számos bonthatatlan, toxikus vagy karcinogén vegyület is képződik, amelyeket fizikai eljárásokkal vonnak ki ezekből a vizekből.
3. **Élelmiszeripar:** Nagymennyiségű bár zömében könnyen bontható szervesanyagok, patogének és zsíros-olajos szennyeződések jelentik ezen iparág legfőbb vízszennyezőit. Előbbiekkel elsősorban biológiailag, utóbbiakkal fizikai-kémiai eljárásokkal küzdenek meg.
4. **Könyvűipar:** A legkevésbé szennyezett vizek a fa- és papíriparban képződnek, míg a bőr- és textiliparban előállított színező- és mosóanyagok nehezen bontható szerves vegyületeket, nehézfémeket is tartalmaznak. Utóbbiak speciális fizikai-kémiai és biológiai kezelést igényelnek.

II.2.2.1. A kokszyártás és szennyvizeinek kezelése

II.2.2.1.1. Koksizálás

A modern nyersvasgyártáshoz, ami egyben az acélgyártás első lépése elengedhetetlen a koksizálás, amely egyrészt biztosítja az olvasztáshoz szükséges hőt, másrészt a szén redukálja a vasérc vas-oxidjait vassá. A koksizálás vagy más néven magas hőfokú szénleparlás során nagy teljesítményű koksizoló blokkokban más néven kamrás kemencékben levegőtől elzártaan hevítik a kőszenet. A hevítés következtében száraz desztilláció megy végbe a következőképpen (Nowak és mtsi, 2004):

1. 100°C-ig a kőszen kiszárad.
2. 100-300°C között a kötött állapotú víz is kiválik, széndioxid, kénhidrogén képződik, a gyantaanyagok desztillálnak.
3. 300-450°C között a kőszen megolvad, kátrány és egyéb szénhidrogének keletkeznek.
4. 450-550°C között a kátrányképződés befejeződik, kialakul a félkoksiz szerkezet.
5. 550-700°C között további gázképződés történik.
6. 700°C felett a szénhidrogének is bomlanak, hidrogén keletkezik, a szén megszilárdul és kialakul az egyre tömörebb koksizszerkezet.
7. 900-1100°C-os maximális hőmérséklet elérésekor a volatilizálható vegyületek már mind távoznak. A szén grafit formájában szilárdul meg, kialakul a koksiz jellegzetes ezüstös színe, porózus szerkezete és nagy szilárdsága.

A koksizálás termékei a koksiz, a koksizgáz, a gázvíz és a kátrány. A kátrány szénhidrogéneket és heterociklusos vegyületeket tartalmaz. A koksizgáz főként hidrogénből és metánból áll, de tartalmaz kátrányt, ammóniát, kén-hidrogént, cián-hidrogént, naftalint, benzolt és benzolanalógokat is. Utóbbiakat a gázmosás során távolítják el, és az így képződő gázmosóvíz a gázvízzel együtt kerül tisztításra.

II.2.2.1.2. A koksizológ szennyvíze

A koksizálás során kidesztillált gázvíz, a gázok tisztításához használt gázmosóvíz, ill. a forró koksiz hűtéséhez használt víz együtt képzik a koksizológ szennyvizét, amely erősen szennyezett elegy. A szennyvízben az egyes komponensek koncentrációja a szén minőségének és a koksizológ folyamat körülményeinek függvényében változik (Vazquez és mtsi, 2006a). Általánosan elmondható, hogy számos szennyező vegyületet tartalmaz nagy koncentrációban, amelyek közül a fenol és különböző származékai (pl. krezolok, rezorcin), a nitrogént tartalmazó heterociklusos (NHC) vegyületek (pl. kinolin), a cianid (CN⁻), a rodanid (tiocianát,

SCN⁻) és az ammónia (szabad NH₃ és NH₄⁺) a legjelentősebbek (3. táblázat, Songhu és mtsi, 2007). A nehézfémek koncentrációja alacsony, a foszfortartalmú vegyületek pedig gyakorlatilag teljesen hiányoznak ezekből a vizekből (Vazquez és mtsi, 2006a).

3. Táblázat. Kokszolóművi szennyvizek összetétele (Ghose, 2002; Liu és mtsi, 1996; Maranon és mtsi, 2008; Toh és Ashbolt, 2002; Vazquez és mtsi, 2007) nyomán [mg/L].

| | India | Kína | Ausztrália | Németország | Spanyolország | Magyarország |
|-------------------------------------|----------|----------|------------|-------------|---------------|--------------|
| KOI | 532-810 | 630-1160 | 1800-2200 | 4000-6500 | 800-3030 | 3400-6100 |
| BOI | 64-92 | 200-726 | 450-720 | 1600-2600 | 500-1150 | |
| NH₄⁺-N | 337-562 | 220-300 | 200-5100 | 50-150 | 200-1010 | 2-500 |
| SCN⁻ | Na | 184 | 180-535 | 200-500 | 180-450 | 360-1000 |
| CN⁻ | 8,2-20,7 | 0,04 | 70-95 | 4,0-15 | 15-50 | 1,7-117 |
| TKN | na | 305-390 | na | 300-500 | 250-1245 | na |
| fenolindex* | 1-124 | 41-80 | 60-1040 | 400-1200 | 180-485 | 59-1070 |
| lebegőanyag | na | Na | 40-50 | 2.0-10 | 25-50 | na |

II.2.2.1.3. A kokszolók szennyvizének kezelése

Ilyen sokféle szennyezőt tartalmazó vizek kezelésére a legalkalmasabb a biológiai tisztítás, ezért kevés kivételtől eltekintve (Ghose, 2002) elsősorban így kezelik a kokszolóművi szennyvizeket. Azonban a szennyezők többsége toxikus a legtöbb mikroorganizmusra, ezért szükséges különböző előkezeléseket végezni (Vazquez és mtsi, 2006b). Számos előkezelési eljárás ismert, ezek közül leggyakrabban az ammónia kihajtást végzik, amely során nyert ammóniát vegyipari célokra (pl. műtrágyagyártás) használják. Ezt követheti a fenol kihajtása, ezt elsősorban Indiában és Kínában alkalmazzák (Ghose, 2002; Liu és mtsi, 1996), ami magyarázza az ottani szennyvizek alacsony fenoltartalmát (3. táblázat). Ezen kívül különböző kémiai eljárásokat végeznek a cianid ártalmatlanítására és a lebegőanyagok csökkentésére (Lai és mtsi, 2007), vagy ózonos kezelést a szín és a rodanid eltávolítására (Chang és mtsi, 2008). Mindez az eltérő szénminőség és a különböző kokszolási eljárások mellett magyarázza a biológiai tisztítás előtt álló vizek eltérő összetételét (3. táblázat).

Az alkalmazott biológiai tisztítási eljárások közül kétségkívül az eleveniszapos a leggyakoribb (Liu és mtsi, 1996; Vazquez és mtsi, 2006b). Léteznek ennek különböző módosított változatai, amikor pl. többlépcsős rendszereket alkalmaznak (Vazquez és mtsi, 2006b) vagy tiszta oxigénnel aerálnak (Vazquez és mtsi, 2007). Kínában az anaerob és anoxikus előkezelési eljárásokat különböző biofilm hordozókkal kombinálják a nagyobb hatékonyság reményében (Jianlong és mtsi, 2002; Li és mtsi, 2005; Li és mtsi, 2003; Yan és mtsi, 2007). Alkalmazznak

* Az összes fenolszerű vegyület koncentrációja, amely 4-aminoantipirénnel reakciót ad.

továbbá anaerob ammónia-oxidációra (II.6.3.5. pont) építő rendszereket (Toh és Ashbolt, 2002), és mesterséges lápokot is (Jardinier és mtsi, 2001). Általánosan elmondható, hogy a kokszolóművi szennyvíz tisztítása nem könnyű feladat, és nagyon változó az egyes rendszerek hatásfoka a különböző szennyezők esetében.

II.2.2.2. Dunai Vasmű, az ISD DUNAFERR Zrt.

Bár egy Duna-menti vasmű felépítésének gondolatát már Széchenyi is felvetette, hazánk első acélművei az ország északkeleti részén létesültek A Dunai Vasmű építését 1950-ben az első ötéves terv legjelentősebb beruházásaként kezdték meg Dunapentelén (1951-61 között Sztálinváros, ma Dunaújváros). A termelés az első két nagyolvasztó (Siemens–Martin kemence) elkészültével kezdődhetett meg (1954), majd az ezt követő időszakban (1955-60) párhuzamosan folyt az építkezés és a termelés. Ennek keretében további két nagyolvasztó került beüzemelésre, átadták a meleghengerművet (1960) és az első két kokszolóblokkot (1956, 1960). Ezt követte a hideghengermű megépítése, a kohászati másodtermékek gyártásának beindítása, majd 1986-ban a harmadik kokszolóblokk üzembe helyezése. Az 1983-tól DUNAFERR Dunai Vasmű a magyar vaskohászat meghatározó vállalata, amely a később egyike lett a rendszerváltás kevés nehézipari túlélőjének. A mára számtalan kisebb állvállalatból álló cégcsoport 2004-es privatizációjakor az ukrán-svájci Donbass–Dufenco konzorciumé lett. A kokszolóblokkokat jelenleg az ISD Kokszoló Kft. (ISD-K) üzemelteti.

II.2.2.2.1. Az ISD Kokszoló Kft. kokszolóművi szennyvizének kezelése

Az ISD-K jelenleg két kokszolóblokkot, a hozzá kapcsolódó szénélőkészítőt, kokszosztályozót és vegyi üzemet működteti. Termékei a kohó- és öntődei koksz, az ipari és háztartási koksz, a kamragáz, a kátrány, a nyersbenzol és a folyékony kén.

II.2.2.2.1.A. Előkezelés

A kokszolómű szennyvizét először a Still-Claus üzemegységben kéntelenítik, valamint kihajtják belőle az ammóniát. Ennek hatására optimális működés esetén az utóbbi vegyület 100-200 g/L-es koncentrációról 300 mg/L alá esik vissza. Innen kerül a tulajdonképpeni szennyvízkezelőbe, ahol először kémiai kezelésnek vetik alá. A kémiai kezelés elsődleges célja a szabad cianid eltávolítása, ehhez először kalcium-poliszulfidot, majd egy polialumínium-klorid és poliamin hatóanyagú flokkulálószerrel adagolnak a vízhez, és keverés után átlag 35 óráig üleptik. Ezzel a szabad cianid igen jó hatásfokkal (88 %) távolítódik el, a kötött cianid azonban felére sem csökken (44 %), az egyéb szennyezők koncentrációja pedig gyakorlatilag változatlan marad.

II.2.2.2.1.B. Biológiai kezelés

Ezt követően a kémiailag kezelt víz (KK) egy kétlépcsős eleveniszapos technológiájú biológiai egységre kerül, amely hat levegőztető medencéből és két Dorr-ülepítőből áll. A biológiai folyamatokhoz szükséges foszfort foszforsav adagolással biztosítják, a levegőztetést pedig felszíni rotátorokkal végzik (4. ábra). A folyamat során keletkező kb. 5%-nyi fölösiszapot a kokszolóblokkokban égetik el.

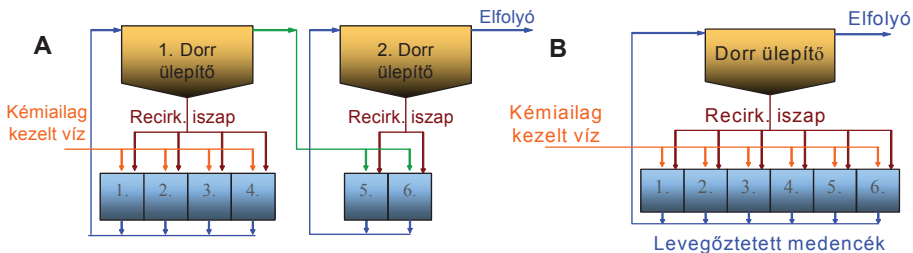


4. ábra ISD Kokszoló Kft. biológiai vztisztító egységének rotátoros levegőztetője

Az első lépcsőben a KK 80 %-a és az első

Dorr ülepítőből származó recirkuláltatott iszap (RI) az első négy párhuzamosan kapcsolt levegőztetett medencébe kerül (5A. ábra), ahol a szennyvíz tartózkodási ideje kb. 24 óra. Erről a lépcsőről ülepítés után elfolyó vizet, a KK 20 %-át és a második ülepítőből származó RI-ot vezetik a második lépcső két levegőztetett medencéjébe, ahol már csak 11 óra a szennyvíz tartózkodási ideje. Bár ennek a kétlépcsős technológiának is előbb a könnyen bontható, majd a nehezebben bontható szennyezők eltávolítása a célja, mégis az általános részben leirtakkal szemben (II.2.1.2.2.B. pont), itt egy kisebb terhelésű, hosszabb tartózkodási idejű első lépcsőt követ egy nagyobb hidraulikus terhelésű, rövidebb tartózkodási idejű második lépcső.

Az általunk vizsgált időszak elején, az egyik Dorr medence karbantartási munkálatai miatt az üzemegység egylépcsősként kényszerült működni (5B. ábra). Ekkor a KK egésze és az egyetlen ülepítőből származó RI a hat párhuzamosan kapcsolt levegőztetett medencébe került, ahol a kezelendő víz tartózkodási ideje kb. 26 óra volt.



5. ábra. ISD Kokszoló Kft. Biológiai vztisztító egységeinek sematikusan rajza kétlépcsős (A) és egylépcsős (B) üzemenet esetén

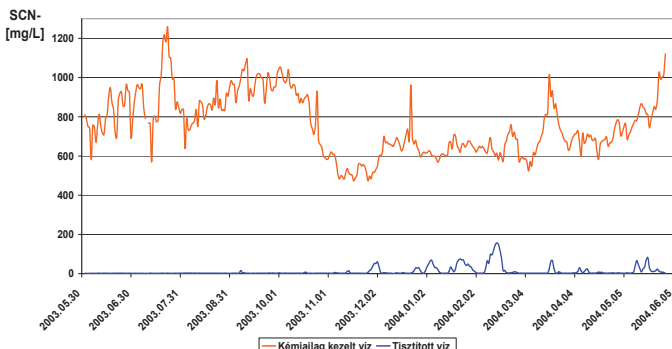
II.2.2.2.2. A szennyvíztisztító hatásfoka

Mint sok más kokszolóművi szennyvízkezelőnél, az ISD-K-nál sem tökéletes a biológiai tisztítás, ahogy azt a 4. táblázat adatai szerint láthatjuk.

4. Táblázat. Az ISD Kokszoló Kft. biológiai víztisztításának jellemzői (2003.06.01-2004.05.31), a cég saját mérési nyomán, kiemelve a határérték feletti értékek, KK = kémiailag kezelt víz, TV = biológiailag tisztított víz.

| | KK [mg/L] | | | TV [mg/L] | | | Hatásfok † [%] | Határérték [mg/L] |
|-------------------------------------|-----------|------|-------|------------|-------------|------------|-------------------|----------------------|
| | min | max | átlag | min | max | átlag | | |
| KOI | 2900 | 5100 | 4059 | 172 | 656 | 332 | 86 | 150 |
| Fenolindex | 372 | 1120 | 621 | 0,01 | 0,11 | 0,02 | 100 | 3 |
| SCN⁻ | 473 | 1258 | 757 | 0,2 | 157 | 11 | 98 | - |
| szabad CN⁻ | 0,1 | 1,1 | 0,5 | 0,01 | 0,28 | 0,05 | 86 | 0,2 |
| összes CN⁻ | 2,4 | 211 | 28 | 1,5 | 120 | 21 | 7 | 10 |
| NH₄⁺-N | 5 | 972 | 208 | 54 | 809 | 279 | -180 | 10 |
| pH | 5,8 | 10,3 | 7,67 | 5,4 | 7,7 | 6,5 | - | 6-9 |

Bár a legtoxikusabb vegyületeket, a fenolt és származékait, valamint a szabad cianidot gyakorlatilag mindig megfelelő hatásfokkal távolítja el a rendszer, a többi szennyező esetén a helyzet már korántsem ilyen jó. A KOI és ammónium-nitrogén még a legjobb működés esetén sem éri el a határérték megkívánta szintet, sőt utóbbi koncentrációja ahelyett, hogy csökkenne, rendszeresen nő a kezelés folyamán. Rodanidra ugyan nincs határérték, és legtöbbször kiváló hatásfokkal degradálódik, mégis bizonyos időszakokban, ismeretlen okok miatt bontása nem teljes (6. ábra).



6. ábra. SCN⁻ koncentráció alakulása a kémiailag kezelt és a biológiailag tisztított vízben a ISD Kokszoló Kft. saját mérési alapján.

† Negatív érték esetén az adott komponens koncentrációja az elfolyóban nagyobb volt, mint a befolyóban, vagyis az adott komponens termelődött a biológiai kezelés során.

II.3. A szennyvíztisztítás mikrobiológiai kutatása

A szennyvíztisztítással kapcsolatos mikrobiológiai folyamatok áttekintése előtt elengedhetetlen megismerkednünk a modern mikrobiális ökológia kialakulásával és módszertani repertoárjával.

II.3.1. A modern mikrobiális ökológia története

II.3.1.1. A mikrobiális ökológia kezdetei

A mikrobiális ökológia első száz évében környezetünk mikrobiótájának megismerésére a tenyésztés alapú módszerek jelentették a legfőbb eszközt. A különböző dúsító és szelektív táptalajok révén már a legelső környezeti mikrobiológusoknak, Martinus Beijerincknek (1851-1931) és Sergei Winogradskynak (1856-1953) is sikerült számos, ma is nehezen tenyészthetőként számon tartott baktériumot leírniuk, mint például a kénhidrogén-oxidáló *Beggiatoa* (Vinogradszkij, 1887), az ammónia-oxidáló *Nitrosomonas* (Vinogradszkij, 1892) vagy az aerob nitrogén-fixáló *Azotobacter* (Beijerinck, 1900) nemzetség tagjait. Az általuk alkalmazott tenyésztéses megközelítésnek azonban számos korlátja van, hiszen a különféle mikrobák életterét különleges tápanyagigényük, szimbiotikus kapcsolataik miatt nagyon nehéz, ha egyáltalán lehetséges laboratóriumi körülmények között modellezni. Az ebből adódó legjelentősebb problémát elsőként még maga Winogradsky fogalmazta meg: „a hagyományosan tenyésztéshez használt közegekben csak a kisebbség tud kifejlődni... a mikroflórát sem minőségileg, sem mennyiségileg nem lehet így értelmezni.” Vagyis a mesterséges tápközegekben történő tenyésztéses eljárások szelekciós erőként hatnak a jelenlévő mikrobaközösségre, és ezért torzítják annak összetételét.

A probléma felvetése tehát viszonylag hamar megtörtént, azonban a mikrobiális ökológia legfőbb kihívásává évtizedekkel később Staley és Konopka (1985) tanulmánya tette, akik a közvetlen mikroszkópos sejtszámlálás eredményeit vetették össze a telepszámláláson alapuló csíraszámbebecslések eredményeivel, és azt találták, hogy a kettő között nagyságrendbeli különbségek vannak. Ezt a jelenséget nevezték el „a nagy telepszámlálási anomáliaként” (“the great plate count anomaly”).

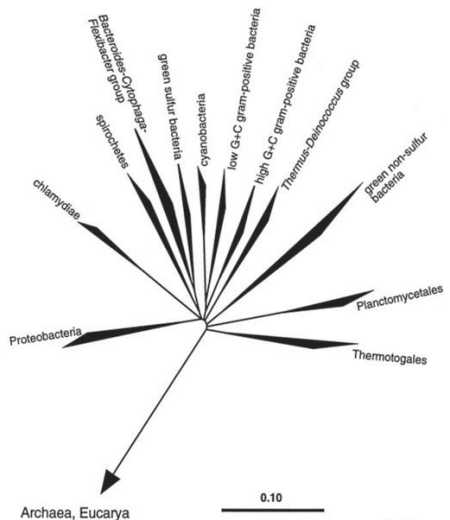
Az 1980-as években a probléma megoldására az eredetileg molekuláris biológus Normann R. Pace új ötlettel állt elő, melynek lényege, hogy minden sejtés élőlény detektálható és azonosítható riboszómáit képző RNS molekulái alapján. A gyakorlatban ez úgy nézett ki, hogy vettek körülbelül 1 kg üledéket a Yellowstone Nemzeti Park Octopus hőforrásából, majd hosszadalmas tisztítási eljárásokkal izolálták az 5S rRNS-t tartalmazó frakciót, és végül

megállapították 3 különböző „faj” bázis sorrendjét (Stahl és mtsi, 1985). Módszerük költséges és körülményes volta miatt nem terjedt el széles körben, de elvük a modern mikrobiális ökológia alapja lett. A nagy áttörést itt is, mint a biológia számos más területén a polimeráz láncreakció (Polimerase Chain Reaction = PCR) jelentette (Mullis és mtsi, 1986).

A mikrobiális ökológusok közül 1990-ben elsőként Pace egykori munkatársa, a tengeri mikrobiológus Stephen Giovannoni használta a PCR technikát (Giovannoni és mtsi, 1990). Ő is a riboszomális RNS-t kódoló gént vizsgálta. A kicsiny 5S RNS génje helyett viszont a korábban törzsfakészítéshez is használt (Woese és Fox, 1977), átlag 1500 bázispár hosszú 16S rRNS molekula génjét szaporította fel. Kutatásai első alanyául a közismerten tápanyag szegény, és ezért feltételezetten szerény mikrobiális diverzitású Sargasso-tengert választotta. A PCR technikának köszönhetően már ebből az alacsony biomasszájú vízből is több százféle baktérium rRNS génjét tudták kimutatni. Az igazi meglepetést azonban az okozta, hogy a legnagyobb számban kimutatott 16S rRNS gén szekvenciája meglehetősen távol állt minden addig tenyésztett baktériumétól. Ez az *α-Proteobacteria* szubdivízióba tartozó csoport a SAR11 nevet kapta, és csak 2001-ben sikerült először tenyészteni (Giovannoni és mtsi, 2005).

II.3.1.2. A modern mikrobiális ökológia által megismert mikrobióta

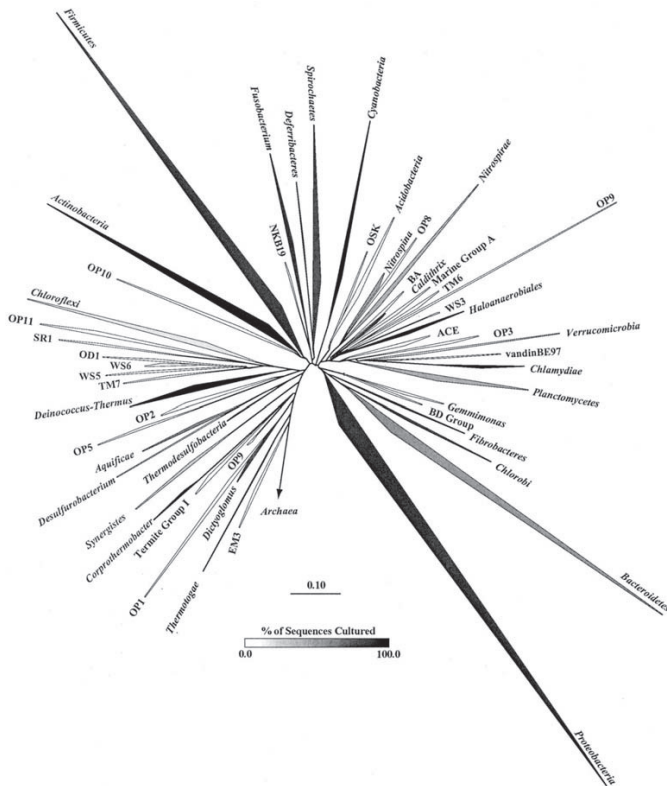
Az úttörő jellegű kutatások után a PCR alapú környezeti mikrobiológiai kutatások a '90-es években gomba módra szaporodtak. A tengereket és hóforrásokat sorba követték az egyre kevésbé különleges élőhelyek. Megvizsgáltak különböző talajokat, üledékeket, édesvizeket, bevonatokat, lepedékeket, és nem utolsósorban számtalan, az alkalmazott tudomány szempontjából érdekes közeget, mint például fermentorokat, bioreaktorokat, komposztokat, rothasztókat, szennyvíziszapokat. A lista gyakorlatilag végtelen, a mikrobiológusok mindig fognak újabb és újabb még nem kutatott élőhelyeket találni. Jól mutatja ezt, hogy Pace és munkatársai egyik közelmúltban született munkájukban a zuhanyzó függönyökön élő mikrobákat vizsgálták (Kelley és mtsi, 2004).



7. ábra. Az ismert bakteriális világ törzsfája 1987-ben Hugenholtz és mtsi (1998) nyomán.

A nem csillapodó lelkesedés eredményeként a publikus szekvenencia-adatbázisok közül a GenBank-ben jelenleg (2008 június) a 900 ezret közelíti a 16S rRNS gén szekvenciák száma, de a csak ellenőrzött szekvenciákat tartalmazó Ribosomal Database Project II (RDP) 2008 október 30-ai frissítésében (release 10) is 706 ezer szekvencia található, és ezek közül mindösszesen 147 ezer származik tenyésztett baktériumokból, és csak 5534 leírt faj típus törzséből (Cole és mtsi, 2007).

A PCR alapú kutatások eredményéből kiderült, hogy a tenyésztéses módszerek sokkal jobban torzítják a valós állapotokat, mint azt korábban feltételezték. Az eredményeket összegezve kiderült, hogy a legkülönbözőbb mintákból tenyészthető baktérium fajok csupán 10-0,1 %-át teszik ki a PCR alapú technikával kimutathatóknak.



8. ábra. Az ismert bakteriális világ törzsfája 2004-ben Schloss és Handelsman (2004) nyomán. A divíziók színe a tenyésztett szekvenciák arányát tükrözi.

Ráadásul az utóbbiak között szinte mindig akad olyan, amelynek még közeli rokonát sem sikerült eddig senkinek sem tenyésztenie. Így az élővilág fája az elmúlt 15-20 évben benépesült számtalan eddig még senki által nem látott, de körülöttünk élő organizmussal (7. és 8. ábra; Hugenholtz és mtsi, 1998; Schloss és Handelsman, 2004). A *Bacteria* ágon számos ilyen eddig nem tenyésztett divízió létezik. Az említett RDP frissítésében szereplő 38 monofiletikus divízió (phylum) közül nyolcnak egyetlen tenyésztett tagja sincs, de további hatnak is kevesebb, mint tíz tenyésztett képviselője van. A tenyésztetlen divíziók között van olyan, amelyet kifejezetten szennyvizekből (anaerob rothasztókból) mutattak ki (Chouari és mtsi, 2005).

Az újonnan felismert tenyésztetlen csoportok nagyszáma miatt új mikrobiális ökológiai fajfogalom is szükségessé vált, amely tenyésztés nélkül is lehetővé teszi a szekvenciájuk alapján hasonló, feltehetően közös leszármazású úgy nevezett filotípusokba sorolt szervezetek rendszertani besorolását. A tenyésztetlen Prokarióták taxonómiája a 16S rRNS gén szekvencia-azonosságán alapszik. Lényege, hogy 93-95 %-os hasonlóság fölött azonos nemzetségről, míg 97 % felett azonos „fajról”, úgy nevezett filospécieszről beszélhetünk (Madigan és mtsi, 2003).

II.3.1.3. A modern mikrobiális ökológia célja

Azonban felmerülhet jogosan a kérdés, hogy mit lehet kezdeni azzal a tudással, hogy például a zuhanyzó függönyünkön él néhány a tudomány számára teljesen új filospéciesz, amelyről létezésén kívül semmi sem ismert? A kérdésre többrétű a válasz.

Egyrészt a taxonómusok új fajok leírása iránti vágya kiolthatatlan, a még tenyésztetlen új csoportok Petri-csészébe szelídítéséhez folyamatosan vetik be újabb és újabb vívmányaikat. Így egyre több filotípus közvetlen fiziológiai megismerésére van mód, és ez által célzott hasznosításuk is lehetségessé válik.

Másrészt folyamatosan fejlődnek azok a módszerek, amelyekkel tenyésztés nélkül nyerhetünk információt egyes mikrobák ökofiziológiai tulajdonságairól. Ilyen például a fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) (Amann és mtsi, 1992), a stabil izotóp próbák (SIP) alkalmazása (Radajewski és mtsi, 2002), de idesorolható a ma még gyerekcipőben járó metagenomika is, amikor nem csak a filogenetika besoroláshoz szükséges 16S rRNS gént vizsgálják, hanem a teljes közösségi genom halmazt, a funkciókért felelős génekkel együtt (Venter és mtsi, 2004).

Harmadrészt, pedig számos esetben nem új filotípusok azonosítása az elsődleges cél, hanem a mikrobiális közösségek dinamikájának a vizsgálata, változásainak a nyomon követése, azok kiváltó okainak és következményeinek az azonosítása. Ez utóbbi kérdéskör megválaszolására talán a legszerencsésebb a molekuláris diverzitásbecslő módszerek tárházához fordulni.

II.3.2. Nukleinsav alapú tenyésztés független mikrobiális diverzitás vizsgáló eljárások

Bár számos nem-nukleinsav alapú tenyésztés független módszer létezik, mint például a leginkább talaj-mikrobiológiában használt foszfolipid-zsír-sav összetétel vizsgálat (Phospholipid Fatty Acid = PLFA) (Frostegard és mtsi, 1993), mégis, ahogy a történeti bevezetőben olvashattuk a PCR alkalmazása óta a nukleinsav alapú technikák vitathatatlanul a legelterjedtebbek.

II.3.2.1. A vizsgált nukleinsavak

A nukleinsav alapú módszerek alapját leggyakrabban környezeti DNS képi, ami által a mintákban található mikrobák azonosítására van lehetőség függetlenül azok állapotától. Aktív sejtek és kitaró képletek (spórák) egyaránt kimutatásra kerülnek. Sőt teljes bomlásukig az élettelen sejtek DNS-e is kivonódik.

Ezzel szemben az RNS alapú kutatásokban a sejtek aktivitásáról is kaphatunk közvetett információt, hiszen mRNS esetén az átíró gének általában tovább íródnak fehérjékké, funkciót ellátó enzimekké (Bollmann és mtsi, 2005). További előny az mRNS molekulák rövid, átlag 3 perces felezési ideje (Takayama és Kjelleberg, 2000), ami további biztosítékot jelent arra vonatkozólag, hogy ne inaktív, esetleg már élettelen sejtekből származó nukleinsavakat vizsgáljunk. Riboszomális RNS vizsgálatok esetén pedig, a nagyobb riboszóma állománnyal rendelkező, feltételezhetően aktívabb filotípusok azonosítására van mód (Nikolausz és mtsi, 2004). Az egyértelműen érdekesebb eredmények lehetősége ellenére az RNS alapú vizsgálatok kevésbé elterjedtek, aminek legfőbb oka a környezeti mintákból történő RNS izolálás módszertani nehézségeiben keresendő úgy, min az tRNS gyors bomlása, vagy az RNáz enzimek nagy ellenálló képessége.

II.3.2.1.1. Nukleinsavak izolálása környezeti mintákból

A nukleinsavak izolálásának első lépése a nukleinsav kivonása, amit tekintve a környezeti minták komplexitását és sokféleségét gyakran egyedi megoldásokat és optimalást igényel. Mivel mintánként változó összetételű közegről van szó, amelyekre a standard, egy élőlényes protokollok általában nem működnek.

Első lépésben a sejteket fel kell táni, és az adott nukleinsavat el kell választani a közeg élettelen részeitől (pl. talajszemcsék, hordozók) és az egyéb sejtalkotóktól. A feltárára számtalan kémiai (pl. detergensok használata, lizozimes sejtfelemésztés) és fizikai (pl. sejtmalomban apró gyöngyökkel való rázatás, folyékony nitrogénes elporítás) módszer létezik. Általában ezek kombinációját használják a házi receptekben és a gyári nukleinsav izoláló

kitekben egyaránt. Szennyvizek esetében Lemarchand és mtsi (2005) tíz különböző eljárást hasonlítottak össze, és a sejtalmos feltárást találták a legeredményesebbnek.

A nukleinsavak tisztítására elsősorban a későbbi sikeres enzim reakciók érdekében van szükség, ez általában szilikagél alapú mátrixok segítségével történik. Amennyiben talajjal vagy egyéb feltételezhetően huminsavakat, polifenolokat tartalmazó mintával dolgozunk, fontos ezek kivonására külön figyelni, mert a PCR során használt *Taq* polimerázt gátolják (Lakay és mtsi, 2007).

Amennyiben RNS-t izolálunk, fokozottan kell ügyelni a sterilitásra, pontosabban mintáink védelmére az igen ellenálló RNáz enzimtől. Ehhez gyors munkára és RNáz mentesített eszközökre van szükség, amit dietilpirokarbonát (DEPC) kezeléssel vagy legalább 3 óras 180°C-os hevítéssel lehet elérni.

II.3.2.2. PCR, ill. RT-PCR környezeti minták esetében

A környezeti minták esetében különösen igaz, hogy ésszerű mintamennyiségből általában nem lehet a további vizsgálatokhoz elegendő, megfelelő minőségű nukleinsavat kinyerni, ezért a PCR technika elengedhetetlen lépés. A környezeti DNS-ből végzett diverzitás feltáró kutatásokban a PCR célszekvenciája leggyakrabban a 16S rRNS gén, de lehetnek fehérjéket kódoló funkciógének is, mint például a háztartási génnek számító RNS polimeráz B (*rpoB*) (Peixoto és mtsi, 2002), vagy az ammónia-oxidálók csoport specifikus ammónia monooxigenáz (*amoA*) génje (Rotthauwe és mtsi, 1997).

A klasszikus PCR alkalmazással szemben, amikor egy konkrét élőlény egy ismert szekvenciájú DNS szakaszát szaporítják fel, a környezeti minták esetében a leglényegesebb különbség az, hogy több élőlény többféle nukleotid sorrendű génszakaszai képezik a templátot. Az ilyen PCR-t multitemplát PCR-ként ismeri a szakirodalom. Mint sejtethető, ilyen esetben különös figyelmet igényel a primerek tervezése, kiválasztása, ill. a megfelelő anellációs hőmérséklet alkalmazása. A primereket általában a célcsoport olyan génszakaszára tervezik, amely a csoporton belül konzervatív, csoporton kívül viszont nem fordul elő. Ez nem egyszerű, különösen nagy célcsoportok esetén, mint például az összes *Bacteria* doménba tartozó szervezet 16S rRNS génjét megcélzó úgy nevezett univerzális primerek esetén, amikor is elkerülhetetlen, hogy legyenek olyan felszaporítani kívánt filotípusok, amelyek szekvenciájához nem illeszkednek tökéletesen, vagyis úgy nevezett mismatch-eket tartalmaznak. Ahogy ezt egy cikkünkben kimutattuk, ahhoz, hogy a később kialakítandó közösség-szerkezeti kép ne torzítson a tökéletesen illeszkedő szekvenciájú csoportok javára, kellőképp alacsony anellációs hőmérsékletet kell választani, anélkül, hogy sérülne a reakció specifitása (Sipos és mtsi, 2007).

Amennyiben RNS-ből indulunk ki, a PCR reakciót meg kell, hogy előzze egy reverz transzkripció (RT) lépés. Ez történhet a későbbi PCR reverz primerével, de a saját tapasztalataink alapján környezeti mintáknál a random hexamer primerek használata hatékonyabbnak mondható (Nikolausz és mtsi, 2004).

II.3.2.3. A multitemplát PCR termék vizsgálata

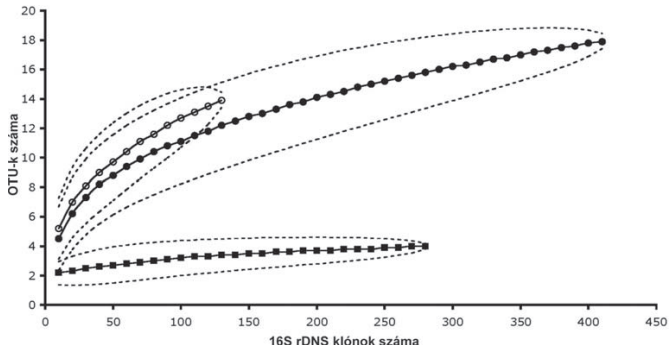
A közösségi PCR eredményeként kapott több filotípusból származó vegyes amplikont a további vizsgálatokhoz mindenképp szét kell választani akár a közösséget alkotó filospécieszek szekvencia-analízis alapján történő azonosítása, akár a közösség szerkezetének a megismerése, akár mindkettő a cél. Erre számos módszer létezik a molekuláris biológia eszköztárában, ezek közül a mikrobiális ökológiában a leggyakrabban a következőkkel találkozhatunk.

II.3.2.3.1. Molekuláris klónozás

A molekuláris klónozás a mikrobiális ökológiában legrégebben használt PCR termék szétválasztó eljárás, már Giovannoni és mtsi (1990) is ezt használták, ill. az első tenyésztés független események mikrobiótát vizsgáló munka (Bond és mtsi, 1995) is ezzel a módszerrel készült. Ilyenkor a multitemplát PCR termékeket általában egy klasszikus ampicillin rezisztencia és kék-fehér szelekción elv alapján működő vektor-kompetens sejt rendszer segítségével választják szét. A transzformálás során kisszámú PCR terméket tartalmazó rekombináns vektort adnak nagyságrendekkel több kompetens sejthez, így biztosítva, hogy a sejtekbe csak egy vektor juthasson be, és a szélesztés után fejlődő telepek plazmidjaiban már csak egy-egy PCR termék molekula többszöröse legyen. Ezek a telepek, ill. a belőlük izolált plazmidokban található inszertek már monomolekuláris klónok lesznek. Az így készíthető klónkönyvtárak mérete a pár száztól a több ezerig terjedhet.

A klónok vizsgálatára több lehetőség adódik. Ezek közül a szekvencia analízis alapján történő filogenetikai besorolás a leggyakoribb. A klónok nagy száma miatt teljes klónkönyvtárak ilyen módon való azonosítása azonban gyakran anyagi, és nagy hatékonyságú eszközök hiányában technikai, ill. időbeli akadályokba ütközik. Ilyen esetben a klónokat csoportosítani kell, ami leggyakrabban restrikción alapú ujjlenyomat készítéssel történik (II.3.2.3.2.A/2. pont).

A molekuláris klónozásban a PCR termék molekula beépülése a vektorokba elméletileg random módon történik, ezért a klónkönyvtárak, bármily nagyok is, csupán a közösséget alkotó összes filotípus egy random kiválasztott halmazának tekinthetők. Ezért összetételük alapján közösség szerkezetet, diverzitást, abundanciát leírni nem szerencsés, amit az úgy nevezett ritkulási (rarefaction) vizsgálatok is jól tükröznek (9. ábra) (Ravenschlag és mtsi, 1999).



9. ábra. Hőforrásból származó különböző prokarióta csoportok ritkulási görbéje (Weidler és mtsi, 2007) nyomán. ■: *Archaea*, ○: *Bacteria* és ●: *Archaea* és *Bacteria* klónok együttvéve.

A ritkulás számítás segítségével az ökológiában megbecsülhető egy nagyobb minta alapján, hogy kisebb mintákban hány fajt találnának, vagyis a gyakorlatban segít megállapítani mekkora mintára van szükség egy adott élőhelyen ahhoz, hogy lehetőleg az összes fajt detektálják (Simberloff, 1978). Klónkönyvtárak esetében a vizsgálandó klónok számát állapítják meg vele. A megfelelő mintaméretet akkor érik el, amikor a ritkulási görbe platóhoz ér. A plató eléréséhez szükséges minták/klónok száma élőhely- (Weidler és mtsi, 2007) és rendszertani csoportfüggő (9. ábra; Ravenschlag és mtsi, 1999).

A klónkönyvtárak összetételét a preferenciális klónozásként ismert hatás is torzíthatja. Ennek a kevésbé kutatott jelenségnek több oka is lehet, amelyek előállhatnak a rekombináns vektor létrehozása közben (pl. rövid ampikonok könnyebb inszerciójából), vagy a gazdasejt révén. Utóbbi lehet bizonyos plazmidok preferenciális többszörözése, ahogy ezt Forns és mtsi (1997) megfigyelték *Escherichia coli* gazdasejt esetében a stop kodont és frameshift mutációt hordozó plazmidok javára, vagy a PCR során keletkezett heteroduplexeket korrigáló gazdasejt repair mechanizmusainak következménye (von Wintzingerode és mtsi, 1997).

II.3.2.3.2. Közösségi ujjlenyomatot képező módszerek

A molekuláris klónozással szemben az ujjlenyomat módszerek esetében nem választjuk ki semmilyen módon a PCR termék molekulák egy részét, hanem azok egészéből alkotunk valamilyen eljárás segítségével egy közösségi ujjlenyomatot. Ezek az eljárások két fő csoportra oszthatók, a közvetlen és a közvetett szekvencia információ alapuló módszerekre. Utóbbiak közé a gének hosszán, ill. a DNS másodlagos tulajdonságai alapján szétválasztó vizsgálatok tartoznak. A továbbiakban e csoportosítás mentén tekintjük át a leggyakrabban használt módszereket.

II.3.3. Közvetlen szekvencia különbségeken alapuló módszerek

A/1. Hibridizáció alapuló technikák

- *Microarray technika*

Ezeknél a módszereknél ismert szekvenciájú filotípusok egy-egy rövid, megkülönböztető szekvenciáját tartalmazó lemezkehez hibridizálják a mintákat. Multitemplát PCR termékekből történő ujjlenyomatképzésre az idetartozó eljárások közül a microarray (DNS chip) technikák sorolhatók. Bár korábban még nagy jövőt jósoltak ennek az eljárásnak, és a szennyvíztisztítás területén alkalmazható chipek is készültek (Kelly és mtsi, 2005; Lemarchand és mtsi, 2005), mégsem vált széles körben elterjedté. Ennek oka a technikai nehézségek és a magas költségek, illetve az, hogy a hibridizációs eljárásokkal csak az ismert filotípusokat lehet detektálni, ami a mikrobiális fajok száma és ismeretlensége miatt a módszer használhatóságát a csak jól ismert fajösszetételű mintákra (habitát specifikus microarray), ill. kisebb csoportok (pl szulfát-redukálók) vizsgálatára korlátozza (Wagner és mtsi, 2007).

- *Fluoreszcens In Situ Hibridizáció (FISH)*

Bár nem minősül ujjlenyomat eljárásnak, de a mikrobiális ökológiában igen gyakran alkalmazzák, ezért itt is említést érdemel a Fluoreszcens *In Situ* Hibridizáció eljárását (Amann és mtsi, 1992). Ennél a módszernél a nukleinsavakat nem vonják ki a mintákból, hanem a sejtekhez *in situ* hibridizáltatnak fluoescensen jelölt nukleinsav vagy nukleinsav analóg próbákat. Így megfigyelhetővé válik az egyes filotípusok egymáshoz viszonyított elhelyezkedése, illetve mikroszkópos számlálással kvantitatív következtetéseket is lehet tenni. Bár e számlások eredményei a környezeti minták komplexitása miatt nem feltétlenül szignifikánsak a minta egészére vetítve.

Amennyiben a mintákat radioaktívan jelölt szubsztrátokkal inkubálják, és a FISH vizsgálattal párhuzamosan egy sugárzás érzékeny ezüst emulziós képet is készítenek (FISH-mikroautoradiográfia = FISH-MAR), a mikrobákat nemcsak azonosítani lehet, hanem metabolikus aktivitásukról is kapunk információt.

A FISH eljárások legfőbb hátránya is az, hogy csak a már ismert filotípusokat tudjuk vele felismerni. E probléma feloldására javasolják egyes szerzők a teljes körű megközelítést (Full cycle approach; Amann és mtsi, 1995; Snaird és mtsi, 1997), amelyben egy adott mintából képzett klónkönyvtár kiértékelése révén talált csoportokra terveznek specifikus próbákat. Ezekkel a próbákkal végzett FISH vizsgálat aztán minden kétséget kizáróan bizonyítja egyes csoportok jelenlétét a mintában. A módszer azonban nagyon költséges és időigényes, ami lehetetlenné teszi alkalmazását nagyszámú mintán.

A/2. Restrikciós hasításon alapuló eljárásokra

- *RFLP, ARDRA*

A restrikciós hasításon alapuló módszerek, avagy restrikciós fragmenthossz polimorfizmus vizsgálatok (RFLP = Restriction Fragment Length Polymorphism) lényege egyszerű: a restrikciós enzimek adott rövid DNS szekvenciákat ismernek fel, és azoknál feldarabolják a molekulát. Így az adott filotípusra jellemző, különböző hosszúságú szakaszok (fragmentek) jönnek létre, amelyeket továbbiakban agaróz vagy poliakrilamid gélelektroforézis segítségével lehet szétválasztani. Amennyiben az amplifikált gén 16S rDNS, ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analyses; Vaneechoutte és mtsi, 1992) névvel illetik az eljárást. Ezek a módszerek leginkább törzsek vagy klónok csoportosítására terjedtek el. Közösség vizsgálatokhoz ma már nagyon ritkán használják, mivel nagyon sok sávból álló, nehezen értékelhető mintázatokat eredményeznek.

- *TRFLP*

A klasszikus RFLP helyett a mikrobiális ökológiában a TRFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism; Liu és mtsi, 1997) vizsgálat terjedt el, amelynek lényege, hogy a már multitemplát PCR-hez használt egyik primert fluoreszcensen jelölik, így egyik végükön jelölt PCR termékek jönnek létre. A restrikciós hasítás után csak a terminálisan fragment lesz jelölt, amelynek detektálásához általában kapilláris elektroforézissel működő genetikai analízátorokat („szekvenátorokat”) használnak. Az eljárás az utóbbi 10 évben igen nagy népszerűsége telt szert. Ennek oka, hogy a gélelektroforézis alapú eljárásoknál egyszerűbben kivitelezhető, jobban reprodukálható és nagyobb felbontóképességű ujjlenyomat módszer (Moeseneder és mtsi, 1999; Nunan és mtsi, 2005). Továbbá, hogy ezekből az ujjlenyomatokból a közösséget alkotó csoportok arányára is következtethetünk, vagyis egy szemikvantitatív módszerről beszélhetünk (Sipos és mtsi, 2007).

Azonban ennek az eljárásnak is van egy nagy a hiányossága még hozzá az, hogy a filospécieszek azonosítására csak közvetve, adatbázisok *in silico* hasításához hasonlítva van lehetőség (Marsh és mtsi, 2000). Az ilyen azonosítás annál nehezebb, minél nagyobb és szerteágazóbb adatbázisról van szó (pl. 16S rRNS gén). A nem-fehérjekódoló gének, mint amilyen 16S rRNS gén esetében további nehézséget jelent a közeli csoportok között is gyakoribb deléciók-inszerciókból adódó jelentős hosszbeli variancia, ami által azonos filospécieszbe tartozó szervezetek jellemző terminális fragmentjei is különbözhetnek.

A filospéciesz-meghatározás csekély lehetősége mellett problémát jelenthetnek az úgy nevezett pszeudo terminális restrikciós fragmentek (pszeudo-TRF) is. Ezek olyan nem megfelelő méretű

csúcsok, amelyek általában a várt méretű TRF mellett jelennek meg, akár annak közvetlen közelében, akár távolabb. Létükre monomolekuláris PCR termékek vizsgálata esetén szokott fényderülni. Kialakulásuk oka ma még nem egyértelmű, valószínűleg több hatás is közre játszik benne úgy, mint egyszálú DNS képződése a PCR reakció során (Egert és Friedrich, 2003; Sanchez és mtsi, 2006) vagy a *Taq* polimeráz fennmaradó aktivitása a restriktációs hasítás folyamán (Hartmann és mtsi, 2007).

II.3.3.1.1.B. Közvetett szekvencia különbségeken alapuló módszerek

Az idesorolható módszerek az amplifikált DNS szakaszokat hosszuk, olvadáspontjuk és/vagy másodlagos konformációjuk alapján, valamilyen elektroforetikus eljárás segítségével választják szét. További csoportosításukat, az elválasztás alapját képező tulajdonságok alapján végezzük:

B/1. Génhossz heterogenitáson alapuló módszerek (LH-PCR, RISA, ARISA)

Az idetartozó eljárások gyűjtő neve LH-PCR (Length Heterogeneity – PCR; Suzuki és mtsi, 1998). Ezeknél az eljárásoknál a PCR célgénjének deléciókból és inszerciókból adódó természetes hosszbeli heterogenitása alapján történik az elválasztás. Az eljárás hatásosságát befolyásolja a heterogenitás mértéke, ami az amplifikált DNS szakasztól függ. Egy fehérjéj kódoló funkciógénben a nonsense mutációk miatt nagyon ritkák a deléciók és inszerciók, míg egy rRNS génben már gyakoribbak.

Igazán nagymértékű hosszbeli heterogenitásról azonban a nem-kódoló szakaszoknál találkozhatunk. Ilyen a 16S és 23S rRNS gén közötti ITS (Internal Transcribed Spacer) szakasz, amelynél a hosszbeli változatosság Fisher és Triplett (1999) szerint 143 és 1529 bp között változik. Az ITS szakasz hosszbeli heterogenitásán alapuló módszert RISA-nak (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis; Borneman és Triplett, 1997), illetve ARISA-nak (Automated RISA; Fisher és Triplett, 1999) nevezik. Előbbit poliakrilamid lapgélén, utóbbit a TRFLP-hez hasonlóan a jobb felbontás érdekében kapilláris elektroforézissel végzik.

A módszer előnye, hogy mentes a restriktációs hasítás, ill. a másodlagos szerkezeten alapuló módszerek anomáliáitól, továbbá kapilláris elektroforézissel még a TRFLP módszernél is jobb eredményeket ad reprodukálhatóság szempontjából (Mills és mtsi, 2003). Az ITS szekvenciái azonban nagymértékű változatosságuk miatt csak közeli csoportok, faj alatti rendszertani kategóriák filogenetikai elemzésére alkalmasak, ezért az ITS alapú környezeti vizsgálatok inkább gombák esetén terjedtek el.

B/2. DNS olvadásponton és másodlagos szerkezeten alapuló módszerek (DGGE, TGGE)

Ezek a módszerek a PCR termékeket alkotó DNS molekulák két tulajdonságát használják ki: a különböző fajok egyedi DNS szekvenciájából (GC-tartalom) adódó eltérő olvadáspontot, és a már megolvadt, egyszálú DNS molekulák által felvett másodlagos konformációt. Az idetartozó módszerek az „olvasztás” módjában térnek el. A DNS egyszálúvá válhat egy hőmérsékleti grádiens (Termális Grádiens GélElektroforézis = TGGE), vagy egy denaturáló ágens koncentráció-grádiense mentén (Denaturáló Grádiens GélElektroforézis = DGGE), amit egy poliakrilamid lapgélben alakítanak ki (Muyzer, 1999).

Azonban, ahogy ezt egy korábbi munkánkban bemutattuk (Nikolausz és mtsi, 2005), számos ma még részben ismeretlen anomáliák miatt, ezen módszerek elválasztása nem tökéletes. Ráadásul a szükséges speciális gélek és futtatási körülmények miatt a reprodukálhatóság sem kielégítő, nem ugyanazon gélen történt futtatások nem összehasonlíthatók, ezért nagyszámú minta vizsgálatára nem alkalmasak. Nagy előnyük viszont, hogy az ujjlenyomatot képező sávok kivágásával, reamplifikálásával, majd szekvencia analízisével egyszerűen információt kaphatunk a mintázatot képző génekről. Sajnos azonban az így nyert szekvenciák a tökéletlen elválasztás miatt gyenge minőségűek.

B/3. Egyszálú DNS másodlagos szerkezetén alapuló módszer (SSCP)

Az SSCP (Single-strand-conformation polymorphism) módszer (Schwieger és Tebbe, 1998) annyiban különbözik a DGGE-től, hogy itt az egyszálúsítás még az elektroforézist megelőzően enzimatikusan történik. Hasonló előnyökkel és hátrányokkal bír, mint a DGGE és TGGE módszer, de körülményes kivitelezése miatt kevésbé elterjedt eljárás.

II.3.3.1.1.C. Stabil izotóp próbák (SIP) alkalmazása

A stabil izotóp próbák alkalmazásával készített közösségi ujjlenyomatok esetén a vizsgálandó mikroba közösséget először stabil izotópokkal módosított vegyületekkel „etetik”, majd ultracentrifugálás segítségével izolálják a nehéz RNS frakciót, amiből kiderítik, hogy mely filotípusok bontják a jelölt komponenst (Radajewski és mtsi, 2002). DGGE vagy TRFLP ujjlenyomat segítségével végig követhető a jelölt vegyület metabolizmusának útvonala az adott közösségben. Bár e napjainkban egyre divatosabb módszer nagyon izgalmas eredményeket ígér, számos módszertani nehézséggel terhelt úgy, mint az ultracentrifugálás alapú szétválasztás vagy a nagymennyiségű karcinogén etidium-bromid igénye.

II.4. Szennyvízkezelésben előforduló Prokarióták

Mint láthattuk a II.3.1.2. pont 8. ábráján a molekuláris alapú rendszerezésnek köszönhetően az elmúlt 20 évben a Prokarióták rendszertana teljesen átalakult, ezért röviden áttekintjük a szennyvízkezelésben leggyakrabban előforduló csoportokat.

II.4.1. *Bacteria*

Wagner és Loy 2002-ben megjelent összefoglaló munkájában számos tenyésztés független módszerrel végzett, szennyvíztisztítók eleven iszapos vagy biofilmes egységének *Bacteria* doménba tartozó tagjait vizsgáló kutatás eredményeit foglalták össze (Wagner és Loy, 2002). Egy-egy objektumban 17 és 268 között mozgott a talált filotípusok száma. Összesen 750 *Bacteria* szekvenciát vizsgáltak, amelyeket 16 különböző divízióba lehetett besorolni. Ezen eredmények alapján a leggyakoribb divíziók a következők voltak:

II.4.1.1. *Proteobacteria* (1978/69 596/249 480) ‡

Néhány speciális tisztítóművet kivéve (pl. egyes foszfát eltávolító rendszerek, az iszapkezelésben használt anaerob rothasztók), ennek a csoportnak a tagjaival találkozhatunk a legnagyobb számban a szennyvíztisztítóknál. Ez nem meglepő, hiszen ez a csoport egyben a baktériumok legnépesebb és legismertebb csoportja is. Az idetartozó baktériumok a bakteriális világ legnagyobb fiziológiai diverzitással rendelkező csoportját képezik. Energetikai anyagszere szempontjából vannak köztük fototrófok (pl. bíbor kén és bíbor nemkén baktériumok), kemolitotrófok (pl. nitrifikálók, metanotrófok, kén- és vasoxidálók) és kemoorganotrófok egyaránt (Madigan és mtsi, 2003). Rendszertanilag öt további szubdivízióra osztjuk őket, amelyek a következők: α (550/17 821/64 855), β (292/10 164/47 927), γ (898/38 344/103 259), δ (166/1743/19 771) és ϵ (72/1319/7239; Cole és mtsi, 2007).

Ezek közül egyértelműen a β -*Proteobacteria* szubdivízió képviselői a leggyakoribbak a szennyvízkezelőkben (Wagner és Loy, 2002; Wagner és mtsi, 2002). Ebben a csoportban számos kemolitotróf baktériumot találunk, mint például az ammónia-oxidáló baktériumok. Vannak szerves vegyületek széles spektrumának bontására képes fajai is, mint például az *Alcaligenes*, idetartoznak a denitrifikáló *Azoarcus* és *Thauera* nemzetség, és a szennyvíztechnológusok által is jól ismert flokkulumképző *Zoogloea ramigera* is.

‡ Zárójelben az RDP adatbázis 2008. október 30-ai frissítésében (release 10) található, adott divízióba tartozó típus törzsek / az összes tenyésztett izolátum / az összes csoportba tartozó szekvencia.

A következő leggyakoribb szubdivíziók az α - és γ -*Proteobacteria*. Előbbi szennyvízkezelésben legismertebb tagja a nitritoxidáló *Nitrobacter* és a denitrifikáló *Paracoccus*, utóbbiak közül pedig a legjelentősebbek a „mindenevő” *Pseudomonas* és *Acinetobacter* nemzetség tagjai, és a fekáliából származó *Enterobacteriaceae* család tagjai.

A δ és ϵ alcsoport tagjai kevésbé gyakoriak a szennyvízkezelőkben. Előbbi szulfát-redukáló tagjai magas kéntartalmú szennyvizek esetén, ill. iszaprohasztókban fordulnak elő. Mindezek mellett számos olyan *Proteobacteria* szekvenciát találhatunk a szennyvizekben, amelyeknek nincs közeli tenyésztett rokona, és ezért nem sejthető semmi fiziológiájukról.

II.4.1.2. *Bacterioidetes* (359/6460/75 529)

Ez a második leggyakoribb divízió a szennyvíztisztítóknál, és az RDP adatbázis szerint a *Bacteria* domén harmadik legnépesebb törzse. Három fő ága van a *Cytophaga*, *Flexibacter* és *Bacterioidetes* csoport, amelyekről szintén használatos CFB nevet kapta. Kemoorganotróf aerob és anaerob, általában mozgásképesekkel rendelkező, negatív Gram-festődésű szervezetek tartoznak ide. Bár léteznek denitrifikáló fajai, a legtöbb szennyvízből származó szekvenciának nincs közeli rokona, ezért a szennyvíztisztításban betöltött szerepük ma még nem világos, valószínűleg a szervesanyag-lebontási folyamatokban, valamint a biofilmek és flokkulumok szempontjából lényeges extracelluláris polimerek (EPS[§]) mátrix képzésében vesznek részt (Ivnitsky és mtsi, 2007).

II.4.1.3. *Actinobacteria* (1318/25 948/54 945)

A baktériumok arányaiban egyik legtöbb tenyésztett törzset tartalmazó divíziója. Ez a sajátos arány könnyen tenyészthető voltuknak köszönhető, amit spóráik, többségében aerob és heterotróf életmódjuk okoz. Elsősorban speciális tisztítóművekben találkozhatunk velük, mint például a foszfát eltávolító rendszerekben, ahol optimális esetben a csoport tagjai a dominánsak (II.6.2. pont), illetve ipari szennyvizekben, ahol nehezen bontható xenobiotikumok degradálására képes nemzetségei fordulnak elő (pl. *Arthrobacter*) (Vasileva-Tonkova és mtsi, 2008). Szokványos eleveniszapos rendszerekben jelenlétüket nem kívánatosnak tekintik, mivel számos fajuknak szerepe van a káros, ülepedést akadályozó iszapduzzadási folyamatokban (Daims és mtsi, 2006).

[§] Az EPS rövidítést használják az Extracelluláris PoliSzacharidokra, vagy ahogy itt is, a biofilmek élettelen mátrixát alkotó extracelluláris polimerek összefoglaló nevéként (Extracellular Polymeric Substances).

II.4.1.4. *Firmicutes* (1229/31 841/176 281)

Sokszínű csoport, melynek endospórát képző és nemképző, aerob és obligát anaerob tagjai is vannak. Anyagcsere szempontjából többségük kemoorganotróf. Bár az RDP adatbázisban a *Bacteria* domén egyik legnépesebb ága, szennyvíztisztítóokban csak ritkán, speciális egységekben található meg nagyobb számban, mint például az időszakosan szárazra kerülő rotáló kontaktoros tisztítókon (Park és mtsi, 2007). Bár a *Bacillus* nemzetségnek vannak heterotróf nitrifikációra képes fajai (Lin és mtsi, 2007), a *Firmicutes* divízióinak inkább anaerob tagjait szokták szennyvizekből elsősorban anaerob rothasztókból kimutatni (Satoh és mtsi, 2007).

II.4.1.5. *Nitrospira* (6/106/2003)

A törzsbe tartozó kemolitotróf nitritoxidáló baktériumok szemben a többi *Proteobacteria* csoportba tartozó nitrifikálóval nem rendelkeznek intracelluláris membránokkal. A tenyésztés független módszerek alapján mára egyértelművé vált, hogy a szennyvíztisztítók nitrifikáló egységeinek többségében ez a csoport a domináns (II.6.3.3.2. pont; Juretschko és mtsi, 1998).

II.4.1.6. *Planctomycetes* (7/147/6322)

A divízió egy nagyon nehezen tenyészthető, elsősorban vízi élőhelyekről kimutatott csoport, amely sarjadzó, peptidoglikán nélküli, speciális kompartmentizált belső sejtszerkezetű, Gram negatív festődésű baktériumokat tartalmaz. Szennyvízkezelésben a leghíresebb *Planctomycetes* a *Candidatus Brocadia anammoxidans*, amely fajhoz az anoxikus ammónia-oxidáció (anammox) folyamat köthető (II.6.3.5. pont; Jetten és mtsi, 2001).

II.4.1.7. *Chloroflexi* (9/79/5670)

Szintén nehezen tenyészthető divízió, amelynek tagjai szennyvíztisztítóokban, az eleveniszapos rendszerekben előforduló káros iszapduzzadási folyamatokban vesznek részt (Bjornsson és mtsi, 2002). Okabe és mtsi (2005) úgy találták, hogy nitrifikáló biofilmekben ammónia éheztetéskor elpusztuló nitrifikálók biomassájának elsődleges fogyasztói szintén a *Chloroflexi* csoport tagjai.

A fent felsorolt csoportokon kívül még számos divízió tagjai kis számban előfordulnak egy-egy szennyvíztisztítóban. Ilyen, pl. az *Acidobacteria* (0/193/23 727), *Verrucomicrobia* (10/108/6810) *Chlorobi* (11/178/735), *Fibrobacteres* (2/60/362), *Fusobacteria* (34/216/1922), *Gemmatimonadetes* (1/5/1544), és több tenyésztett képviselő nélküli törzs, pl. OP10 (0/0/363). Ezeknek a csoportoknak a szerepe ma még ismeretlen (Wagner és Loy, 2002).

II.4.2. Archaea

A *Bacteria* domén tagjai mellett természetesen az *Archaea* domén is megtalálható a szennyvíztisztítóknál. Számuk a metántermelő anaerob iszaprohasztókban a legjelentősebb. Itt az *Euryarchaeota* ágba tartozó metanogének a domináns mikroorganizmusok (Satoh és mtsi, 2007). Az iszapág tárgyalása azonban nem része a jelen dolgozatnak, ezért e csoportot sem tárgyaljuk részletesen.

Azonban az utóbbi évek egyik legizgalmasabb mikrobiológiai felfedezése az első ammónia-oxidáló archea (AOA), a *Nitrosopumilus maritimus* leírása volt (Konneke és mtsi, 2005). Ezt megelőzően csak termofil szulfátredukálókat tenyésztettek a *Crenarchaeoták* közül, habár környezeti mintákból már régóta ismert volt egy mezofil tengeri ág (Fuhrman, 1992). Utóbbi csoport ammóniát nitríté oxidáló képessége azonban csak tenyésztésükkel vált ismertté. A kemolitotróf ammónia-oxidációt korábban csak a *Proteobacteria* csoportba tartozó ammónia-oxidálóknál figyelték meg (AOB). Mivel a szennyvizek nitrogén-mentesítése szempontjából ez az egyik legfontosabb folyamat, nyomban felmerült, hogy vajon részt vesznek-e itt is a folyamatban az újonnan felfedezett AOA csoport tagjai? Szennyvíztisztítókból való sikeres kimutatásukról eddig mindösszesen egy cikk jelent meg (Park és mtsi, 2006), Milner és mtsi (2008) viszont számos szennyvíztisztító célzott AOA vizsgálata során sem találták ezt a csoportot. Valódi szerepük e rendszerekben a közel jövő kutatásai során fog eldőlni.

II.5. A biológiai szennyvíztisztítás színtere: a biofilmek és a flokkulumok

Általánosan elmondható, hogy amikor a környezet-technológiában biokémiai folyamatokat alkalmaznak, a lehető legnagyobb hatékonyságra törekednek a legkisebb üzemeltetési költségek mellett. Ehhez a lehető legnagyobb sejtkoncentrációkat szükséges biztosítani. A sejttömeg növelésének természetes és mesterséges módjai is léteznek, a szennyvíztisztításban azonban csak a sejtek természetes adszorpciós folyamatai révén létrejövő biofilmeket, és a bioflokkuláció által képződő ülepíthető pelyheket (flokkulumok) tartalmazó eleveniszapokat alkalmazzák. Utóbbiakat képező flokkulumok mind szerkezetileg, mind összetételük alapján nagyon hasonlítanak a biofilmekhez, jelentős különbséget igazából csak a hordozó hiánya jelent (Manser, 2006; Qureshi és mtsi, 2005).

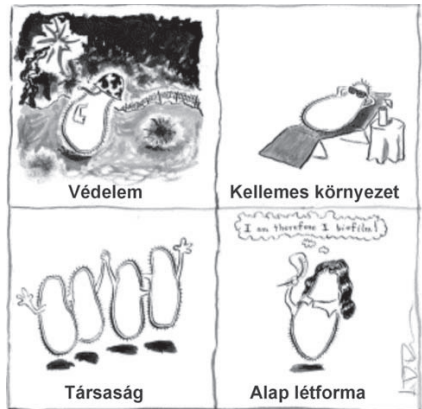
II.5.1. Biofilmek és flokkulumok általános jellemzői

II.5.1.1. Biofilmek és flokkulumok kialakulása

A biofilmek és a flokkulumok kialakulásának Jefferson (2004) szerint négy fő oka van (10. ábra):

1. Védekezés: A biofilmekben vagy flokkulumokban élő szervezetek sokkal jobban viselik környezetük változásait (pl. időszakos tápanyaghiányt, pH változások, antimikrobiális ágensek), mint a planktonikus életmódot folytatók.
2. Kedvező körülmények megragadása:

A biofilmek révén a mikrobák képesek lehorgonyozni a számukra kedvező mikrohabitatokban, amit modell baktériumfajoknál (*V. cholerae*, *E. coli*, pszeudomonaszok) kimutatott glükóz-indukált exopoliszacharid termelés bizonyít (O'Toole és mtsi, 2000). Bár a flokkulumok elsodródhatnak, kimosódhatnak az optimális körülmények közül, mégis az általuk képzett mikrohabitatok sokszor az adott közegben a baktériumok számára az egyetlen lehetséges életteret biztosítják.



10. ábra. A biofilmekben való élet előnyei Dr. Sean D. Tavera karikatúrája Jefferson (2004) nyomán.

3. Közösségi lét: A közösségi léttel olyan előnyös tulajdonságok járnak, mint például a metabolikus terhek megosztása (pl. xenobiotikumok kometabolizmusa) vagy a géntranszfer lehetősége. Általánosan megállapítható, hogy a biofilmben vagy flokkulumban létező mikrobiális közösség biológiai potenciálja nagyobb, mint a közösséget alkotó egyes fajok képességeinek összege (Sutherland, 2001).
4. Biofilm vagy flokkulum, mint alap életforma: Számos mikroorganizmusnak ez az elsődleges életformája, számukra a planktonikus lét csupán kedvezőtlen időszakokra jellemző.

II.5.1.1.1. Biofilmek kialakulása

A biofilmek kialakulásának négy fő lépése van, ezek a következők:

1. Planktonikus sejtek elsődleges megkötődése a hordozón: A primer asszociáció létrejöttében a sejtek szilárd felszínre iránti endogén „vonzalmán” kívül, szerepe van a hordozók hidrofób vagy hidrophil tulajdonságaiknak, a kemotaxisnak és a felszínre közelében kialakuló speciális turbulencia viszonyoknak (Annachhatre és Bhamidimarri, 1992).
2. Irreverzibilis kötődés: A kezdeti kötődés után a sejtek igen hamar megkezdik a tartós kapcsolathoz szükséges EPS termelését. Az EPS mennyiségének növekedése révén kialakul egy barrier közeg, amely védelmet nyújt, valamint a térhatás és a korlátozott tápanyag diffúzió miatt a sejtek növekedését és osztódását is lassítja (Dunne, 2002).
3. Biofilm érése: Az érés folyamán a víz és a tápanyagok diffúziójának elősegítésére csatornák jönnek létre a biofilm mátrixban, kialakul a biofilm jellegzetes struktúrája.
4. Visszaalakulás: A biofilmekben élő sejtek kiszakadhatnak a mátrixból, és ismét planktonikussá válhatnak. Tápanyaghiány esetén a sejtek EPS bontó enzimek termelésébe kezdenek, és annak alkotó elemeit tápanyagként is felhasználják.

II.5.1.1.2. Flokkulumok kialakulása, a bioflokkuláció

Az eleveniszap pelyhek kialakulása egy komplex biológiai és fizikai-kémiai kölcsönhatások által meghatározott folyamat, amelynek első lépése a felszíni töltés, a részecskék ütközései és az ellentétes töltésű részecskék vonzása révén megvalósuló aggregáció. Az így kialakult aggregátumok taszító erőt fejtenek ki egymásra, ami által stabilizálják a kolloidot. Ha ezeket a hidrozolokat flokkulánsokkal, koagulánsokkal keverik, akkor a diszpergált részecskék összetapadnak, és nagyobb pelyhek alakulnak ki. Ezeknek a folyamatoknak az alapjait értelmezi a Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek (DLVO) elmélet. Ebben a flokkulációs modellben azonban nem számolnak a polimerek szerepével (Maximova és Dahl, 2006).

A bioflokulációs modellekben az oldott részecskék maguk a mikrobák. Vogelaar és mtsi, (2005) eleveniszapok bioflokulációját hasonlították össze a DLVO elmélet jóslataival, és mivel utóbbiak nem egyeztek a mért eredményekkel, arra a következtetésre jutottak, hogy a bioflokulációban a sejtfelszínhez kötődő EPS között létrejövő hosszabb hatótávolságú polimer kölcsönhatásoknak is szerepe van. Az ilyen nem-DVLO flokkulációt az oldószer minősége és a hőmérséklet mellett nagymértékben befolyásolják a polimerek (ez esetben az EPS) mennyiségi és minőségi tulajdonságai.

A pelyhek szétesésének, a deflokulációnak a legfőbb oka a fragmentálódás és az EPS kioldódása. Előbbit a túl nagy mértékű nyíróerők idézhetik elő, míg utóbbi bekövetkezhet a közeg változása (pl. hőmérséklet emelkedés), és/vagy a pelyhet képző mikrobák miatt (pl. anaerob stressz hatására oldhatatlan biopolimereket termelhetnek; Morgan-Sagastume és Grant Allen, 2005).

II.5.1.2. Biofilmek és flokkulumok szerkezete

II.5.1.2.1. Biofilmek szerkezete

Napjainkban két fő biofilm szerkezetmodell létezik: a heterogén mozaik modell (Walker, 1995) és a gomba vagy tulipán modell (Costerton és mtsi, 1994).

A heterogén mozaik modell lényege, hogy a baktériumok EPS által összetartott mikrotelepei kazlakként és oszlopként emelkednek ki a felszínről, köztük folyadék található és protozoák legelésznek. A felszint pedig körülbelül 5 µm vastagon egy szorosan a felszínhez kötött sejtréteg borítja. Ha papucsállatka méretűvé összemehetnénk, az ilyen biofilmek a bokros szavannákra emlékeztetnének.

A gomba vagy tulipán modellben a mikrotelepek kazlainak alsó része elkeskenyedik, és a bakteriális galériák alatt csatornák képződnek. Ha mikroszkópikus lényként ezekben a biofilmekben sétálhatnánk, akkor egy zárt lombkoronájú ritka aljnövényzetű erdőben érezhetnénk magunkat.

A valós rendszerekben a biofilmek szerkezete mindkét modellnek megfelelő lehet, azok közti átmenetek is előfordulnak. Azt, hogy melyik alakul ki elsősorban a tápanyag ellátottság és a hidrodinamikai viszonyok határozzák meg. A heterogén mozaik modellt tápanyagban szegény közegben írták le (ivóvíz rendszerek), míg a gomba modellt tápanyagban gazdag , mesterséges laboratóriumi körülmények között figyelték meg.

II.5.1.2.2. Flokkulumok szerkezete

Az eleveniszapos kezelések hatékonyságát döntően befolyásolja az üleppíthetőség. Jól üleppíthetőnek minősül az az eleveniszap, amely az ülepités során rövid idő alatt tiszta felülúszót és sűrű iszapüledéket eredményez. Az ülepedési képesség számszerűsítésére a Mohlmann-indexet, vagy Sludge Volume Indexet (SVI, [cm³/g])** alkalmazják (Barótfi, 2000). Az ülepedési tulajdonságokat a flokkulumok szerkezete határozza meg, ami pedig a pelyhek mikrobiológiai összetételétől és a közeg fizikai-kémiai tulajdonságaitól függ. A mikróbák az EPS összetételén keresztül és a morfológiájukkal is befolyásolják a szerkezetet. Utóbbit a szennyvíztechnológusok fonalas-flokkulens sejt arányként jellemzik.

Az „elfonalasodott” iszap rendkívül nehezen üleppíthető, megduzzad és a szennyvíz felszínén úszik, ezért képződését iszapduzzadásnak hívják. Az ilyen iszap nagy SVI értékkel jellemezhető, viszont jó szűrőképességekkel bír. A flokkulens iszap ezzel szemben alacsony SVI értékkel bír, de a fonalas szervezetek hiányában ülepitést követően a felülúszója zavaros, nagy lebegőanyag-tartalmú. Az optimális eleveniszapban, megfelelő arányban mindkét forma megtalálható (Tardy, 2005).

A flokkulumok belső szerkezete egy porózus három dimenziós rendszer, amelyet az EPS és a polivalens kationok tartanak össze egy fraktál jellegű struktúra formájában (Chu és mtsi, 2004).

II.5.1.2.3. Biofilm és flokkulum mátrix alkotói

Az érett biofilmeket 97%-ban víz alkotja, amely részben a sejtek belsejében található. A sejtek csak 2-15%-át teszik ki a biofilmek szárazanyag-tartalmának. Az EPS-t elsősorban poliszacharidok alkotják, ezek vegyesen homo- és heteropoliszacharidok semleges vagy polianionos töltéssel. A szerkezet kialakításában részt vesznek fehérjék és nukleinsavak is. Utóbbiak sejtlízisből származnak, míg előbbieket extracellulárisak is lehetnek (Sutherland, 2001).

Eleveniszapok flokkulumjainak EPS összetételéről elmondható, hogy ezeknél a rendszereknél a legfőbb EPS összetevők a fehérjék (27-50 %), őket követik a humuszszerű vegyületek (10-30 %) és a szénhidrátok (5-12 %). Utóbbiak 5-36 %-át teszik ki az uronsav-származékok. A biofilmek esetében magasabb fehérjetartalom jellemző, ami a mikroorganizmusok nagyfokú aktivitására utal (Di Iaconi és mtsi, 2004).

** A Mohlmann-index vagy SVI meghatározása: 1 L eleveniszapban 30 perc ülepedési idő után kialakult iszaptérfogat és az iszapkoncentráció hányadosa, vagyis megadja 1 g iszap 30 perces ülepedési térfogatát.

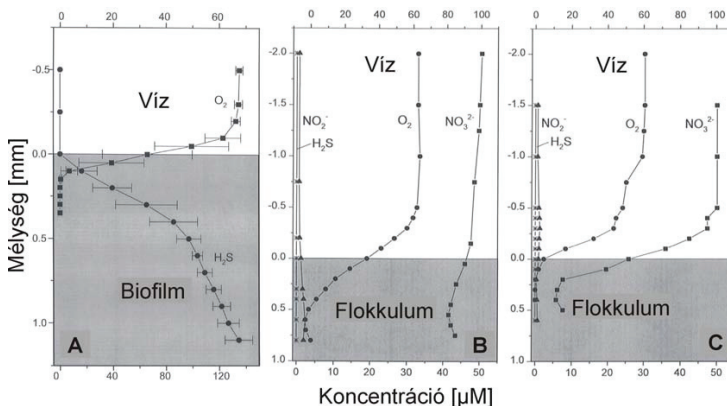
II.5.2. Mikrokörnyezetek a biofilmekben és flokkulumokban

II.5.2.1. Mikroszenzoros eredmények

A biofilmek és flokkulumok térbeli jellemezéséhez nagyban hozzájárulnak a mikroszenzoros mérések, amelyeknek köszönhetően számos paraméterről (pl. pH, oldott oxigén, ammónium, metán) kaphatunk információt akár kevesebb, mint 50 μm -es felbontásban. Ezekből a kutatásokból tudhatjuk, milyen rendkívül változatos életkörülmények jöhetnek létre akár kevesebb, mint 1 mm vastag biofilm rétegben is (Santegoeds és mtsi, 1998b).

Egy eleveniszapos medencében újonnan kialakuló biofilm vizsgálata azt mutatta, hogy már egy hét alatt 400 μm vastag réteg képződik, végső 1000-1200 μm -es vastagságát pedig nyolc hét alatt érte el. Az oldott oxigén mérések szerint 200-400 μm mélyen a biofilm-folyadék fázis határtól már teljesen eltűnt az oxigén, és anaerob élőhelyek jöttek létre. Ezekben a mikrohabitatokban a közismerten anaerob szulfátredukció is végbe ment (Santegoeds és mtsi, 1998a; 11. ábra).

Eleveniszap flokkulumokon végzett mikroszenzoros vizsgálatok hasonló oxigén grádienseket mutatnak. Ezekben az anaerob mikrohabitatokban levegőztetés ellenére a szulfátredukción kívül más anaerob folyamatok is végbe mehetnek, mint például a denitrifikáció.

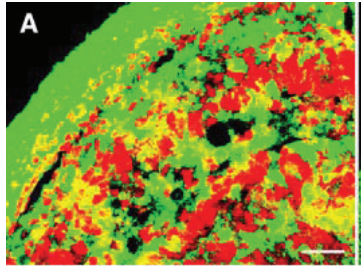


11. ábra Mikroszenzoros mérések eredményei egy szennyvíztisztítói szulfát-redukáló biofilmben (A), és két nitrifikáló eleveniszapos rendszer flokkulumaiban (B) és (C) Santegoeds és mtsi (1998b) nyomán.

II.5.2.2. FISH eredmények

A biofilmek és flokkulumok alkotta élettér komplexitásáról tanuskodnak a FISH módszerrel (II.3.2.3.2.A/1. pont) elért eredmények is. A számos ilyen módszerrel végzett kutatás igazolta, hogy a mikroszenzoros mérések alapján jóslott mikronicheket valóban más és más ökofiziológiájú filotípusok foglalják el (Sanz és Köchling, 2007).

A legtöbbet az anaerob rothasztók nagyméretű granuláris flokkulumait vizsgálták. Ezekből a vizsgálatokból kiderül, hogy a metanotróf archeák a mélyebb rétegekben, míg az iszapduzzadásért (II.5.1.2.2. pont) is felelősnek tartott *Chloroflexi* csoport tagjai a granulumok felszínén helyezkednek el (Yamada és mtsi, 2005; 12. ábra). Mikroaerofil szennyvizes körülmények között tartott szulfátredukáló biofilm kialakulásának vizsgálata is igazolta a mikroszenzoros jóslatokat, ugyanis a biofilm vastagodásával ezek a szervezetek is egyre aktívabbak lettek, és egyre vastagabb réteget képeztek az alsó rétegekben (Ito és mtsi, 2002). Nagy ammónium koncentrációjú szennyvizet kezelő rotátoros kontaktoron képződő biofilm FISH analízise pedig azt mutatta ki, hogy az aerob nitrifikálók egy vékony felső rétegben helyezkednek el, míg az anaerob ammónia-oxidálók a biofilm legmélyebb szintjén találhatók (Egli és mtsi, 2003).



12. ábra. Anaerob iszaprothasztó granuluma, zöld: *Bacteria*, piros *Archaea* specifikus próba Yamada és mtsi (2005) nyomán.

II.6. Mikrobiológiai folyamatok a szennyvíztisztításban

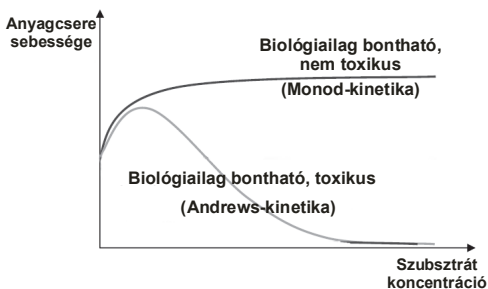
II.6.1. Szervesanyagok eltávolítása

A szennyvíztisztítás legfőbb feladata a szervesanyagok bontása széndioxidig (anaerob rendszereknél biogázig), vízig és egyéb szervesen vegyületekig. Ez az ásványosodásnak vagy mineralizációnak nevezett folyamat idővel a befogadó vizekben is végbe megy, azonban mivel oxigént igényel súlyosan befolyásolja azok oxigénegyensúlyát (Barótfi, 2000).

Bonthatóság alapján megkülönböztetünk könnyen és nehezen biodegradálható anyagokat. Előbbiek általában oldott anyagok, amelyek gyors degradációjára számos mikroba képes. Ilyenek pl. a cukrok, ecetsav, etanol, metanol. A kommunális szennyvizekben elsősorban ilyen szennyezők vannak. Amennyiben ezek a szennyezők nitrogén és foszfor vegyületekkel együtt az élővizekbe jutnak az ott beinduló mikrobiális bontás miatt eutrofizáció alakul ki.

A nehezen bontható vagy másnéven perzisztens szennyezők biodegradációja lassú vagy egyáltalán nem lehetséges. Ilyenek pl. a peszticidek, oldószerek, színezékek, detergensok, halogénezett és aromás vegyületek, amelyek a környezetben felhalmozódva, és egy kritikus koncentrációt elérve, toxikus hatást fejtenek ki. További kedvezőtlen hatásai lehetnek a befogadó vizekben a habzás vagy az oxigénátadás csökkenése. Az ilyen anyagok előfordulása inkább ipari szennyvizekre jellemző (Tardy, 2005).

A biodegradáció kinetikája általában két alapsémát követ. Az egyik a Monod-féle növekedési görbe (Monod, 1949), amikor az anyagcsere sebessége arányos a szubsztrátfogyás sebességével. Ez a nem toxikus, bontható anyagokra jellemző. A biodegradálható, de toxikus anyagok viszont az Andrews (1968) által leírt kinetika szerint bomlanak. Az ilyen jellegű szubsztrátokat ugyanis kis koncentrációnál tudják a mikroorganizmusok metabolizálni, míg nagy koncentrációban gátló ill. mérgező hatásúak rájuk, ezért koncentrációtól függően



gyorsabban vagy lassabban degradálódnak (13. ábra). A toxikus, de biodegradálható szennyezőket tartalmazó szennyvizeket ezért érdemes olyan rendszerekben kezelni, ahol azok minél gyorsabban hígulni tudnak. Erre a legalkalmasabbak a folyamatos üzemű szuszpendált rendszerek.

13. ábra. Biológiailag bontható szennyezők hatása a mikroorganizmusok anyagcseréjére, Tardy (2005) nyomán.

Bonthatóságtól függetlenül a szerves vegyületek biodegradációját elsősorban heterotróf szervezetek végzik aerob vagy anaerob módon. Előbbi a levegőztetés miatt ugyan költségesebb, nagyobb hatékonysága révén a szennyvíztisztításban mégis elterjedtebb. A bontó szervezetek, ahogy a bontandó szennyezők, sokfélék rendszertanilag, de a metabolikus diverzitásukról ismert *Protobacteriák* nagy számban vesznek részt e folyamatokban.

II.6.1.1. Fenol biodegradációja

Mivel az általunk vizsgált kocszólóművi szennyvíz legfőbb szerves szennyezője a fenol, ezért annak biodegradációját részletesebben tárgyaljuk.

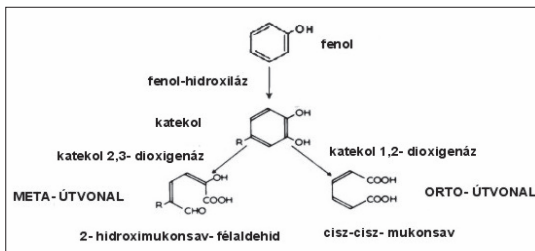
Bár az aromás vegyületek a természetben is széles körben előfordulnak, fenollal nagymennyiségben emberi tevékenység (gyógyszeripar, műanyaggyártás, petrokémia, stb.) nyomán találkozhatunk vele. A fenol erősen toxikus és karcinogén vegyület, amely jó vízoldhatósága miatt (83 g/L), különösen veszélyes a természetes vizeinkre (Geng és mtsi, 2006).

A fenol szénforrásként való hasznosítására baktériumok és a mikroszkopikus gombák is képesek, de vizes élőhelyeken, mint a szennyvízben elsősorban baktériumok bontják. A legismertebb a fenolbontók a *Proteobacteria* (*Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Pseudomonas*), *Firmicutes* (*Bacillus*) és *Actinobacteria* (*Rhodococcus*) divíziókba tartoznak (Zhang és mtsi, 2004).

Kedvező körülmények esetén a fenol bontása teljes mértékben végbemegy, akár nagyon magas szennyezőanyag koncentráció mellett is. Ez a biodegradáció elsősorban aerob módon történik, de egyes szervezetek anaerob körülmények között is képesek hasznosítani ezt a vegyületet, bár kisebb hatékonysággal (Amor és mtsi, 2005).

Az aerob anyagcsere-útvonalakat két csoportra oszthatjuk. Az elsőbe az aromás gyűrű hasításáért felelős dioxygenáz enzimekkel (14. ábra), a másik csoportba a monooxygenázokkal fémjelzett útvonalakat sorolhatjuk. Utóbbiak az aromás gyűrű szubsztituenseit támadják (Harayama és Reik, 1989).

Míndezekek közül a katekol 2,3-dioxygenáz (C23O) enzimnek tulajdonítják a fő szerepet a fenol bontásában.



14. ábra. A fenol dioxygenáz enzimekkel katalizált biodegradációja

A fenol biodegradációjának első lépéseként a fenol-hidroxiláz által katalizált reakcióban egy dihidroxilált intermedier keletkezik, a katekol. A katekol aromás gyűrűjének hasítása kulcslépés a fenol degradációja során, ezt végzik a dioxigenáz enzimek. A bontási anyagcsere-útvonalak között a gyűrűhasítás mechanizmusa alapján megkülönböztetünk *orto*- és *meta*-útvonalakat. Az *orto*- típusú gyűrűhasításban a C12O vesz részt, míg a *meta*-típusút a C23O katalizálja. A gyűrűhasítás során keletkező termék a C12O esetén a *cisz-cisz*-mukonsav, míg a C23O terméke a 2-hidroximukonsav-félaldehid. (Hendrickx és mtsi, 2006; 14. ábra)

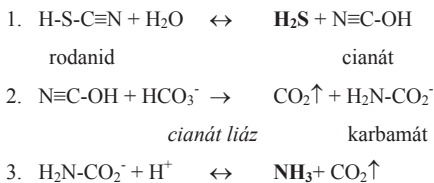
II.6.1.2. Rodanid biodegradációja

A vizsgált kocszólóművi szennyvíz másik legjelentősebb széntartalmú, KOI értéket képző szennyezője a rodanid vagy más néven tiocianát ion ($S-C\equiv N^-$).

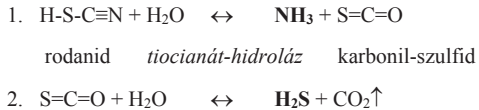
A rodanid a természetben is előforduló vegyület, amely elsősorban növényi sejtek glükózinolátjainak (tioglükozid) glükózidáz enzimek katalizálta hidrolízise során képződik. A növényi glükózidázokból származó szabad rodanid emlősök nyálában és vérében is megtalálható, ahol peroxidázok segítségével bomlik. Hatvan mg/L szérum koncentráció felett azonban neurotoxinként hat rájuk, és a vér jószállító képességét is rontja. Emberi tevékenység révén nagyobb mennyiségben a már említett kocszgyártás, és a hasonló szén elgázosítás folyamán képződik (Katayama és mtsi, 1998; Katayama és mtsi, 1992).

A baktériumoknál kétféle rodanid biodegradációs útvonal ismert: a „cianát” és a „karbonil-szulfid útvonal”. Ezek végtermékeikben nem, csak köztes metabolitjaikban különböznek.

A „cianát útvonalnál” először a szén-kénkötés hidrolizál, így cianát és kénhidrogén képződik. A cianát a továbbiakban spontán módon széndioxiddá és ammóniává alakul, a kénhidrogén szulfáttá oxidálódik (Stratford és mtsi, 1994). A folyamatot az alábbi egyenletek írják le (dölt betűvel az ismert katalizáló enzimek; Caspi és mtsi, 2008):



A „karbonil-szulfid útvonal” esetén, először a nitrilkötés ($C\equiv N$) bomlik, és karbonil-szulfid (COS) képződik, ami tovább hidrolizál szulfiddá és széndioxiddá, ahogy alább látható (Caspi és mtsi, 2008; Katayama és mtsi, 1992):



A rodanidbontás képességét számos rendszertani besorolás és metabolizmus szempontjából különböző baktériumnál kimutatták már. Így például heterotróf szervezeteknél, mint a γ -*Proteobacteria* szubdivízióba tartozó *Pseudomonas fluorescens* és *Acinetobacter junii* (Mason és mtsi, 1994), vagy az α -*Proteobacteria* metilotróf *Methylobacterium thiocyanatum*. Ezek a mikrobák egyedüli nitrogén és kén forrásaként (Wood és mtsi, 1998) hasznosítják ezt a vegyületet, míg az alkalofil autotróf kénoxidáló, γ -*Proteobacteria* csoportba tartozó *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans* egyedüli szén és energia forrásként (Sorokin és mtsi, 2002). A legismertebb és legjobban kutatott rodanidbontó azonban kétségkívül a β -*Proteobacteria* kemolitotróf kénoxidáló *Thiobacillus thioiparus*, amely egyedüli szén és energia forrásként hasznosítja a tiocianátot, és amely törzseiből mindkét metabolikus útvonalat, valamint azok ismert katalizáló enzimeit leírták (Katayama és mtsi 1992; 1998; Stratford és mtsi, 1994).

II.6.2. A foszfor eltávolítása

A szennyvizek foszfor kivonása elengedhetetlen része a modern kommunális és ipari szennyvízkezelésnek, mivel a befogadó vizekbe jutva ez az anyag jelentősen elősegítheti az eutrofizációt. A foszfor kémiai úton vas vagy alumínium sók adagolásával precipitálható, és a főlössizappal kivethető a rendszerből. Ez hatékony foszfor kivonási eljárás, de jelentősen növeli a költségeket és a főlössizap mennyiségét. Ráadásul megnöveli a szennyvíz só koncentrációját is (Blackall és mtsi, 2002).

A foszfor-mentesítést mikrobiológiai mechanizmusok segítségével is megoldható, ezt nevezik serkentett biológiai foszfáteltávolításnak, vagyis EBPR-nek (Enhanced Biological Phosphate Removal). Ezzel a folyamattal optimális működés esetén egy átlagos 10-15 mg/L összes foszfortartalmú kommunális szennyvízből 0,1-0,2 mg/L koncentrációjú elfolyó vizet lehet elérni (Blackall és mtsi, 2002).

Az EBPR folyamatot elsősorban anoxikus szelektoros eleveniszapos rendszerek kialakításával végzik. Lényege, hogy először anaerob viszonyok között találkozik a recirkuláltatott iszap mikrobiótája a tisztítandó szennyvízzel. Ebben a fázisban a polifoszfát akumuláló szervezetek (PAO = Polyphosphate-Accumulating Organism) a korábban elraktározott polifoszfát hidrolíziséből energiát nyernek, aminek a segítségével rövid szénláncú zsírsavakat metabolizálnak és raktároznak polihidroxi-alkanoátok (PHA) formájában.

Az aerob fázisban a PAO jelentős előnyt élveznek azokkal a baktériumokkal szemben, amelyek nem voltak képesek zsírsav felvételre az anaerob szakaszban, mivel fel tudják használni a tárolt PHA-t az egyébként szénforrásban már szegényebb környezetben. Mindezek közben újra feltöltik polifoszfát-tartalékaikat a vízben jelenlévő foszfát segítségével, így akár tömegük 20 %-ának megfelelő foszfort raktározhatnak. Ülepités után a rendszerből kivont fölösisszappal megvalósul a foszfáteltávolítás. Az így keletkező iszap magas foszfortartalma miatt később különösen alkalmas talajok trágyázására (Wagner és mtsi, 2002).

A gyakorlatban azonban az EBPR egységek gyakran nem úgy működnek, ahogy elvárják tőlük. Ennek is mikrobiológiai oka van, még pedig az, hogy ilyenkor a glikogén akkumuláló szervezetek (GAO = Glycogen Accumulating Organism) szaporodnak el. Ezek a tenyésztés független eljárások alapján *γ-Proteobacteria* csoportba sorolt, Candidatus *Competibacter phosphatis*-nak nevezett baktériumok (Wagner és Loy, 2002) versengenek a zsírsavakért az anaerob szakaszban a PAO-vel, de foszfátot nem tartalékolnak, ezért a szennyvíztisztítás szempontjából nem hasznosak (Blackall és mtsi, 2002).

Az EBPR folyamatért felelős baktériumok azonosításával régóta próbálkoznak a kutatók. Sokáig a tenyésztéses eredmények alapján a *γ-Proteobacteria* csoportba tartozó *Acinetobacter* nemzetséget és az *Actinobacteriák* közé tartozó *Microlunatus phosphovorius* nevű baktériumot gondolták a szennyvíztisztítók PAO-inak. Azonban az élettani vizsgálatok azt mutatták, hogy egyikük sem képes teljes egészében a fent vázolt EBPR folyamatra, ill. a FISH technikával végzett kutatások is azt jelezték, hogy mindkét csoport arányát jelentősen túlbecsülték a tenyésztéses eljárásokkal (Blackall és mtsi, 2002; Wagner és mtsi, 2002).

A tenyésztés független molekuláris módszerekkel végzett kutatások két domináns csoportot találtak a jól működő EBPR reaktorban. Az egyik az *Actinobacteria* törzsbe tartozó *Micrococcineae* baktériumok, a másik a *β-Proteobacteriák* *Rhodocyclus* csoportjába sorolt beszédes nevű Candidatus *Accumulibacter phosphatis* (Wagner és mtsi, 2002). Kong és mtsi (2006) arra hívták fel a figyelmet, hogy utóbbi csoportnak a tagjai fiziológiai szempontból hasonlók a GAO-hez, és ezért azokkal versengenek. Ezzel szemben az *Actinobacteriák* közé tartozó PAO szélesebb és különbözőbb felvehető és tárolható szénforrás spektrumuknak köszönhetően nem versenytársai azoknak. Ezt az is bizonyítja, hogy azokban a rendszerekben, ahol az *Actinobacteria* PAO voltak a dominánsak, nem is találtak jelentős számú GAO-t vagy *Rhodocyclus* típusú PAO-t.

Ezen eredmények alapján a mikrobiológusok azt a javasolták a szennyvíztechnológusoknak, hogy ahhoz, hogy elkerüljék az EBPR egységek üzemzavarait, olyan rendszereket hozzanak létre, amelyek az *Actinobacteria* PAO-nak kedveznek (Wagner és Loy, 2002).

II.6.3. A nitrogén eltávolítása

II.6.3.1. Nitrogén vegyületek élettani hatása

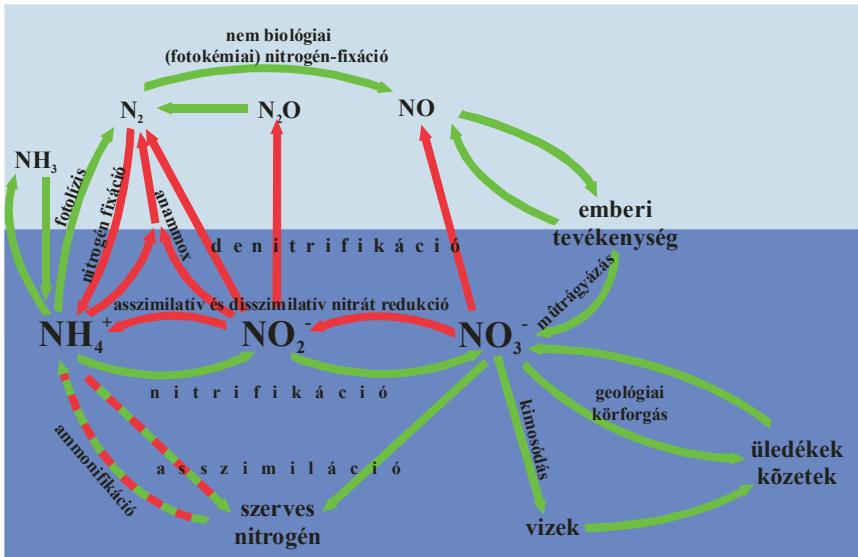
A szennyvizekben leggyakoribb nitrogénformák közül a szabad ammónia és a nitrit-ion bír káros élettani hatásokkal. Előbbi, szemben az ammónium-ionnal átjut a sejtmembránon, és sejtméregként hat. Halakra 0,2–2 mg/L szabad ammónia már toxikus. A nitrit pedig egyrészt karcinogén, másrészt toxikus lehet. Rákkeltő hatását a belőle képződő nitrózaminok fejtik ki, míg toxicitását a hemoglobin metahemoglobinná oxidálása révén fejtik ki. A metahemoglobin nem képes oxigén szállítására, és egy bizonyos arány után letális. Felnőttekben egy specifikus enzim visszaalakítja a metahemoglobint hemoglobinná. Csecsemőkben azonban ez az enzim még nincs jelen, ezért a magasabb nitrítartalom elsősorban rájuk nézve jelent veszélyt.

Ezeknek a vegyületeknek a koncentrációja összefüggésben van az ammónium és a nitrát koncentrációjával. A szabad ammónia és az ammónium aránya elsősorban a víz kémhatásának és hőmérsékletének függvénye (nagyobb pH és hőmérséklet több szabad ammóniát jelent). Nitrátból pedig a szervezetben belül is képződhet nitrit (pl. az egyébként is veszélyeztetett csecsemők alacsonyabb pH-jú gyomrában), ezért a WHO 10 mg/L-es határértéket szab a vegyületre az ivóvizekben (Barótfi, 2000).

II.6.3.2. A nitrogén körforgás

A szennyvizek nitrogén-mentesítése gyakorlatilag minden tisztítórendszerben a természetes nitrogén ciklus egyes lépéseit kihasználva biológiai úton történik, ezért először tekintsük át a körforgás egyes lépéseit, majd külön-külön annak a szennyvíztisztítás szempontjából lényeges elemeit különös tekintettel az aerob nitrifikációra, azon belül is az ammónia-oxidációra, ami e dolgozat egyik fő témája.

A nitrogén a fehérjék, nukleinsavak és számos gyűrűs vegyület alkotórészeként az élő szervezetek nélkülözhetetlen alkotóeleme. Bár legnagyobb mennyisége a légkörben található (78 %; 15. ábra), az élőlények többsége nem képes felvenni a légköri nitrogént (N_2). Megkötését zömében a nitrogénfixáló baktériumok végzik. Az élő szervezetekben redukált formában van jelen, és ezek pusztulásával, ill. salakanyagaikkal kerül a környezetbe. A szerves nitrogén mineralizációja során keletkező ammónium élővizekbe jutva, a belőle képződő szabad ammónia toxicitása mellett, eutrofizációt idéz elő. A növények képesek a nitrogént ammóniumsók formájában is felvenni, mégis felvétele inkább nitrátként történik. Az ammónium kisebb részéből fény hatására elemi nitrogén keletkezik (fotolízis), ill. szabad ammóniaként elillan a légkörbe, nagyobb részét pedig oxikus viszonyok közt az aerob



15. ábra. A nitrogén körforgása a természetben Madigan és mtsi (2003) nyomán.

nitritifikáló szervezetek nitritté, majd nitráttá alakítják. A denitrifikáló szervezetek anoxikus körülmények között a keletkező nitrátot (vagy nitritet) redukálják enzim készletüktől függően nitritig vagy légköri nitrogénvegyületekig (NO , N_2O , N_2) (Madigan és mtsi, 2003). Oxigén hiányában (pl. tengeri üledékekben) is végbe megy az ammónium-nitrogén felszabadítása az utóbbi évtizedekben felismert anammox folyamat révén (Francis és mtsi, 2007).

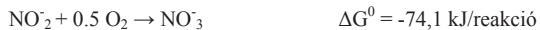
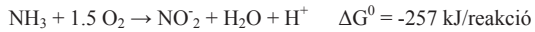
II.6.3.3. Az aerob nitrifikáció

A szennyvizekben a nitrogén elsősorban ammónium vagy urea formájában van jelen. Mivel az urea is ammóniummá hidrolizál, a nitrifikáció a szennyvíz nitrogén mentesítésének első, kulcsfontosságú lépése. A nitrifikációt, vagyis az ammónia nitráttá alakítását elsősorban specializált kemolitotróf nitrifikáló szervezetek végzik. Létezik ugyan heterotróf nitrifikáció is, amelyben baktériumok (pl. *Paracoccus denitrificans*), gombák (pl. *Aspergillus* és *Penicillium* fajok), sőt algák is részt vesznek, és szerves vegyületekből származó ammóniát vagy más redukált nitrogén vegyületet oxidálnak. Ezek az organizmusok azonban a nitrifikációból nem nyernek energiát (Bock és mtsi, 1991).

A nitrifikáció orszlánrészét azonban azok a kemolitotróf nitrifikálók végzik, amelyek képesek a folyamatból nyert energiával, mint egyetlen energiaforrással növekedni, és azt felhasználni a Calvin-cikluson keresztüli széndioxid fixációhoz. Bár ez az életforma csak lassú növekedéshez

elégséges energiát szolgáltat, ezek a mikróbák mégis igen elterjedtek, sokféle ökoszisztéma tagjai lehetnek (Madigan és mtsi, 2003).

A kemolitotróf nitrifikáció kémiaiailag és a résztvevő mikróbák alapján is két részre osztható. Az ammónia nitritté alakítását az ammónia-oxidáló, míg a nitrit nitráttá oxidálását a nitritoxidáló szervezetek végzik. A folyamat kémiaiailag az alábbi két egyenlettel írható le:



A *Nitrospira* és *Nitrospina* nemzetségek kivételével a nitrifikáló baktériumok mindegyikére jellemző a kiterjedt intracitoplazmatikus membránrendszer, amelyhez specifikus enzimkomplexeik kötődnek. Méretük általában 1-2 μm , de egyes pálca alakú *Nitrospinák* 6 μm hosszúak is lehetnek. Alakjuk, nemzetségen belül is, meglehetősen változatos. Előfordulnak kokkoid, pálca, vibrio, lobuláris és spirális formák is. Többségüknél mozgásképességet is megfigyeltek, ami történhet egy vagy akár 20 csillóval is (Bock és mtsi, 1991).

Evolúciós szempontból az autotróf nitrifikálóknál és a fototróf baktériumoknál (*Rhodospseudomonas*, *Rhodocyclus*, *Ectothiorhodospira*) egyaránt megtalálható intracitoplazmatikus membránok közvetett bizonyítékként szolgálhatnak a fotoszintézis és az ammónia-, illetve nitritoxidáció közötti leszámazási kapcsolatra. Az azonban, hogy egyes csoportjaik egymástól filogenetikailag távol helyezkednek el, azt jelzi, hogy a fotoszintézis és a kemolitotróf nitrifikáció közötti átmenet egymástól függetlenül többször és viszonylag könnyen mehetett végbe. A *Nitrospina* és *Nitrospira* nemzetségek valószínűleg a nitrifikáló anyagcsere olyan típusát képviselik, aminek nincs közvetlen fotoszintetikus eredete (Teske és mtsi, 1994).

II.6.3.3.1. Az ammónia-oxidáció

II.6.3.3.1.A. Ammónia-oxidáló baktériumok (AOB) taxonómiai besorolása

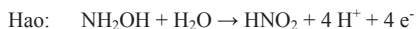
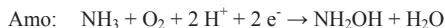
Korábban úgy vélték, hogy az ammónia oxidációját nitritté a *Proteobacteria* csoport két monofiletikus ágába sorolható baktériumok végézik. Ma már tudjuk, hogy *Bacteria* domén ammónia-oxidálói (AOB) mellett az *Archaea* doménben is léteznek ezt a folyamatot katalizáló szervezeteket (AOA) II.4.2. pont (Konneke és mtsi, 2005).

Az AOB egyik ágát a γ -*Proteobacteria* bimbóknál baktériumok leszámazási vonalába, azon belül is az *Ectothiorhodospiraceae* családba tartozó, eddig kizárólag tengerekből izolált *Nitrosococcus* (*Nsc*) nemzetség egyes tagjai képezik. A másik csoport a β -*Proteobacteria* egy monofiletikus ágát képezi, melynek legközelebbi rokonai a vasoxidáló *Gallionella ferruginea*, a fotoszintetizáló *Rhodocyclus purpureus* és a metilotróf baktériumok. Utóbbi csoportba

tartoznak a *Nitrosomonas* (*Nsm.*), *Nitrospira* (*Nsp.*), *Nitrosovibrio* és *Nitrosolobus* nemzetségek, valamint a *Nitrosococcus* nemzetség egyes fajai (*Nsc. mobilis* és *Nsc. oceani*). Utóbbi két faj nemzetségneve mai molekuláris alapú filogenetikai tudásunk alapján már nem tekinthető szerencsésnek, inkább a *Nitrosomonas* nemzetségbe lennének sorolandók, ez a taxonómiai revízió azonban még nem történt meg. A *Nitrosovibrio* és *Nitrosolobus* törzseket azonban igen nagyfokú 16S rRNS szekvencia-azonosságuk miatt ma már a *Nitrospira* (*Nsp.*) nemzetségbe sorolják (Purkhold és mtsi, 2000; Teske és mtsi, 1994; Utaaker és mtsi, 1995). Korábban a szennyvíztisztításban a *Nsm. europaea* modellfajnak tulajdonították az ammónia-oxidációt. A tenyésztés független vizsgálatoknak köszönhetően ma már tudjuk, hogy más filotípusok is előfordulnak, mint például a korábban csak brack vizekből ismert *Nsc. mobilis* (Juretschko és mtsi, 1998), vagy a sokáig talajmikróbának tartott *Nitrospira* nemzetség tagjai is. Dominánsnak azonban továbbra is a *Nitrosomonas* nemzetség tűnik, de kiderült, hogy ez a csoport is jóval változatosabb és több leszármazási ágra osztható (Purkhold és mtsi, 2000). Jelenlegi tudásunk szerint szennyvizekben jelentős szerepe csak a β -*Proteobacteria* csoportba tartozó AOB-nak van, ezért a továbbiakban az ő jellemzőiket tekintjük át.

II.6.3.3.1.B. Az ammónia-oxidáció biokémiája

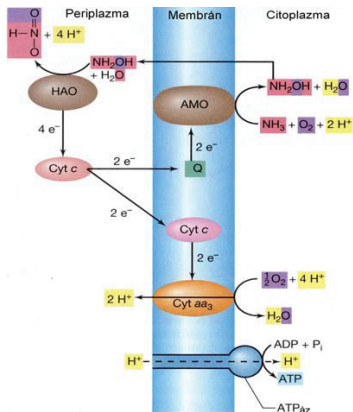
A biológiai ammónia-oxidációt legalaposabban eddig a modellfajnak számító *Nsm. europaea* fajnál vizsgálták. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy az energianyerő rendszer szubsztrátja az ammónia, és nem az ammónium-ion, mivel az ammóniát oxidáló enzim a citoplazmamembrán közelében található, amely sokkal permeábilisabb az ammónia számára, mint az ammónium-ionnak. Maga a folyamat a kiterjedt intracitoplazmatikus membránrendszerhez kötődik. Az elektronáramlásban résztvevő citokróm rendszer mellett az ammónia nitríté alakítása két enzim segítségével, két lépésben megy végbe. Az egyik a réztartalmú ammónia-monooxigenáz (Amo), amely a teljes nitrifikációs folyamat legnagyobb aktivációs energiát igénylő reakcióját, ezért egyben a nitrifikáció sebesség-meghatározó lépését katalizálja. A másik a multihem jellegű hidroxilamin-oxidoreduktáz (Hao). Az általuk katalizált reakciók a következő egyenletekkel írhatók le (Koops és mtsi, 2003):



A két enzim működése kölcsönösen függ egymástól hiszen míg a Hao az Amo-ról jövő hidroxilamint alakítja tovább nitríté, addig az Amo enzim a Hao közreműködésével létrejött elektronokat használja az ammónia oxidációjához. Ezért a felszabaduló négy elektrontól valójában csak kettő éri el a végoxidázt (citokróm aa₃), aminek közreműködésével

protonmozgató erő jön létre. Ez végül az ATP molekulák szintéziséhez vezet (16. ábra). Mivel azonban egy ammónia molekula oxidációjakor csak egy ATP molekula képződik, ezek a baktériumok meglehetősen lassú növekedésűek

Az eddig vizsgált AOB ezen kívül mind rendelkeznek nitrítreduktáz enzimmal is, amelynek segítségével csökkent parciális oxigén nyomás esetén képesek nitrít-redukció útján denitrifikációra (Kuai és Verstraete, 1998).



16. ábra. Az NH_3 oxidációja a *Nsm europaea* sejtekben Madigan és mtsi (2003) nyomán.

II.6.3.3.1.C. Az ammónia-oxidálók kutatása

C/1. Az ammónia oxidálók tenyésztése

Bár első törzseiket több mint száz éve izolálták (Winogradskij, 1890), a csoport alacsony növekedési rátája (Koops és mtsi, 2003) és obligát kemolitotrófiája miatt az AOB tenyésztése meglehetősen körülményes és időigényes. Dúsító tenyészetek kizárólag szervesetlen tápanyagokat tartalmazhatnak, mivel a szervesanyag gátolja autotróf növekedésüket, továbbá heterotrófok feldúsulását okozhatja. Ezenkívül gondoskodni kell a megfelelő pH-ról, ammónium és nitrít koncentrációról, állandó levegőztetésről és teljes sötétségről (Princic és mtsi, 1998). A fent említett nehézségek miatt izolálásuk, tiszta tenyészetek előállításuk és fenntartása, valamint a hagyományos csíraszámbecslési eljárások hónapokat vesznek igénybe. Érthető módon rutinszerű vizsgálatuk nem terjedt el a szennyvíztisztító rendszerek monitorozásában sem, viszont a molekuláris mikrobiális ökológiai módszerek térhódítása a csoport megismerésében különösen jelentősnek bizonyult.

C/2. A 16S rRNS gén alapú vizsgálatok

Az AOB molekuláris vizsgálata a törzsgyűjteményekben található tiszta tenyészetek pontos filogenetikai helyének tisztázásával kezdődött (Teske és mtsi, 1994). Ehhez molekuláris markerként a 16S rRNS gént használták. Nem sokkal később a génre specifikus primerekkel történt PCR segítségével környezeti mintákból is kimutatták őket (Voytek és Ward, 1995), majd az első FISH detektálásukra is hamar sor került (Mobarry és mtsi, 1996). Ezt követték a klónkönyvtár (Stephen és mtsi, 1996), majd DGGE alapú (Kowalchuk és mtsi, 1997) közösség vizsgálataik.

16S rRNS gén alapú molekuláris vizsgálatokkor azonban sokszor filogenetikailag közeli, de fiziológiailag és ökológiailag különböző baktériumok (pl. *Rhodocyclus*, *Gallionella*) kimutatására is sor került, ahogy ezt egy korábbi munkánk során mi is tapasztaltuk (Székely, 2001). Sőt, ammónia-oxidálókat sokszor egyáltalán nem is sikerül kimutatni, pedig más módszerrel jelenlétük egyértelműen igazolható (Juretschko és mtsi, 1998). Ennek oka a rokon fajok nagyfokú szekvencia-hasonlósága (és ezáltal a PCR megfelelő specifikitásának hiánya), valamint a célcsoport viszonylag alacsony sejt száma lehet (Bothe és mtsi, 2000; Rothhuwe és mtsi, 1997). Ezért a többi baktériumnál általánosan használt 16S rRNS gén mellett, az ammónia-oxidálók vizsgálatára Sinigalliano és mtsi (1995) az Amo enzimet kódoló DNS szakasz (*amo* operon) vizsgálatát javasolta. Az Amo fehérje az AOB csoport specifikus enzimje, ezért a fent említett PCR alapú hamis pozitív eredmények megjelenése elkerülhetővé vált.

C/3. Az *amoA* alapú vizsgálatok

Az *amo* operon négy nyitott leolvasási keretet (Open Reading Frame: ORF) tartalmaz, amelyek a következő sorrendben kódolnak négy membrán fehérjét: *amoC*, *amoA*, *amoB* és ORF4. Az *AmoC* és *AmoA* alegységek hat-hat transzmembrán szakasszal az ionáramlás számára pórust formálnak, valamint periplazmikus részükön réz csoport kötésére alkalmas régióval rendelkeznek. Az AmoA doménon található egy hosszú erősen konzervált periplazmikus hurok is, mely feltételezhetően az enzim katalitikus részét tartalmazza. Az AmoB alegység két transzmembrán szakaszán kívül egy hosszú peri- vagy citoplazmikus résszel bír. A terminátor régió után következő ORF4 pedig egy eddig ismeretlen funkciójú fehérjét kódol (Norton és mtsi, 2002).

Az AmoA alegység kevésbé konzervált transzmembrán szakaszainak köszönhetően, valamint a fehérje kódszótár degeneráltsága miatt, az *amoA* gén a csoporton belül nagyobb változatosságot mutat, mint a 16S rRNS gén, és ezért jobb felbontású filogenetikai vizsgálatokra ad módot közeli rokonok esetén is. A faji elkülönítéshez szükséges 97 %-os 16S rRNS hasonlósági értékhez az *amoA* gén esetében 80 %-os nukleotid és 85 %-os aminosav szekvencia hasonlósági érték tartozik (Purkhold és mtsi, 2000). Továbbá a két molekuláris marker alapján szerkesztett filogenetikai fák topológiája alapján megegyezik. (Aakra és mtsi, 2001; Norton és mtsi, 2002; Purkhold és mtsi, 2000). E kedvező tulajdonságoknak köszönhetően az AOB diverzitásának és eloszlásának feltérképezése az *amoA* alapú technikák ma már elterjedtebbek a 16S rDNS alapú módszereknél.

Az első környezeti mintából történt *amoA* gén kimutatások után (Sinigalliano és mtsi, 1995), fokozatosan terjedt a génen alapuló egyéb tenyésztés független eljárások alkalmazása, mint a FISH (Juretschko és mtsi, 1998) vagy a DGGE (Kowalchuk és mtsi, 1999). Horz és mtsi (2000) pedig *amoA* TRFLP ujjlenyomatot készítettek különböző környezeti mintákból. A módszert tenyésztett törzseken is tesztelték, és felhívták a figyelmet arra, hogy az *amoA* gén fehérje kódoló mivolta miatt sokkal alkalmasabb arra, hogy terminális restrikciós hasítási mintázata alapján, szekvencia analízis nélkül, nagyobb filogenetikai csoportokat megkülönböztessünk (pl. *Nitrosomonas-Nitrospira* nemzetség).

Az *amo* operon szoros filogenetikai rokonságban van a metanotróf baktériumok metán monooxygenáz enzimét kódoló *pmo* génnel. Sőt, a γ -*Proteobacteria* szubdivízióba tartozó *Nitrosococcus* fajok *amoA* génje nagyobb hasonlóságot mutat a szintén γ szubdivízióba tartozó metanotrófok *pmoA* génjével, mint a β szubdivízió ammónia-oxidálóinak *amoA* génjével (Holmes és mtsi, 1995). Tehát nagy valószínűséggel e két enzim alaptípusa már jelen volt a β - és γ -*Proteobacteria* szétválása előtt. Ezért egy olyan *amoA* primerpárt, amely minden ammónia-oxidáló baktériumra specifikus, de kizárja a homológ metanotrófok *pmoA* génjét, valószínűleg lehetetlen tervezni (Rotthauwe és mtsi, 1997).

II.6.3.3.2. Nitritoxidáció

A nitritoxidáló baktériumoknak (NOB) négy ismert nemzetsége, a *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina* és *Nitrospira* polifiletikus csoportot képeznek. Előbbi három a *Proteobacteriák* közé tartozik, utóbbi pedig, ahogy azt korábban leírtuk (II.4.1.5. pont) külön divíziót képez (Ehrlich és mtsi, 1995). A *Nitrobacter* az α szubdivízióba tartoznak. Közeli rokonaik a gyökérmódulációt okozó *Bradyrhizobium japonicum* és *Blastobacter denitrificans*, a humán patogén *Afipia felis* és *Afipia clevelandensis*, és az anaerob fotoszintetizáló *Rhodospseudomonas palustris*. A *Nitrococcus mobilis* a *Nitrosococcus oceanus*hoz hasonlóan a γ -*Proteobacteria Ectothiorhodospiraceae* családjába tartozik, bár egy másik ághoz. Míg a *Nitrospina* nemzetség a δ -*Proteobacteriák* egy mélyen gyökerező ágán található (Teske és mtsi, 1994).

A nitrit oxidációját elsősorban a *Nitrobacter* nemzetség tagjainál tanulmányozták. A reakciót a membránintegráns molibdén-tartalmú nitrit-oxidoreduktáz (NO₂-OR) enzim katalizálja:



A keletkező elektronok egy nagyon rövid elektron-transzportláncon vándorolnak a végoxidázig (a NO₃⁻/NO₂⁻ pár magas potenciálja miatt), és a citokróm aa₃ közreműködésével létrejön a protonmozgató erő, amely csak kevés ATP szintéziséhez elegendő, ami még az ammónia-oxidálóknál is lassabb növekedést tud csak biztosítani (generációs idejük fél nap és egy hét

között változik). A $\text{NO}_2\text{-OR}$ a fordított folyamatot, vagyis a nitrát redukcióját is elősegítheti. Így a *Nitrobacter* sejtek nitráttal litotróf, nitrát jelenlétében vagy nitrát nélkül anoxikus viszonyok között pedig heterotróf módon növekednek. Továbbá rendelkeznek nitratreduktázzal is, és csökkent oxigéntartalom esetén denitrifikálhatnak is (Bock és Koops, 1991).

A szennyvíztisztítóban ezért a folyamatért hagyományosan szintén a *Nitrobacter* nemzetség tagjainak szoktak hálásak lenni. Ma már azonban a tenyésztés független módszereknek köszönhetően tudjuk, hogy sokszor ennél jóval nagyobb számban vannak jelen a *Nitrospira* divízió tagjai. A FISH-MAR vizsgálatok kimutatták, hogy ezek a szervezetek mixotrófok, vagyis széndioxid fixációra és piruvát fogyasztásra is képesek nitrít oxidálás mellett (Daims és mtsi, 2001).

Arra, hogy a két nemzetség közül melyik dominál egy szennyvíztisztítóban, életmódjuk ad választ. A *Nitrospira* rokon fajok ökológiai szemszögből tipikus K-stratégisták: nagyon lassan nőnek, viszont jól adaptálódtak az alacsony nitrít és oxigén szintekhez. A *Nitrobacter* nemzetség tagjai ezzel szemben inkább r-stratégisták: viszonylag gyorsan szaporodnak, de kicsi nitrít- és oxigén-affinitásúak. Mivel a szennyvízkezelő rendszerekben általában alacsony a nitrítartalom, a *Nitrospirák* túlnövik a *Nitrobactereket*. Olyan üzemekben, ahol időszakosan magasabb nitrít koncentrációk is előfordulnak (pl. szakaszos működésű üzemek), a két csoport egyszerre lehet jelen. Ezt a teóriát támasztja alá Wagner és mtsi (2002) kísérlete, amelyben két párhuzamos biofilmes kemosztátot inokuláltak *Nitrospira* mintákkal, majd a kemosztátokat azonos módon üzemeltették. A *Nitrospirák* elszaporodása után, mindkét rendszert *Nitrobacterrel* oltották be, és az egyiknél drasztikusan megnövelték a nitrít terhelést. A *Nitrobacter* törzs csak a megnövelt terhelésű kemosztátban tudott jelentősen elszaporodni.

II.6.3.3.3. Nitrifikáció a szennyvíztisztításban

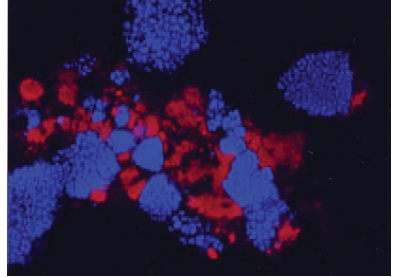
Mivel mind az AOB, mind a NOB érzékeny, lassan növekvő szervezetek, ezért gyakran előfordul szennyvízkezelő műveknél, hogy a nitrifikációs folyamat nem kielégítően zajlik (Wagner és Loy, 2002). Ezeknek a baktériumoknak a biofilmes szennyvízkezelő rendszerek sokkal jobb életteret biztosítanak, mint az eleveniszapos tisztóművek, mivel a nitrifikációt gátló anyagok (pl. fenol) diffúziója is korlátozottabb. Az EPS mátrix térbeli korlátai miatt a biofilmekben elméletileg a gyorsabban szaporodó heterotróf szervezetek túlnövése sem fenyegeti annyira a nitrifikálókat. A valóságban azonban vegyes nitrogén és KOI eltávolító biofilmes egységeknél a heterotrófok általában a biofilmek külső felszínén találhatóak, amivel ugyan megvédik a lassan regenerálódó nitrifikálókat a nyíróerők okozta leszakadástól, de alacsony oldott oxigén szintek esetén akadályozzák a szükséges oxigén diffúzióját a mélyebb rétegekbe (Nogueira és mtsi,

2002). Mind ezért általában térben külön választják a két folyamatot, vagyis a szervesanyag-eltávolító egységek után (pl. eleveniszapos) találjuk a biofilmes nitrifikáló rendszereket (II.2.1.3.1. pont).

A két nitrifikáló csoport szimultán FISH vizsgálataiból tudjuk, hogy az AOB és a NOB szoros aggregátumokat képeznek a flokkulumok EPS mátrixában (Okabe és mtsi, 2005; Schramm és mtsi, 1998). A keresztmetszeti vizsgálatok azt is kimutatták, hogy a nitrit oxidálók a biofilmek mélyebb részeiben, míg az ammónia-oxidálók a felszínhez közelebb helyezkednek el, a kémiai folyamatok sorrendjének megfelelően (Schramm és mtsi, 1998; 15. ábra).

Ez magyarázza a jól működő nitrifikáló rendszereknél megfigyelhető rendkívül alacsony nitrit koncentrációkat. Ehhez adódik még az a tény, hogy az ammónia-oxidáció lassabb folyamat, mint a nitritoxidáció, ezért eleve csak ritkán fordul elő a természetben 1 mg/L-nél magasabb nitrittartalom.

A szennyvízkezelésben a nitrifikációs folyamatokat elsősorban a hőmérséklet és a pH-érték változása befolyasolják, pontosabban az ezektől függő szabad NH_3 és szabad salétromos sav (HNO_2) koncentrációja. A hőmérséklet emelkedésével mindkét vegyület koncentrációja nő, míg a pH változással előbbi egyenes, utóbbi fordított arányban változik (Anthonisen és mtsi, 1976). Mindkét vegyületre az ammónia-oxidálóknál a NOB egy nagyságrendnyi gátló koncentráció értékkel érzékenyebbek. A szabad NH_3 esetében az AOB-nál a gátló érték 10-150 mg/L, míg a NOB-nál 0,1-1 mg/L, a szabad HNO_2 esetében pedig 0,4 mg/l, ill. 0,02 mg/L ez az érték (Vadivelu és mtsi, 2007). A NOB továbbá önmagában is érzékenyebbek az alacsony hőmérsékletre (Kim és mtsi, 2006).



17. ábra. *Nitrosospira* spp. (kék) és *Nitrospira* spp. (piros) baktériumok egy nitrifikáló flokkulumban Schramm és mtsi (1998) nyomán.

II.6.3.4. Denitrifikáció

A szennyvizek nitrogén-mentesítése során a nitrifikáció után a következő lépcső optimális esetben a nitrát légköri nitrogénné redukálása, vagyis az anoxikus körülmények között zajló denitrifikáció. A denitrifikációt szemben a nitrifikációval, egy heterotróf, fakultatív folyamat, amely anoxikus körülmények között megy végbe, és nem csupán egy-két jól körülírható taxonómiai csoporthoz köthető, hanem legalább 50 különböző csoportban előfordul (Francis és mtsi, 2007). Leírták a baktériumok és az archeák körében, sőt egy bentikus *Foraminifera* esetében is (Risgaard-Petersen és mtsi, 2006), így az *Eukarya* csoportban is jelen van.

Heterotróf jellegüknek köszönhetően a denitrifikáló szervezetek vizsgálata már a tenyésztéses időszakokban megkezdődött. A legismertebb denitrifikálók a *Proteobacteria* csoportba tartozó *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Hyphomicrobium*, és a *Firmicutes* közé tartozó *Bacillus* nemzetségre tartoznak. Ezeknek a baktériumoknak a vizsgálatából tudjuk, hogy a denitrifikáció is többlépcsős folyamat, amelynek a következők a lépései (↑: légkörbe távozik):



Szemben a nitrifikációval, egyetlen organizmus is képes lehet a teljes folyamatra, de minden lépéshez más-más enzimek szükségesek, ezért léteznek olyan baktériumok, amelyeknek enzimrendszere hiányos, és csak a folyamat első lépésére képesek (pl. *E. coli*), ez azonban nem számít denitrifikációnak, hiszen a képződő nitrit nem távozik a rendszerből, oldatban marad. Környezetvédelmi szempontból a leghatékosabb az inert nitrogén gázig történő denitrifikáció, ugyanis a köztes lépésekből származó nitrogén oxidok üvegházhatást okozó gázok (Madigan és mtsi, 2003).

Az ismert denitrifikáló fajok specifikus FISH próbákkal végzett vizsgálatai azt mutatják, hogy a biofilmes szennyvíztisztítóokban a *Paracoccus* és a *Hyphomicrobium* nemzetség tagjai a leggyakoribbak (Wagner és mtsi, 2002). Ezek a fajok képesek a teljes nitrogénig történő redukcóra.

A denitrifikáció kevésbé érzékeny folyamat, mint a nitrifikáció. Bizonyos hatékonysággal, a flokkulumok mikrohabitatjainak köszönhetően még a levegőztetett eleve szűz medencékben is megfigyelhető. Az igazán jó teljesítményhez azonban célszerű biofilmet használni, és biztosítani az anaerobitást (Gomez és mtsi, 2002). Mivel a denitrifikáció általában a szervesanyag-csökkentést és a nitrifikációt követő lépés, megfelelő hatásfokhoz szénforrás (pl. metanol, etanol, szukróz) adagolása szükséges (Gomez és mtsi, 2003).

II.6.3.5. Anaerob ammónia-oxidáció, anammox

A *Planctomyces* csoportban előforduló anammox (anoxikus ammónia-oxidáció) folyamat lényege, hogy az ammónia-oxidációja oxigén helyett nitrítet segítségével történik, és elemi nitrogén képződik. A reakciót a következő egyenlet írja le (Jetten és mtsi, 2001):



A folyamat az anammox törzsek (pl. *Brocadia anammoxidans*, *Kuenenia stuttgartiensis*) speciális kompartmentjeiben, az anammoxoszómában megy végbe, és több energiát szabadít fel 1 mol ammóniumból, mint az aerob ammónia-oxidáció (II.6.3.3.1.B. pont). Ennek ellenére a reakció szennyvízkezelésben való hasznosítása ma még gyerekcipőben jár, aminek elsődleges oka a résztvevő baktériumok rendkívül lassú növekedése. A szintén lassúnak számító AOB hozzájuk képest szapora lényeknek számítanak a laboratóriumi körülmények között mérhető átlagos 0,7 naposmegkettőződési idejükkel, ugyanis az érzékeny anammox szervezeteknél ez 10,6 nap, ami reaktor rendszerekben elérheti a három hetet is (Jetten és mtsi, 2001).

A folyamat alkalmazásának további nehézsége a reakcióhoz szükséges nagymennyiségű nitrít előállítására. Ehhez olyan reaktorokat kell létrehozni, amelyekben gátoltak a NOB, az ammónia-oxidálók viszont nem. Ezt vagy alacsony oldott oxigénszintekkel oldják meg, kihasználva az AOB nitrtoxidálókhoz képest alacsonyabb oxigén-affinitását, vagy az AOB gyorsabb növekedésére építő kis tartózkodási idejű kemosztát jellegű rendszereket hoznak létre (Bernet és mtsi, 2005).

Az előbbi stratégiára épít az AOB és anammox szervezeteket egyszerre tartalmazó, teljesen autotróf nitrogén-mentesítő reaktortípus, a CANON (Completely Autotrophic Nitrogen Over Nitrite). Egy ilyen rendszer létrehozásakor először az anammox szervezeteknek kedvező viszonyokat biztosítják, majd ezek elszaporodása után fokozatosan kezdik levegőztetni a reaktort, aminek köszönhetően az AOB is el tudnak szaporodni. A kevés bevitt oxigént az utóbbiak az ammónia nitrít oxidálására felhasználják, és ezzel fenntartják az anoxikus viszonyokat. Az első üzembe helyezett anammox rendszer egy ilyen CANON reaktor volt, amelyet iszaprothasztók viszonylag stabil összetételű csurgaléklevének a kezelésére használnak (Schmidt és mtsi, 2003).

Amennyiben sikerül ezeket a mikrobákat meghonosítani a szennyvízkezelésben, teljesen felszámolhatóak lennének a denitrifikációs egységek, illetve 50-75 %-ra csökkenthető lenne az aerob nitrifikáció oxigén igénye. Továbbá a folyamat 40 %-kal kevesebb szervesanyagot igényel, mint a hagyományos denitrifikáció, és kevesebb fölösizsap képződéssel is jár. Mindezzel 90 %-os költség megtakarítást lehetne elérni (Strous és mtsi, 1999).

III. CÉLKITŰZÉSEK

Jelen dolgozat elsődleges célja olyan modern mikrobiális ökológiai módszerek kidolgozása, tesztelése és alkalmazása, amelyekkel lehetőség nyílik szennyvíztisztítók mikrobiotájának a monitorozására, különös tekintettel a közösség összetétel változásokra. Az ilyen diverzitás monitorozásoktól remélhető, hogy egyre többet tudunk meg a biológiai szennyvíztisztásról, amire a legtöbb technológus még ma is „fekete dobozként” tekint. A hatások ingadozások mögött rejlő mikrobiológiai változások feltérképezése, azok ok-okozati viszonyainak tisztázása és az optimális üzemmenetre jellemző bióta megismerése lehetőséget nyit a szennyvíztisztító-rendszerek tudatos biológiai befolyásolására.

A molekuláris mikrobiológiai monitorozás kidolgozását egy kommunális (Délpesti Szennyvíztisztító Telep) és egy ipari (DUNAFERR - ISD Kokszoló Kft.) szennyvíztisztítóműnél végeztük el más-más céllal. A Délpesti Telep esetében elsődlegesen egy olyan vizsgáló eljárás fejlesztését tűztük ki célul, amellyel lehetőség nyílik a nitrogén-eltávolítási ingadozásokkal feltételezeten együttjáró mikrobiológiai változások nyomonkövetésére, különös tekintettel a nitrifikáció sebesség-meghatározó lépéséért felelős ammónia-oxidálókra. Míg a kokszolóművi szennyvíznél a rodanid-eltávolítási hatásokban tapasztalt kilengések mikrobiológiai hátterét szerettük volna tisztázni az eleveniszap mikrobiotájának feltárása révén.

Az első esetben kutatómunkánk célul kitűzött mérőföldkövei a következők voltak:

1. Egy adatbázis létrehozása, amely segítségével a domináns ammónia-oxidáló csoportok molekuláris ujjlenyomat mintázatuk alapján azonosíthatók.
2. Az adatbázis alapján történő azonosítás hatékonyságának tesztelése.
3. A monitorozó rendszer használata szezonális változások nyomon követésére.

A kokszolóművi szennyvíztisztító esetében a következők voltak a céljaink:

1. Az eddig teljesen ismeretlen eleveniszapos kezelőegység mikrobiális közösségének feltérképezése.
2. A rendszer mikrobiotájának összetétel- és aktivitásbeli változásainak nyomon követése rodanidbontás hatásoknak ingadozása mellett.

IV. ANYAG ÉS MÓDSZER

A szennyvíztisztító-rendszerek diverzitás monitorozásához olyan molekuláris mikrobiális ökológiai módszert kerestünk, amely a következőknek felel meg:

- viszonylag gyors és ez által heti-havi mintavételre ad lehetőséget;
- költségkímélő;
- hosszútávon összehasonlítható eredményeket ad;
- információt ad a legfontosabb csoportokról és azok arányairól.

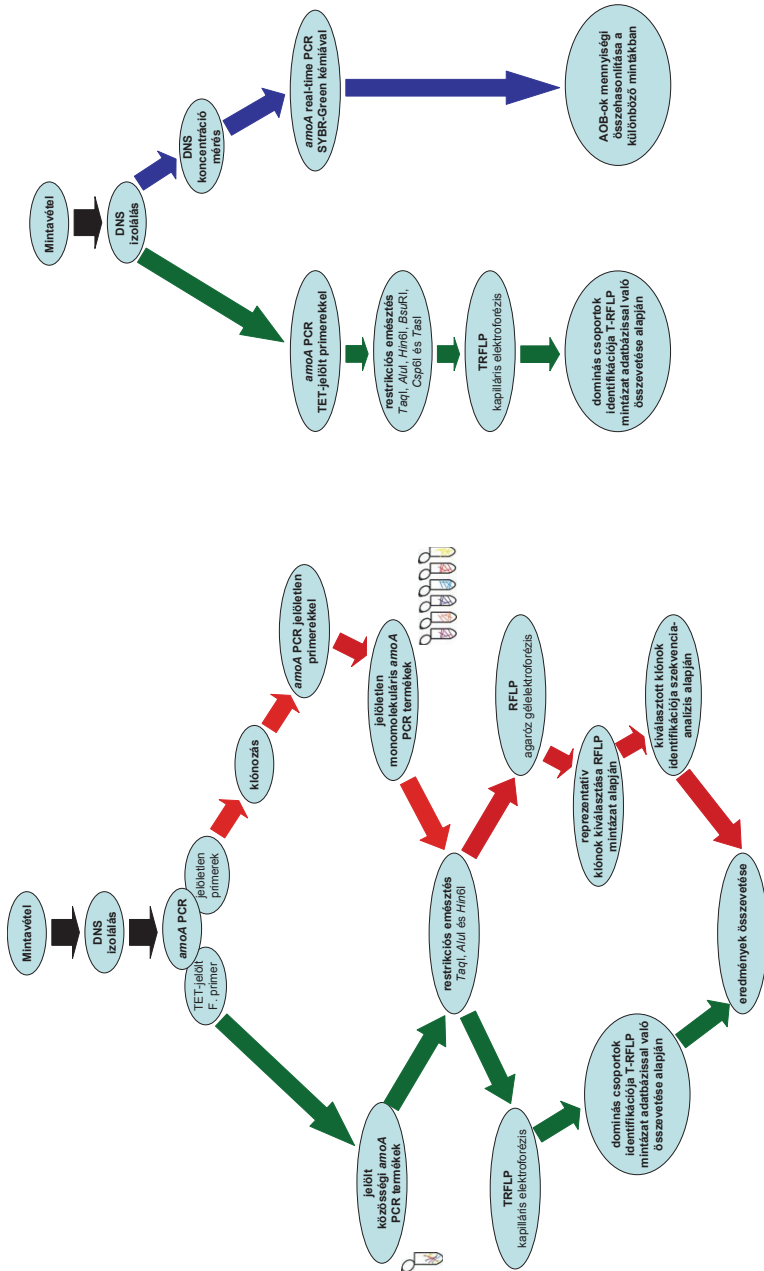
A II.3.2. pontban áttekintettek alapján a TRFLP ujjiyenomat technikát választottuk, amely:

- optimalizált körülmények között viszonylag gyorsan (kb. 2 nap) eredményt ad;
- egyszerűségének köszönhetően költségkímélő;
- a kapilláris elektroforézis és a belső standard révén nem kell az összehasonlítandó mintákat egyszerre futtatni szemben a géralapú módszerekkel (pl. DGGE);
- tekintve, hogy a mintázata közvetlen szekvencia tulajdonságokon alapszik (restrikciós hasítóhelyek), lehetőséget ad a csúcsoakat képező filotípusok azonosítására, ill. a módszer szemikvantitatív voltának köszönhetően azok arányainak megállapítására.

IV.1. A DpSzT nitrifikáló medencéinek monitorozása

A Délpesti Szennyvíztisztító Telep nitrifikáló medencéinek monitorozására alkalmas eljárás kidolgozását egy olyan adatbázis létrehozásával kezdtük, amely segítségével a minták domináns ammónia-oxidálóit TRFLP mintázatuk alapján azonosítani lehet. Az adatbázisba Horz és mtsi (2000) által javasolt *amoA* génszakaszt fedő szekvenciák, és a szintén általuk javasolt endonukleázokkal, ill. további három általunk választott enzimmel *in silico* restrikciós emésztés révén képzett terminális restrikciós fragmentek (TRF) jellemzői kerültek.

Ezt követően az adatbázis alapján történő azonosítást teszteltük. Ehhez elkészítettük néhány minta TRFLP mintázatát úgy, ahogy a későbbi monitorozás során is terveztük végezni. Párhuzamosan pedig, ugyanazon izolált DNS mintából *amoA* gén klónkönyvtárat készítettünk, hogy szekvencia-analízis alapján is azonosítsuk a minták domináns ammónia-oxidálóit. Ehhez a klónokat restrikciós mintázat (RFLP) alapján csoportosítottuk, és minden csoport egy-egy képviselőjét szekvencia-analízisnek vetettünk alá. Az így kapott szekvenciák filogenetikai besorolását összehasonlítottuk az adatbázis által jószoltakkal. A következő évben pedig a rendszer segítségével már valós monitorozást végeztünk (18. ábra).



18. ábra. A Délpesti Szennyvíztisztító Telep nitrifikáló baktériáinak a vizsgálatának a folyamatábrája.

IV.1.1. Az adatbázis létrehozása

Az *amoA* gén terminális restriktív fragmenthossz adatbázis (továbbiakban adatbázis) létrehozásához elsősorban a MEGA 4.0 (Tamura és mtsi, 2007) programcsomagot használtuk. A legfőbb lépések a következők voltak:

1. Letöltöttük a GenBank adatbázisban elérhető összes *amoA* szekvenciát.
2. A szekvenciákat ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) alkalmazás segítségével illesztettük egymáshoz, az illesztést manuálisan ellenőriztük.
3. Kiválogattuk és kiszedtük az adatbázisból az olyan, nem megfelelő szekvenciákat, amelyek túl sok ismeretlen nukleotidot (N) tartalmaztak, túl rövidek voltak, nem fedték le a szükséges génszakaszt vagy hibás annotáció révén valójában nem is *amoA* gént fedtek.
4. A szekvenciák filogenetikai viszonyainak tisztázására törzsfát hoztunk létre Neighbor-Joining módszerrel a Maximum Composite Likelihood (MCL) helyettesítési mátrix alkalmazásával.
5. A szekvenciákat *in silico* hasítottuk, hogy megállapítsuk a terminális restriktív fragmentjeiknek a hosszát a következő enzimekkel: *AluI*, *BsuRI*, *Csp6I*, *Hin6I*, *TaqI* és *TasI* (az enzimek felismerő helye a VIII.1.2.2 pontban található).
6. A hasítóhelyeket, a filogenetikai pozíciót (nagyobb csoportonként kódolva) és a szekvenciák annotációjából tudható egyéb hasznos információkat (pl. származás helye) táblázatba foglaltuk össze.

Az első adatbázis 2002-ben készült el, majd ezt 2005-ben frissítettük.

IV.1.2. A mintavételek jellemzői

IV.1.2.1. A mintavételezés módja

Az első, az adatbázis tesztelését célzó mintavételezésre 2002 májusában került sor a Délpesti Szennyvíztisztító Telepen. Három különböző üzemidejű nitrifikáló Biofor egységet, valamint az L-1-jelű eleveniszapos medencét mintáztuk. Előbbiek esetében kérésünkre mosatást végeztek (II.2.1.3.1. pont), és az ekkor elfolyó biofilm partikulumokban gazdag mosóvízből vettünk 1 litert a kb. 15 perces mosatás közepidejében. Az eleveniszapos medence utolsó levegőztetett egységéből merítéssel nyertünk mintát.

A mintákat hűtőtáskában szállítottuk a laborba, ahol a további feldolgozásig -20°C -on tároltuk. A monitorozás során mintavételként 2-4 párhuzamos NP egységet és időnként az eleveniszapos medencét is mintáztunk a fent leírtakhoz hasonló módon (5. táblázat).

5. Táblázat. Mintavételi időpontok és körülmények a DpSzT nitrifikáló medencéinek vizsgálatához.

| Minta neve | Mintavétel ideje | Származási hely | Üzemidő |
|-------------|------------------|--------------------------|---------|
| L1-2002/05 | 2002.05.16. | L1 eleveniszapos medence | - |
| NP3-2002/05 | 2002.05.16. | Biofor NP3 medence | 22 |
| NP4-2002/05 | 2002.05.16. | Biofor NP4 medence | 15 |
| NP7-2002/05 | 2002.05.16. | Biofor NP7 medence | 27 |
| NP2-2003/03 | 2003.03.20. | Biofor NP2 medence | 23 |
| NP3-2003/03 | 2003.03.20. | Biofor NP3 medence | 24 |
| NP4-2003/03 | 2003.03.20. | Biofor NP4 medence | 14 |
| NP7-2003/03 | 2003.03.20. | Biofor NP7 medence | 22 |
| NP1-2003/05 | 2003.05.08. | Biofor NP1 medence | 22 |
| NP2-2003/05 | 2003.05.08. | Biofor NP2 medence | 15 |
| NP4-2003/05 | 2003.05.08. | Biofor NP4 medence | 18 |
| L1-2003/07 | 2003.07.08. | L1 eleveniszapos medence | - |
| NP2-2003/07 | 2003.07.08. | Biofor NP2 medence | 13 |
| NP8-2003/07 | 2003.07.08. | Biofor NP7 medence | 24 |
| L1-2003/09 | 2003.09.02. | L1 eleveniszapos medence | - |
| NP2-2003/09 | 2003.09.02. | Biofor NP2 medence | 24 |
| NP6-2003/09 | 2003.09.02. | Biofor NP7 medence | 25 |

IV.1.2.2. Fizikai és vízkémiai vizsgálatok

A 2002-es mintavételkor a Telep laboratóriuma rendelkezésünkre bocsátotta saját ellenőrző kémiai méréseinek az eredményeit, míg a 2003-as mintavételezéskor mi mértük a legfontosabb nitrogénformákat DR/2000 típusú (Hach, Loveland, CO, USA) hordozható spektrofotométerrel és az ahhoz tartozó gyorstesztekkel. Az NH_4^+ -N-t megfelelő hígítás után a Nessler-reagens alapú 8038-as, a NO_2^- -N -t a kis koncentrációkra kifejlesztett 8507-es, a NO_3^- -N -t pedig a nagyobb koncentrációkra kifejlesztett 8039-es módszer segítségével állapítottuk meg.

IV.1.3. Minták közösségi TRFLP ujjlenyomata

IV.1.3.1. DNS izolálás és jelölt *amoA* gén PCR

A biofilm fragmentumokat tartalmazó mosóvízből a közösségi DNS-t a XI.2.1.1. pontban leírtaknak megfelelően nyertük ki. Ezt követte a közösségi DNS-ből az *amoA* gén felszaporítása a Rottthauwe és mtsi (1997) által javasolt primerekkel (*amoA*-1F és *amoA*-2R, szekvenciáik a VIII.1.2.1. pontban). Ez a primerpár az *amoA* gén egy, a metanotrófok *pmoA* génjével nem homológ 491 bázispár (bp) hosszú szakaszának amplifikációját teszi lehetővé. Azért esett választásunk erre a primerpárra, mert specifitását és a csoport egészére kiterjedő megfelelő affinitását többen is igazolták (Horz és mtsi, 2000; Purkhold és mtsi, 2000).

A PCR reakcióelegy a VIII.1.3.1. pontnak megfelelően készítettük, a hőprofil pedig a Rothauwe és mtsi (1997) által javasoltakat követte (VIII.1.4.1. pont). Az *amoA*-1F primer 5' végén tetrakloro-fluorescein foszforamidit (TET) jelölést tartalmazott. A reakciót a GeneAmp® PCR System 2400 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) típusú készülékkel végeztük. A terméket agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük (VIII.1.1.2. pont).

IV.1.3.2. Jelölt PCR termékek restrikciós emésztés

A közösségi TRFLP vizsgálathoz restrikciós emésztésnek vetettük alá a TET-jelölt közösségi *amoA* PCR termékeket. Az első mintákat (2002) a Horz és mtsi (2000) által javasolt *TaqI*, *AluI* és *Hin6I* (Fermentas, Vilnius, Litvánia) restrikciós endonukleázokkal hasítottuk, míg a 2003-as monitorozás idején további felbontás érdekében a *BsuRI*, *Csp6I* és *TasI* (Fermentas) enzimeket is használtuk (minden enzimet külön-külön reakcióban alkalmaztunk). A reakcióelegyet minden enzim esetében a VIII.1.3.4. pontban megadottaknak megfelelően a gyártó által ajánlott pufferrel készítettük el, majd 3 órán keresztül a VIII.1.2.2. pontban megadott módon inkubáltuk.

IV.1.3.3. TRFLP vizsgálat

Az emésztett TET-jelölt közösségi PCR termékeket etanol precipitációval (VIII.1.1.4. pont) megtisztítottuk a felesleges enzimektől és sóktól. A pelletet 20 µL DEPC-kezelt vízben (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) oldottuk fel, majd a fragmenteket kapilláris elektroforézissel választottuk szét az VIII.1.1.6. pont szerint.

A detektált terminális fragmenteket a GeneMapper 3.7 szoftver (Applied Biosystems) segítségével elemeztük. Megállapítottuk a különböző TRF-k pontos méretét és arányát az adott közösségben a csúcsok összfluoreszcenciájához viszonyítva. Az összfluoreszcenciát a 35 és 550 bázishossz közti csúcsok görbe alatti területének összege adta. Kisebbségi csúcsok vizsgálata a TAMRA 500 standard gyártásából, valamint a mi mintáink PCR reakciójából maradt nagymennyiségű jelölt primer zavaró hatása miatt nem ajánlott. A különböző enzimekkel kapott TRF-k lehetséges kombinációit összevetettük az adatbázisunkkal, és így igyekeztünk azokat azonosítani.

IV.1.4. Az adatbázis alapján történő azonosítás tesztelése

IV.1.4.1. Kiválasztott minták és PCR amplifikációjuk

Az adatbázis alapján történő csoportazonosítás hatékonyságának értékeléséhez megbízható szekvencia adatokra volt szükség, amire a legalkalmasabb a monomolekuláris klónok szekvencia-analízise (II.3.2.3.1. pont). A szükséges klónkönyvtárat két minta (NP3- és NP7-2002/05) *amoA* PCR termékéből készítettük. A PCR-t ugyanabból a közösségi DNS-ből, és ugyanúgy végeztük, mint a TRFLP ujjlenyomat esetén, kivéve, hogy az *amoA*-1F primert jelöletlenül alkalmaztuk.

IV.1.4.2. Klónkönyvtár készítés

A közösségi PCR során kapott poliklonális terméket a kék-fehér szelekción alapuló TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) alkalmazásával választottuk szét a szekvencia-analízishez szükséges monomolekuláris klónokra. A rendszert a pCR[®]2.1-TOPO[®] vektorral alkalmaztuk, amely egy 3' timidin túlnyúló véget tartalmaz, amihez kovalensen kötődik egy topoizomeráz molekula, amely a vektort linearizált állapotban tartja. A *Taq* polimeráz terminális transzferáz aktivitásának köszönhetően az amplikon 3' végén egy túlnyúló dezoxiadenozin található. A PCR termék inszerciója a vektorba szobahőmérsékleten, spontán bekövetkezik 5 percen belül, ami rendkívül gyors klónozást tesz lehetővé.

A klónozást a gyártó leírásának megfelelően végeztük, maximális mennyiségű PCR terméket alkalmazva. A transzformált One Shot[®] TOP10 kompetens *E.coli* sejtek (Invitrogen) szuszpenziójának 50, 100 és 200 µL-ét VIII.1.1.3.1.B. pontban leírtaknak megfelelően előkészített ampicillin-tartalmú LB lemezekre szélesztettük, majd a VIII.1.1.3.2. pontban leírtaknak megfelelően feldolgoztuk. A megfelelő méretű M13-as PCR termékeket a közösségi DNS-ből végzett *amoA* PCR-rel azonos módon amplifikáltuk, és ezt vetettük alá restriktációs hasításnak, hogy elkerüljük a kétirányú inszercióból adódó redundanciákat.

IV.1.4.3. Reprezentatív klónok kiválasztása: klónok RFLP vizsgálata

A klónokat RFLP mintázatuk (II.3.2.3.2.A/2. pont) alapján csoportosítottuk. Az egyes klónok *amoA* amplikonjait az első mintákhoz (2002) hasonlóan a Horz és mtsi (2000) által javasolt *TaqI*, *AluI*, *Hin6I* és *BsuRI* (Fermentas) restriktációs endonukleázokkal hasítottuk. Az emésztési reakciók mindenben megegyeztek a TET-jelölt közösségi PCR termék hasításával (IV.1.3.2. pont). A fragmenteket 2 %-os agaróz gélen választottuk szét a VIII.1.1.2. pontban leírtaknak megfelelően.

IV.1.4.4. Szekvenca-analízis és eredményeinek összevetése az adatbázissal

Az RFLP mintázat alapján képzett klóncsoportok két-két képviselőjének végeztük el a bázissorrend-elemzését. Ahhoz, hogy a teljes *amoA* génszakasz szekvenciáját megkapjuk a szekvenca-analízist az M13F primerrel végeztük VIII.1.1.5. és VIII.1.1.6. pontban leírtak szerint. A kapott szekvenciákat a MEGA 4.0 (Tamura és mtsi, 2007) programcsomag segítségével vizsgáltuk meg. Először illesztettük az adatbázis szekvenciáival a ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) alkalmazással, majd azonosítás céljából megkerestük a hozzájuk legközelebbi szekvenciákat a Maximum Composite Likelihood (MCL) helyettesítési mátrix segítségével készített távolság mátrixban.

IV.2. Az ISD-K eleveniszapos medencéinek monitorozása

Az ISD-K biológiai szennyvízkezelő egységének mikrobiológiai vizsgálatát 16S rRNS gén alapján végeztük, ugyanis ezen rendszerek mikrobiótája sokkal kevésbé ismert, a problematikus rodanidbontásért felelős szervezetek is ismeretlenek, így nem lehetett csak egy specifikus csoportot kiválasztani a monitorozáshoz.

Először összehasonlítottuk az üzem hat párhuzamos eleveniszapos medencéjének 4 különböző restrikciós enzimmel képzett TRFLP mintázatát. Ennek alapján a rendszeres monitorozáskor már csak egy medencét vizsgáltunk a két legnagyobb diverzitást adó endonukleáz segítségével. A monitorozás során a mintáknak nemcsak a genomi DNS-en kódolt 16S rRNS génjük alapján készítettük el a TRFLP mintázatát, hanem a riboszómáikat képező 16S rRNS segítségével is. Utóbbit az aktivitásbeli különbségek nyomonkövetésének reményében végeztük (II.3.2.1. pont), hogy a mikrobióta a rendszer hirtelen változásaira adott válaszait is érzékelni tudjuk. Mivel a kocszolóművi szennyvíztisztítók különleges közegének mikroorganizmusaival kapcsolatos ismereteink hiányosak, a TRF-k adatbázisok alapján történő azonosítása reménytelennek tűnt. Ezért a négy legkülönbözőbb mintából klónkönyvtárat készítettünk, és a klónokból képzett TRFLP mintázatokat hasonlítottuk össze a közösségi minták TRFLP ujjlenyomatával. Igyekeztünk a lehető legtöbb csúcsot klónokkal párosítani, majd utóbbiak szekvenca-analízise segítségével a domináns csoportokat azonosítani (19. ábra).

IV.2.1. A mintavételek jellemzői

IV.2.1.1. A mintavételezés módja

A mivel kémiai vizsgálataink alapján az eleveniszapos medencék a felső rotáros keverésnek (II.2.2.2.1.B. pont) köszönhetően mind horizontálisan, mind vertikálisan megfelelően homogénnek bizonyultak, a mikrobiológiai vizsgálatainkhoz a körülbelül 20 mL-es minták mindig ugyanazon pontról, a medencék széléről, felszínéről származtak (V.2.1.3. pont, 32. ábra II. pont). Szeptemberben mind a hat levegőztetett medencét mintáztuk, valamint helyszíni vizsgálatokat is végeztünk (IV.2.1.2. pont). 2004. október és november között az üzem munkatársai vették a mintákat a kettes számú medencéből (M2), ahonnan az általunk vett júliusi minta is származott. A kétlépcsős üzemmenet visszaállítása után (2004.11.04) az első lépcsőhöz tartozó M2 mellett a második lépcsőhöz tartozó ötös medencét (M5) is mintázták (6. táblázat).

A mintákat minden esetben a mintavételezés napján, hűtőtáskában szállították Tanszékünkre, ahol azonnal elvégeztük a DNS és RNS izolálás első lépését (VIII.1.1.1. pont: mintasűrités:), majd további feldolgozásig 2 mL-es csövekben -20°C-n tároltuk a sűritett mintákat.

6. Táblázat. Mintavételi időpontok és körülmények az ISD-K eleveniszapos medencéinek vizsgálatához.

| Minta neve | Mintavétel ideje | Szármarzási hely | Feldolgozás módja | | | |
|------------|------------------|--------------------------|-------------------|-----|--------------|-----|
| | | | TRFLP | | Klónkönyvtár | |
| | | | DNS | RNS | DNS | RNS |
| M2 07.17 | 2004.07.17. | 2-es medence | + | | | |
| M1 09.20 | 2004.09.20. | 1-es medence | + | | | |
| M2 09.20 | 2004.09.20. | 2-es medence | + | + | + | |
| M3 09.20 | 2004.09.20. | 3-es medence | + | | | |
| M4 09.20 | 2004.09.20. | 4-es medence | + | + | | |
| M5 09.20 | 2004.09.20. | 5-es medence | + | | | |
| M6 09.20 | 2004.09.20. | 6-es medence | + | | | |
| M2 10.06 | 2004.10.06. | 2-es medence | + | + | | |
| M2 10.13 | 2004.10.13. | 2-es medence | + | + | | |
| M2 10.20 | 2004.10.20. | 2-es medence | + | + | | |
| M2 10.26 | 2004.10.26. | 2-es medence | + | + | | + |
| M2 11.24 | 2004.11.24. | 2-es medence (1. lépcső) | + | + | + | + |
| M5 11.24 | 2004.11.24. | 5-es medence (2. lépcső) | + | + | | |

IV.2.1.2. Fizikai és vízkémiai vizsgálatok

A szennyvíztisztító üzem saját laboratóriumában napi rendszerességgel ellenőrzi a biológiai medencék fizikai paramétereit és kémiai összetételét. E mérések eredményét rendelkezésünkre bocsátották, ill. a mikrobiológiai vizsgálatra szánt minták mintavételi időpontjában az ELTE-TTK Kémiai Technológiai és Környezetkémiai Tanszéknek munkatársai is végeztek további kiegészítő méréseket. A mérésekhez mindkét esetben szabványos eljárásokat alkalmaztak, amelyeket a 7. táblázatban foglaltunk össze.

7. Táblázat. ISD Kocszoló szennyvíztisztítójából származó minták fizikai és vízkémiai vizsgálata során alkalmazott szabványok.

| Mért paraméter | DUNAFERR laboratórium által használt módszerek | ELTE-TTK KTK Tanszék által használt módszerek |
|---------------------------------------|--|---|
| pH | | MSZ 260/4-71 |
| hőmérséklet | | MSZ 260/2-55 |
| KOI | | MSZ 260/16-82 |
| fenolindex | MSZ 1484-1/1992 | MSZ 1484-1/1992 |
| összes N | Nitrogén NanOx 83 teszt | MSZ 260/12-1987 |
| NH ₄ ⁺ -N | | MSZ 260/9-1988 |
| NO ₂ ⁻ -N | | MSZ 260/10-1985 |
| NO ₃ ⁻ -N | | MSZ 260/11-1971 |
| S ⁻ | | MSZ 260/8-1968 |
| SCN ⁻ | MSZ260/33-1971-nek megfelelő házi szabvány | MSZ260/33 -1971-nek megfelelő házi szabvány |
| szárazanyagtartalom | | MSZ 260/3 T(73. I.) |
| SO ₄ ²⁻ | | MSZ 260/7-1987 |
| illékony aromás szénhidrogének (BTEX) | | MSZ 1484-4: 1998 |
| klór-, metil- és nitrofenolok | | MSZ EN 12673: 2000 |
| fenolok (hidroxi) | | MSZ/T1484-9: 2004 |
| policiklusos aromások (PAH) | | MSZ 1484-6: 2003 |
| oldott O ₂ tartalom | | MSZ 260/15-67 |

IV.2.2. Minták közösségi TRFLP ujjlenyomata

IV.2.2.1. DNS és RNS izolálás

A DNS izolálást a VIII.1.1.1. pontban megadott módon végeztük, annak második pontjától, mivel a sűrítést a mintavételezés napján, a fagyasztás előtt elvégeztük (IV.2.1.1. pont).

Az RNS extrakciót az RNeasy[®]Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével végeztük, annak sejtalmos protokolljával. A fenolos vegyületek okozta problémák elkerülése végett a DNS izoláláshoz hasonlóan 20 mg PVPP-t adtunk a mintákhoz az extrakció elején. A DNS szennyezés elkerülésére az RNeasy[®]Kit (Qiagen) kiegészítő DN-áz kezelését alkalmaztuk. A tisztított RNS minták DNS mentességét minden esetben RT reakció nélküli, a DNS mintákkal azonosan végrehajtott PCR reakcióval (IV.2.2.2. pont) ellenőriztük. Sikertelen, agaróz gélen nem detektálható PCR termék esetén a mintákat kellőképpen DNS-mentesnek tekintettük.

IV.2.2.2. Reverz Transzkripció (RT) és 16S rRNS gén PCR

Az RT reakciót a RevertAid[™] First Stand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) segítségével végeztük. A reakcióelegyet a VIII.1.3.2. pont szerint mértük össze, és az VIII.1.4.4. pont hőprofilja szerint végeztük.

Mind a közösségi cDNS-ből, mind az izolált DNS-ből az VIII.1.3.1. pont szerint mértük össze a PCR reakcióelegyet a TET-jelölt 27F és a jelöletlen 519R primerek (VIII.1.2.1. pontban; Lane, 1991) használatával. Mindkét primer a 16S rRNS erősen konzervált szakaszához illeszkedik, és az RDP adatbázisban (Cole és mtsi, 2007) megtalálható szekvenciák több mint 70 %-kával tökéletes egyezést mutat. Továbbá e két primer használatával egy közel 500 bp hosszú PCR terméket kapunk, ami különösen előnyös a későbbi TRFLP vizsgálatoknál, ahol 500 bázishosszig tart a standard skála.

Genomi DNS esetében ahhoz, hogy a magasabb GC-tartalmú fajok DNS-e is biztosan egyszerűlvá váljon az VIII.1.4.2. pont hosszabb kezdeti denaturációt tartalmazó hőprofilját alkalmaztuk, míg a cDNS esetében a VIII.1.4.3. pont hőprofilját.

IV.2.2.3. Restrikciós emésztés és TRFLP vizsgálat

A közösségi TRFLP vizsgálathoz a TET-jelölt közösségi 16S rDNS PCR termékeket restrikciósan emésztettük. A szeptemberi mintákat (6. táblázat) *AluI*, *Hin6I*, *MspI* és *TasI* (Fermentas) endonukleázokkal hasítottuk, majd az időbeni monitorozás során már csak az *AluI* és *MspI* enzimeket használtuk. Minden enzimet külön-külön reakcióban alkalmaztunk a VIII.1.3.4. pontban leírtak szerint a gyártó által ajánlott pufferrel készített reakcióelegyben, amelyet minden esetben 3 órán át a VIII.1.2.2. pontban megadott módon inkubáltuk.

A TRFLP vizsgálat előkészítését, a minták futtatását és az eredmények értékelését az *amoA* gén alapú TRFLP esetén leírtakkal azonosan végeztük (IV.1.3.3. pont) kivéve, hogy eredményeinket itt nem hasonlítottuk adatbázishoz.

IV.2.3. Közösségi TRFLP csúcsainak azonosítása klónkönyvtár segítségével

IV.2.3.1. Kiválasztott minták és PCR amplifikációjuk

A TRFLP mintázatok domináns csúcsainak azonosításához a kettes medence TRFLP mintázatok alapján legkülönbözőbb mintáiból készítettünk klónkönyvtárakat. Ezek az egylépcsős üzemmenetből származó szeptember 20-ai DNS és október 26-ai RNS, ill. a kétlépcsős időszakból a november 24-ei DNS és RNS minták voltak (6. táblázat). A szükséges PCR termékeket ugyanabból az izolált DNS-ből, ill. cDNS-ből készítettük, mint a TRFLP ujjlenyomatot, ugyanazon körülmények közt.

IV.2.3.2. Klónkönyvtár készítés

A közösségi PCR termékből a kék-fehér szelekción alapuló pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega, Madison, WI, USA) alkalmazásával készítettünk klónkönyvtárt. Ez a rendszer is TA-klónozáson alapszik, vagyis a *Taq* polimeráz terminális transzferáz aktivitásából eredő az ampikonok 3' végén található túlnyúló dezoxiadenozinnek használja ki. A vektorba beépülés azonban egy ligáz enzim segítségével, hosszabb inkubáció során következik be.

A klónozást a gyártó leírásának megfelelően végeztük, a PCR termékekből a ligáló elegybe azok nagy koncentrációja miatt a maximális 13 μ L helyett csak 3 μ L-t tettünk. A már transzformált JM 103 kompetens *E. coli* sejtek szuszpenziójának 50, 100 és 200 μ L-ét szélesztettük az VIII.1.1.3.1.B. pontban leírtaknak megfelelően előkészített ampicillin-tartalmú LB lemezekre, majd az VIII.1.1.3.2. pontban leírtaknak megfelelően feldolgoztuk. A megfelelő méretű M13-as PCR termékeket a közösségi cDNS-ből végzett 16S rRNS gén PCR-rel azonos módon (IV.2.2.2. pont), TET-jelölt 27F primerrel amplifikáltuk.

IV.2.3.3. Reprezentatív klónok kiválasztása: klónok TRFLP vizsgálata

A reprezentatív klónok kiválasztásához szemben az *amoA* génnél alkalmazott agaróz gélen végzett RFLP vizsgálattal (IV.1.4.3. pont) a pontosabb TRFLP módszert használtuk. Ezt a 16S rRNS gén által kapott diverzebb mintázat indokolta. A klónok TRFLP ujjlenyomatát a közösségi TRFLP-hez hasonlóan készítettük (IV.2.2.3. pont) azzal a különbséggel, hogy az értékeléskor csak a klóncsúcs méretét állapítottuk meg. Először az első klónkönyvtár első 50 tagját egyesével vetettük alá TRFLP vizsgálatnak. Ezeknek a klónoknak a TRFLP mintázatát először csak az *AluI* enzimmal végeztük el, majd az azonos hosszú csúccsal jellemzett klónokat

tovább csoportosítottuk *MspI* endonukleázzal. Mivel ily módon a közösség legnagyobb csúcsait sikerült azonosítani, a többi klón közül már csak a közösségi ujjlenyomatok hiányzó csúcsait igyekeztünk „levadászni”. Ehhez a klónokból nyolcasával keverékeket állítottunk elő és azokat vizsgáltuk. Ha a keverékek kromatogramján addig nem ismert csúcsot láttunk, akkor az adott keverék tagjainak egyesével elkészítettük a TRFLP ujjlenyomatát.

IV.2.3.4. Szekvencia-analízis és eredményeinek értékelése

Minden klóncsoportból, amennyiben egynél több tagja volt két-két darabot vetettünk alá szekvencia-analízisnek, amit az 519R primerrel végeztük az VIII.1.1.5. és VIII.1.1.6. pontban leírtak szerint. A kapott szekvenciákat a MEGA 4.0 (Tamura és mtsi, 2007) programcsomag segítségével vizsgáltuk. Először a GenBank adatbázishoz tartozó Blast (Basic local alignment search tool) program (Altschul és mtsi, 1997) segítségével megkerestük szekvenciáinkhoz legközelebbi rokon szekvenciákat, amiket le is töltöttünk melléjük. Ezután illesztettük szekvenciáinkat egymáshoz és rokonaikhoz a ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) alkalmazással. A szekvenciák filogenetikai viszonyainak tisztázására törzsfát hoztunk létre Neighbor-Joining módszerrel a Maximum Composite Likelihood (MCL) helyettesítési mátrix alkalmazásával.

V. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

V.1. A DpSzT nitrifikáló medencéinek vizsgálata

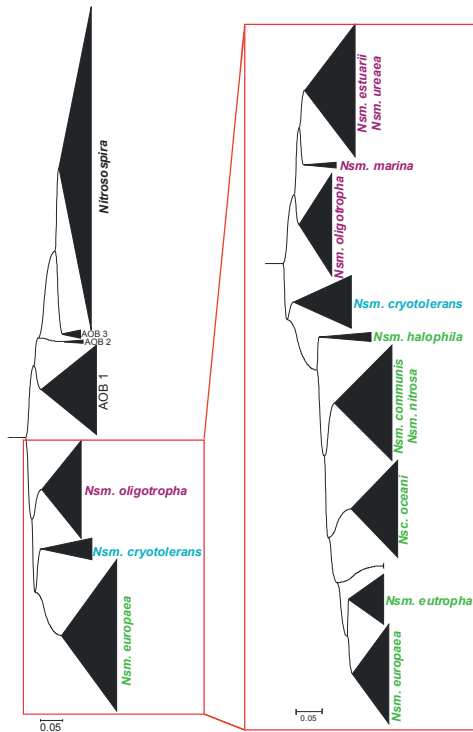
V.1.1. Az *amoA* gén TRF adatbázisa

Az első 2002-ben készült adatbázisunkba 410 különböző *amoA* szekvencia került. A 2005-ben elvégzett bővített változat már 1929 szekvenciát tartalmazott. A megbízhatóság érdekében ezek közül 115 túl rövid szekvenciát kizstedtünk, mert a számunkra érdekes, *amoA*-1F és *amoA*-2R (Rotthauwe és mtsi, 1997) primerek használatával amplifikált 491 bp hosszú génszakaszból kevesebb, mint 400 bp-t tartalmazott. További 222 szekvenciát a bennük található ismeretlen bázisok (N) nagy száma miatt vettünk ki az adatbázisból, ugyanis ezekben a szekvenciákban nem lehet kellő bizonyossággal megállapítani a várt TRF-eket. A redundancia elkerülésére a teljesen azonos bázissorrendű szekvenciákat csoportosítottuk, és csak a leghosszabbakat, ill. a tenyésztett törzsekhez tartozókat hagytuk az adatbázisban. A kizstedt szekvenciákat megfelelően csoportosítva egy külön mellék adatbázisba helyeztük. A végső adatbázisunk így 1188 szekvenciát tartalmazott.

A szekvenciák alapján készített fa topológiája (19. ábra) követi a korábbi szerzők (Koops és mtsi, 2003; Park és Noguera, 2004; Purkhold és mtsi, 2000) által megállapítottakat. Három egyértelműen különálló nagy ága van: a *Nitrosospira* nemzetség, a *Nitrosomonas oligotropha* és a *Nsm. earopaea* rokon szekvenciák leszármazási köre, valamint egy kisebb ág, amit a *Nsm. cryotolerans* rokonsági kör ad. Az említett szerzők által, főként tenyésztett törzsek *amoA* szekvenciáiból készített törzsfákhoz képest, a miénken elkülöníthető két kisebb és egy nagyobb, a *Nitrosospira* nemzetséggel egy leszármazási vonalon található, de attól egyértelműen elkülönülő, kizárólagosan tenyésztetlen filotípusok szekvenciáit tartalmazó ág.

Mivel a *Nitrosospira* ágon kívüli leszármazási vonalak a leggyakoribbak szennyvíztisztítóokban (Purkhold és mtsi, 2000; Rotthauwe és mtsi, 1997; Wagner és Loy, 2002), ezek részletesebb filogenetikáját is megvizsgáltuk, és azt kaptuk, hogy ennek a fának a topológiája is követte a Koops és mtsi (2003) által leírtakat, ahogy ezt az 19. ábra kinagyított részén láthatjuk. A *Nsm. oligotropha* ágon három (*Nsm. oligotropha*, *Nsm. marina*, valamint *Nsm. aestuarii* és *Nsm. ureae* fajokkal jellemezhető ágak), a *Nsm. earopaea* ágon pedig öt (*Nsm. europaea*, *Nsm. eutropha*, *Nitrosococcus oceani*, *Nsm. communis* és *Nsm. nitrosa*, valamint a *Nsm. halophila* fajokkal jellemezhető ágak) további nagyobb leszármazási vonalat különböztethetünk meg.

Az *in silico* hasítás eredményei igazolták Horz és mtsi (2000) feltevését, miszerint a *TaqI* restrikciós enzimmel képzett 283 bp hosszú TRF alapján a *Nitrosospira* nemzetség tagjai, továbbá az általunk felismert három rokon tenyésztetlen ág nagybiztonsággal felismerhetők. Az adatbázisunkban található 611 darab 283 bp hosszú *TaqI* TRF-tel bíró szekvenciának csupán kevesebb, mint 1 %-a nem tartozott a *Nitrosospira* leszármazási ágba. Eltérő hosszú *TaqI* TRF azonban nem biztosíték arra, hogy a szekvencia a *Nitrosospira* ágtól eltérőbe tartozik, ugyanis a leszármazási ágba tartozó szekvenciák 14 %-a más *TaqI* TRF-tel jellemezhető, ezek a szekvenciák azonban kevés kivételtől (13 db) eltekintve az általunk felismert tenyésztetlen ágakba tartoznak. Hasonlóan egyértelmű nagy filogenetikai csoportot különválasztó TRF-t egyik további általunk használt enzimmel sem tudtunk elérni, de a TRF-k leszármazási áganként való csoportosulása, különösen több enzim hasítási mintázatát együtt nézve felismerhető volt.



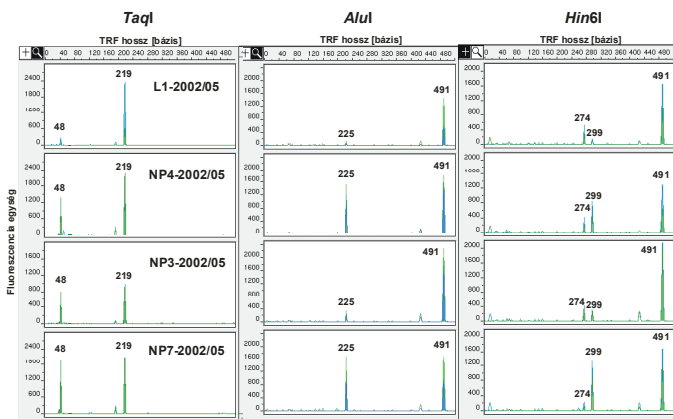
19. ábra. A β -Proteobacteria divízió tartozó ammónia-oxidálók törzsfája az adatbázisunkban szereplő *amoA* gén szekvenciák alapján.

V.1.2. Az adatbázis alapján történő azonosítás tesztelése

Az adatbázis alapján való AOB csoport azonosítás hatékonyságának megítéléséhez előbb tekintsük meg, hogy milyen csoportokat jósolt az adatbázisunk az első, 2002-es három restriktív endonukleázzal (*TaqI*, *AluI* és *Hin6I*) készített TRFLP ujjlenyomatok alapján.

V.1.2.1. TRFLP vizsgálat eredményei - 2002.05.16-ai minta

Az első mintavétel négy különböző mintájának feldolgozása látható a 20. ábrán. Minden esetben legalább három párhuzamos kapilláris elektroforézist végeztünk, hogy kiszűrjük a zajokat, ill. a futtatási hibákat. Így a 20. ábrán is két-két párhuzamos futás egymásra vetített képe látható.



20. ábra. A 2002.05.16-ai minták TRFLP ujjlenyomata 3 restriktív enzimmel. Minden kromatogramon két párhuzamos futás (kék és zöld) egymásra vetített mintázata látható.

Mindegyik medencénél azonos csúcsokat találtunk: a *TaqI* restriktív enzimmel kétféle hosszúságú (48 és 219 bp) TRF-et, az *AluI* enzimmel egy hasított (225 bp) és egy hasítatlan (491 bp), a *Hin6I*-gyel pedig háromféle hosszúságú (275, 299 és 491 bp) fragmentet kaptunk, igaz ezek aránya minden mintában eltérő volt.

A kapott csúcsok hosszát összevetettük az adatbázisunkkal, és azokat öt lehetséges kombinációban találtuk meg benne, amelyeket a 8. táblázatban foglaltunk össze. Az egyes kombinációkhoz tartozó szekvenciákat egy-egy hasítás mintázat (HM) csoportba soroltuk.

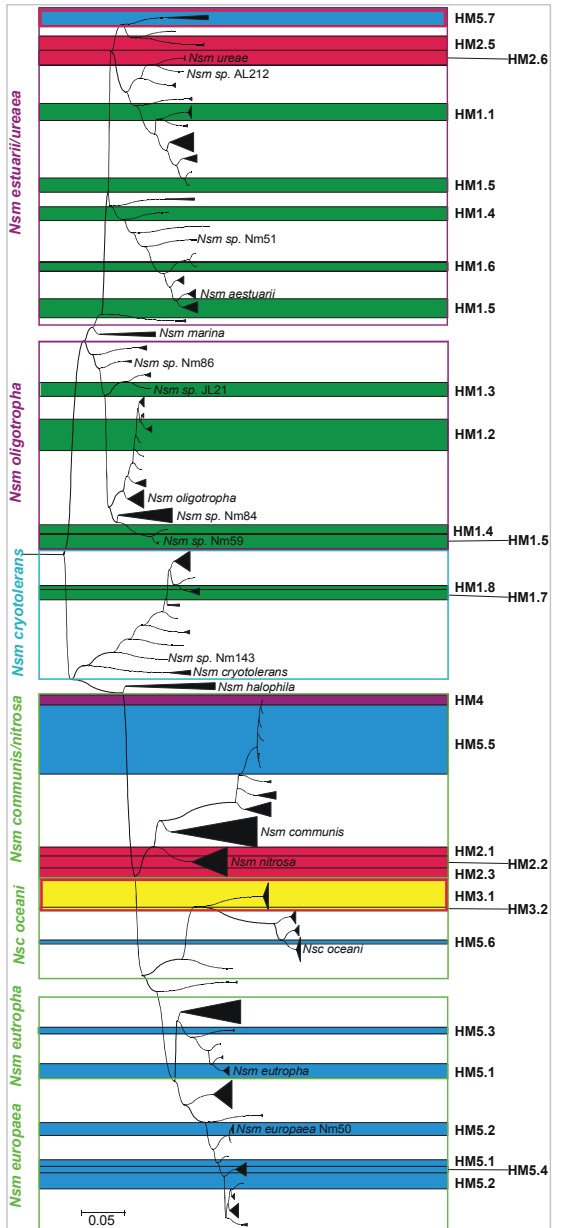
8. Táblázat. A 2002.05.16-ai minták TRFLP ujjlenyomata alapján lehetséges hasítási mintázat kombinációk.

| | <i>TaqI</i> | <i>AluI</i> | <i>Hin6I</i> |
|-----|-------------|-------------|--------------|
| HM1 | 48 | 225 | 491 |
| HM2 | 48 | 491 | 491 |
| HM3 | 219 | 491 | 274 |
| HM4 | 219 | 491 | 299 |
| HM5 | 219 | 491 | 491 |

A lehetséges hasítási mintázatokat fedő csoportok közül természetesen nem biztos, hogy mind jelen volt a mintáinkban, azonban azok, amelyeknek legalább egy enzimmel csak rájuk jellemző hosszúságú fragmentje van (pl. HM1 esetében az *AluI* enzimmel képzett 225 bp-os TRF), feltételezhetően megtalálhatóak voltak bennük. Így a már említett HM1 mellett a HM3 és HM4 csoportba tartozó szekvenciákkal rokon filotípusok jelenlétét véltük bizonyosnak mintáinkban.

A HM csoportok elhelyezkedése az adatbázis szekvenciáiból készült törzsfán a 21. ábrán látható. A fán a *Nitrosospira* vonalat nem ábrázoltuk, mivel az idetartozó szekvenciák egyikének sem volt olyan hasítási mintázata, mint amelyenket mi találtunk.

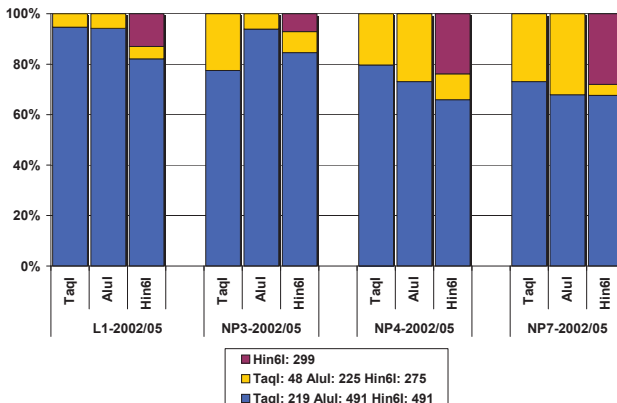
21. ábra. A 19. ábrán szereplő nagyított *amoA* törzsfá részletes szerkezete. Különböző színnel jelölve a 2002-es mintákban feltételezett HM csoportok. Fekete kerettel jelölve, jobb oldalt nevesítve az aHM csoportok, piros kerettel a klónszekvenciák pozíciója látható.



A filogenetikai fán egyértelműen látszik, hogy a különböző színnel jelölt HM-ok nem monofiletikus csoportokat fednek. Kivételt képez a sárga színnel jelölt HM3, amely a *Nitrosococcus oceani* ág egy csak tenyésztetlen szekvenciákat tartalmazó csoportját fedi. Monofiletikusnak tekinthető még a HM4, amellyel csupán egyetlen egy szekvencia rendelkezik az adatbázisunkban. Ez a szekvencia azonban 98,7-99,6 %-ban azonos a vele egy ágon lévő HM5-be tartozó szekvenciákkal. Mivel az *amoA* gén esetében 80 % alatti nukleotid-szekvencia azonosság esetén sorolunk két filotípust külön fajba (II.6.3.3.1.C/3. pont), az ezen az ágon található szekvenciákhoz tartozó filotípusok mindenképp egy fajt képeznek.

A 21. ábrán látható továbbá az is, hogy a későbbi, 2003-as mintáknál használt *BsuRI* és *Csp6I* endonukleázokkal hány további alcsoportot lehet megkülönböztetni, ezeket fekete keretekkel jelöltük, és a három eredeti enzimmel kapott hasítási mintázatok nevéből vezettük le a jelölésüket (pl. HM1.1, HM5.7, stb.). Az így kapott hasítási mintázatokkal már sokkal jobb felbontást kaphattunk volna. Például a HM5 egyetlen, *Nsm. oligotropha* ágba tartozó csoportja (HM5.7) egyértelműen megkülönböztethető a többitől. Azonban még így is előfordulnak polifiletikus kombinációk (pl. HM5.1), ill. sokszor alig eltérő szekvenciákat választanak külön ezek a mintázatok (pl. HM2.1-3). A 2003-as mintáknál használt *TasI* enzim további alcsoportokat eredményezett volna, azonban ezeket nem ábrázoltuk, mivel ez az enzim nagyon sok AOB esetében 50 bázishossznál kisebb TRF-et eredményez, amelyek méretezése módszertani okok miatt problematikus (IV.1.3.3. pont), így használata gyakorlati szempontból nem előnyös.

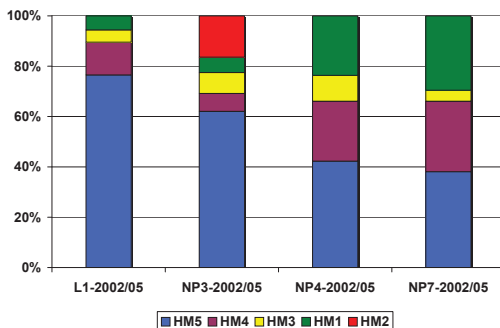
Mindentől függetlenül megállapítható, hogy a HM1, HM3 és HM4 alapján egyértelműen különválaszthatók a *Nsm. europaea* nagyág tagjai a *Nsm. oligotropha* és *Nsm. cryotolerans* leszármazási vonalaktól. Utóbbi két ágba tartozó HM1 mintázattal jellemezhető csoportok a 2003-ban már használt két további enzimmel egyértelműen megkülönböztethetőek lettek volna egymástól. Továbbá ugyanez igaz a HM2 és HM5 kombinációkra, amelyek a *BsuRI* és *Csp6I* endonukleázokkal kiegészítve már olyan alcsoportokra váltak volna külön, amelyek nagyobb taxonómiai besorolása már nem kétséges. Sajnos a minták utólagos kiegészítő vizsgálata ezen enzimekkel technikai okok miatt nem volt lehetséges.



22. ábra. A 2002-es minták 3 enzimmel kapott TRFLP csúcsainak görbe alatti terület aránya.

A lehetséges csoportok azonosítására további segítséget ad a TRFLP csúcsokhoz tartozó csoportok arányának a megállapítása azok görbealatti területéből. Az így számolt enzimenkénti fragmentarányok láthatók a 22. ábrán.

Az adatbázis alapján lehetséges hasítási mintázatokat összevetettük az egyes csúcsok arányaival. Először az említett három egyedi hasítóhellyel rendelkező csoport arányát vettük figyelembe, majd a többiét ezek alapján számoltuk ki. A 23 ábrán látható eredményből megállapítható, hogy a HM1, HM3, HM4 és HM5 mind a négy mintában, míg a HM2 csak az NP3 jelű Biofor medencében volt jelen. Minden mintában a HM5 csoport bizonyult a legnépesebbnek, de a legnagyobb arányú az eleveniszapos medencében volt. Az NP3 medence kivételével a HM3 csoport volt a legkisebb arányú minden mintában. Az eleveniszapos és Biofor medencék hasonló AOB közösség-összetétele nem volt meglepő, hiszen a bioszűrők mosóvizét az eleveniszapos medencékbe vezetik vissza.



23. ábra. A 2002-es mintákban feltételezett HM csoportok számított aránya a TRFLP csúcsok görbe alatti terület alapján.

V.1.2.2. Klónozás eredményei

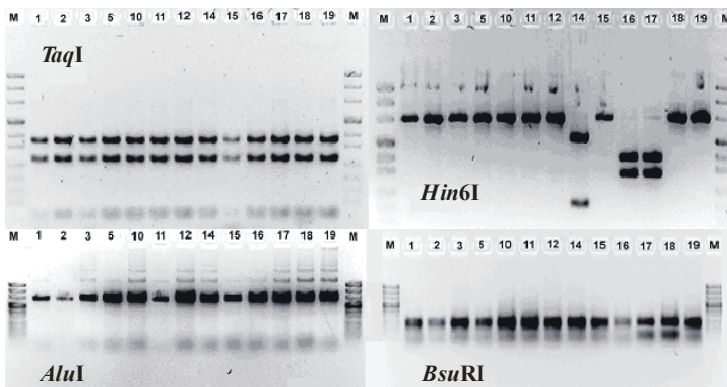
A 23. ábra alapján választottuk ki az NP3-2002/05 és NP7-2002/05 mintákat klónkönyvtár készítésére, egyrészt a csak az előbbiben feltételezett HM2 miatt. Másrészt az NP7-2002/05 tartalmazta a HM1, HM4 és HM5 csoportokat a legkiegyensúlyozottabb arányban, ezért reméltük, hogy itt kapjuk vissza a legkevesebb klón RFLP szűrésével ezt a három, a mintáinkban legjelentősebb csoportot.

Az NP3-2002/05 minta klónozása 88 megfelelő inszertet tartalmazó (pozitív) klónt eredményezett. Az RFLP mintázat csak a *Hin6I* enzim esetén mutatott eltérést, ahogy ez az első 19 klón vizsgálatáról készült képen (23. ábra) látszik. A *Hin6I* hasítás alapján három klóncsoportot különböztettünk meg, amelyeket az első szekvencia-analízisnek alávetett tagjuk számával jelöltünk. Aklóncsoportok mérete a 9. táblázatban található.

Az NP7-2002/05 minta esetében csak 51 pozitív klónt kaptunk, ezek azonban változatosabb RFLP mintázatot mutattak. Bár a *TaqI* és az *AluI* mintázat itt is minden klón esetében azonos volt, és a *Hin6I* RFLP itt is három különböző mintázatot mutatott, ennél a klónkönyvtárnál a *BsuRI* enzim alapján is megtudtuk különböztetni egy csoportot. E klóncsoport jellemzőit szintén a 9. táblázatba foglaltuk össze.

9. Táblázat. A 2002.05.16-ai mintákból készített klónkönyvtárak klóncsoportjainak tulajdonságai.

| Minta | Klón-csoport | Klónok száma | Megkülönböztető RFLP |
|-------|--------------|--------------|----------------------|
| NP3 | 14 | 3 | <i>Hin6I</i> |
| | 15 | 53 | <i>Hin6I</i> |
| | 17 | 32 | <i>Hin6I</i> |
| | 7 | 8 | <i>BsuRI</i> |
| NP7 | 18 | 13 | <i>Hin6I</i> |
| | 20 | 26 | <i>Hin6I</i> |
| | 44 | 4 | <i>Hin6I</i> |



24. ábra. A NP3-2002/05 mintából készített klónkönyvtár első 19 tagjának RFLP mintázata.

V.1.2.3. Szekvenca-analízis eredményei

Tizennégy klónt vetettünk alá szekvenca-analízisnek (klóncsoportonként két klónt), amelyek 12 különböző szekvenciát eredményeztek. A szekvenciák az általunk használt restriktációs enzimekkel végzett *in silico* hasítása alapján jósolt TRF-jeinek hosszát a10. táblázatban foglaltuk össze.

Amint látható, TRF szempontjából klónszekvenciáink alapján az általunk használt enzimekkel csupán három hasítási mintázatot lehet megkülönböztetni. Annak magyarázata, hogy a klónok a hagyományos RFLP segítségével másképp csoportosultak, abban rejlik, hogy a nem-terminális, jelöletlen fragmenteket eredményező hasítóhelyekben volt eltérés.

A klónszekvenciák adatbázis szekvenciákkal való illesztése után készített törzsfá alapján megállapítottuk azok filogenetikai helyzetét, amit a 21. ábrán piros négyzetekkel jelöltünk. Látható, hogy a szekvenciák egy része a *Nsm. europaea* vonal *Nsc. oceani* ágának egy csak tenyésztetlen

környezeti klónokat tartalmazó csoportjához tartozik. Két további szekvenca a *Nsm. oligotropha* vonal *Nsm. aestuarii* és *Nsm. ureae* ágához tartozik, annak egy egyértelműen elkülönülő csak környezeti klónok *amoA* szekvenciáit tartalmazó csoportjának a tagja. Hasítási mintázat szempontjából az előbbi csoport a monofiletikus HM3 TRFLP ujjlenyomattal jellemezhető, míg az utóbbi két szekvenca a HM5 csoportnak abba a részébe tartozik, amely a 2003-ban már használt további két enzimmel a HM5.7 monofiletikus csoportot adja (21. ábra).

10. Táblázat. 2002.05.16-ai mintákból készített klónkönyvtárból kapott szekvenciák *in silico* számított TRF-jeinek hossza.

| Minta | Klón | TaqI | AluI | Hin6I | BsuRI |
|-------|------|------|------|-------|-------|
| NP3 | 14 | 219 | 491 | 274 | 167 |
| | 15 | 219 | 491 | 274 | 167 |
| | 17 | 219 | 491 | 274 | 167 |
| | 19 | 219 | 491 | 274 | 167 |
| NP7 | 7 | 219 | 491 | 274 | 167 |
| | 18 | 219 | 491 | 491 | 167 |
| | 20 | 219 | 491 | 274 | 167 |
| | 41 | 219 | 491 | 274 | 167 |
| | 44 | 219 | 491 | 97 | 167 |
| | 52 | 219 | 491 | 491 | 167 |
| | 67 | 219 | 491 | 274 | 167 |
| | 77 | 219 | 491 | 274 | 167 |

V.1.2.3.1. HM3 csoport

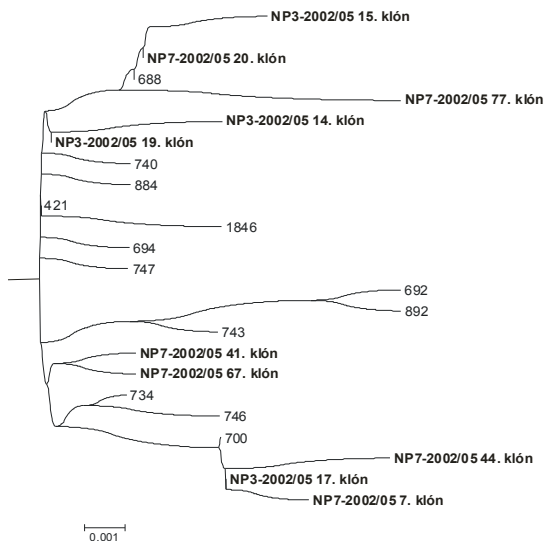
A 25. ábrán látható a HM3 ág nagyított részletes törzsfája. A fán szereplő szekvenciák az adatbázisunkban szereplő számokkal vannak jelölve. Részletesebb tulajdonságaik a 11. táblázatban láthatók.

A csoportba tartozó szekvenciák beleértve a mi klónjainkat is legalább 97,9 %-os *amoA* gén bázissorrend azonossággal jellemezhetőek, vagyis egyértelműen egy filospécieszbe tartoznak. Legközelebbi tenyésztett rokonaik a *Nsc. oceani* törzsek (*Nsc. oceani*, *Nitrosomonas* sp.

Nm 93, Nm 104 és Nm107), amelyekkel 80 % körüli hasonlóságot mutatnak (77,9 - 81,4 %), ami a közös fajba tartozás határesetete, vagyis ha lenne az ágnak tenyésztett tagja, az nagyvalószínűséggel egy új AOB fajt képezne.

Ahogy az a 11 táblázatban és a 25. ábrán látható a szekvenciák mindegyike kommunális szennyvíztisztító üzemből származik (Park és Noguera, 2004; Purkhöld és mtsi, 2000; Rotthauwe és mtsi, 1997). Azon belül is a többség (8 szekvencia) az általunk is mintázott Biofor típusú harmadlagos bioszűrő rendszerből került elő (Purkhöld és mtsi, 2000). Két szekvencia más jellegű biofilmes nitrifikáló reaktorból származott (Purkhöld és mtsi, 2000), míg másik kettő eleveniszapból (Park és Noguera, 2004; Rotthauwe és mtsi, 1997). Az eleveniszapos minták egyikéről (Park és Noguera, 2004) pedig tudható, hogy egy biológiai foszforeltávolítás és a nitrifikáció-denitrifikáció elősegítése érdekében, anoxikus szelektoral ellátott Orbal típusú (Park és mtsi, 2002; II.2.1.2.2.B. pont, I. ábra) medencéből származik.

A csoportba tartozó klónokat a redundáns, és a gyenge minőségű szekvenciákat tartalmazó mellékadatbázisban is találtunk (V.1.1. pont). Így további 16 a HM3 filospécieszbe tartozó szekvenciát találtunk. Ezek egyrészt a már említett munkákból származó szekvenciák voltak



25. ábra. Az adatbázisunk és klónjaink HM3 csoportjának részletes *amoA* törzsfája.

(Park és Noguera, 2004; Purkhold és mtsi, 2000), vagy szintén szennyvíztisztó rendszereket vizsgáló munkákhoz tartoztak. A vizsgált üzemegységek között EBPR biofilmes rendszereket (Gieseke és mtsi, 2001), és nitrifikáció-denitrifikáció elősegítése céljából ciklikusan aerált eleveniszapos medencéket (Nicolaisen és Ramsing, 2002) találtunk. Másrészt volt néhány nem szennyvíztisztítóból nyert klón is, úgymint édesvízű pocsolnyából (Horz és mtsi, 2000), és szennyvízzel terhelt ár-ápaló zóna sárrétegéből (Nicolaisen és Ramsing, 2002) kimutatott szekvenciák. Összességében a csoportba tartozó szekvenciák 91 %-a szennyvíztisztítóból, azon belül is vagy biofilmes reaktorból (52 %), vagy változó aerobitású eleveniszapos rendszerből (33 %) származott.

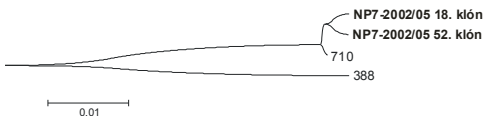
Elmondható tehát, hogy a HM3 TRFLP ujjenyomattal jellemezhető filospéciesz tagjai elsősorban szennyvizekben fordulnak elő, ami a nagy szervesanyag-tartalmú és nagy ammónium koncentrációjú közegek toleranciájára utal. A változó anaerobitású rendszerek nagyszáma a származási helyek között arra enged következtetni, hogy ezek a baktériumok jól tűrik az alacsonyabb oldott oxigénszinteket. Valószínűleg nagy oxigénaffinitással bírnak, aminek a biofilm reaktorokban is hasznát vehetik.

11. Táblázat. HM3 csoportba tartozó klónjainkhoz legközelebbi szekvenciák tulajdonságai.

| Szekvencia száma | Származási hely | Azonosító kód | Hivatkozás |
|-------------------------|--|----------------------|-------------------------|
| 421 | Nitrifikáló-denitrifikáló eleveniszap | AY356431 | Park és Noguera, 2004 |
| 688 | Biofor | AF272498 | Purkhold és mtsi, 2000 |
| 692 | Biofor | AF272494 | Purkhold és mtsi, 2000 |
| 694 | Biofor | AF272492 | Purkhold és mtsi, 2000 |
| 700 | Biofor | AF272486 | Purkhold és mtsi, 2000 |
| 740 | Biofor | AF272446 | Purkhold és mtsi, 2000 |
| 743 | Biofor | AF272443 | Purkhold és mtsi, 2000 |
| 746 | Biofor | AF272440 | Purkhold és mtsi, 2000 |
| 747 | Biofor | AF272439 | Purkhold és mtsi, 2000 |
| 884 | M6-biofilm reaktor | AF272543 | Purkhold és mtsi, 2000 |
| 892 | M5-biofilm reaktor | AF272535 | Purkhold és mtsi, 2000 |
| 1846 | Eleveniszap kommunális szennyvíztisztító | Z97846 | Rotthauwe és mtsi, 1997 |

V.1.2.3.2. HM5.7 csoport

A 26. ábrán látható a HM5.7 ág nagyított változata, a 12. táblázatban pedig a fán szereplő szekvenciák tulajdonságai. Klónjaink szekvenciái a 710 jelű szekvenciával, valamint egymással majdnem azonosak (99,4–



26. ábra. Az adatbázisunk és klónjaink HM5.7 csoportjának részletes *amoA* törzsfája.

99,6 %), míg a 388-as klónnal már csak 92,4–92,7 %-ban hasonlók. Legközelebbi tenyésztett rokonukkal, az eleveniszapból izolált ammónium szenzitív *Nitrosomonas sp.* AL212 törzssel (Suwa és mtsi, 1997) kevesebb mint 80 %-ban (79,2–79,5 %) azonosak, tehát egy külön filospécieszt képeznek.

Klónjaink mindkét legközelebbi tenyésztetlen rokona eleveniszapból került kimutatásra (12. táblázat). A 388-as klón egy Orbal rendszerből (Park és Noguera, 2004), míg a 710-es egy 105 ezer LE terhelésű kommunális szennyvíztisztító eleveniszapos medencéjéből származott. Ez esetben is megvizsgáltuk a mellékadatbázisunkat, valamint a 2005 után publikus adatbázisokba lerakott szekvenciákat, de nem találtunk további a csoportba tartozó szervezeteket. Ezért nem sokat állapíthatunk meg erről a tenyésztetlen filospécieszről, csak a közös szennyvízes élőhely alapján feltételezhető jellemzőket (V.1.2.3.1. pont).

12. Táblázat. HM5.7 csoportba tartozó klónjainkhoz legközelebbi szekvenciák tulajdonságai.

| Szekvencia száma | Származási hely | Azonosító kód | Hivatkozás |
|------------------|------------------------------|---------------|------------------------|
| 388 | Nitrifikáló eleveniszap | AY356464 | Park és Noguera, 2004 |
| 710 | PoII eleveniszap, kommunális | AF272476 | Purkhold és mtsi, 2000 |

V.1.2.4. Adatbázis segítségével történő azonosítás értékelése

Három restriktions enzimmel kapott TRFLP mintázatok adatbázisunkkal való összevetése nyomán öt különböző hasítási kombinációt feltételeztünk (8. táblázat), amelyek közül legalább egy endonukleázal adott egyedi TRF-jük miatt három jelenlétére (HM1, HM3 és HM4) mindenképp számítottunk. A klónok szekvencia-analízise nyomán azonban csak a HM3 és HM5 jelenlétét tudtuk bizonyítani. Ráadásul klónjaink többsége a HM3 csoportba tartozott, amely a TRFLP ujjlenyomat alapján számított arányok szerint a legkisebb hányadát adta mintáink AOB közösségeinek.

A HM3 csoport filogenetikai pozícióját már a háromenzimes ujjlenyomata alapján is egyértelműen meg tudtuk jósolni, amit a klónszekvenciáink is igazoltak. A HM5 viszont polifiletikus csoportnak bizonyult, és a pontos klónszekvenciákkal is igazolt ágának (HM5.7)

besorolásához szükség lett volna a későbbiekben már használt *BsuRI* és *Csp6I* enzimekre is. Az igazi problémát azonban az jelenti, hogy két olyan csoport (HM1 és HM4) jelenlétét nem igazolta a klónozás, amelyeket pedig mindenképp vártunk a TRFLP ujjlenyomat alapján.

Az RFLP vizsgálat homogenitása mellett a klónszekvenciák *in silico* hasítása is igazolta, hogy a rájuk jellemző egyedi TRF-ket adó hasítóhelyek (*TaqI*: 48 bp, *AluI*: 225 bp és *Hin6I*: 299 bp) nem voltak jelen a szekvenca-analízisnek alávetett klónjainkban. Ennek lehet oka a klónkönyvtár készítés, ill. a klónok RFLP vizsgálata során fellépő hiba, vagy a TRFLP ujjlenyomat, ill. értékelésének tökéletlensége.

A legegyszerűbb oknak az agaróz gél alapú RFLP analízis nem kielégítő felbontása látszik, ami miatt esetlegesen nem észleltük a HM1 és HM4 klónokat. Az adatbázis szekvenciák vizsgálata azonban azt mutatta, hogy olyan, mértékű különbségeket adott volna e két csoport a találatokhoz képest, amit agarózon is detektáltunk volna.

A klónozás természetéből két hatás is befolyásolhatta eredményeinket (II.3.2.3.1. pont). Az egyik lehetőség, hogy az eltéréseket preferenciális klónozás okozta, ilyen komoly torzításokat azonban a jelenséget vizsgáló kutatások eredményei alapján nem feltételezhetünk. A másik lehetőség, hogy nem kellő mennyiségű klónt vizsgáltunk, és nem értük el a klónok ritkulási görbéjének plató szakaszát. A csúcsok alatti területe alapján azonban a HM1 csoport a klónozott NP3-2002/05 és NP7-2002/05 minták AOB-inak 6 ill. 30 %-át tette ki, míg a HM4 rendre 7 ill. 28 %-át. Tehát az NP7 medencéből még a vizsgált 51 klón esetén is nagy valószínűséggel vissza kellett volna kapnunk ezeket a csoportokat, amelyek a TRFLP ujjlenyomat alapján több mint felét tették ki a vizsgált közösségnek.

A TRFLP esetében felmerülhet az egyszerű DNS másodlagos szerkezetből adódó hasítási hiba, ami Egert és Friedrich (2003) szerint az úgynevezett pszeudo-TRF-ket is okozza (II.3.2.3.2. A/2. pont). Ezt a hatást azonban a TRFLP és az RFLP vizsgálat során alkalmazott azonos PCR és hasítási körülmények, és a keresett TRFLP csúcsok mérete miatt az RFLP mintázatban is látnunk kellett volna. Továbbá a pszeudo-TRF-k feltételezett képződése szerint a restrikciós endonukleáz a kihurkolódások miatt „kihagyja” az első hasítóhelyet, és csak a következőnél hasít, vagyis a várnál nagyobb TRF-t detektálunk. A HM1 esetében azonban mind a *TaqI*, mind az *AluI* enzimmel kisebb TRF-t detektáltunk, mint a többi hasítási mintázatban, vagyis az Egert-féle pszeudo-TRF-k jelenléte kétséges.

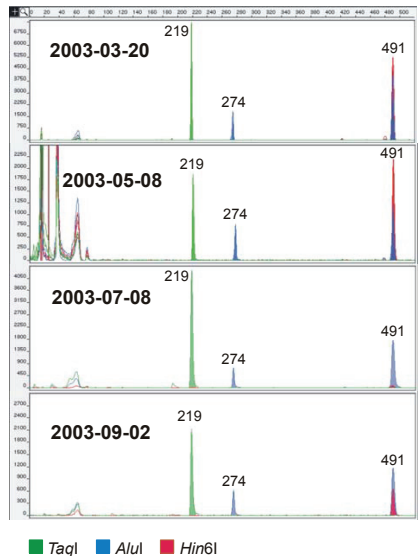
Bár a HM1 és HM4 csoportok hiányát a klónkönyvtárakban a felsorolt lehetséges okok közül egy sem magyarázza teljesen, a TRFLP segítségével detektált, de klónkönyvtárakból nem kimutatható csoportok jelensége nem ismeretlen az irodalomban. Sakano és mtsi (2002) a NASA számára tervezett, szennyvíztisztító bioreaktorokat vizsgáltak párhuzamos 16S rRNS

gén alapú klónozás-szekvenálás és T-RFLP módszerrel, és azt találták, hogy a 156 általuk detektált filotípusból 86-ot csak TRFLP segítségével tudtak kimutatni, míg kizárólagosan klónozással csak 6 szekvencia került elő.

Összességében eredményeink alapján az adatbázisos azonosítás csak részlegesen tekinthető megfelelőnek. A nem igazolt csoportok felhívják a figyelmet a kisszámú klón RFLP segítségével való csoportosításának és a pseudo restrikciós fragmenteknek a problematikájára, ami miatt későbbi munkáinkban már más klón vizsgálati módszereket alkalmaztunk (IV.2.3.3. pont). A HM5 csoport polifiletikus jellege miatt pedig a későbbiekben további restrikciós enzimek használata mellett döntöttünk, hogy egyértelműbb besorolást végezhessünk

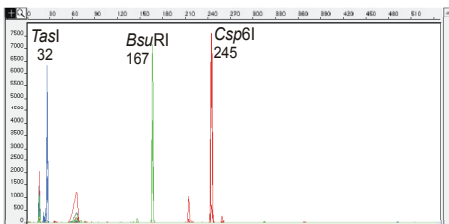
V.1.3. Monitorozás – 2003-as minták

A 2003-ban négy alkalommal vett minták *TaqI*, *AluI* és *Hin6I* endonukleázokkal készített TRFLP ujjlenyomatainak egymásra vetített képe a 27. ábrán látható. Amint látszik, ebben az évben kevesebb TRF-et detektáltunk, valamint minden mintában, származási medence és mintavételi időponttól függetlenül ugyanazokat a csúcsokat azonosítottuk (*TaqI*: 219 bp, *AluI*: 491 bp és *Hin6I*: 274 és 491 bp). A 2002-es eredményeknél tapasztaltak miatt (V.1.2.4. pont), további három enzimmel (*BsuRI*, *Csp6I* és *TasI*) is elkészítettük a TRFLP profilokat, azonban ezekkel is minden minta azonosnak bizonyult (*BsuRI*: 167 bp, *Csp6I*: 245 bp és *TasI*: 32 bp), ahogy a 28. ábrán látható.



27. ábra. A 2003-as minták 3 endonukleázzal készített, egymásra vetített TRFLP mintázata.

A kapott terminális fragmenteket összevetettük az adatbázisunkkal, és csak egyféle lehetséges hasítási mintázatot találtunk a 2002-es mintákban is bizonyítottan megtalált HM3 csoportra jellemző *TaqI*: 219 bp, *AluI*: 491 bp, *Hin6I*: 274 bp, *BsuRI*: 167



28. ábra. A 2003.03.20-ai minták 3 endonukleázzal kapott egymásra vetített ujjlenyomata

bp, *Csp6I*: 245 bp és *TasI*: 32 bp TRF kombinációt. A *Hin6I* endonukleázzal kapott haszatlan 491 bp hosszú csúcás azonban kakkuktojásnak bizonyult, ugyanis a többi enzimmel kapott terminális fragmentekkel nem felelt meg az adatbázisunkban szereplő szekvenciákra jellemző HM csoportok egyikének sem. Ennek legkézenfekvőbb oka a még ismeretlen, adatbázisunkban nem szereplő AOB filotípusok lehetnének, a megoldás valószínűleg mégsem ez.

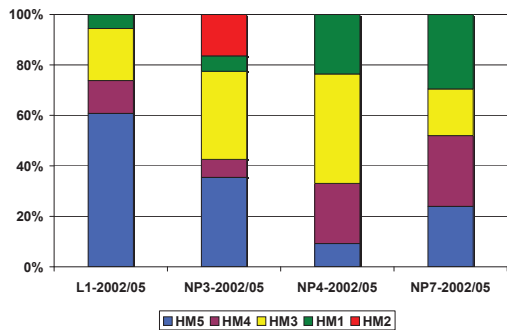
Amikor kiszámoltuk a csoport arányokat a *Hin6I*, mint az egyetlen nem egyöntetű TRFLP ujjlenyomatokat adó enzim alapján, feltűnt, hogy a 274 és 491 bp-os csúcok görbealatti területének aránya gyakorlatilag minden mintában azonos: $274 : 491 = 23 : 77 \pm 2$. Mindez Egert-féle pszeudo-TRF-re enged következtetni, ami a 2002-es klónoknál kapott *Hin6I* RFLP képet is magyarázza. Ez alapján ugyanis olyan klónokat találtunk különbözőnek, és vetettünk alá szekvencia-analízisnek, amelyek később szekvenciájuk alapján gyakorlatilag egyformának bizonyultak (24. ábra), és azonos TRF-ekkel voltak jellemezhetőek (10. táblázat).

Elmondhatjuk tehát, hogy a mintavételi időponttól és a származási helytől függetlenül a 2003-as minták AOB közösség-összetétel szempontjából teljesen homogének voltak, mindegyiket a korábban részletesen tárgyalt (V.1.2.3.1. pont) HM3 ujjlenyomattal jellemezhető csoport uralta.

V.1.4. 2002-es minták újraértékelése

A 2003-as mintákban felfedezett *Hin6I* enzimmel képzett pszeudo-TRF miatt újraszámoltuk a 2002.05.16-ai minták feltételezett AOB csoportjainak arányát. Ez a pszeudo-TRF a HM5 csoport arányát érintette a HM3 javára, ahogy a 29. ábrán látható. Utóbbi csoport aránya átlagban a korábbi 7 %-ról 29 %-ra nőtt, könnyebben értelmezhetővé téve ezzel a HM3 csoportba tartozó klónok dominanciáját.

Az így kapott végső közösség arányok alapján elmondhatjuk, hogy 2002.05.16-ai mintákban átlagosan a HM5 csoport után a HM3 volt a legnépesebb.



29. ábra. A 2002-es mintákban feltételezett HM csoportok számított aránya a TRFLP csúcok görbe alatti terület alapján a *Hin6I* ujjlenyomat Egert-féle pseudoTRF-ekre való korekció után.

V.1.5. A szennyvíztisztító teljesítményének összetétele az AOB közösség-összetételével

Mintavételi időpontjainkkor a Biofor medencékben mért pH és hőmérséklet értékek a 13. táblázatban, míg a befolyó és elfolyó nitrogénformák koncentrációja a 30. ábrán láthatók.

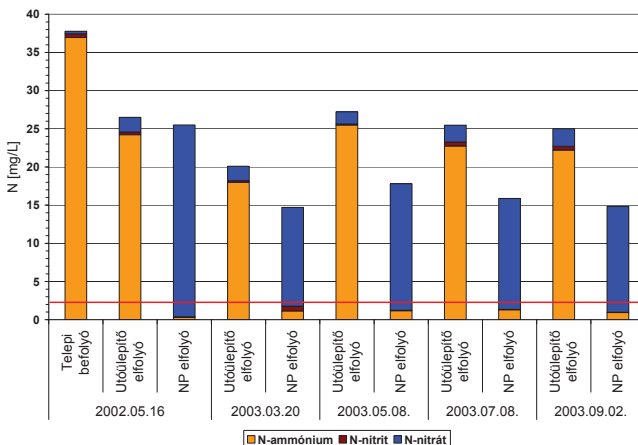
Az eleveniszapos medencék működéséről információt adó telepí befolyó értékeket sajnos csak az első mintavétel alkalmával kaptuk meg, azt azonban megtudtuk a telep munkatársaitól, hogy az EBPR folyamat elősegítése érdekében a medencékben alkalmazott különböző aerobitász zónáknak köszönhetően nitrogénmentesítés is végbe megy bennük. A 2002.05.16-án mért 30 %-os nitrogén-eltávolítás tehát nem szokatlan.

Az eleveniszapos medencékről elfolyó víz minden mintavételi időpontunkban hasonló összetétellel bírt a fontosabb nitrogénformák tekintetében ($\text{NH}_4^+ \text{-N}$: 88–94 %, $\text{NO}_2^- \text{-N}$: 1-2 % és $\text{NO}_3^- \text{-N}$: 5–10 %), ami hasonló működést feltételez.

Munkánk célja azonban elsődlegesen a Biofor egységek vizsgálata volt. Ezek működéséről elmondható, hogy az AOB-ok tevékenységének köszönhetően minden mintavételi időpontban az elfolyó víz ammónium-nitrogén szintje határérték alatti volt (30. ábra, piros vonal).

13. Táblázat. A mintavételi időpontokban a Biofor medencék hőmérséklete és pH értéke.

| Időpont | Hőmérséklet | pH |
|-------------|-------------|-----|
| 2002.05.16. | 19,4°C | 7,0 |
| 2003.03.20. | 17,6°C | 6,9 |
| 2003.05.08. | 20,5°C | 7,1 |
| 2003.07.08. | 23,3°C | 7,3 |
| 2003.09.02. | 23,1°C | 7,6 |



30. ábra. Nitrogén-formák aránya a Dél-pesti Szennyvíztisztító Telepen mintavételi időpontjainkban. Az ammónium-nitrogén határértéke piros vonallal jelölve.

A nitrit-nitrogén minden esetben 0,05 mg/L alatt volt kivéve a leghidegebb 2003.03.20-kai mintát, amikor egy nagyságrenddel nagyobb koncentrációt mértünk. Tekintve, hogy a nitrit elsősorban nem a kezelendő vízből, hanem az oxidált ammóniumból származik, a nitrit felhalmozódása a nitritoxidálók gátolt tevékenységére utal. Hasonló jelenséget figyeltek meg Kim és mtsi (2006), akik egy nagy ammónium-tartalmú csurgaléklé nitrifikációját végző fixágyas biofilmes reaktornál tapasztalták a téli időszakban a nitrit koncentrációjának növekedését. A jelenséget ők azzal magyarázták, hogy az alacsony hőmérséklet miatt minden biokémiai folyamat lelassult, így az ammónia-oxidáció is, ami egyébként a közeg kisebb pH értékét biztosította. A nagyobb pH érték mellett megjelent a szabad ammónia, bár csak a NOB-at gátló koncentrációt érte el (II.6.3.3.3. pont). A mi esetünkben ez a magyarázat nem állja meg a helyét, ugyanis a 2003.03.20-ai mintavételkor mértük a legkisebb pH értéket a Biofor medencékben. Ehelyett inkább a kisebb pH mellett jelentkező nagyobb szabad salétromossav (HNO_2) értékek, ill. a NOB aktivitásának fokozott gátlódása az alacsonyabb hőmérsékletek miatt lehetett az oka a csökkent nitritoxidációnak.

A mért értékek alapján 2003-ban a nitrifikáció érdekében intenzíven levegőztetett NP-Biofor medencékben denitrifikációt feltételező 27 – 41 %-os nitrogén-eltávolítás is végbe ment. Ez a jelenség azt feltételezi, hogy 2002-höz képest egy sokkal érettebb, tagoltabb biofilm képződött a Biolite tölteten, amelyben a denitrifikációhoz szükséges anoxikus mikronichek is megjelentek. Ez azért következhetett be, mert a Biofor egység mosatási ciklusainál a korábbi kizárólagosan üzemidő alapján való szabályozás helyett bevezették a nyomásesés alapú időzítést, ami által csak akkor került sor a biofilm lemosására, amikor annak vastagsága már a rendszer eldugulását idézhette volna elő. A nitrifikációs medencében végbement nitrogén-eltávolítás gazdasági szempontból is előnyös, ugyanis ha a denitrifikációs medencébe kevesebb nitrogén jut, akkor kevesebb metanolt kell adagolni, ami egyébként a nitrogénmentesítés egyik legjelentősebb költsége.

V.1.6. A nitrifikáló medencék vizsgálatának az eredményeinek az összegzése

V.1.6.1. Az *amoA* szekvenciák TRF adatbázisának használata monitorozás céljából

Sikeresen létrehoztunk egy könnyen használható, több mint ezer *amoA* szekvencia alapján készült TRF adatbázist.

A TRFLP ujjlenyomat és az adatbázis alapján történő AOB csoport meghatározás azonban problematikusnak bizonyult. A közösség alkotók ilyen módon való filogenetikai besorolását mintáink esetén egyértelműen nehezítették a pseudo-terminális fragmentek. Egyöntetű közösség esetén (2003-as minták) viszonylag könnyebb volt ezeket felismerni. Azonban az összetettebb, 2002-es mintáknál ez már koránt sem volt ilyen egyszerű. Kiszűrésükre az azonos mintából származó monomolekuláris klónok TRFLP mintázatának vizsgálata javasolható.

A mintákból készített klónkönyvtárak a pseudo-TRF-ek mellett azért is szükségesek, mert ahogy a 2002-es mintáinknál tapasztaltuk, még öt restriktív enzim használata esetén is előfordulnak olyan hasítási mintázat kombinációk, amelyek polifiletikus csoportokat fednek.

Klónkönyvtár készítésre azonban nincs szükség minden mintavételkor, ugyanis ahogy a 2003-as monitorozás esetében is láttuk, és ahogy azt Park és Noguera (2004) különböző aeráltságú kísérleti reaktorok ammónia-oxidáló közösségének 271 napig tartó monitorozása során kimutatták, a hosszú generációs idejű AOB közösségei a drasztikus külső hatásokat kivéve, lassan, több hónap alatt reagálnak környezetük változásaira.

Mindez alapján az AOB szennyvíztisztítóban való monitorozására a következők javasolhatók:

1. A vizsgálat kezdetekor először közösségi *amoA* TRFLP ujjlenyomat készítése a lehető legtöbb (4-6) restriktív enzim segítségével.
2. A TRFLP mintázatok adatbázisunkkal való összevetése alapján a valószínűsíthető filotípusok meghatározása.
3. A legdiverzebb és az összes jelentősen eltérő mintából, ill. a későbbi mintáknál új csúcsok megjelenésekor klónkönyvtár készítése.
4. A klónok egyedi TRFLP mintázata alapján a közösségi TRFLP csúcsainak és az esetleges pseudo-TRF-eknek az egyértelmű azonosítása, majd amennyiben szükséges a kiválasztott klónok szekvencia-analízisének elvégzése.
5. A vizsgálandó egység egy-két havonkénti ellenőrzése TRFLP segítségével, amit az azonosított csoportokat egyértelműen megkülönböztető restriktív enzimekkel ajánlott végezni (pl. HM3 esetében a kezdetben használt három enzim elégségesnek bizonyult, míg a HM5.7 csoport megkülönböztetéséhez öt endonukleázra volt szükség).

V.1.6.2. A DpSzt AOB monitorozásának eredményei

Monitorozásunk eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy mintáink mind a vízkémiai paraméterek (nitrogén-eltávolítás), mind az AOB közösség összetétele alapján két részre oszthatók: a 2002-es és a 2003-as mintákra.

A 2002-es mintavételi időpontkor a nitrogén-eltávolítás mértéke a Biofor medencékben csekély (4 %-os) volt. Mindeközben a mikrobióta egy komplexebb, szekvencia-analízissel is bizonyítottan kettő, TRFLP alapján feltételezhetően akár négy különböző csoportból álló AOB közösséggel volt jellemezhető. A két egyértelműen azonosított csoport tagjai az AOB közösség egy-egy harmadát tették ki. Mindkét filotípus csak tenyésztetlen közeli rokonokkal rendelkezik, ezért csak azok előfordulása alapján következtethetünk jellemzőikre.

Ezek alapján elmondható, hogy az egyik csoport (HM3) a *Nsm. europaea* ág *Nsc. oceani* törzseihez közelálló, szennyvizekre jellemző nagyobb ammónium- és szervesanyag-terhelést jól toleráló, nagy oxigénaffinitású, a biofilmben való életmódot előnyben részesítő szervezeteket tartalmaz. A másik filotípus (HM5.7) a *Nsm. oligotropha* ág *Nsm. ureae* törzsével rokon csoport, amely valószínűsíthetően hasonló tulajdonságokkal bír, mint az előbbi, csak a biofilmek preferenciája itt nem állítható, hiszen a lebegő flokkulumok (adatbázis szekvenciák) és a biofilmek (a mi klónjaink) fele-fele arányban vannak jelen a származási helyek tekintetében.

A 2003-as mintavételeinkkor viszont jelentős nitrogéncsökkenés (25-30 %) történt a Biofor medencékben, ami egy szerkezetét tekintve komplexebb, anoxikus zónákat is tartalmazó biofilmre utal. Ezekben a mintákban a feltételezetten biofilmeket preferáló HM3 filospéciesz volt a mikrobiális közösség egyeduralgoló ammóniaoxidáló csoportja, ami szintén a biofilm érettségét jelezheti. A hatékonyabb és költségkímélőbb nitrogénmentesítést lehetővé tevő strukturáltabb biofilm valószínűleg a mosatási fázisok nyomásesésen alapuló szabályozásának a bevezetésének köszönhető.

V.2. Az ISD-K biológiai vízkezelő egységének vizsgálata

V.2.1. Az üzemegység fizikai és kémiai jellemzői a vizsgált időszakban

V.2.1.1. Befolyó víz – kémiailag kezelt víz (KK) jellemzői

Az üzem saját mérési eredményei alapján tudjuk, hogy vizsgálatunk időszakában (2004.07.01-11.30.) a kokszolómű szennyvizének eleveniszapos biológiai egységére érkező, előkezelt szennyvíz (II.2.2.2.1.A. pont) jellemzői a korábbi évben tapasztaltakhoz (II.2.2.2.2. pont, 4. táblázat) hasonlóan alakultak mind értékhatárok, mind átlagértékek tekintetében (14. táblázat).

14. Táblázat. Az ISD-K biológiai vztisztításának jellemzői (2004.06.01-12.31), a cég saját mérési nyomán, kiemelve a határérték feletti értékek, KK = kémiailag kezelt víz, TV = biológiailag tisztított víz.

| | KK [mg/L] | | | TV [mg/L] | | | Hatásfok ^{††} | Határérték |
|-------------------------------------|-----------|------|-------|------------|------------|------------|------------------------|------------|
| | Min | max | átlag | min | max | átlag | [%] | [mg/L] |
| KOI | 3400 | 6100 | 4782 | 292 | 880 | 459 | 79 | 150 |
| Fenolindex | 59 | 1067 | 779 | 0,01 | 0,17 | 0,08 | 100 | 3 |
| SCN⁻ | 360 | 1000 | 681 | 1,1 | 305 | 25 | 96 | - |
| szabad CN⁻ | 0,1 | 0,7 | 0,4 | 0,01 | 0,18 | 0,04 | 87 | 0,2 |
| összes CN⁻ | 1,7 | 117 | 22 | 2,2 | 103 | 20 | -16 | 10 |
| NH₄⁺-N | 2 | 498 | 70 | 103 | 327 | 162 | -472 | 10 |
| pH | 6,0 | 9,4 | 7,85 | 5,6 | 8,0 | 6,4 | - | 6-9 |

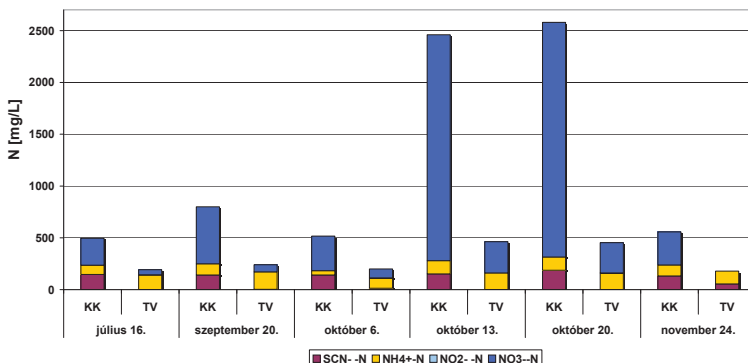
Egyes paraméterek (KOI, fenolindex) kevéssel nagyobb értékek mutattak, míg más vegyületekből (rodanid, ammónium) átlagosan kevesebb volt. A VIII.2. pontban található diagramokon látszik, hogy a KOI, fenolindex, szabad cianid és rodanidtartalom egy-két kiugró értéktől eltekintve egyenletesen alakult a KK vízben. Az ammónium és az összes cianid koncentráció a vizsgált időszak elején nagyobb értéket mutatott, ami az ammónia kihajtó Still-Claus üzemegység nem megfelelő működésével függ össze. Erre az időszakra azonban csak egy mintavételünk esett (07.17.).

Az ELTE-TTK Kémiai Technológiai és Környezetkémiai Tanszék munkatársai által a mintavételek időpontjában végzett kiegészítő mérések alapján tudjuk, hogy a KK vizet igen nagy nitráttartalom jellemzi, ami októberben kiugró értékeket mutatott (~2200 mg/l NO₃⁻-N, 31. ábra). A nitrit viszont mindvégig a kimutathatóság határán mozgott.

A kiegészítő GC-MS vizsgálatok alapján elmondhatjuk, hogy sem a klórfenolok, sem az illékony aromás szénhidrogének (BTEX) nem voltak jelentős mennyiségben mérhetőek, csupán

^{††} Negatív érték esetén az adott komponens koncentrációja az elfolyóban nagyobb volt, mint a befolyóban, vagyis az adott komponens termelődött a biológiai kezelés során.

néhány $\mu\text{g/L}$ -es koncentrációt mutattak. Ugyanez volt igaz a legtöbb policiklusos aromás szénhidrogénre (PAH), csak néhány antracén jellegű vegyületből lehetett 10-120 $\mu\text{g/L}$ -es koncentrációt mérni. A heterociklusos vegyületek közül pedig egyedül a kinolin mutatott mérés határ feletti értéket. A fenol származékok közül viszont a krezolok és a rezorcin nagyobb, a fenol koncentráció 40-60 %-ának megfelelő mennyiségben voltak jelen.



31. ábra. Nitrogénformák alakulása az ISD Kokszoelő Kft. biológiai vízisztítása során az ELTE-TTK Kémiai Technológiai és Környezetkémiai Tanszék által mérték alapján ^{††}.

V.2.1.2. Elfolyó biológiailag kezelt tisztított víz (TV)

A tisztított víz kémiai jellemzői a legtöbb vegyület esetében a korábbi évhez hasonlóan alakultak, ahogy azt a 14. táblázatban és a VIII.2. pontban láthatjuk. A fenol bontás mindvégig kiváló, gyakorlatilag 100 %-os volt. Ennek megfelelően a KOI is csökkent, de ahogy korábban, ebben az időszakban sem sikerült határérték alatti értéket elérni. Ugyanez igaz az összes cianidtartalomra, amelyre azonban hatással volt a vizsgált időszak elején a befolyó KK víznél tapasztalt kilengés is. Ez az időszak kismértékben az ammóniumtartalmat is befolyásolta. Utóbbi vegyület koncentrációja az elfolyóban mindvégig a befolyó értékeknél nagyobb volt, feltételezhetően a rodanid biodegradációja során képződő ammónia miatt (II.6.1.2. pont).

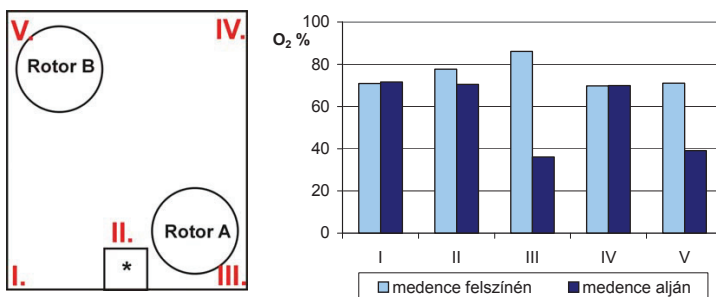
A rodanid bontása vizsgálatunk elején gyakorlatilag teljes volt, azonban a kétlépcsős üzemenetre való áttérés után (VIII.2.6. pont: piros szaggatott vonal) jelentős romlást mutatott, vagyis bekövetkezett egy ahhoz hasonló rodanidbontásbéli visszaesés, amelyet a korábbi évben is tapasztaltak (II.2.2.2.2. pont, 6. ábra), és amelynek vizsgálata kutatásunk egyik fő célja volt. Ebben az időszakban a mindvégig határérték alatti szabad cianid is némi emelkedést mutatott.

^{††} A November 24-ei mintavételkor nem történt nitrát mérés a tisztított vízből (TV).

A biológiai kezelés hatására a GC-MS mérések szerint az egyéb szerves szennyezők mindegyike a mérhetőség határára esett vissza. A mintavételek időpontjában mért nagy bemenő nitrát koncentrációk szintén jelentősen csökkentek 75-90 %-os eltávolítást jelezve (31. ábra).

V.2.1.3. A levegőztetett eleveniszapos medencék jellemzői

Szeptemberi mintavételünk alkalmával összehasonlítottuk a hat párhuzamos medence fizikai és kémiai jellemzőit, valamint a második medence (M2) esetében a felső rotátorok levegőztetésének hatékonyságát. Ezen mérések eredményéről elmondható, hogy a párhuzamos medencék lényegi eltérést nem mutattak, fizikai és kémiai szempontból gyakorlatilag egyformáknak tekinthetők. A térbeli vizsgálat sem mutatott anoxikus zónákat, egyedül a rotátorok melletti sarkokban észleltünk alacsonyabb oldott oxigén koncentrációkat (32. ábra). Azonban az itt mérhető értékek sem jelentettek anoxikus viszonyokat (36 ill. 39 %-os oxigéntelítettség).



32. ábra. A 2-es levegőztetett medence felülnézeti sematikus rajza a mintavételi pontjainkkal, és az egyes pontokon általunk mért oldott O₂ tartalom és hőmérséklet alapján számolt oxigéntelítettségek.

Az eleveniszapos medencék hőmérsékletéről (VIII.2.7. pont) elmondhatjuk, hogy bár a vizsgálat időszakában a temperálatlan medencék átlaghőmérséklete 24°C volt, az évszakos hőmérsékletváltozásnak megfelelően fokozatosan hűltek. A nyári időszakban, szeptember végéig két kiugró értéktől eltekintve 20°C feletti volt a hőmérséklet, novemberben azonban már csak egy-két alkalommal mértek 15°C feletti értéket, és az utolsó mintavételi időpontunkban (11.24.) már csak 12°C-osak voltak a medencék.

A medencék szárazanyagtartalma (VIII.2.8. pont) az egylépcsős üzemmenet időszakában két kiugró értéktől eltekintve viszonylag stabilnak, 11-17 g/L közöttinek (átlag: 13,8 g/L) adódott. Azonban az üzemmenet váltás után, a rodanidbontás visszaeséssel egyidejűleg 10 g/L alá (átlag: 7,5 g/L) esett vissza.

A pH érték alakulása a tisztítási folyamat során a VIII.2.9. pont diagramján látható. Ez alapján elmondható, hogy a biológiai folyamatok eredményeként a medencék savanyodnak. A KK víz enyhén lúgos, 7-9 közötti (átlag: 7,9) pH értéke a levegőztetett medencékben körülbelül két értékkel csökken, így itt 5-7 közötti (átlag: 5,6) érték jellemző. Az ülepítés során kismértékben ismét lúgosodik a víz, így az elfolyó tisztított vízben 5,5-7,5 közötti (átlag: 6,2) érték mérhető. Mindez azonban az általunk vizsgálat időszaknak csak az egylépcsős időszakára igaz, az üzemmenet váltás után, a rodanidbontás visszaesésével egyidejűleg a medencékben tapasztalt savanyodás elmaradt, és az elfolyó víz pH 8 körüli értékkel hagyta el az üzemegységet.

V.2.1.4. A fizikai és vízkémiai vizsgálatok eredményeinek összegzése

Össességében elmondható, hogy az ISD-K eleveniszapos medencéire a vizsgált időszakban érkező KK víz aránylag egyenletes összetételű volt. A korábban nem mért szennyezők közül krezoloból, rezorcinból és nitrátból sikerült jelentősebb mennyiséget kimutatni. Utóbbi vegyület két mintavételi időpontunkkor (10.13. és 10.20.) kiugró koncentrációjú volt.

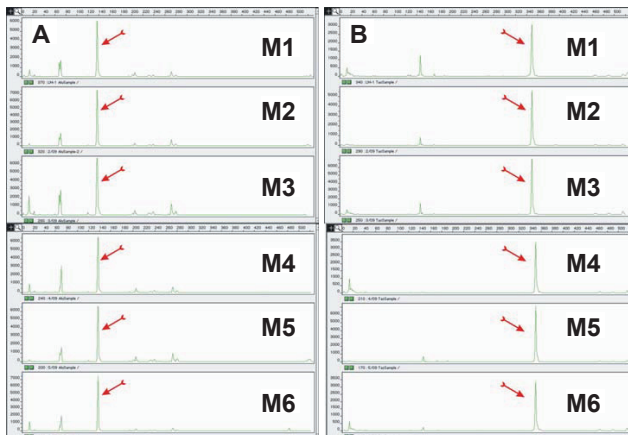
A biodegradáció a legtöbb szennyező, így az újonnan kimutatott vegyületek esetében is teljes volt (fenol származékok, szabad cianid), vagy a korábbiakhoz hasonló hatásokkal zajlott (KOI, összes cianid, ammónium). A rodanid esetében azonban bekövetkezett egy jelentős, a korábbi években tapasztaltaknál is drasztikusabb bontásbéli visszaesés, amely együtt járt a medencékben tapasztalt savanyodás elmaradásával, ill. szárazanyagtartalmuk csökkenésével. A rodanid degradációjának elromlása a leghidegebb időszakban, az egylépcsősről kétlépcsősre való üzemmenet váltás után következett be.

V.2.2. Az eleveniszapos medencék TRFLP ujjlenyomatai

V.2.2.1. Párhuzamos medencék összehasonlítása

Először a szeptember 20-án, mind a hat levegőztetett medencéből vett minták TRFLP ujjlenyomatát készítettük el négy különböző restriktív enzimmel. Ezek közül a legtöbb (*AluI*) és a legkevesebb (*TasI*) csúcsot adó két enzimmel készült mintázatok találhatóak a 33. ábrán.

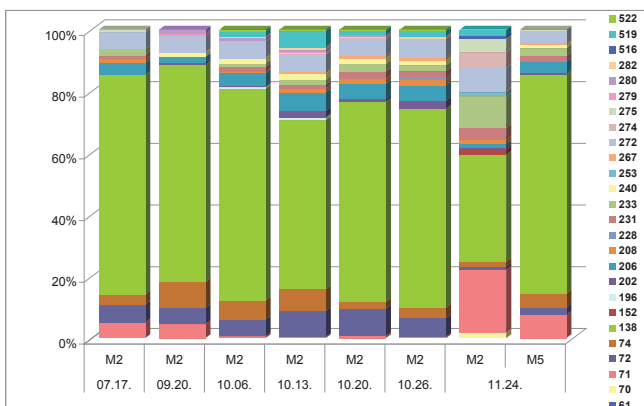
Amint látható a medencékben egy viszonylag egyszerű, kevés csúcsból álló közösséget találtunk, amelyet egy domináns csúcs (33. ábra piros nyíl) jellemez. Ez a csoport *AluI* enzimmel egy 138 bp hosszú TRF-t ad, amely a görbealatti területekből számolt arányok alapján a közösség 60-70 %-át teszi ki. További nagyobb csúcsokat láthatunk 70-74, ill. 270-280 bázishossz között. Össességében elmondható, hogy a hat párhuzamos medence TRFLP ujjlenyomata alapján mikrobiológiailag is kellőképp homogénnek adódott, így a továbbiakban - a kétlépcsős üzemmenetet kivéve - csak a második medencét vizsgáltuk.



33. ábra. Hat levegőztetett medence szeptember 20-ai *AluI* (A) és *TasI* (B) enzimekkel képzett TRFLP ujjlenyomata.

V.2.2.2. Medencék időbeli változása DNS alapú ujjlenyomatuk alapján

A közösségi DNS-ből készült TRFLP mintázatok alapján számolt csúcsok görbealatti területének aránya látható a 34. ábrán. Megfigyelhető, hogy az egylépcsős üzemenetből származó minták (július-október) TRF összetétele nem, a dominancia viszonyok pedig csak kis mértékben változtak. Így a legnagyobb 138 bp-os csúcs ez idő alatt is végig domináns maradt. Az üzemenet váltás utáni, november 24-ei első lépcsőt képviselő M2-es minta (M2 11.24.) TRFLP ujjlenyomatán viszont jelentős változások figyelhetők meg.



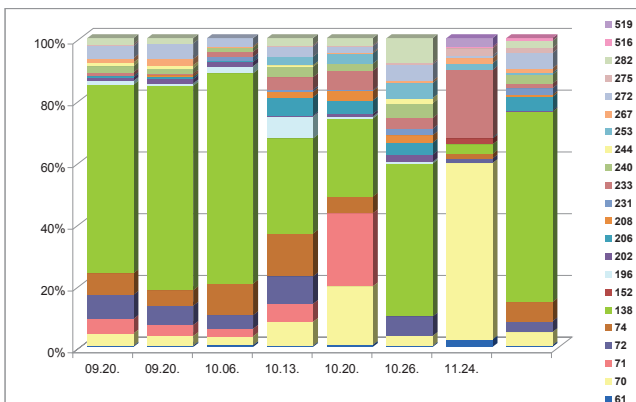
34. ábra. DNS alapon *AluI* enzimmel készített TRFLP ujjlenyomatok csúcsainak görbealatti területének aránya.

A domináns 138 bázis hosszú TRF nagysága a júliusi és szeptemberi érték felére csökkent (35 %), míg más csúcsok területe növekedett (pl. 71, 233, 274, 275 bp-os csúcsok). Tapasztalható továbbá, hogy korábbiakban ki nem mutatott TRF-ek jelentek meg a közösségi mintázatban (pl. 152, 253 és 516 bp hosszú csúcs). A második lépcsőt képviselő M5-ös minta közössége viszont hasonlóságot mutat a korábbi időpontokban tapasztaltakkal.

V.2.2.3. Medencék időbeli változása RNS alapú ujjlenyomatuk alapján

A baktériumok aktivitását jobban tükröző (II.3.2.1. pont) RNS alapon készített TRFLP ujjlenyomatok alapján készült 35. ábrából azonnal láthatjuk, hogy ezzel a módszer a mintáink sokkal változatosabbnak bizonyultak, mint DNS alapon. Összességében csökkent a minták diverzitás, számos DNS alapon észlelt csúcs RNS alapon nem volt detektálható (pl. 228, 239, 280 bp-os TRF), és csupán egy új TRF (244 bp) tűnt fel. Egymáshoz képest azonban sokkal több eltérést mutattak, és többször jelentősen eltértek DNS alapon készített „ujjlenyomatpárjuktól”. Így míg az első három mintavételi időpontkor a domináns 138 bp-os csúcs DNS és RNS alapon is 60-70 %-os arányt képviselt, addig az október 13. és 20-ai mintákban jelentősen csökkent az aktivitása (25-30 %). Mindeközben ugyanezen mintákban RNS alapon a 70 és a 71 bázis hosszú TRF-ek mérete jelentősen, míg másoké (pl. 206, 233 bp-os csúcs) kisebb mértékben nőtt. Az utolsó októberi mintában (M2 10.26.) aztán ismét növekedett a 138 bp-os TRF aránya.

A kétlépcsős üzemmenetnél az első lépcső mintáján (M2 11.24.) radikális változásokat figyelhettünk meg. Az addig domináns 138 bp-os TRF szinte eltűnt (3 %-os arány), míg a 70 bp-os csúcsához tartozó csoport a közösség domináns tagjává vált.



35. ábra. RNS alapon *AluI* enzimmel készített TRFLP ujjlenyomatok csúcsainak görbealatti területének aránya.

Jelentősen nőtt továbbá a 233 bp-os csúcs mérete, valamint itt is megjelentek olyan TRF-ek (pl. 152, 516, 519), amelyek a korábbi mintákban nem voltak kimutathatóak. A második lépcsőt képviselő M5 11.24. mintában viszont ismét a 138 bp-os csúcs lett a domináns.

Mindez azt mutatja, hogy számos csoport relatív abundanciája és aktivitása nincs egymással összhangban, továbbá, hogy az RNS alapú ujjlenyomatok jóval nagyobb mértékben változtak mintavételről mintavételre, mint a DNS alapúak.

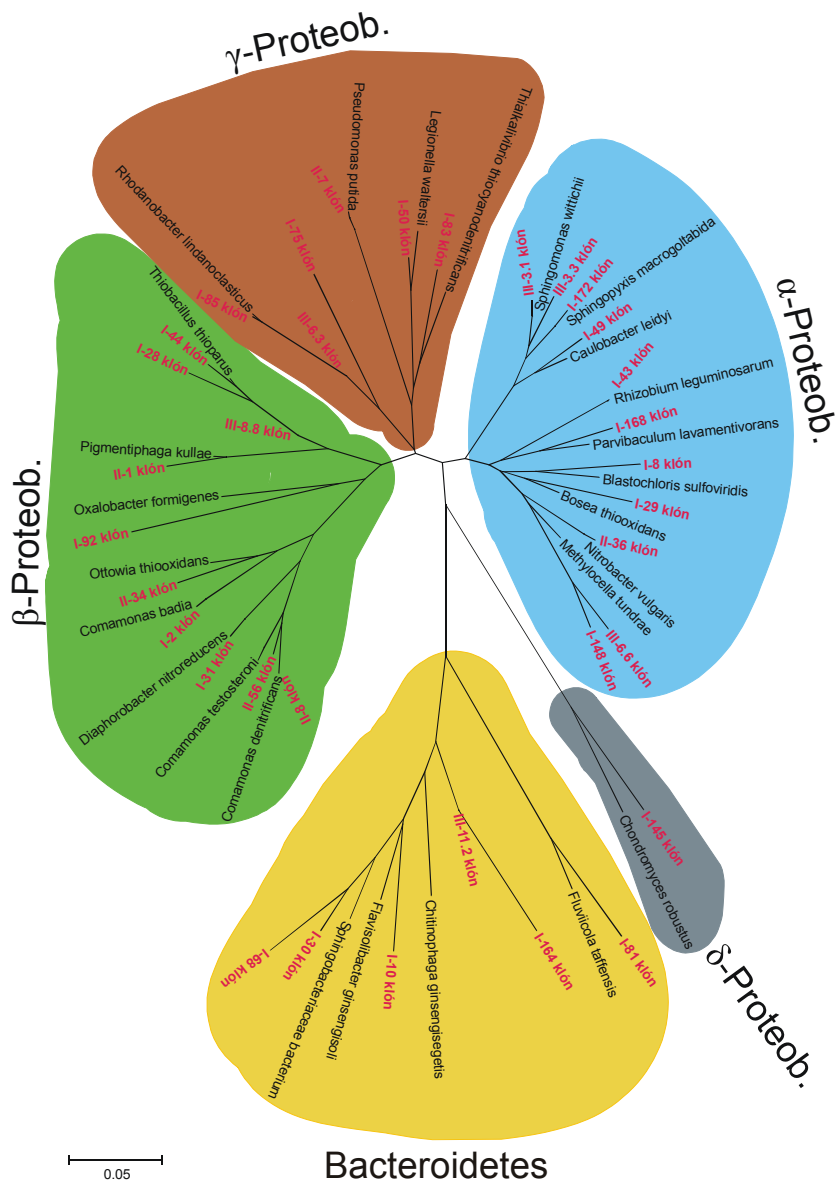
V.2.3. Klónozás eredményei

A TRFLP ujjlenyomat alapján négy mintát választottunk ki klónkönyvtár készítés céljából. Izolált DNS-ből amplifikált PCR termékek közül a szeptember 20-ai (I. klónkönyvtár) és a november 24-ei (II. klónkönyvtár) mintákat választottuk, mivel ezek voltak a legkülönbözőbbek (34. ábra). Utóbbi mintavételi időpontról az izolált RNS-ből felszaporított RT-PCR terméket is klónoztuk (IV. klónkönyvtár). A másik kiválasztott, RNS-ből készített minta azonban az október 26-ai (III. klónkönyvtár) volt, mivel ennél az ujjlenyomathoz számos, más mintákban csak nagyon kis arányt képviselő csúcs nagyobb arányban szerepelt (35. ábra).

A négy klónkönyvtár összesen több mint 500 tagból állt, amelyek közül 300 klónt vizsgáltunk meg a IV.2.3.3 pontban leírt módon. A TRFLP mintázat alapján történő analízis azon túl, hogy lehetővé tette a hiányzó csúcsokra való célzott „vadászatot”, kimutatta a pszeudo-TRF-eket is. Így kiderült, hogy a 272 bp-os TRF a legtöbb mintában domináns 138 bázis hosszú csúcshoz tartozó pszeudo-TRF. A későbbi szekvencia-analízis igazolta, hogy az Egert és Friedrich (2003) által leírt, első hasító helyet részben kihagyó endonukleázok révén jöhetett létre. Az izolált RNS-ből készült mintákban több pszeudo-TRF-t találtunk, amit a reverz transzkripció okozhatott, ahogy ezt más szerzők (Sanchez és mtsi, 2006) is tapasztalták.

Szekvencia-analízisre 56 klónt választottunk ki. A szekvenciák AluI és MspI enzimmel adott TRF-jei, valamint legközelebbi rokonaiak jellemzői a 15-17. táblázatban találhatóak meg, míg a legfontosabb csoportok rokonsági viszonyai a 36. ábrán található 16S rRNS gén szekvencia alapján készített törzsfán láthatók.

A klónjaink a szennyvíztisztítókból leggyakrabban kimutatott csoportokba, a *Proteobacteria* és a *Bacteroidetes* törzsekbe tartoztak. Előbbi csoportból szintén más szennyvízes munkákhoz hasonlóan a β , majd a γ ágba tartozó szekvenciák voltak a leggyakoribbak (Wagner és Loy, 2002). A legközelebbi rokon szekvenciákat a rendszertani csoportok szerint tekintjük át, zárójelben a megfelelő klónok kódját (klónkönyvtár száma – klón száma) tüntettük fel. A különböző filotípusok nemzetségbe, ill. filospécieszbe sorolásánál a II.3.1.2. pontban leírtakat követtük: 93 % felett egy nemzetségbe, 97 % felett egy fajba tartozónak tekintettük.



36. ábra. Reprezentatív klónszekvenciák és legközelebbi rokonaiak parciális 16S rRNS génszekvenciája alapján készített törzsfá.

15. Táblázat. Az *α-Proteobacteria* szubdivízióba tartozó szekvenciáink *Alul* és *MspI* TRF-jeinek hossza, ill. legközelebbi rokonainak jellemzői.

| Klon | TRF [bp] | | Név ^a | Hasonlóságság ^b [%] | Legközelebbi rokonok tulajdonságai | | |
|----------------|-------------|-------------|--|--------------------------------|--|----------------------|---|
| | <i>Alul</i> | <i>MspI</i> | | | azonosító kód | származási hely | hivatkozás |
| II-36 | 210 | 152 | <i>Bacterium</i> Ellin435 <i>Nitrobacter vulgaris</i> DSM 10236T | 100 | talaj | AF432257 AM114522 | Janssen és mtsi, 2002 Vanparys és mtsi, 2007 |
| III-3.1 | 208 | 404 | <i>Sphingomonas wittichii</i> RW1 | 99 | | CP000699 | |
| III-3.3 | 144 | 405 | t.k.k. FFCH10497 <i>Sphingomonas wittichii</i> RW1 | 97 95 | | EU133320 CP000699 | |
| I-49 | 208 | 150 | <i>Sphingomonas</i> sp. MN 122.2a <i>Caulobacter leidyi</i> ATCC 15260T | 96 95 | hexán degradáló biofilter | AJ313019 AJ227812 | Abraham és mtsi, 1999 |
| I-172 | 208 | 404 | <i>Sphingopyxis macrogoltabida</i> IFO 15867 | 99 | | AB372255 | |
| I-43 | 141 | 128 | <i>Rhizobium leguminosarum</i> CCNWXJ0114 | 100 | | EU329024 | |
| III-1.3 | 141 | 128 | <i>bacterium</i> LJ27 <i>Mesorhizobium huakuii</i> IAM 14158 | 98 98 | ápa rizosféra | AJ605229 D12797 | Yanagi és Yamasato, 1993 |
| III-8.3 | 140 | 128 | <i>Mesorhizobium</i> sp. GN25 <i>Mesorhizobium plurifarium</i> LMG 11892T | 99 99 | | DQ862066 Y14158 | de Lajudie és mtsi, 1998 |
| I-8 | 210 | 441 | t.k.k. DOK_NOFERT_392 <i>Blastochloris sulfovivida</i> DSM 729T | 99 92 | trópusi fa rizóbioma mezőgazdasági talaj | DO829340 D86514 | Hartmann és Widmer, 2006 Hiraishi, 1997 |
| I-29 | 61 | 173 | t.k.k. CL18 <i>Bosea thiooxidans</i> TJ1 | 96 93 | PCE szennyezett terület denitrifikáló és fenoldegradáló faj | AF529343 AF508112 | Baek és mtsi, 2003 |
| III-6.6 | 141 | 148 | t.k.k. 2N6-71 <i>Meganema periferodes</i> DSM 15528T | 97 91 | rizosféra talaj eleveniszap | EU160100 AF180468 | Thomsen és mtsi, 2006 Okabe és mtsi, 2007 |
| I-168 | 210 | | t.k.k. SC-144. <i>Parvibaculum lavamentivorans</i> DS-1T | 99 95 | szennyvíztisztító korrodáló betonja | AB255109 AY387398 | Schleheck és mtsi, 2004 |
| I-148 | 206 | 148 | t.k.k. 3-40 <i>Methylocella tundrae</i> T4 | 96 91 | rothadó erdő talaj <i>Sphagnum</i> tőzegmohatalaj, tundra | EU637686 AJ555244 | Dedysh és mtsi, 2006 |

^a t.k.k. = tenyésztetlen környezeti klon.

^b Klonjaink és a jelzett rokon szekvenciák százalékos szekvencia hasonlósága.

16. Táblázat. A β -*Proteobacteria* szubdivízióba tartozó szekvenciáink *AluI* és *MspI* TRF-jeinek hossza, ill. legközelebbi rokonainak jellemzői.

| Klón | TRF [bp] | | Hasonlóságb [%] | Legközelebbi rokonok tulajdonságai | | Azonosító kód | Hivatkozás |
|---------|-------------|-------------|-----------------|--|--|---------------|-------------------------|
| | <i>AluI</i> | <i>MspI</i> | | Név ^a | Származási hely | | |
| I-2 | 138 | 123 | 99 | <i>Comamonas badia</i> IAM 14839 | flokkulumképző b. eleveviszappból | AB164432 | Tago és Yokota, 2004 |
| I-4 | 276 | 149 | 96 | <i>Comamonas badia</i> IAM 14839 | flokkulumképző b. eleveviszappból | AB164432 | Tago és Yokota, 2004 |
| III-6.2 | 275 | 139 | 96 | <i>Ottowia</i> sp. RB3-7 | eleveviszapp | EU518930 | |
| II-34 | 275 | 139 | 95 | <i>Comamonas badia</i> IAM 14839 | flokkulumképző b. eleveviszappból | AB164432 | Tago és Yokota, 2004 |
| II-32 | 152 | 457 | 92 | <i>Ottowia</i> sp. RB3-7 | eleveviszapp | EU518930 | Spring és mtsi, 2004 |
| | | | 92 | <i>Ottowia thiooxidans</i> K11T | érfelszerelést tisztító szoba | AJ537466 | Moissi és mtsi, 2007 |
| | | | 96 | t.k.k. KSC3-52 | úrfelszerelést összeszerelő tisztító szoba | DQ532306 | |
| | | | 95 | <i>Comamonas testosteroni</i> Tack2 | | AM937260 | |
| II-56 | 152 | 457 | 100 | <i>Comamonas</i> sp. PD3 | fenol-degradáló baktérium | EF373535 | |
| | | | 100 | <i>Comamonas testosteroni</i> Tack2 | | AM937260 | |
| II-8 | 278 | 492 | 96 | t.k.k. G92 | szennyvíztisztító elfolyó vize | DQ531988 | |
| II-59 | 253 | 490 | 95 | <i>Comamonas denitrificans</i> 123 | eleveviszapp | AF233877 | Gumaelius és mtsi, 2001 |
| | | | 97 | <i>Comamonas</i> sp. R-25060 | denitrifikáló áúsító kom. eleveviszappból | AM084020 | Heylen és mtsi, 2006 |
| | | | 96 | <i>Comamonas denitrificans</i> 123 | eleveviszapp | AF233877 | Gumaelius és mtsi, 2001 |
| I-31 | 148 | 488 | 99 | <i>Diaphorobacter nitroreducens</i> KSP3 | eleveviszapp | AB076855 | Khan és mtsi, 2002 |
| I-13 | 74 | 432 | 97 | t.k.k. FW104-105 | biostimulált urán(VI) szennyezett talaj | EF693492 | |
| I-28 | 72 | 448 | 96 | <i>Thiobacillus denitrificans</i> ME16 | | EU546130 | |
| | | | 93 | t.k.k. SS-96 | denitrifikáló, kinon bontó eleveviszapp | AY945900 | Liu és mtsi, 2006 |
| I-44 | 72 | 432 | 97 | <i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259 | denitrifikáló, kinon bontó eleveviszapp | CP000116.1 | Beller és mtsi, 2006 |
| | | | 96 | <i>Thiobacillus denitrificans</i> ME16 | | EU546130 | Liu és mtsi, 2006 |
| I-80 | 234 | | 98 | t.k.k. D08 | mangrove talaj | AM902716 | Luo és mtsi, 2008 |
| | | | 97 | <i>Bordetella petrii</i> DSM 12804 | zebrahal | DQ811841 | |
| I-92 | 157 | 494 | 93 | t.k.k. mdt15b01 | | U49757 | Rawls és mtsi, 2004 |
| | | | 87 | <i>Oxalobacter formigenes</i> ATCC 35274T | | AF494542 | |
| II-1 | 234 | 446 | 97 | <i>Alcaligenes</i> sp. H | denitrifikáló reaktor | AJ412685 | |
| | | | 96 | <i>Pigmentiphaga kullae</i> DSM 13608T | | AF282916 | Blumel és mtsi, 2001 |

^a t.k.k. = tenyésztetlen környezeti klón.

^b klónjaink és a jelzett rokon szekvenciáink százalékos szekvencia hasonlósága.

17. Táblázat. γ - és δ -*Proteobacteria* szubdivízióba, valamint *Bacteroidetes* divízióba tartozó szekvenciáink *Alul* és *MspI* TRF-jetek hossza, ill. legközelebbi rokonainak jellemzői.

| Klón | TRF [bp] | | Név ^a | Legközelebbi rokonok tulajdonságai | | Azonosító kód | Hivatkozás |
|-----------------|-------------|---------------------------------------|--|------------------------------------|--------------------------------------|---------------|--------------------------|
| | <i>Alul</i> | <i>MspI</i> | | Hasonlóság ^b [%] | Divízió ^c Származási hely | | |
| II-7 | 234 | 488 | <i>Pseudomonas putida</i> GB-1 | 99 | <i>γ-Pb.</i> | CP000926 | |
| II-60 | 70 | 490 | <i>Pseudomonas putida</i> GB-1 | 99 | <i>γ-Pb.</i> | CP000926 | |
| IV-4.7 | 70 | 491 | <i>Pseudomonas plecoglossicida</i> P18 | 97 | <i>γ-Pb.</i> | AY972174 | De Gelder és mtsi, 2005 |
| | | | <i>Pseudomonas putida</i> GB-1 | 97 | | CP000926 | |
| I-26 | 74 | 156 | t.k.k. LTUG01856 | 99 | <i>γ-Pb.</i> | AY144243 | Kaplan és Kitts, 2004 |
| | | | <i>Rhodanobacter lindaniasticus</i> LMG 18385T | 99 | | AF039167 | Nalin és mtsi, 1999 |
| I-112 | 74 | 156 | <i>Rhodanobacter</i> sp. BPC1 | 97 | <i>γ-Pb.</i> | RHKRGD | Kanally és mtsi, 2002 |
| I-166 | 240 | 156 | <i>Rhodanobacter lindaniasticus</i> | 96 | | EF061531 | Thomas és mtsi, 1996 |
| | | | <i>Rhodanobacter lindaniasticus</i> czh-131 | 98 | <i>γ-Pb.</i> | DQ370020 | |
| III-6.3 | 68 | 149 | <i>Rhodanobacter lindaniasticus</i> LMG 18385T | 96 | <i>γ-Pb.</i> | AF039167 | Nalin és mtsi, 1999 |
| | | | t.k.k. MSB-4C11 | 92 | <i>γ-Pb.</i> | AY360060 | |
| I-50 | 71 | 282 | <i>Thiokaibivrio thiocyanodenitrificans</i> ARhD | 90 | | AF494542 | Sorokin és mtsi, 2004 |
| | | | t.k.k. EV818EB5CPSA.JJ36 | 95 | <i>γ-Pb.</i> | DQ337039 | |
| I-145 | 198 | 77 | <i>Legionella waltersii</i> 2074-AUS-E | 95 | | AF122886 | Lo Presti és mtsi, 2001 |
| | | | t.k.k. D1 | 97 | δ - <i>Pb.</i> | AY268299 | Keiley és mtsi, 2004 |
| I-68 | 204 | 91 | <i>Chondromyces robustus</i> Cm a13T | 88 | | AJ233942 | Sproer és mtsi, 1999 |
| | | | t.k.k. e08=d10 | 95 | <i>Bact.</i> | AB241560 | |
| I-164 | 283 | 93 | <i>Sphingobacteriaceae</i> sp. BR5-29 | 89 | | EU370957 | |
| | | | t.k.k. 82_L_Rhizo_L1_T7s | 92 | <i>Bact.</i> | EF606140 | Kielak és mtsi, 2008 |
| III-11.2 | 283 | 93 | <i>Flavisolibacter ginsengisoli</i> Gsoil 643T | 86 | | AB267477 | Yoon és Im, 2007 |
| | | | t.k.k. GASP-KB1W3_D01 | 97 | <i>Bact.</i> | EU297943 | |
| I-10 | 91 | | <i>Chitinophaga ginsengisegetis</i> M1-09T | 92 | | AB264798 | Lee és mtsi, 2007 |
| | | | t.k.k. AS85 | 93 | <i>Bact.</i> | EU283376 | |
| I-113 | 71 | 142 | <i>Flavisolibacter ginsengisoli</i> Gsoil 643T | 91 | | AB267477 | Yoon és Im, 2007 |
| | | | t.k.k. R1-C16 | 100 | <i>Bact.</i> | AF493694 | |
| I-30 | 204 | 91 | <i>Fluvicola taiffensis</i> RW262 | 95 | | AY943329 | O'Sullivan és mtsi, 2005 |
| | | | t.k.k. W1035 | 94 | <i>Bact.</i> | AM259167 | |
| | | <i>Sphingobacteriaceae</i> sp. BR5-29 | 92 | | EU370957 | | |

^a t.k.k. = tényésztetlen környezeti klón.

^b Klónjaink és a jelzett rokon szekvenciák százalékos székvenca hasonlósága.

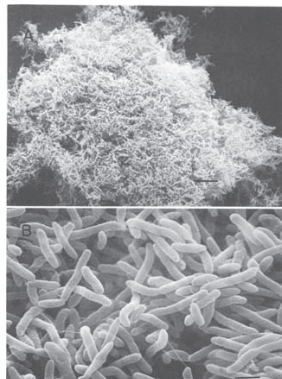
^c *Pb.* = *Proteobacteria*; *Bact.* = *Bacteroidetes*

V.2.3.1. β -Proteobacteria

V.2.3.1.1. *Comamonadaceae* család

A β -Proteobacteria klónszekvenciák többsége a *Comamonadaceae* családba tartozott, azon belül is a legtöbb a *Comamonas badia* és *Ottowia thiooxidans*, míg kisebb részük a *C. testosteroni*, *C. denitrificans* és *Diaphorobacter nitroreducens* fajokkal jellemezhető ágba (36. ábra; 16. táblázat).

Comamonas badia (I-2 és II-4): Klónjaink többsége ebbe a fajba tartozónak tekinthető, mivel 99 %-os szekvenciaazonosságot mutattak vele. A fajt elsőként is egy fenol adaptált eleveniszapból izolálták (Tago és mtsi, 1975). Pálcika alakú, szigorúan aerob, mozgásképeséggel bíró, egy poláris helyzetű flagellummal rendelkező baktérium. Metabolizmusát tekintve képes a fenolt, mint egyedüli szénforrást hasznosítani. Lassan szaporodó baktérium, hőmérsékleti optimumán (27–30°C között) 12 óra alatt duplázódik, míg 20°C-on csak 19 óra alatt. A többi *Comamonas* fajjal ellentétben 37°C-on nem tenyészthető. A többi *Comamonas* fajtól elsődlegesen intenzív flokkulumképző tulajdonsága különbözteti meg (Tago és Yokota, 2004). Táplevesben látható flokkulumokat képez, amelyekben elsősorban mukopoliszacharidok tartják össze a sejteket (36. ábra; Tago és Aida, 1977).



37. ábra. *C. badia* tenyészet táplevesben, SEM kép Tago és Aida (1977) nyomán.

Ottowia thiooxydans (II-34 és II-6.2): Klónjaink csak a nemzetségbe tartozáshoz elégséges hasonlóságot mutatnak ezzel az elsőként kommunális szennyvíztisztító eleveniszapos medencéjéből leírt fajjal. Sejtjei egyenes vagy enyhén hajlított pálcika alakúak, mozgásképeséggel nem bírnak. Aerob kemolitoheterotróf módon képesek tioszulfátot hasznosítani, amely oxidációjának végterméke a szulfát. Fakultatív anaerobok, részleges denitrifikációra képesek, nitritet és nitrátot dinitrogén-oxidig (N_2O) képesek redukálni. Intracellulárisan polihidroxi-alkanoátokat (PHA) raktároznak (Spring és mtsi, 2004). A PHA vegyületeket, leggyakrabban polihidroxi-butirátot (PHB) egyes baktériumok szénben gazdag, tápanyagban (nitrogén és/vagy foszfor) szegény közegben képzik tartalék gyanánt. Ez egy poliészter jellegű polimer, amely biodegradálható műanyagként is hasznosítható (Anderson és Dawes, 1990).

Comamonas testosteroni (II-32 és II-56): Korábban *Pseudomonas* néven, szteroid vegyületek bontása alapján leírt, flokkulumot nem képző faj (Tamaoka és mtsi, 1987), amely ritka humán patogénként is ismert (Gul és mtsi, 2007). Metabolizmusát tekintve számos nehezen degradálható vegyület hasznosítójaként leírták úgy, mint például szintetikus cserzőanyagok (Song és Burns, 2005), nitrobenzol vagy mono-nitrofenol (Zhao és Ward, 1999) bontóként. Fenolon kizárólagos szénforrásként nem képes nőni, viszont rendelkezik katekol 2,3-dioxigénázzal (C230), és képes azt a *meta*-útvonalon keresztül (II.6.1.1. pont) hasznosítani (Arai és mtsi, 1998). Szintén képes PHA szintézisre (Ciesielski és mtsi, 2006).

Comamonas denitrificans (II-8 és II-59): Eleveniszapból leírt, denitrifikáló, PHA-t raktározó szerkezet (Gumaelius és mtsi, 2001), amely biofilm képzésre is képes (Andersson és mtsi, 2008). Flokkulációs képességei nem ismertek.

V.2.3.1.2. Thiobacillus nemzetség (I-13, I-28 és I-44)

A második leggyakoribb klóncsoport a β -*Proteobacteria* klónszekvenciák között a *Hydrogenophilaceae* családba tartozó *Thiobacillus* nemzetség tagjai voltak (16. táblázat).

A *Thiobacillus* nemzetség a legtöbbet tanulmányozott autotróf kénoxidáló csoport. Az ide tartozó törzsek a legkülönbözőbb redukált kénformák (H_2S , S_0 , $S_2O_3^{2-}$) oxidációjára képesek. A kénhidrogént például szulfátig oxidálják kiterjedt citokrom c rendszerük segítségével, ami nem csak az ATP szintézishez szükséges protonmozgató erőt hozza létre, hanem jelentősen savanyítja is a közeget (Beller és mtsi, 2006).

Klónjainkhoz legközelebb a *Thiobacillus denitrificans* és a *Thiobacillus thioparus* fajok állnak, bár a fajszintű besoroláshoz nem elégséges a szekvencia-azonosságuk (92-96 %).

Thiobacillus denitrificans: Ennek az elsőként több mint száz éve (Beijerinck, 1904) izolált, a klónjainkhoz legközelebbi fajnak jellemzője, hogy anoxikus körülmények között képes oxigén helyett nitrátot használni a redukált kénformák oxidációjához. A nitrátot egészen elemi nitrogénig redukálja. Politionátokat, tiosulfátot, szulfidot, és egyes törzsei rodanidot is képesek oxidálni aerob és denitrifikáló viszonyok között (Beller és mtsi, 2006).

Thiobacillus thioparus: Obligát kemolitotróf, autotróf baktérium, amely képes a rodanidot egyedüli szén és energia forrásként hasznosítani (Stratford és mtsi, 1994). Így rodanid bontó dúsítók segítségével édesvízű tóból (Yamasaki és mtsi, 2002) és kokszolóművi szennyvízhez nagyon hasonló összetételű szénelgázosítás során keletkező szennyvizet kezelő eleveniszapból (Katayama és mtsi, 1992) is sikerült törzseit tenyészteni. A rodanidbontást egyes törzsei a „cianát” (Youatt, 1954), mások a „karbonil-szulfid útvonalon” keresztül végzik (II.6.1.2. pont).

E vegyület biodegradációjának biokémiáját is elsősorban ennél a baktériumnál vizsgálták, így a tiocianát-hidroláz nevű enzimet is belőle izolálták elsőként (Katayama és mtsi, 1992).

A rodanidbontás során képződő ammónia és kénhidrogén (II.6.1.2. pont) magyarázza az ISD-K eleveniszapos medencéiben tapasztalt ammónium koncentráció-növekedést (VIII.2.5. pont), ill. a kénhidrogén oxidációval járó savanyodás a biológiai tisztítás során tapasztalt pH esést (VIII.2.9. pont).

V.2.3.1.3. Egyéb β -Proteobacteria csoportok

Egy-egy klón által képviselve egyéb β -Proteobacteria fajokkal rokon szekvenciák is előkerültek klónkönyvtárainkból (16. táblázat). Itt csak azokat részletezzük, amelyek legalább az azonos nemzetségbe tartozáshoz elégséges hasonlóságot mutatták szekvenciáinkkal.

Bordetella petrii (I-80): Anaerob bioreaktorból izolált, nitrát légzésre és szelén redukcióra képes baktérium, amely aerob módon is képes növekedni (von Wintzingerode és mtsi, 2001).

Pigmentiphaga kullae (II-1-): *Alcaligenaceae* családba tartozó talajból izolált azo festékek aerob degradációjára képes faj (Blumel és mtsi, 2001).

V.2.3.2. γ -Proteobacteria

V.2.3.2.1. Pseudomonas nemzetség

Legtöbb γ -Proteobacteria szubdivízióba tartozó klónunk ebbe a könnyen tenyészthető, igen jól ismert, mozgásképességgel bíró pálcika alakú fajokat tartalmazó nemzetségbe tartozott (17. táblázat). Tagjai nagyon sokféle kis molekulású szervesanyagot, így sok xenobiotikumot, köztük fenolt is hasznosítanak. Számos fajuk nitrát légzésre is képes (Madigan és mtsi, 2003).

Pseudomonas putida (II-7 és II-60): A nemzetség legjobban ismert fenolbontó faja, amely ezt a vegyületet *meta*-útvonalon keresztül (II.6.1.1. pont) bontja, és akár 1000 mg/L-es koncentrációban is képes tolerálni (Regenhardt és mtsi, 2002). Fenol mellett a kokszolóművi szennyvízben szintén előforduló kreozolt is képes metabolizálni (Gallego és mtsi, 2008).

Biofilmképző tulajdonsága révén a biofilm képződés és szerkezet kutatás egyik „áttörési pontja” (Klausen és mtsi, 2006). Mono-klorofenolon tenyésztve flokkulumokat is képez, 500 mg/L-es fenol koncentráció esetén viszont nem flokkulál (Fakhrudin és Quilty, 2007).

Pseudomonas plecoglossicida (IV-4.7): Előbbi faj közeli rokona ez az elsőként halpatogénként leírt szerkezet (Nishimori és mtsi, 2000). Szintén képes fenolbontásra (Zouari és mtsi, 2002).

V.2.3.2.2. *Rhodanobacter lindaniclasticus* (I-26, I-112, I-166 és III-6.3)

Több klónszekvenciánk is ebbe a fajba tartozó, vagy nagyon közeli rokon (96 %-os hasonlóság) filotípust képvisel (17. táblázat). Ahogy a nevéből sejtethető, ezt a fajt először lindán (hexaklór-ciklohexán) bontó képessége alapján írták le (Nalin és mtsi, 1999; Thomas és mtsi, 1996). Törzseit azóta benzo(a)-pirén mineralizációs képességük révén is izolálták (Kanaly és mtsi, 2002). Rokon szekvenciáit kőolaj szennyezett talajokból (Kaplan és Kitts, 2004), rodanidbontó dúsítókból (Yamasaki és mtsi, 2002) is kimutatták.

V.2.3.2.3. *Egyéb γ -Proteobacteria csoportok*

Thialkalivibrio thiocyanodenitrificans (I-83): Bár az azonos nemzetségbe tartozáshoz szükséges hasonlóságot nem érte el a rokon klónszekvenciánkkal (17. táblázat), mégis anyagcseréje miatt említést érdemel ez az anaerob növekedésre is képes haloalkalofil denitrifikáló és kén-oxidáló baktériumfaj. Rodanidot és tioszulfátot aerob és anaerob módon is képes elektron donorként használni. A rodanidot a „cianát útvonalon” keresztül oxidálja (Sorokin és mtsi, 2004).

V.2.3.3. α -Proteobacteria

Bár nem a leggyakoribb, de mindenképp a legváltozatosabb az α -Proteobacteria közé tartozó klónszekvenciáink voltak (36. ábra). Ezek közül a *Nitrobacter* nemzetség, a *Sphingomonadaceae* és a *Rhizobiaceae* család tagjai voltak a legnagyobb számban (15. táblázat).

V.2.3.3.1. *Nitrobacter* nemzetség (II-36)

Autotróf nitrít oxidációra képes nemzetség, amely a többi NOB-hoz képest gyorsan szaporodik, de kicsi nitrít- és oxigén-affinitású (r-stratégista). Részletesebb jellemzését a II.6.3.3.2. pontban olvashatjuk.

V.2.3.3.2. *Sphingomonadaceae* család (I-49, I-172, III-3.1. és III-3.3)

A család számos elsősorban a *Sphingomonas* nemzetségbe tartozó tagja képes különböző xenobiotikumok bontására úgy, mint dioxinok (Yabuuchi és mtsi, 2001), alkil-fenolok (Gabriel és mtsi, 2005) és fenol *meta*-útvonalon keresztüli (Suenaga és mtsi, 2007) degradációjára. Lopez-Vazquez és mtsi (2008) *Sphingomonas* izolátumokat potenciális glikogén raktározó szerzettként (GAO) írtak, míg a *Sphingomonas paucimobilis* faj flokkulumképzésre, (Soda és mtsi, 1999), a *Sphingopyxis macrogoltabida* törzsek pedig PHB raktározásra képesek (Silva és mtsi, 2007).

V.2.3.3.3. *Rhizobiaceae* család (I-43, III-1.3 és III-8.3)

Ennek a nitrogénkötő gyökérgumót képző fajairól ismert családnak az előfordulása szennyvíztisztítókból nem példa nélküli, de szerepükről keveset tudunk. Több törzséről (*Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae*, *R. leguminosarum* *bv. phaseoli*, *R. leguminosarum* *bv. trifolii*) is leírták a PHB raktározás képességét kommunális és ipari eleveniszapban (Ben Rebah és mtsi, 2008). Míg *Mesorhizobium* *sp.* izolátumokról a nitril vegyületek degradációjának képességét jegyezték fel (Feng és mtsi, 2008).

V.2.3.3.4. *Egyéb α -Proteobacteria* csoportok

Bosea thiooxidans (I-29): Fenolbontásra és nitrát redukcióna képes faj (Baek és mtsi, 2003), amelyet szennyvíztisztítók beton műtárgyainak korrodálódásával kapcsolatban is kimutattak (Okabe és mtsi, 2007).

Meganema perideroedes (III-6.6): Ipari szennyvíztisztító eleveniszapjának káros iszapduzzadási folyamataival (II.5.1.2.2. pont) kapcsolatba hozott faj (Thomsen és mtsi, 2006).

V.2.3.4. δ -Proteobacteria

Ebbe a csoportba mindössze egy klónszekvenciánk tartozott, amelynek sajnos csak nagyon távoli tenyésztett rokonai léteznek (17. táblázat), így szerepéről semmit sem tudhatunk. Hozzá legközelebbi rokon környezeti szekvencia, abból a zuhanyzó függönyökön képződő biofilmeket vizsgáló munkából (Kelley és mtsi, 2004) származik, amelyet a II.3.1.2. pontban is megemlítettünk.

V.2.3.5. Bacteroidetes

Ebbe a csoportba tartozó klónszekvenciáink többségének a legközelebbi rokonaikhoz viszonyított hasonlósága nem éri el az egy nemzetségbe soroláshoz szükséges 93 %-ot. Ráadásul ezeknek a fajoknak egyike sem származik szennyvíztisztítókból, hanem szekvenciáink legközelebbi tenyésztetlen rokonaiknak többségéhez hasonlóan különböző talajokból izolálták őket (17. táblázat).

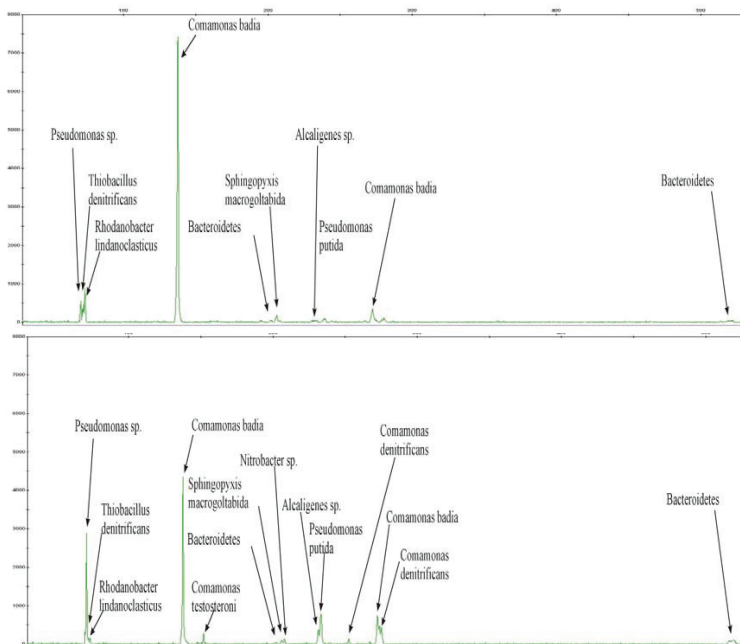
Ahogy az a II.4.1.2. pontban is olvasható, ez a csoport bár igen gyakori szennyvíztisztítókból, szerepét tekintve inkább csak találgatások léteznek. Fonalas tagjait gyakran mutatják ki kommunális és ipari szennyvíztisztítókból is, de a káros duzzadási folyamatokkal (II.5.1.2.2. pont) vagy a habképződéssel csak ritkán hozhatók kapcsolatba. A FISH-MAR vizsgálatok alapján a könnyebben bontható vegyületek (pl. cukrok) és a halott biomassza eltakarításában lehet szerepük (Kragelund és mtsi, 2008).

V.2.3.6. Klónozás eredményeinek összegzése

Összességében klónjaink legközelebbi rokonairól elmondható, hogy túlnyomó többségük szennyvíztisztító éleleniszapos medencéiből származó aerob vagy fakultatív anaerob szervezet, amelyek közül számos képes fenol és/vagy egyéb aromás vegyületek bontására, nitrát légzésre és/vagy PHA raktározásra. Egy részük flokkulum képző, míg mások rodanid és/vagy egyéb kénvegyületek oxidációjával hozhatók kapcsolatba.

V.2.4. TRFLP csúcsok azonosítása

A klónok egyedi TRFLP mintázata és pontos szekvenciáik birtokában lehetőségünk nyílt a közösségi TRFLP ujjlenyomatok csúcsainak azonosítására (38. ábra). Így a görbealatti területek alapján megállapítottuk az egyes TRF-ekhez tartozó filotípusok arányát is. Hogy elkerüljük az egymáshoz túl közeli csúcsok (pl. 70, 71 és 72 bp hosszú TRF-ek) nem mindig tökéletes szétválasztásából adódó problémákat, az arányszámításnál, mind az *AhlI*, mind az *MspI* enzim segítségével készített ujjlenyomatokat figyelembe vettük.



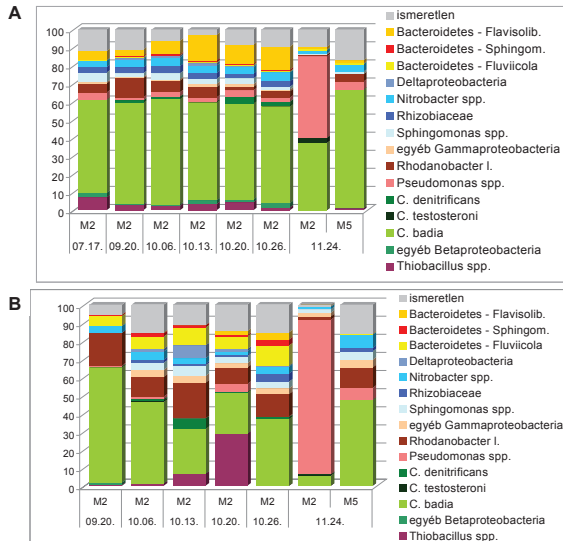
38. ábra. M2 09.20. és M2 11.24. minta DNS alapon *AhlI* enzimmel készített TRFLP ujjlenyomata és annak azonosított csúcsai.

A csúcok identifikációja eredményesnek mondható, hiszen az általuk képviselt filotípusok átlagosan 90 %-át sikerült azonosítani (39. ábra).

A β -*Proteobacteria* szubdivízió tagjai a klónozáshoz hasonlóan, a valóságos viszonyokat jobban tükröző szemikvantitatív TRFLP módszerrel (II.3.2.3.2.A/2. pont) is a közösségek domináns tagjának bizonyultak 60 % feletti aránnyal. Egyedül az M2 11.24. mintában képviseltek csak 40 %-ot (39A. ábrán). Aktivitás szempontjából (RNS) azonban csak az M2 09.20. mintában voltak ennyire jelentősek, a többi mintában 40-50 % körüli, míg az M2 11.24. mintának csak 6 %-át tették ki (39B. ábra).

A β -*Proteobacteria* csoport után az M2 11.24. mintát kivéve, nagyjából azonos aránnyal az α -*Proteobacteria* (11 %), a *Bacteroidetes* (10 %) és a γ -*Proteobacteria* (9 %) csoport tagjai következtek (39A. ábrán). A riboszómák számát tekintve (RNS) előbbi két csoport hasonló arányt képviselt, mint DNS alapon, míg γ -*Proteobacteria* szubdivízió riboszómái a közösség 18 %-át tették ki (39B. ábra).

Az M2 11.24. mintában DNS alapon a γ -*Proteobacteria* baktériumok aránya 46 %-os volt, míg a másik két csoport csak 2 % körüli arányt képviselt (39A. ábrán). Aktivitás szempontjából az M2 11.24. mintában a γ -*Proteobacteria* szubdivízió 89 %-os arányt képviselt, míg a másik két csoport kimutathatatlannal (*Bacteroidetes*), ill. 3 %-ot (α -*Proteobacteria*) tett ki (39B. ábra).

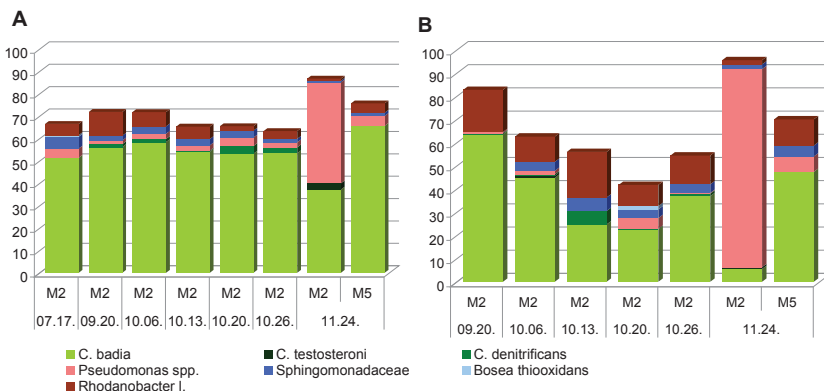


39. ábra. A baktérium közösség azonosított tagjainak TRFLP csúcok görbealatti területe alapján számolt 16S rRNS gén kópiaránya (A) és riboszómáik feltételezett aránya (B).

V.2.4.1. Fenolbontáshoz kapcsolódó szervezetek

Az összes DNS és a legtöbb RNS ujjlenyomaton domináns, *AluI* enzimmel 138 bázis hosszú csúcsot adó szervezet a kiváló flokkulumképző, fenolbontó *C. badia* fajba tartozónak bizonyult (V.2.3.1.1. pont). Néhány kisebb csúcsot adó *C. badia* és az *Ottowia thioxidans* rokon törzsekkel együtt (39. és 40. ábrán *C. badia*-ként), ez a csoport kópiaszám tekintetében az M2 11.24. minta kivételével a közösség domináns filotípusa (50-65 %-os arány, 40A. ábra). Aktivitás szempontjából (RNS) is domináns volt ezekben a mintákban, bár az első mintákat kivéve dominanciájuk korántsem volt oly kifejezett (40B. ábra).

A többi *Comamonas* fajjal rokon csúcsokat adó filotípusok csak kisebb arányát (1-4 %) képviselték a közösségeknek, közülük is a flokkulumot nem képző *C. testosteroni* csak az M2 11.24. mintában volt jelen. Hasonlóan alakult a riboszómaszámbéli arányuk, bár a denitrifikációra is képes *C. denitrificans* rokon törzsek a kiugró bemenő nitrát értékekkel jellemezhető 10.13-ai mintában (V.2.1.1. pont: 31. ábra) nagyobb számban voltak jelen.



40. ábra. A közösség fenolbontással kapcsolatba hozható filotípusainak az aránya DNS (A) és RNS (B) alapú TRFLP ujjlenyomatuk alapján.

A *Comamonadaceae* család mellett a fenolbontásban a *Pseudomonas* fajokkal (V.2.3.2.1. pont) a *Sphingomonadaceae* családdal (V.2.3.3.2. pont) és a *Bosea thioxidans* fajjal (V.2.3.3.4. pont) rokon filotípusok vehettek részt. Továbbá az egyéb aromás vegyületek biodegradációjáról ismert *Rhodanobacter lindanoclasticus* filotípusok (V.2.3.2.2. pont) is szerepet játszhattak a fenol és származékainak eltávolításában, ezért ezeket is feltüntettük a 40. ábrán.

A sejtszámot is tükröző DNS alapú ujjlenyomatok alapján készített diagramon (40A. ábra) jól látható, hogy a fenolbontásban résztvevő filotípusok összességében mindvégig 60 % feletti

arányát képviselték a baktérium közösségnek. Amikor a domináns *C. badia* filotípus visszaszorul, helyét a *Pseudomonas* nemzetség (elsősorban *P. putida*) tagjai veszik át. Ez a változás a kisebb fenolbontó csoportok tekintetében is megfigyelhető, amelyeket a *C. testosteroni* vált le.

Az aktivitást tükröző RNS alapú mintázatoknál hasonló helyettesítés látható az M2 11.24. minta esetében (40B. ábra). Az októberi mintáknál (kivéve M2 10.06) azonban a fenolbontók összes aktivitása visszaesik, ami a változatlan befolyó koncentráció és fenoleltávolítási hatások ismeretében vagy egy fel nem ismert fenol degradáló csoport jelenlétét feltételezi, vagy itt egy olyan azonosított csoport vett részt a fenol bontásában, amelyről eddig nem írtak le ezt a képességet. A legvalószínűbbnek azonban az látszik, hogy ezek a nagyon effektív fenolbontó szervezetek ezzel a kisebb aránnyal is képesek voltak a fenol teljes eltávolítására.

A két fő fenolbontó filotípusunkat, a *Comamonadaceae* és a *Pseudomonadaceae* család tagjait koksizolóművi szennyvizet kezelő eleveniszapos rendszert vizsgáló, stabil izotóppal jelölt fenol segítségével készített DGGE ujjlenyomatból (SIP módszer, II.3.2.3.2.C. pont) is kimutattak (Manefield és mtsi, 2005), ami egyértelműen igazolja e csoportok szerepét a fenoldegradációban. Az említett tanulmányban ugyan nem ezt a két csoport, hanem a szintén β -*Proteobacteria* szubdivízióba tartozó *Acidovorax* nemzetség tagjait találták a domináns fenolbontó szervezeteknek. Tanulmányukban Watanabe és Hino (1996) is jelezték, hogy bár a γ -*Proteobacteria* fenolbontó izolátumok nagyobb fenolaffinitással bírnak, és nagyobb koncentrációkat képesek belőle tolerálni, mégis az eleveniszapos rendszerekben tapasztalt fenolbontási kinetika inkább a β -*Proteobacteria* szubdivízióba tartozó fenolbontókra utal.

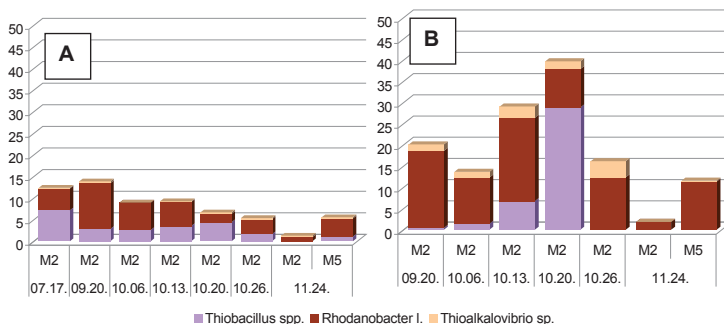
Általában tehát a koksizolóművi szennyvíz fenolbontói a kisebb fenolaffinitású és toleranciájú β -*Proteobacteria* filotípusok, esetünkben a lassú növekedésű, flokkulumképző *Comamonadaceae* család tagjai lehetnek. A nagyobb affinitású és toleranciájú γ -*Proteobacteria* fenolbontók, esetünkben a gyors növekedésű, flokkulumot nem-képző *Pseudomonas* nemzetség tagjai csak előbbi csoport visszaesése esetén juthatnak szerephez. A kezdetben domináns *C. badia* tehát inkább K-stratégistának, míg a novemberi első lépcsős mintában domináns *P. putida* r-stratégista fenolbontónak tekinthető.

V.2.4.2. Rodanidbontáshoz kapcsolódó szervezetek

A *Thiobacillus* nemzetség jellemzőit (V.2.3.1.2. pont) figyelembe véve nagy valószínűséggel állítható, hogy az általunk vizsgált levegőztetett medencék rodanideltávolító képességében döntő szerepe volt e csoportnak. Az azonosított csúcsok közül még a *Thioalkalovibrio thiocyanodenitrificans* rokon csoportról feltételezhető a rodanid degradáció (V.2.3.2.3. pont), bár ez a klónszekvencia csak kismértékű hasonlóságot (90 %) mutat az említett fajjal (17. táblázat). *Rhodanobacter sp.* rokon szekvenciákat több különböző eredetű rodanidbontó dúsítóból (V.2.3.2.2. pont) kimutattak, így bár rodanidhasznosító képességük nem bizonyított, mégis valószínűsíthetően szerepük van annak metabolizmusában, ezért szerepelnek a 41. ábrán. Amint látható a rodanidbontó baktériumok csak kisebb hányadát, átlagosan kevesebb, mint 10 %-át teszik ki a közösségnek (41A. ábra), az üzemmenet váltásig azonban teljes rodanidmentesítést végeztek (VIII.2.6. pont). A csökkent rodanidbontású időszakból származó első lépcsős mintában (M2 11.24) viszont létszámuk 1 % körülire csökkent, azt is a csak feltételezeten rodanidot bontó *Rhodanobacter lindanoclasticus* tagjai adták.

Aktivitás tekintetében, mind a három filotípus nagyobb arányt képviselt a közösségben (átlagosan 23 %-ot), mint DNS alapon (41B. ábra). Továbbá, ahogy a fenolbontóknál (40B. ábra), úgy itt is megfigyelhető a november előtti mintákban változatosabb aktivitásbéli arányuk. A két kiemelkedően magas nitrát befolyókkal bíró időpontban (V.2.1.1. pont: 31. ábra) a *Thiobacillus* nemzetség aránya megugrik, ami ezen filotípus nitrátredukáló képességével függhet össze (V.2.3.1.2. pont).

A rodanidbontás hatáskromlásával egyidejűleg RNS alapon még kifejezettebb volt a rodanidbontók arányának visszaesése, mint DNS alapon, sőt a jól ismert rodanidbontó kénoxidáló *Thiobacillus* nemzetség teljesen hiányzott ezekből az ujjlenyomatokból.



41. ábra Rodanidbontással kapcsolatos csoportok aránya DNS (A) és RNS (B) alapú TRFLP ujjlenyomatok alapján

V.2.5. Rodanidbontás határfok-romlásának lehetséges okai

Ahogy láthattuk a V.2.1. pontban a rodanidbontás visszaesése az egy lépcsőről két lépcsős üzemmenetre való átállás, és a medencék hőmérsékletének jelentős csökkenése (egy hét alatt 6°C-os csökkenés) után következett be. Továbbá együtt járt a biológiai kezelés során korábban tapasztalt pH érték csökkenésének elmaradásával, és a medencék szárazanyagtartalmának csökkenésével.

A mikrobiológiai vizsgálataink azt mutatták, hogy a rodaniddegradáció elromlásával egyidejűleg a baktérium közösség összetétele is jelentősen átrendeződött. Így a korábban domináns fenolbontó és flokkulumképző *C. badia* filotípus tagjainak abundanciája csökkent, míg a szintén fenolbontó, de flokkulumot nem képző *P. putida* rokon csoport aránya jelentősen nőtt (40A. ábra). Mindeközben a rodanidbontásért felelősnek tartott filotípusok, élükön a *Thiobacillus* nemzetség tagjaival gyakorlatilag eltűntek a medencékből (41A. ábra). Aktivitás szempontjából mindezek a változások még kifejezettebbek voltak (40B és 41B. ábra).

A rodanidbontás visszaesését tehát számos fizikai, kémiai és biológiai változás kísérte, ezek ok-okozati viszonyainak tisztázása azonban korántsem egyszerű. Ennek feltárására induljunk ki a közösség legjelentősebb tagjának, a *C. badia* filotípusnak a visszaeséséből. E csoport csökkenése bekövetkezhetett az üzemmenet váltással együtt járó hirtelen változások (pl. terhelés növekedése, tartózkodási idő változása) miatt, azonban az RNS alapú ujjlenyomatok azt mutatják (40B. ábra), hogy már korábban, az október 13-ai és 20-ai mintavételkor is csökkent az aktivitásuk. Utóbbi mintavételekkor, a novemberi időszakhoz hasonlóan alacsonyabb hőmérsékletűek voltak a medencék (VIII.2.7. pont). Tehát nagy valószínűséggel ez a hőmérsékletesésre bizonyítottan jelentős aktivitás csökkenéssel reagáló faj (V.2.3.1.1. pont), elsődlegesen a hőmérséklet változása miatt csökkentette aktivitását. A lassult anyagcseréjű *C. badia* sejtek a fenolt is lassabban bonthatták, ezért annak koncentrációja, az elfolyókban változatlanul alig mérhető értékek ellenére megnövekedhetett a medencékben. A nagyobb fenoltartalomra és a környezeti változásokra kevésbé érzékeny, r-stratégistának tekinthető *Pseudomonas* nemzetség tagjai így képesek voltak, legalábbis az üzemmenet váltás miatt eleve magasabb fenolterheléssel bíró első lépcsőben a *C. badia* helyébe lépni, és annak fenolbontó szerepét átvenni. A már alacsonyabb fenol koncentrációjú második lépcsőben viszont ismét az utóbbi filotípus volt a domináns.

A *C. badia* csoport tagjai nem vesznek részt a rodanidbontásban, fenolbontó szerepüket, a helyükbe lépő *P. putida* filotípus tagjai ellátták, viszont intenzív flokkulumképzésüket nem pótolta egy másik filotípus sem. Ez jól látszik a szárazanyagtartalom alakulásában, valamint az

eleveniszap az üzem munkatársai által jelzett rossz ülepedéséből. A flokkulumoknak, mint számtalan szervezet elsődleges élőhelyének (II.5.1. pont), döntő szerepe van a biodegradációs folyamatokban. Így a *Thiobacillus* baktériumok is nagy valószínűséggel az izsappelyhekhez kötöttek élnek, amelyek a csökkent diffúzió révén a toxikus vegyületektől (pl. fenol) is védelmet biztosítanak.

A rodanidbontás visszaesésének tehát legvalószínűbb oka a *C. badia* hőmérsékletesés következtében csökkent aktivitása, amit az üzemmenet váltással járó változások tovább fokoztak. Mindennek a következtében a flokkulumok száma és szerkezete jelentősen romlott. Ez az első lépcsőben feltételezhetően lokálisan emelkedett fenol koncentrációkkal együtt a rodanidbontásért felelős filotípusokat súlyosan érintette, ami a rodanidbontás jelentős visszaesését eredményezte.

A második lépcsőben aztán ismét a *C. badia* filotípus válhatott a domináns csoporttá, amit a második lépcsős medencék szárazanyagtartalma is jelez (VIII.2.8. pont). Az üzemmenet váltást követő szárazanyagtartalom visszaesés ellenére a második lépcsős medencéinek az első lépcsőnél kevéssel mindvégig nagyobb volt a szárazanyagtartalma, majd az általunk már nem mintázott decemberi időszakban fokozatosan növekedett. Utóbbi emelkedéssel párhuzamosan a rodanidbontás is fokozatosan helyre állt a második lépcsőben (VIII.2.9. pont), és december végére helyreállt a teljes rodanidbontás.

V.2.6. Az eleveniszapos medencék vizsgálatának az eredményeinek az összegzése

V.2.6.1. Az eleveniszapos medencék mikrobiális közösségének feltérképezése

Az ISD-K levegőztetett medencéinek bakteriális közösségének feltérképezése az alkalmazott TRFLP ujjlenyomatot és klónozást összekapcsoló eljárással mindenképp sikeresnek tekinthető, hiszen a közösség tagjainak átlagosan 90 %-át sikerült azonosítanunk.

A közösséget *Proteobacteria* és *Bacteroidetes* divízióba tartozó filotípusok alkották, amelyek közül a medencék optimális működése esetén más szennyvíztisztítókhöz hasonlóan a β -*Proteobacteria* szubdivízió tagjai bizonyultak a legnépesebbnek. Közülük a legjelentősebbnek a K-stratégistának tekinthető fenolbontó és flokkulumképző *Comamonas badia*, valamint a *Thiobacillus* nemzetségbe tartozó baktériumok bizonyultak. Utóbbi csoport egyes tagjai bizonyítottan képesek rodanidbontásra, amely folyamat során ammónia és kénhidrogén képződik. A kénhidrogént ugyanez a csoport szulfátiig oxidálja jelentős pH csökkenés mellett, ami magyarázza a medencékben tapasztalt savanyodást. Az ammónia képződése pedig a biológiai kezelés során tapasztalt ammónium koncentrációnövekedést segít értelmezni.

Az üzemegység csökkent hatásfokú működésekor azonban a γ -*Proteobacteria* szubdivízióba

tartozó *Pseudomonas putida* filotípus volt a domináns. Ez a csoport szintén képes fenolbontásra, viszont flokkulumpépzésre nem, és a *C. badia* filotípussal szemben gyors szaporodása, széles környezeti optimuma miatt tipikus r-stratégista baktériumnak tekinthető.

Az azonosított csoportok közül a különféle aromás vegyületek bontására képes filotípusok érdemelnek még említést. Ilyenek az α -*Proteobacteria* szubdivízióba tartozó *Bosea thioxidans* és *Sphingomonas spp.* rokon baktériumok vagy a γ -*Proteobacteria Rhodanobacter lindanoclasticus* rokonsági kör, amely korábbi kimutatásai alapján valószínűleg szintén szerepet játszhat a rodanidbontásban.

Azonosítottunk továbbá számos nitrát redukción, denitrifikációra képes filotípust is (*Bosea thioxidans*, *Comamonas denitrificans*, *Diaphorobacter nitroreducens*, *Thiobacillus denitrificans*, *Thiobacillus thiooxydans*), ami magyarázza a kiegészítő méréseink által tapasztalt jelentős nitrátszintcsökkenést a medencékben.

Összességben a közösség azonosított tagjai és azok legközelebbi rokonai alapján feltételezett metabolikus aktivitása jól magyarázta a biológiai kezelőegységénél tapasztalt víztisztító hatását, vagyis eredményeinknek köszönhetően a koksizálóvízi eleveiszapos medencéket többé nem kell „fekete dobozként” kezelnie az üzemeltetőknek.

V.2.6.2. A rodanidbontás határfok-romlásának oka és megoldása

Eredményeink alapján a rodanidbontás mintavételi időszakunkban tapasztalt visszaesésének feltételezhetően a legfőbb oka az évszakos változások miatt bekövetkezett drasztikus hőmérséklet csökkenés, és az azzal egyidejű üzemmenet váltással járó változások lehettek. A hőmérséklet esése elsődlegesen a *C. badia* csoport aktivitását csökkentette, ami flokkulumpépzésének visszaesése révén az iszapszerkezet romlásához vezetett. A rossz szerkezetű eleveiszapban aztán számos filotípus, így a rodanidbontó *Thiobacillus* nemzetség tagjai sem tudtak fennmaradni, ami a rodanidbontás visszaeséséhez vezetett.

Hasonló határfok romlások elkerülése végett az üzemeltetőknek a medencék temperálására javasoltuk, valamint azt, hogy amennyiben lehetséges a nagyobb üzemmenet váltásokat és karbantartási munkálatokat stabil külső paraméterekkel (hőmérséklet, terhelés) jellemezhető időszakokban végezzék.

Az ISD-K eleveiszapos medencéinek temperálására a koksizálóblokkok felesleges hőjét kihasználva, egy kisebb beruházás keretében már 2005 őszi megvalósították és a beszámolóik szerint azóta nem tapasztaltak rodanidbontás visszaesését. Munkánk tehát nem csak mikrobiális ökológiai jelenségeket tárt fel, hanem hozzájárult a stabilabb üzemeltetés megvalósulásához is.

VI. EREDMÉNYEK ÖSSZEGRÉSE

Munkánk során két különböző szennyvíztisztító mikrobiótáját vizsgáltuk. E két üzemegység a tisztítandó szennyvíz jellegében és a kezelés módjában is jelentősen eltért. Egyik egy kommunális szennyvíztisztító (Dél-pesti Szennyvíztisztító Telep) III. fokozataként üzemelő fixágyas, biofilmes nitrifikáló egység volt, melynél az ammónia-oxidáló baktériumok (AOB) vizsgálatát tűztük ki célul. Míg a másik a DUNAFERR Zrt. alvállalatának, az ISD-Kokszoló Kft-nek a kokszolóművi szennyvizét kezelő eleveniszapos rendszere volt, ahol a teljes bakteriális közösség feltérképezését és nyomon követését céloztuk meg.

VI.1.1. Az alkalmazott módszerek értékelése

A tenyésztés független mikrobiális ökológiai eljárások közül a restriktív hasításon alapuló, jól reprodukálható, szemkvantitatív TRFLP ujjlenyomat módszer mellett döntöttünk. A nitrifikáló egység esetében a közösségi DNS-ből amplifikált, csoportspecifikus *amoA* génből készítettük a TRFLP ujjlenyomatokat. A kokszolóművi eleveniszapos medencéknél viszont az univerzális 16S rRNS gén amplifikációját céloztuk meg, hiszen itt egy gyakorlatilag ismeretlen összetételű mikrobiótával álltunk szemben. Utóbbi vizsgálatnál a közösségi DNS mellett reverz transzkripcióval a sejtek aktivitását jobban tükröző közösségi 16S rRNS összetételét is vizsgáltuk, aminek a segítségével lehetővé vált a mikrobióta környezeti hatásokra adott gyorsabb változásainak a nyomon követése.

A közösségalkotók monitorozása mellett azok azonosítását is megcéloztuk. Ehhez az AOB esetében egy több mint ezer *amoA* szekvenciát és azok virtuális terminális fragmentjét tartalmazó adatbázist hoztunk létre, amellyel összehasonlítva a közösségi TRFLP ujjlenyomatokat azok domináns csúcsait az azonosítottuk. Eredményeinket a mintákból készített klónkönyvtárakból RFLP vizsgálat segítségével kiválasztott klónok szekvencia-analízisével ellenőriztük. Ez alapján kiderült, hogy egyes esetekben a közösségi ujjlenyomatokat úgy nevezett pszeudo-TRF-k torzíthatják, ill. hogy az agarózgél alapú RFLP nem kielégítő eljárás a klónok csoportosítására. Mindezek alapján javaslatot tettünk az adatbázisunk segítségével történő hatékony AOB monitorozás módjára.

Az AOB esetében tapasztaltak miatt a kokszolóművi eleveniszapos medencék baktériumainak az azonosítására a klónokat nem RFLP, hanem TRFLP módszerrel csoportosítottuk, ami a pszeudo-TRF-k felismerését, ill. a hiányzó közösségalkotók célt „vadászátát” is lehetővé tette. Így a medencék baktérium közösségének 90 %-át sikeresen azonosítottuk.

Az eleveniszapos medencéknél alkalmazott RNS alapú ujjlenyomatok időben változatosabb képet adtak a közösségről. A baktériumok kisebb környezeti változásokra adott reakcióit tudtuk ezzel a módszerrel kimutatni, míg DNS alapon csak a drasztikusabb behatások eredményeztek jelentős változást az ujjlenyomatokban. Mindez igazolta, hogy a mikrobiális közösségek kisebb hatásokra csak funkcionális profiljukat változtatják, sejtszámbéliösszetételüket nem. Így az RNS alapú eljárás alkalmazása aktivitás monitorozás céljából kifejezetten javasolt.

VI.1.2. A mikrobiális közösségek monitorozásának legfontosabb eredményei

A megfelelő módszerek birtokában és a közösségek tagjainak ismeretében megkezdjük azok monitorozást. A nitrifikáló medencék ammónia-oxidálói esetében egy viszonylag stabil közösséget mutattunk ki, amelynél csak éves szinten tapasztaltunk különbséget. Így első, 2002-es mintavételünkkor a medencéket egy diverzebb AOB közösség jellemezte, míg a 2003-as évben a medencéket egyetlen, szennyvízkezelő biofilmekhez köthető filotípus uralta. Eredményeinket a vízkémiai paraméterekkel összevetve kiderült, hogy 2002-ben nem zajlott denitrifikáció a medencékben, míg 2003-ban igen. A denitrifikáció és a biofilmekhez köthető filotípus dominanciája egy érettebb, szerkezetileg komplexebb, anoxikus zónákkal is rendelkező biofilmre utal, ami feltételezhetően az üzemeltetők által időközben bevezetett nyomásesésen alapuló mosatási fázisoknak köszönhetően alakult ki. Mikrobiológiai eredményeink tehát az AOB közösség megismerése mellett igazolták egy technológiai fejlesztés jótékony hatását.

Az addig ismeretlen kokszolóművi szennyvizet kezelő eleveniszapos medencék esetében egy viszonylag egyszerű közösséget tártunk fel, melyet *Proteobacteria* és *Bacteroidetes* divíziókba tartozó filotípusok alkottak, és amelyet a fenolbontó *Comamonas badia* uralt. A közösségalkotók többségének azonosításával értelmezni tudtuk a medencék vízkezelő hatását, hiszen megtaláltuk a rodanid, a fenol- és egyéb aromás vegyületek, valamint a nitrát bontásáért felelős filotípusokat. Az üzemben időszakonként tapasztalt rodanidbontás visszaesések okait is sikerült mikrobiális ökológiai monitorozásunk segítségével megérteni. Megállapítottuk, hogy a drasztikus hőmérséklet-ingadozásoknak ill. üzemeltetési anomáliáknak egymásra épülő mikrobiológiai folyamatok indukálásával döntő szerepe van a rodaniddegradáció hatásfokromlásában. Eredményeink tükrében az üzem megoldotta a medencék temperálását, aminek köszönhetően azóta nem következett be hasonló üzemzavar.

VI.1.3. Legfontosabb eredményeink

Összességében munkánk igazolta a szennyvizekhez köthető mikrobióta tenyésztés független eljárások segítségével történő vizsgálatának a létjogosultságát, hiszen mikrobiális ökológiai és szennyvíztechnológiai szempontból is fontos eredményeket értünk el, amelyeket a következőképp foglalhatunk össze:

1. Kidolgoztunk egy viszonylag gyors és egyszerű AOB közösség monitorozó eljárást;
2. Hozzájárultunk egy szennyvizekben elterjedt, elsődlegesen biofilmekhez köthető, ez eddig tenyésztetlen AOB filospéciesz jobb megismeréséhez;
3. Azonosítottuk egy eddig ismeretlen, fenolt, rodanidot és nitrátot bontó eleveniszap mikrobiális közösségének domináns tagjait;
4. Feltártunk mikrobiális szinten olyan ökológiai folyamatokat, mint egy adott niche-t (fenolbontás) betöltő K-stratégista csoport környezeti hatásokra bekövetkező leváltást egy r-stratégista filotípussal
5. Eredményeink segítségével egyrészt igazoltuk egy műszaki újítás kedvező mikrobiológiai hatását, másrészt olyan technológiai fejlesztésre tudtunk javaslatot tenni, amely azóta igazoltan stabilabbá tette egy szennyvíztisztítóegység működését.

VI.1.4. Továbblépés lehetőségei

Munkánk folytatását mind alap kutatás, mind módszerfejlesztés, mind szennyvíztechnológiai szempontból szükségesnek véljük.

Mikrobiális ökológiai kutatás tekintetében különösen érdekesnek ígérkezik a kokszolóművi szennyvizet kezelő eleveniszap rodanidbontó és fenolbontó filotípusainak részletesebb vizsgálata, azok kölcsönhatásának a felderítése.

Módszereink tekintetében tervezzük az *amoA* TRF adatbázis mások által is elérhető és bővíthető online változatának a fejlesztését, ill. egy új rendszer kidolgozását, amely a nitrifikáció másik kulcsfontosságú csoportja, a nitritoxidáló baktériumok monitorozását segíti elő.

Szennyvíztechnológiai szempontból a fejlesztési feladatok száma óriási. A nitrifikációs medencék időszakos ammónium koncentráció növekedésének kivédése még megoldásra vár úgy, ahogy a kokszolóművi vízkezelőnél számos szennyező továbbra is határérték feletti koncentrációkban hagyja el az üzemet. Ezeknek a problémáknak a hatékony megoldása még évekre előre ad kutatási feladatokat.

VII. IDÉZETT IRODALMAK

- Aakra, A., Utaker, J. B., Nes, I. F. (2001):** Comparative phylogeny of the ammonia monooxygenase subunit A and 16S rRNA genes of ammonia-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 205(2):237-42
- Abraham, W. R., Strompl, C., Meyer, H., Lindholst, S., Moore, E. R., Christ, R., Vancanneyt, M., Tindall, B. J., Bennasar, A., Smit, J., Tesar, M. (1999):** Phylogeny and polyphasic taxonomy of *Caulobacter* species. Proposal of *Maricaulis* gen. nov. with *Maricaulis maris* (Poindexter) comb. nov. as the type species, and emended description of the genera *Brevundimonas* and *Caulobacter*. *Int J Syst Bacteriol.* 49 Pt 3:1053-73
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997):** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-402
- Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1995):** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* 59(1):143-69
- Amann, R. I., Stromley, J., Devereux, R., Key, R., Stahl, D. A. (1992):** Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 58(2):614-23
- Amor, L., Eiroa, M., Kennes, C., Veiga, M. C. (2005):** Phenol biodegradation and its effect on the nitrification process. *Water Res.* 39(13):2915-20
- Anderson, A. J., Dawes, E. A. (1990):** Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev.* 54(4):450-72
- Andersson, S., Rajarao, G. K., Land, C. J., Dalhammar, G. (2008):** Biofilm formation and interactions of bacterial strains found in wastewater treatment systems. *FEMS Microbiology Letters.* 283(1):83-90
- Andrews, J. F. (1968):** A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. *Biotechnol Bioeng* 10:707-723
- Annachhatre, A. P., Bhamidimarri, S. M. (1992):** Microbial attachment and growth in fixed-film reactors: process startup considerations. *Biotechnol Adv.* 10(1):69-91
- Anthonisen, A.C., Loehr, R.C. Prakasam, T.B.S. Srinath, E.G. (1976):** Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *JWPCF* 48: 835-852.
- Arai, H., Akahira, S., Ohishi, T., Maeda, M., Kudo, T. (1998):** Adaptation of *Comamonas testosteroni* TA441 to utilize phenol: organization and regulation of the genes involved in phenol degradation. *Microbiology.* 144 (Pt 10):2895-903
- Baek, S. H., Kim, K. H., Yin, C. R., Jeon, C. O., Im, W. T., Kim, K. K., Lee, S. T. (2003):** Isolation and characterization of bacteria capable of degrading phenol and reducing nitrate under low-oxygen conditions. *Curr Microbiol.* 47(6):462-6
- Barótfi, I. (2000):** A vízszennyezés csökkentése - Környezettechnika. *Mezőgazda Kiadó.*
- Beijerinck, M. W. (1904):** Phe'nome'nes de re'duction produits par les microbes (Conf'e'rence avec demonstrations faite—Delft, le 16 avril 1903). *Arch. Neerl. Sci. Ser.* 2 9:131-157.
- Beller, H. R., Chain, P. S. G., Letain, T. E., Chakicherla, A., Larimer, F. W., Richardson, P. M., Coleman, M. A., Wood, A. P., Kelly, D. P. (2006):** The Genome Sequence of the Obligately Chemolithoautotrophic, Facultatively Anaerobic Bacterium *Thiobacillus denitrificans*. *J Bacteriol.* 188(4):1473-1488

- Ben Rebah, F., Prevost, D., Tyagi, R. D., Belbahri, L. (2008):** Poly-beta-hydroxybutyrate Production by Fast-Growing Rhizobia Cultivated in Sludge and in Industrial Wastewater. *Appl Biochem Biotechnol.*
- Bernet, N., Sanchez, O., Cesbron, D., Steyer, J.-P., Delgenes, J.-P. (2005):** Modeling and control of nitrite accumulation in a nitrifying biofilm reactor. *Biochemical Engineering Journal.* 24(2):173-183
- Bjornsson, L., Hugenholtz, P., Tyson, G. W., Blackall, L. L. (2002):** Filamentous Chloroflexi (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiology.* 148(Pt 8):2309-18
- Blackall, L. L., Crocetti, G. R., Saunders, A. M., Bond, P. L. (2002):** A review and update of the microbiology of enhanced biological phosphorus removal in wastewater treatment plants. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 81(1-4):681-91
- Blumel, S., Mark, B., Busse, H. J., Kampfer, P., Stolz, A. (2001):** Pigmentiphaga kullae gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Alcaligenaceae with the ability to decolorize azo dyes aerobically. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51(Pt 5):1867-71
- Bock, E., Koops, H.-P., Ahlers, B., Harms, H. (1991):** Oxidation of inorganic nitrogen compounds as energy source. - *In* Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (eds.). *The Prokaryotes*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York. p. 414-430.
- Bock, E., Koops, H.-P. (1991):** The genus *Nitrobacter* and related genera. - *In* Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (eds.). *The Prokaryotes*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York. p. 2302-2309.
- Bollmann, A., Schmidt, I., Saunders, A. M., Nicolaisen, M. H. (2005):** Influence of starvation on potential ammonia-oxidizing activity and amoA mRNA levels of *Nitrosospira briensis*. *Appl Environ Microbiol.* 71(3):1276-82
- Bond, P. L., Hugenholtz, P., Keller, J., Blackall, L. L. (1995):** Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors. *Appl Environ Microbiol.* 61(5):1910-6
- Borneman, J., Triplett, E. W. (1997):** Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl Environ Microbiol.* 63(7):2647-53
- Bothe, H., Jost, G., Schloter, M., Ward, B. B., Witzel, K. (2000):** Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiol Rev.* 24(5):673-90
- Caspi, R., Foerster, H., Fulcher, C. A., Kaipa, P., Krummenacker, M., Latendresse, M., Paley, S., Rhee, S. Y., Shearer, A. G., Tissier, C., Walk, T. C., Zhang, P., Karp, P. D. (2008):** The MetaCyc Database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. *Nucleic Acids Res.* 36(Database issue):D623-31
- Chang, E. E., Hsing, H. J., Chiang, P. C., Chen, M. Y., Shyng, J. Y. (2008):** The chemical and biological characteristics of coke-oven wastewater by ozonation. *J Hazard Mater.* 156(1-3):560-7
- Chouari, R., Le Paslier, D., Dauga, C., Daegelen, P., Weissenbach, J., Sghir, A. (2005):** Novel major bacterial candidate division within a municipal anaerobic sludge digester. *Appl Environ Microbiol.* 71(4):2145-53
- Chu, C. P., Lee, D. J., Peng, X. F. (2004):** Structure of conditioned sludge flocs. *Water Research.* 38(8):2125-2134
- Ciesielski, S., Cydzik-Kwiatkowska, A., Pokoj, T., Klimiuk, E. (2006):** Molecular detection and diversity of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates-producing bacteria enriched from activated sludge. *Journal of Applied Microbiology.* 101(1):190-199

- Cole, J. R., Chai, B., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., Bandela, A. M., Cardenas, E., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. (2007):** The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res.* 35(Database issue):D169-72
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., James, G. (1994):** Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol.* 176(8):2137-42
- Daims, H., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H., Schleifer, K. H., Wagner, M. (2001):** In situ characterization of Nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl Environ Microbiol.* 67(11):5273-84
- Daims, H., Taylor, M. W., Wagner, M. (2006):** Wastewater treatment: a model system for microbial ecology. *Trends Biotechnol.* 24(11):483-9
- Dedysh, S.N., Berestovskaya, Y.Y., Vasylieva, L.V., Belova, S.E., Khmelina, V.N., Suzina, N.E., Trotsenko, Y.A., Liesack, W. and Zavarzin, G.A. *Methylocella tundrae* sp. nov., a novel methanotrophic bacterium from acidic tundra peatlands. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54 (PT 1), 151-156 (2004)
- De Gelder, L., Vandecasteele, F. P., Brown, C. J., Forney, L. J., Top, E. M. (2005):** Plasmid donor affects host range of promiscuous IncP-beta plasmid pB10 in an activated-sludge microbial community. *Appl Environ Microbiol.* 71(9):5309-17
- de Lajudie, P., Willems, A., Nick, G., Moreira, F., Molouba, F., Hoste, B., Torck, U., Neyra, M., Collins, M. D., Lindstrom, K., Dreyfus, B., Gillis, M. (1998):** Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 48 Pt 2:369-82
- Deront, M., Samb, F. M., Adler, N., Peringer, P. (1998):** Biomass growth monitoring using pressure drop in a cocurrent biofilter. *Biotechnol Bioeng.* 60(1):97-104
- Di Iaconi, C., Ramadori, R., Lopez, A., Passino, R. (2004):** Preliminary biomass characterization in a sequencing batch biofilm reactor. *Ann Chim.* 94(12):889-98
- Dunne, W. M., Jr. (2002):** Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev.* 15(2):155-66
- Egert, M., Friedrich, M. W. (2003):** Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting terminal restriction fragment length polymorphism analysis of microbial community structure. *Appl Environ Microbiol.* 69(5):2555-62
- Egli, K., Bosshard, F., Werlen, C., Lais, P., Siegrist, H., Zehnder, A. J., Van der Meer, J. R. (2003):** Microbial composition and structure of a rotating biological contactor biofilm treating ammonium-rich wastewater without organic carbon. *Microb Ecol.* 45(4):419-32
- Ehrich, S., Behrens, D., Lebedeva, E., Ludwig, W., Bock, E. (1995):** A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship. *Arch Microbiol.* 164(1):16-23
- Élóduna (2006):** Budapesti Központi Szennyvíztisztító Telep és kapcsolódó létesítményei – Vízisztítás. Honlap: <http://www.eloduna.hu>
- Fakhruddin, A. N., Quilty, B. (2007):** Measurement of the growth of a floc forming bacterium *Pseudomonas putida* CP1. *Biodegradation.* 18(2):189-97
- FCSM (2006):** Fővárosi Csatornázási Művek Zrt. – Szolgáltatások – Szennyvíztisztítás. Honlap: <http://www.fcsm.hu>
- Feng, Y. S., Lee, C. M., Wang, C. C. (2008):** Methods for increasing nitrile biotransformation into amides using *Mesorhizobium* sp. *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 44(3):304-7
- Fisher, M. M., Triplett, E. W. (1999):** Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl Environ Microbiol.* 65(10):4630-6

- Forns, X., Bukh, J., Purcell, R. H., Emerson, S. U. (1997):** How *Escherichia coli* can bias the results of molecular cloning: preferential selection of defective genomes of hepatitis C virus during the cloning procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(25):13909-14
- Francis, C. A., Beman, J. M., Kuypers, M. M. (2007):** New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *Isme J.* 1(1):19-27
- Frostegard, A., Tunlid, A., Baath, 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(11):3605-3617
- Fuhrman, M., Davis, J., Kirk, Alison A. (1992):** Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *356(6365):148-149*
- Gabriel, F. L., Giger, W., Guenther, K., Kohler, H. P. (2005):** Differential degradation of nonylphenol isomers by *Sphingomonas xenophaga* Bayram. *Appl Environ Microbiol.* 71(3):1123-9
- Gallego, A., Gemini, V. L., Fortunato, M. S., Dabas, P., Rossi, S. L., Gómez, C. E., Vescina, C., Planes, E. I., Korol, S. E. (2008):** Degradation and detoxification of cresols in synthetic and industrial wastewater by an indigenous strain of *Pseudomonas putida* in aerobic reactors. *Environmental Toxicology.* 9999(9999):NA
- Geng, A., Soh, A. E., Lim, C. J., Loke, L. C. (2006):** Isolation and characterization of a phenol-degrading bacterium from an industrial activated sludge. *Appl Microbiol Biotechnol.* 71(5):728-35
- Ghose, M. K. (2002):** Complete physico-chemical treatment for coke plant effluents. *Water Res.* 36(5):1127-34
- Gieseke, A., Purkhold, U., Wagner, M., Amann, R., Schramm, A. (2001):** Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate-removing biofilm. *Appl Environ Microbiol.* 67(3):1351-62
- Giovannoni, S. J., Britschgi, T. B., Moyer, C. L., Field, K. G. (1990):** Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature.* 345(6270):60-3
- Giovannoni, S. J., Tripp, H. J., Givan, S., Podar, M., Vergin, K. L., Baptista, D., Bibbs, L., Eads, J., Richardson, T. H., Noordewier, M., Rappe, M. S., Short, J. M., Carrington, J. C., Mathur, E. J. (2005):** Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium. *Science.* 309(5738):1242-5
- Gomez, M. A., Galvez, J. M., Hontoria, E., Gonzalez-Lopez, J. (2003):** Influence of ethanol concentration on biofilm bacterial composition from a denitrifying submerged filter used for contaminated groundwater. *J Biosci Bioeng.* 95(3):245-51
- Gomez, M. A., Hontoria, E., Gonzalez-Lopez, J. (2002):** Effect of dissolved oxygen concentration on nitrate removal from groundwater using a denitrifying submerged filter. *J Hazard Mater.* 90(3):267-78
- Gul, M., Ciragil, P., Bulbuloglu, E., Aral, M., Alkis, S., Ezberci, F. (2007):** *Comamonas testosteroni* bacteremia in a patient with perforated acute appendicitis. Short communication. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 54(3):317-21
- Gumaelius, L., Magnusson, G., Petterson, B., Dalhammar, G. (2001):** *Comamonas denitrificans* sp. nov., an efficient denitrifying bacterium isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51(Pt 3):999-1006
- Harayama, S., Reik, M. (1989):** Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *J Biol Chem.* 264(26):15328-33
- Hartmann, M., Enkerli, J., Widmer, F. (2007):** Residual polymerase activity-induced bias in terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Environ Microbiol.* 9(2):555-9
- Hartmann, M., Widmer, F. (2006):** Community structure analyses are more sensitive to differences in soil bacterial communities than anonymous diversity indices. *Appl Environ Microbiol.* 72(12):7804-12

- Hendrickx, B., Junca, H., Vosahlova, J., Lindner, A., Ruegg, I., Bucheli-Witschel, M., Faber, F., Egli, T., Mau, M., Schlomann, M., Brennerova, M., Brenner, V., Pieper, D. H., Top, E. M., Dejonghe, W., Bastiaens, L., Springael, D. (2006):** Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. *J Microbiol Methods*. 64(2):250-65
- Heylen, K., Vanparys, B., Wittebolle, L., Verstraete, W., Boon, N., De Vos, P. (2006):** Cultivation of denitrifying bacteria: optimization of isolation conditions and diversity study. *Appl Environ Microbiol*. 72(4):2637-43
- Hiraishi, A. (1997):** Transfer of the bacteriochlorophyll b-containing phototrophic bacteria *Rhodopseudomonas viridis* and *Rhodopseudomonas sulfoviridis* to the genus *Blastochloris* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 47(1):217-9
- Holmes, A. J., Costello, A., Lidstrom, M. E., Murrell, J. C. (1995):** Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiol Lett*. 132(3):203-8
- Horz, H. P., Rotthauwe, J. H., Lukow, T., Liesack, W. (2000):** Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of *amoA* PCR products. *J Microbiol Methods*. 39(3):197-204
- Hugenholtz, P., Goebel, B. M., Pace, N. R. (1998):** Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol*. 180(18):4765-74
- Ito, T., Okabe, S., Satoh, H., Watanabe, Y. (2002):** Successional development of sulfate-reducing bacterial populations and their activities in a wastewater biofilm growing under microaerophilic conditions. *Appl Environ Microbiol*. 68(3):1392-402
- Ivnitsky, H., Katz, I., Minz, D., Volvovic, G., Shimoni, E., Kesselman, E., Semiat, R., Dosoretz, C. G. (2007):** Bacterial community composition and structure of biofilms developing on nanofiltration membranes applied to wastewater treatment. *Water Research Membranes*. 41(17):3924-3935
- Janssen, P. H., Yates, P. S., Grinton, B. E., Taylor, P. M., Sait, M. (2002):** Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. *Appl Environ Microbiol*. 68(5):2391-6
- Jardinier, N., Blake, G., Mauchamp, A., Merlin, G. (2001):** Design and performance of experimental constructed wetlands treating coke plant effluents. *Water Sci Technol*. 44(11-12):485-91
- Jefferson, K. K. (2004):** What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*. 236(2):163-173
- Jetten, M. S. M., Wagner, M., Fuerst, J., van Loosdrecht, M., Kuenen, G., Strous, M. (2001):** Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation (–anammox–) process. *Current Opinion in Biotechnology*. 12(3):283-288
- Jianlong, W., Xiangchun, Q., Liping, H., Yi, Q., Hegemann, W. (2002):** Microbial degradation of quinoline by immobilized cells of *Burkholderia pickettii*. *Water Res*. 36(9):2288-96
- Juhász, J. (2004):** Hidrológia Vizhasznosítás. - Tarsoly, I., Fábry Gy. (eds.): Magyarország a XX. században. IV. KÖTET Tudomány I. Műszaki és természettudományok. 453-479
- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K. H., Pommerening-Roser, A., Koops, H. P., Wagner, M. (1998):** Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl Environ Microbiol*. 64(8):3042-51
- Kanaly, R. A., Harayama, S., Watanabe, K. (2002):** *Rhodanobacter* sp. strain BPC1 in a benzo[a]pyrene-mineralizing bacterial consortium. *Appl Environ Microbiol*. 68(12):5826-33

- Kaplan, C. W., Kitts, C. L. (2004):** Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Appl Environ Microbiol.* 70(3):1777-86
- Katayama, Y., Matsushita, Y., Kaneko, M., Kondo, M., Mizuno, T., Nyunoya, H. (1998):** Cloning of Genes Coding for the Three Subunits of Thiocyanate Hydrolase of *Thiobacillus thioparus* THI 115 and Their Evolutionary Relationships to Nitrile Hydratase. *J. Bacteriol.* 180(10):2583-2589
- Katayama, Y., Narahara, Y., Inoue, Y., Amano, F., Kanagawa, T., Kuraishi, H. (1992):** A thiocyanate hydrolase of *Thiobacillus thioparus*. A novel enzyme catalyzing the formation of carbonyl sulfide from thiocyanate. *J Biol Chem.* 267(13):9170-9175
- Kelley, S. T., Theisen, U., Angenent, L. T., St Amand, A., Pace, N. R. (2004):** Molecular analysis of shower curtain biofilm microbes. *Appl Environ Microbiol.* 70(7):4187-92
- Kelly, J. J., Siripong, S., McCormack, J., Janus, L. R., Urakawa, H., El Fantroussi, S., Noble, P. A., Sappelsa, L., Rittmann, B. E., Stahl, D. A. (2005):** DNA microarray detection of nitrifying bacterial 16S rRNA in wastewater treatment plant samples. *Water Research.* 39(14):3229-3238
- Khan, S. T., Hiraishi, A. (2002):** *Diaphorobacter nitroreducens* gen. nov., sp. nov., a poly(3-hydroxybutyrate)-degrading denitrifying bacterium isolated from activated sludge. *The Journal of General and Applied Microbiology.* 48(6):299-308
- Kielak, A., Pijl, A. S., van Veen, J. A., Kowalchuk, G. A. (2008):** Differences in vegetation composition and plant species identity lead to only minor changes in soil-borne microbial communities in a former arable field. *FEMS Microbiol Ecol.* 63(3):372-82
- Kim, D. J., Lee, D. I., Keller, J. (2006):** Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH. *Bioresour Technol.* 97(3):459-68
- Klausen, M., Gjermansen, M., Kreft, J. U., Tolker-Nielsen, T. (2006):** Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. *FEMS Microbiology Letters.* 261(1):1-11
- Kong, Y., Xia, Y., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H. (2006):** Ecophysiology of a group of uncultured Gammaproteobacterial glycogen-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal wastewater treatment plants. *Environ Microbiol.* 8(3):479-89
- Konneke, M., Bernhard, A. E., de la Torre, J. R., Walker, C. B., Waterbury, J. B., Stahl, D. A. (2005):** Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *437(7058):543-546*
- Koops H.-P., Purkhold U., Pommerening-Röser A., Timmermann G., Wagner M. (2003):** The Lithoautotrophic Ammonia-Oxidizing Bacteria. *In* M. Dworkin et al., (eds.) *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community* 3rd ed. release 3.13, Springer-Verlag, New York. <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>
- Kowalchuk, G. A., Naoumenko, Z. S., Derikx, P. J., Felske, A., Stephen, J. R., Arkhipchenko, I. A. (1999):** Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in compost and composted materials. *Appl Environ Microbiol.* 65(2):396-403
- Kowalchuk, G. A., Stephen, J. R., De Boer, W., Prosser, J. I., Embley, T. M., Woldendorp, J. W. (1997):** Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl Environ Microbiol.* 63(4):1489-97
- Kragelund, C., Levantesi, C., Borger, A., Thelen, K., Eikelboom, D., Tandoi, V., Kong, Y., Krooneman, J., Larsen, P., Thomsen, T. R., Nielsen, P. H. (2008):** Identity, abundance and ecophysiology of filamentous bacteria belonging to the Bacteroidetes present in activated sludge plants. *Microbiology.* 154(3):886-894
- Kuai, L., Verstraete, W. (1998):** Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system. *Appl Environ Microbiol.* 64(11):4500-6

KvVM (2007): Magyar Köztársaság Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium – Vízügy - Szennyvízelvezetés és tisztítás – Tájékoztató: Magyarország településeinek szennyvízelvezetési és -tisztítási helyzetéről, a Települési szennyvízkezelésről szóló 91/271/EGK irányelv Nemzeti Megvalósítási Programjáról Időszak: 2005. január 01. – 2006. december 31. 2008. március hó. Honlap: <http://www.kvvm.hu>

Lai, P., Zhao, H. Z., Wang, C., Ni, J. R. (2007): Advanced treatment of coking wastewater by coagulation and zero-valent iron processes. *J Hazard Mater.* 147(1-2):232-9

Lakay, F. M., Botha, A., Prior, B. A. (2007): Comparative analysis of environmental DNA extraction and purification methods from different humic acid-rich soils. *J Appl Microbiol.* 102(1):265-73

Lane, D. J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (ed.), *Nucleic Acids Techniques in Bacterial Systematics*, John Wiley and Sons, New York, pp. 115-175.

Lee, H. G., An, D. S., Im, W. T., Liu, Q. M., Na, J. R., Cho, D. H., Jin, C. W., Lee, S. T., Yang, D. C. (2007): *Chitinophaga ginsengisegetis* sp. nov. and *Chitinophaga ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field in South Korea. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57(Pt 7):1396-401

Lemarchand, K., Berthiaume, F., Maynard, C., Harel, J., Payment, P., Bayardelle, P., Masson, L., Brousseau, R. (2005): Optimization of microbial DNA extraction and purification from raw wastewater samples for downstream pathogen detection by microarrays. *Journal of Microbiological Methods.* 63(2):115-126

Li, B., Sun, Y. L., Li, Y. Y. (2005): Pretreatment of coking wastewater using anaerobic sequencing batch reactor (ASBR). *J Zhejiang Univ Sci B.* 6(11):1115-23

Li, Y. M., Gu, G. W., Zhao, J. F., Yu, H. Q., Qiu, Y. L., Peng, Y. Z. (2003): Treatment of coke-plant wastewater by biofilm systems for removal of organic compounds and nitrogen. *Chemosphere.* 52(6):997-1005

Lin, Y., Kong, H. N., He, Y. L., Liu, B. B., Inamori, Y., Yan, L. (2007): Isolation and characterization of a new heterotrophic nitrifying *Bacillus* sp. strain. *Biomed Environ Sci.* 20(6):450-5

Liu, B., Zhang, F., Feng, X., Liu, Y., Yan, X., Zhang, X., Wang, L., Zhao, L. (2006): *Thauera* and *Azoarcus* as functionally important genera in a denitrifying quinoline-removal bioreactor as revealed by microbial community structure comparison. *FEMS Microbiology Ecology.* 55(2):274-286

Liu, J., Wang, B., Li, W., Jin, C., Cao, X., Wang, L. (1996): Removal of nitrogen from coal gasification and coke plant wastewaters in A/O submerged biofilm-activated sludge (SBF-AS) hybrid system. *Water Sci Technol.* 34(10): 17-24

Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., Forney, L. J. (1997): Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 63(11):4516-22

Lo Presti, F., Riffard, S., Meugnier, H., Reyrolle, M., Lasne, Y., Grimont, P. A., Grimont, F., Benson, R. F., Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G., Etienne, J., Freney, J. (2001): *Legionella greslensis* sp. nov. and *Legionella beliardensis* sp. nov., isolated from water in France. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51(Pt 6):1949-57

Lopez-Vazquez, C. M., Hooijmans, C. M., Brdjanovic, D., Gijzen, H. J., van Loosdrecht, M. C. (2008): Factors affecting the microbial populations at full-scale enhanced biological phosphorus removal (EBPR) wastewater treatment plants in The Netherlands. *Water Res.* 42(10-11):2349-60

Luo, W., D'Angelo, E. M., Coyne, M. S. (2008): Organic carbon effects on aerobic polychlorinated biphenyl removal and bacterial community composition in soils and sediments. *Chemosphere.* 70(3):364-73

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (2003): *Brock Biology of Microorganisms*. 10th ed. Pearson Education, Inc., Upper Saddle River, NJ. 351-472.

- Manefield, M., Griffiths, R. I., Leigh, M. B., Fisher, R., Whiteley, A. S. (2005):** Functional and compositional comparison of two activated sludge communities remediating coking effluent. *Environ Microbiol.* 7(5):715-22
- Manser, R. (2006):** Activated Sludge – Biofilm Flocs. *Eawag News* 60e/July: pp. 28-30.
- Maranon, E., Vazquez, I., Rodriguez, J., Castrillon, L., Fernandez, Y., Lopez, H. (2008):** Treatment of coke wastewater in a sequential batch reactor (SBR) at pilot plant scale. *Bioresour Technol.* 99(10):4192-8
- Marsh, T. L., Saxman, P., Cole, J., Tiedje, J. (2000):** Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. *Appl Environ Microbiol.* 66(8):3616-20
- Mason, F., Harper, D., Larkin, M. (1994):** The microbial degradation of thiocyanate. *Biochem Soc Trans.* 22(4):423S
- Maximova, N., Dahl, O. (2006):** Environmental implications of aggregation phenomena: Current understanding. *Current Opinion in Colloid & Interface Science.* 11(4):246-266
- Mills, D. K., Fitzgerald, K., Litchfield, C. D., Gillevet, P. M. (2003):** A comparison of DNA profiling techniques for monitoring nutrient impact on microbial community composition during bioremediation of petroleum-contaminated soils. *J Microbiol Methods.* 54(1):57-74
- Milner, M. G., Curtis, T. P., Davenport, R. J. (2008):** Presence and activity of ammonia-oxidising bacteria detected amongst the overall bacterial diversity along a physico-chemical gradient of a nitrifying wastewater treatment plant. *Water Research.* 42(12):2863-2872
- Mobarry, B. K., Wagner, M., Urbain, V., Rittmann, B. E., Stahl, D. A. (1996):** Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 62(6):2156-62
- Moeseneder, M. M., Arrieta, J. M., Muyzer, G., Winter, C., Herndl, G. J. (1999):** Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* 65(8):3518-25
- Moissl, C., Osman, S., La Duc, M. T., Dekas, A., Brodie, E., DeSantis, T., Venkateswaran, K. (2007):** Molecular bacterial community analysis of clean rooms where spacecraft are assembled. *FEMS Microbiol Ecol.* 61(3):509-21
- Monod, J. (1949):** The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Review of Microbiology.* 3(1):371-394
- Morgan-Sagastume, F., Grant Allen, D. (2005):** Activated sludge deflocculation under temperature upshifts from 30 to 45 °C. *Water Research.* 39(6):1061-1074
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986):** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51 Pt 1263-73
- Muyzer, G. (1999):** DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol.* 2(3):317-22
- Nalin, R., Simonet, P., Vogel, T. M., Normand, P. (1999):** *Rhodanobacter lindaniclasticus* gen. nov., sp. nov., a lindane-degrading bacterium. *Int J Syst Bacteriol.* 49 Pt 119-23
- Nicolaisen, M. H., Ramsing, N. B. (2002):** Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *Journal of Microbiological Methods.* 50(2):189-203
- Nikolausz, M., Marialigeti, K., Kovacs, G. (2004):** Comparison of RNA- and DNA-based species diversity investigations in rhizoplane bacteriology with respect to chloroplast sequence exclusion. *J Microbiol Methods.* 56(3):365-73

- Nikolausz, M., Sipos, R., Revesz, S., Szekely, A., Marialigeti, K. (2005):** Observation of bias associated with re-amplification of DNA isolated from denaturing gradient gels. *FEMS Microbiol Lett.* 244(2):385-90
- Nishimori, E., Kita-Tsakamoto, K., Wakabayashi, H. (2000):** *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50(1):83-89
- Nogueira, R., Melo, L. F., Purkhold, U., Wuertz, S., Wagner, M. (2002):** Nitrifying and heterotrophic population dynamics in biofilm reactors: effects of hydraulic retention time and the presence of organic carbon. *Water Res.* 36(2):469-81
- Norton, J. M., Alzerreca, J. J., Suwa, Y., Klotz, M. G. (2002):** Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Arch Microbiol.* 177(2):139-49
- Nowak, M. A., Paul, A. D., Srivastava, R. D., Radziwon, A. (2004):** Coal Conversion Encyclopedia of Energy. In: Cleveland, C. J. (ed.), Elsevier, New York, pp. 425-434
- Nunan, N., Daniell, T. J., Singh, B. K., Papert, A., McNicol, J. W., Prosser, J. I. (2005):** Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils, characterized using molecular techniques. *Appl Environ Microbiol.* 71(11):6784-92
- Okabe, S., Kandaichi, T., Ito, T. (2005):** Fate of ¹⁴C-labeled microbial products derived from nitrifying bacteria in autotrophic nitrifying biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 71(7):3987-94
- Okabe, S., Odagiri, M., Ito, T., Satoh, H. (2007):** Succession of sulfur-oxidizing bacteria in the microbial community on corroding concrete in sewer systems. *Appl Environ Microbiol.* 73(3):971-80
- O'Sullivan, L. A., Rinna, J., Humphreys, G., Weightman, A. J., Fry, J. C. (2005):** *Fluviicola affensis* gen. nov., sp. nov., a novel freshwater bacterium of the family Cryomorphaceae in the phylum 'Bacteroidetes'. *Int J Syst Evol Microbiol.* 55(Pt 5):2189-94
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., Kolter, R. (2000):** Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 54:49-79
- Park, H. D., Noguera, D. R. (2004):** Evaluating the effect of dissolved oxygen on ammonia-oxidizing bacterial communities in activated sludge. *Water Res.* 38(14-15):3275-86
- Park, H. D., Regan, J. M., Noguera, D. R. (2002):** Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacterial populations in aerated-anoxic orbital processes. *Water Sci Technol.* 46(1-2):273-80
- Park, H. D., Wells, G. F., Bae, H., Criddle, C. S., Francis, C. A. (2006):** Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Appl Environ Microbiol.* 72(8):5643-7
- Park, S. J., Yoon, J. C., Shin, K. S., Kim, E. H., Yim, S., Cho, Y. J., Sung, G. M., Lee, D. G., Kim, S. B., Lee, D. U., Woo, S. H., Koopman, B. (2007):** Dominance of endospore-forming bacteria on a Rotating Activated Bacillus Contactor biofilm for advanced wastewater treatment. *J Microbiol.* 45(2):113-21
- Peixoto, R. S., da Costa Coutinho, H. L., Rumjanek, N. G., Macrae, A., Rosado, A. S. (2002):** Use of rpoB and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. *Lett Appl Microbiol.* 35(4):316-20
- Princic, A., Mahne, I. I., Megusar, F., Paul, E. A., Tiedje, J. M. (1998):** Effects of pH and oxygen and ammonium concentrations on the community structure of nitrifying bacteria from wastewater. *Appl Environ Microbiol.* 64(10):3584-90
- Princz, P., Oláh, J. (2005):** A biológiai szennyvíztisztítás módszerei és az eleveniszapos szennyvíztisztítás hatásfokának növelése természetes, valamint felületkezelt zeolitok felhasználásával. ÉLŐ Bolygó Környezetvédelmi Kutató Kft. Honalp: <http://www.living-planet.hu/>

- Purkhold, U., Pommerening-Roser, A., Juretschko, S., Schmid, M. C., Koops, H. P., Wagner, M. (2000):** Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl Environ Microbiol.* 66(12):5368-82
- Qureshi, N., Annous, B. A., Ezeji, T. C., Karcher, P., Maddox, I. S. (2005):** Biofilm reactors for industrial bioconversion processes: employing potential of enhanced reaction rates. *Microb Cell Fact.* 424
- Radajewski, S., Webster, G., Reay, D. S., Morris, S. A., Ineson, P., Nedwell, D. B., Prosser, J. I., Murrell, J. C. (2002):** Identification of active methylotroph populations in an acidic forest soil by stable-isotope probing. *Microbiology.* 148(Pt 8):2331-42
- Ravenschlag, K., Sahn, K., Pernthaler, J., Amann, R. (1999):** High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Appl Environ Microbiol.* 65(9):3982-9
- Rawls, J. F., Samuel, B. S., Gordon, J. I. (2004):** Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(13):4596-601
- Regenhardt, D., Heuer, H., Heim, S., Fernandez, D. U., Strompl, C., Moore, E. R., Timmis, K. N. (2002):** Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440. *Environ Microbiol.* 4(12):912-5
- Risgaard-Petersen, N., Langezaal, A. M., Ingvardsen, S., Schmid, M. C., Jetten, M. S. M., Op den Camp, H. J. M., Derksen, J. W. M., Pina-Ochoa, E., Eriksson, S. P., Peter Nielsen, L., Peter Revsbech, N., Cedhagen, T., van der Zwaan, G. J. (2006):** Evidence for complete denitrification in a benthic foraminifer. *443(7107):93-96*
- Rotthauwe, J. H., Witzel, K. P., Liesack, W. (1997):** The ammonia monoxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol.* 63(12):4704-12
- Sakano, Y., Pickering, K. D., Strom, P. F., Kerkhof, L. J. (2002):** Spatial distribution of total, ammonia-oxidizing, and denitrifying bacteria in biological wastewater treatment reactors for bioregenerative life support. *Appl Environ Microbiol.* 68(5):2285-93
- Sanchez, J. I., Rossetti, L., Martinez, B., Rodriguez, A., Giraffa, G. (2006):** Application of reverse transcriptase PCR-based T-RFLP to perform semi-quantitative analysis of metabolically active bacteria in dairy fermentations. *J Microbiol Methods.* 65(2):268-77
- Santegoeds, C. M., Ferdelman, T. G., Muyzer, G., de Beer, D. (1998a):** Structural and functional dynamics of sulfate-reducing populations in bacterial biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 64(10):3731-9
- Santegoeds, C. M., Schramm, A., Beer, D. d. (1998b):** Microsensors as a tool to determine chemical microgradients and bacterial activity in wastewater biofilms and flocs. *Biodegradation.* 9(3 - 4):159-167
- Sanz, J. L., Köchling, T. (2007):** Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. *Process Biochemistry.* 42(2):119-133
- Satoh, H., Miura, Y., Tsushima, I., Okabe, S. (2007):** Layered structure of bacterial and archaeal communities and their in situ activities in anaerobic granules. *Appl Environ Microbiol.* 73(22):7300-7
- Schleheck, D., Tindall, B. J., Rossello-Mora, R., Cook, A. M. (2004):** *Parvibaculum lavamentivorans* gen. nov., sp. nov., a novel heterotroph that initiates catabolism of linear alkylbenzenesulfonate. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54(Pt 5):1489-97
- Schloss, P. D., Handelsman, J. (2004):** Status of the microbial census. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68(4):686-91
- Schmidt, I., Slijkens, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J. G., Jetten, M. S. M., Strous, M. (2003):** New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiology Reviews.* 27(4):481-492

- Schramm, A., De Beer, D., Wagner, M., Amann, R. (1998):** Identification and activities in situ of *Nitrosospira* and *Nitrosira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. *Appl Environ Microbiol.* 64(9):3480-5
- Schwieger, F., Tebbe, C. C. (1998):** A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl Environ Microbiol.* 64(12):4870-6
- Seeger, H. (1999):** The history of German waste water treatment – In: *European Water Management.* 2(5)
- Silva, J. A., Tobella, L. M., Becerra, J., Godoy, F., Martinez, M. A. (2007):** Biosynthesis of poly-beta-hydroxyalkanoate by *Brevundimonas vesicularis* LMG P-23615 and *Sphingopyxis macrogoltabida* LMG 17324 using acid-hydrolyzed sawdust as carbon source. *J Biosci Bioeng.* 103(6):542-6
- Simberloff, D. S. (1978):** Use of rarefaction and related methods in ecology. – In: Dickson, K.L., Cairns, Jr. J., Livingston, R.J. (eds.) *Biological Data in Water Pollution Assessment: Quantitative and Statistical Analyses* American Society for Testing and Materials STP 652, Philadelphia. 150-165.
- Sinigalliano, C. D., Kuhn, D. N., Jones, R. D. (1995):** Amplification of the *amoA* gene from diverse species of ammonium-oxidizing bacteria and from an indigenous bacterial population from seawater. *Appl Environ Microbiol.* 61(7):2702-6
- Sipos, R., Szekely, A. J., Palatinszky, M., Revesz, S., Marialigeti, K., Nikolausz, M. (2007):** Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. *FEMS Microbiol Ecol.* 60(2):341-50
- Snaird, J., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1997):** Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol.* 63(7):2884-96
- Soda, S., Uesugi, K., Ike, M., Fujita, M. (1999):** Application of a floc-forming genetically engineered microorganism to a sequencing batch reactor for phenolic wastewater treatment. *J Biosci Bioeng.* 88(1):85-91
- Song, Z., Burns, R. G. (2005):** Depolymerisation and biodegradation of a synthetic tanning agent by activated sludges, the bacteria *Arthrobacter globiformis* and *Comamonas testosteroni*, and the fungus *Cunninghamella polymorpha*. *Biodegradation.* 16(4):305-18
- Songhu, Y., Yanchao, H., Dajun, R., Xiaohua, L. (2007):** Degradation of nitrogen-heterocyclic compounds by anodic oxidation and electro-Fenton methods. *Water Environ Res.* 79(7):759-64
- Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Antipov, A. N., Muyzer, G., Kuenen, J. G. (2004):** Anaerobic growth of the haloalkaliphilic denitrifying sulfur-oxidizing bacterium *Thioalkalivibrio thiocyanodenitrificans* sp. nov. with thiocyanate. *Microbiology.* 150(Pt 7):2435-42
- Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Lysenko, A. M., Mityushina, L. L., Kuenen, J. G. (2002):** Thioalkalivibrio thiocyanoxidans sp. nov. and Thioalkalivibrio paradoxus sp. nov., novel alkaliphilic, obligately autotrophic, sulfur-oxidizing bacteria capable of growth on thiocyanate, from soda lakes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52(Pt 2):657-64
- Spring, S., Jackel, U., Wagner, M., Kampfer, P. (2004):** *Ottowia thiooxydans* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic, N₂O-producing bacterium isolated from activated sludge, and transfer of *Aquaspirillum gracile* to *Hylemonella gracilis* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54(Pt 1):99-106
- Sproer, C., Reichenbach, H., Stackebrandt, E. (1999):** The correlation between morphological and phylogenetic classification of myxobacteria. *Int J Syst Bacteriol.* 49 Pt 3:1255-62
- Stahl, D. A., Lane, D. J., Olsen, G. J., Pace, N. R. (1985):** Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol.* 49(6):1379-84
- Staley, J. T., Konopka, A. (1985):** Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol.* 39:321-66

- Stephen, J. R., McCaig, A. E., Smith, Z., Prosser, J. I., Embley, T. M. (1996):** Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 62(11):4147-54
- Stratford, J., Dias, A. E., Knowles, C. J. (1994):** The utilization of thiocyanate as a nitrogen source by a heterotrophic bacterium: the degradative pathway involves formation of ammonia and tetrathionate. *Microbiology.* 140 (Pt 10):2657-62
- Strous, M., Kuenen, J. G., Jetten, M. S. (1999):** Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Appl Environ Microbiol.* 65(7):3248-50
- Suenaga, H., Ohnuki, T., Miyazaki, K. (2007):** Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds. *Environ Microbiol.* 9(9):2289-97
- Sutherland, I. W. (2001):** The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology.* 9(5):222-227
- Suwa, Y., Sumino, T., Noto, K. (1997):** Phylogenetic relationships of activated sludge isolates of ammonia oxidizers with different sensitivities to ammonium sulfate. *J Gen Appl Microbiol.* 43(6):373-379
- Suzuki, M., Rappe, M. S., Giovannoni, S. J. (1998):** Kinetic bias in estimates of coastal picoplankton community structure obtained by measurements of small-subunit rRNA gene PCR amplicon length heterogeneity. *Appl Environ Microbiol.* 64(11):4522-9
- Székely, A. (2001):** A dunai kavicságy nitrifikáló bacterium közösségeinek vizsgálata molekuláris módszerekkel. Szakdolgozat. ELTE, Budapest
- Tago, Y., Aida, K. (1977):** Exocellular mucopolysaccharide closely related to bacterial floc formation. *Appl Environ Microbiol.* 34(3):308-14
- Tago, Y., Kuraishi, H., Aida, K. (1975):** The formation of a model floc able to decompose phenol by the mixed culture of bacteria isolated from activated sludge. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 21: 41-49.
- Tago, Y., Yokota, A. (2004):** *Comamonas badia* sp. nov., a floc-forming bacterium isolated from activated sludge. *J Gen Appl Microbiol.* 50(5):243-8
- Takayama, K., Kjelleberg, S. (2000):** The role of RNA stability during bacterial stress responses and starvation. *Environ Microbiol.* 2(4):355-65
- Tamaoka, J., Ha, D.M., Komagata, K. (1987):** Reclassification of *Pseudomonas acidovorans* den Dooren de Jong 1926 and *Pseudomonas testosteroni* Marcus and Talalay 1956 as *Comamonas acidovorans* comb. nov. and *Comamonas testosteroni* comb. nov., with an emended description of the genus *Comamonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:52-59.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007):** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 24(8):1596-9
- Tardy, G. (2005):** Szennyvíztisztítási Műveletek - Környezeti Biológia tantárgyi jegyzet. BME. 1-15
- Teske, A., Alm, E., Regan, J. M., Toze, S., Rittmann, B. E., Stahl, D. A. (1994):** Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *J Bacteriol.* 176(21):6623-30
- Thomas, J. C., Berger, F., Jacquier, M., Bernillon, D., Baud-Grasset, F., Truffaut, N., Normand, P., Vogel, T. M., Simonet, P. (1996):** Isolation and characterization of a novel gamma-hexachlorocyclohexane-degrading bacterium. *J Bacteriol.* 178(20):6049-55
- Thomsen, T. R., Blackall, L. L., de Muro, M. A., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H. (2006):** *Meganema perideroedes* gen. nov., sp. nov., a filamentous alphaproteobacterium from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol.* 56(Pt 8):1865-8
- Toh, S. K., Ashbolt, N. J. (2002):** Adaptation of anaerobic ammonium-oxidising consortium to synthetic coke-ovens wastewater. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59(2-3):344-52

- Utaaker, J. B., Bakken, L., Jiang, Q. Q., Nes, I. F. (1995):** Phylogenetic analysis of seven new isolates of ammonia-oxidizing bacteria based on 16S rRNA gene sequences. *System. Appl. Microbiol.* 18: 549-559.
- Vadivelu, V. M., Keller, J., Yuan, Z. (2007):** Free ammonia and free nitrous acid inhibition on the anabolic and catabolic processes of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*. *Water Sci Technol.* 56(7):89-97
- Vaneechoutte, M., Rossau, R., De Vos, P., Gillis, M., Janssens, D., Paepe, N., De Rouck, A., Fiers, T., Claeys, G., Kersters, K. (1992):** Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol Lett.* 72(3):227-33
- Vanparys, B., Spieck, E., Heylen, K., Wittebolle, L., Geets, J., Boon, N., De Vos, P. (2007):** The phylogeny of the genus *Nitrobacter* based on comparative rep-PCR, 16S rRNA and nitrite oxidoreductase gene sequence analysis. *Syst Appl Microbiol.* 30(4):297-308
- Vasileva-Tonkova, E., Galabova, D., Stoimenova, E., Lalchev, Z. (2008):** Characterization of bacterial isolates from industrial wastewater according to probable modes of hexadecane uptake. *Microbiol Res.* 163(4):481-6
- Vazquez, I., Rodriguez, J., Maranon, E., Castrillon, L., Fernandez, Y. (2006a):** Simultaneous removal of phenol, ammonium and thiocyanate from coke wastewater by aerobic biodegradation. *J Hazard Mater.* 137(3):1773-80
- Vazquez, I., Rodriguez, J., Maranon, E., Castrillon, L., Fernandez, Y. (2006b):** Study of the aerobic biodegradation of coke wastewater in a two and three-step activated sludge process. *J Hazard Mater.* 137(3):1681-8
- Vazquez, I., Rodriguez-Iglesias, J., Maranon, E., Castrillon, L., Alvarez, M. (2007):** Removal of residual phenols from coke wastewater by adsorption. *J Hazard Mater.* 147(1-2):395-400
- Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K. E., Nelson, W., Fouts, D. E., Levy, S., Knap, A. H., Lomas, M. W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y. H., Smith, H. O. (2004):** Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science.* 304(5667):66-74
- Vogelaar, J. C. T., De Keizer, A., Spijker, S., Lettinga, G. (2005):** Biofloculation of mesophilic and thermophilic activated sludge. *Water Research.* 39(1):37-46
- von Wintzingerode, F., Gobel, U. B., Stackebrandt, E. (1997):** Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev.* 21(3):213-29
- von Wintzingerode, F., Schattke, A., Siddiqui, R., Rosick, U., Gobel, U., Gross, R. (2001):** *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51(4):1257-1265
- Voytek, M. A., Ward, B. B. (1995):** Detection of ammonium-oxidizing bacteria of the beta-subclass of the class Proteobacteria in aquatic samples with the PCR. *Appl Environ Microbiol.* 61(4):1444-50
- Wagner, M., Loy, A. (2002):** Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Curr Opin Biotechnol.* 13(3):218-27
- Wagner, M., Loy, A., Nogueira, R., Purkhold, U., Lee, N., Daims, H. (2002):** Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 81(1-4):665-80
- Wagner, M., Smidt, H., Loy, A., Zhou, J. (2007):** Unravelling microbial communities with DNA-microarrays: challenges and future directions. *Microb Ecol.* 53(3):498-506
- Watanabe, K., Hino, S. (1996):** Identification of a functionally important population in phenol-degrading activated sludge with antisera raised against isolated bacterial strains. *Appl Environ Microbiol.* 62(10):3901-4

- Weidler, G. W., Dornmayr-Pfaffenhuemer, M., Gerbl, F. W., Heinen, W., Stan-Lotter, H. (2007):** Communities of archaea and bacteria in a subsurface radioactive thermal spring in the Austrian Central Alps, and evidence of ammonia-oxidizing Crenarchaeota. *Appl Environ Microbiol.* 73(1):259-70
- Winogradsky, S. (1949):** *Microbiologie du Sol: Problemes et Methodes.* S. Paris: Masson et Cie. 861 pp.
- Woese, C. R., Fox, G. E. (1977):** Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(11):5088-90
- Wood, A. P., Kelly, D. P., McDonald, I. R., Jordan, S. L., Morgan, T. D., Khan, S., Murrell, J. C., Borodina, E. (1998):** A novel pink-pigmented facultative methylotroph, *Methylobacterium thiocyanatum* sp. nov., capable of growth on thiocyanate or cyanate as sole nitrogen sources. *Archives of Microbiology.* 169(2):148-158
- Yabuuchi, E., Yamamoto, H., Terakubo, S., Okamura, N., Naka, T., Fujiwara, N., Kobayashi, K., Kosako, Y., Hiraishi, A. (2001):** Proposal of *Sphingomonas wittichii* sp. nov. for strain RW1(T), known as a dibenzo-p-dioxin metabolizer. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51(2):281-292
- Yamada, T., Sekiguchi, Y., Imachi, H., Kamagata, Y., Ohashi, A., Harada, H. (2005):** Diversity, Localization, and Physiological Properties of Filamentous Microbes Belonging to Chloroflexi Subphylum I in Mesophilic and Thermophilic Methanogenic Sludge Granules. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(11):7493-7503
- Yamasaki, M., Matsushita, Y., Namura, M., Nyunoya, H., Katayama, Y. (2002):** Genetic and immunochemical characterization of thiocyanate-degrading bacteria in lake water. *Appl Environ Microbiol.* 68(2):942-6
- Yan, X., Xu, Z., Feng, X., Liu, Y., Liu, B., Zhang, X., Zhu, C., Zhao, L. (2007):** Cloning of environmental genomic fragments as physical markers for monitoring microbial populations in coking wastewater treatment system. *Microb Ecol.* 53(1):163-72
- Yanagi, M., Yamasato, K. (1993):** Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiol Lett.* 107(1):115-20
- Yoon, M. H., Im, W. T. (2007):** *Flavisolibacter ginsengiterrae* gen. nov., sp. nov. and *Flavisolibacter ginsengisoli* sp. nov., isolated from ginseng cultivating soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57(Pt 8):1834-9
- Youatt, J. B. (1954):** Studies on the metabolism of *Thiobacillus thiocyanoxidans*. *J Gen Microbiol.* 11(2):139-49
- Zhang, X., Gao, P., Chao, Q., Wang, L., Senior, E., Zhao, L. (2004):** Microdiversity of phenol hydroxylase genes among phenol-degrading isolates of *Alcaligenes* sp. from an activated sludge system. *FEMS Microbiol Lett.* 237(2):369-75
- Zhao, J. S., Ward, O. P. (1999):** Microbial degradation of nitrobenzene and mono-nitrophenol by bacteria enriched from municipal activated sludge. *Can J Microbiol.* 45(5):427-32
- Zouari, H., Moukha, S., Labat, M., Sayadi, S. (2002):** Cloning and sequencing of a phenol hydroxylase gene of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain MH1: a bacterium able to mineralize various aromatic compounds. *Appl Biochem Biotechnol.* 102-103(1-6):261-76

VIII. MELLÉKLETEK

VIII.1. Anyag és módszer kiegészítés

VIII.1.1. Alap protokollok

VIII.1.1.1. DNS extrakció és tisztítás

1. Mintasűrítés: A -20°C -on tárolt mintákat felengedése után 5000 g sebességgel 5 percig centrifugáljuk, majd a felülúszó óvatos leöntése után a pelletet a fölötte maradt körülbelül 5 mL felülúszóban szuszpendáljuk, és 700 μL -es adagonként 2 mL-es csövekbe osztjuk szét.
2. Sejtfeltárás: A kimért mintákhoz kb. 200 μL steril üvegyöngyöt, 20 mg PVPP-t (polivinil-polipirrolidon) és a 600 μL CLS-TC oldatot (Fast DNA® Kit, Bio101® Systems, Q-BIOgene, MP Biomedicals, Irvine, CA, USA). adunk. A PVPP a huminsavakat és fenolos vegyületeket köti meg. A CLS-TC oldat a sejtek lízisét, valamint a DNázok és egyéb fehérjék inaktiválódását segíti elő. Ezt az oldatot 2 percig sejtmalomban (Vibrogen-Zellmühle, Edmund Bühler, Hechingen, Németország) rázatjuk.
3. DNS tisztítása: A szétroncsolódott sejtek maradványaitól a vízdékony DNS-t centrifugálással (5 perc, 14 000 g, 4°C) választjuk el. A felülúszóból a DNS-t a szilikamembrános V-gene Bacterial Genomic DNA Mini-prep Kit (V-gene Biotechnology Limited, Hangzhou, China) segítségével tisztítjuk meg, annak 5. lépésétől. A tisztított DNS-t 40 μL DEPC kezelt vízben (Carl Roth) eluáltuk, és további felhasználásig -20°C -on tároljuk.
4. Ellenőrzés: Az izolált DNS mennyiségét, méretét és tisztaságát agaróz gélelektroforézissel ellenőrizzük (VIII.1.1.2. pont).

VIII.1.1.2. Agaróz gélelektroforézis

VIII.1.1.2.1. Felhasznált oldatok

| | | |
|--------------------------------|--------------|-----------|
| 10x TBE oldat (pH 8,3): | Tris | 107,8 g/L |
| | bórsav | 55 g/L |
| | EDTA | 7,4 g/L |
| Töltő puffer: | glicerin | 30 V/V% |
| | brómfenolkék | 0,25 mM |

VIII.1.1.2.2. Gélkészítés és elektroforézis

1. 100 mL 1x TBE oldatba (bidesztillált. vízzel tízszeresére hígított 10x TBE oldat) kimérjük a megfelelő mennyiségű agarózt: 1 g 1%-os és 2 g 2%-os gél esetén.
2. Az oldatot felforraltjuk.
3. Az oldatot kb. 50°C-ra hűtjük, és bemérünk 5 µL 100 g/L koncentrációjú etidium-bromid oldatot.
4. Még folyékony állapotban kiöntjük a gélt egy megfelelő fésűkkel ellátott kádba, ahol 30-40 perc alatt megszilárdul.
5. A mintákat a töltőpufferrel való összekeverés után a zsebekbe töltjük, ill. melléjük 1,2 µL-t a megfelelő DNS markerből (Fermentas) is betöltünk.
6. A megfelelő feszültségen és ideig elektroforetizáljuk a mintákat.
7. Áteső UV fényben detektáljuk a mintákat.

VIII.1.1.2.3. Az agaróz gélelektroforézis jellemzői különböző alkalmazások esetén

| | Izolált közösségi DNS | PCR termékek | RFLP |
|----------------------------|--|-------------------|-------------------|
| Gél sűrűség | 1% | 1% | 2% |
| Mintamennyiség | 5 µL | 5 µL | 10 µL |
| Töltőpuffer | 3 µL | 3 µL | 6 µL |
| Molekulasúly marker | Lambda DNA / EcoRI + HindIII Marker, 3 | pUC Mix Marker, 8 | pUC Mix Marker, 8 |
| Feszültség | 100 V | 100 V | 80 V |
| Idő | 20 perc | 20 perc | 40-50 perc |

VIII.1.1.3. Klónozás

VIII.1.1.3.1. Előkészítés

VIII.1.1.3.1.A. PCR termék tisztítás

A klónozási reakciók előtt ajánlott a PCR termékek tisztítása, hogy megszabaduljunk a PCR során keletkezett primer dimerektől, amik a klónozás során ugyanúgy beépülhetnek a vektorba, rontva ezzel a folyamat hatékonyságát. Ehhez a szilikamembrán alapú PCR-M™ Clean Up System (Viogene, Proteogenix, Illkirch Cedex, France) használjuk, annak leírása szerint.

VIII.1.1.3.1.B. LB (Luria-Bertani lemezek)

Mindkét munkánk során használt klónozó rendszer esetén ampicillin-tartalmú, megfelelően előkészített LB lemezek szükségesek a transzformált sejtek tenyésztéséhez. Ezeket a következőképpen készítjük el:

1. LB tápleves összemérése:

| | |
|---|------|
| tripton | 10 g |
| élesztő kivonat | 5 g |
| NaCl | 10 g |
| agar | 15 g |
| <hr/> | |
| végtérfogat (felönt dH_2O -zel) | 1 L |

2. NaOH segítségével beállítjuk a pH-t 7,0 értékre.
3. Az oldatot autoklávozzuk (120°C, 1,2 bar, 15 perc), majd hagyjuk hűlni.
4. Kb. 55°C-osan, az agar szilárdulása előtt bemérjük az ampicillint (50 µg/mL).
5. A táplevest 10 cm átmérőjű lemezekre öntjük, hagyjuk megszilárdulni, majd felhasználásig 4°C-on tároljuk.

Közvetlenül a transzformált sejtek szélesztése előtt a lemezeket 37°C-on előmelegítjük, valamint 20 µL 80 µL/mL koncentrációjú dimetilformamidban (DMF) oldott X-gal és 40 µL 100 mM koncentrációjú IPTG oldatot szélesztünk szét rajtuk.

VIII.1.1.3.2. Klónok feldolgozása

Az egyes gyártók által megadott protokolloknak megfelelően transzformált kompetens sejtekből a következő lépésekben nyerünk ki a további vizsgálatokra alkalmas monomolekuláris PCR termékeket:

1. Az ampicillin-tartalmú LB lemezekre szélesztett transzformált sejteket 24 órán keresztül 37°C-on inkubáljuk.
2. A kinőtt pozitív (fehér) telepeket steril fogpiszkálóval átpontozzuk egy újabb X-gal és IPTG nélküli LB lemezre, hogy a szabad szemmel nehezen látható kolóniák és az összenőtt telepek okozta problémákat minimalizáljuk.
3. A lemezeket újabb 24 óráig inkubáljuk.
4. A kinőtt telepeket steril fogpiszkálóval leszedjük, és 50 µl steril dH_2O -ban szuszpendáljuk.
5. A sejtek feltárása céljából 5 percig 98°C-on denaturáljuk azokat.
6. A szuszpenziót 2 percig 14 000 g sebességgel centrifugáljuk, majd a DNS-t tartalmazó felülúszóból dolgozunk tovább.
7. A minket érdeklő inszertet a plazmidokból az azt keretező M13 primerkötőhelyek segítségével szaporítjuk fel az M13 forward és reverse primerek (VIII.1.2.1. pont) használatával összeállított PCR reakcióelegyben (VIII.1.3.1. pont) a VIII.1.4.3. pont. hőprofiljával.
8. A kapott PCR termékeket 1 %-os agaróz gélben ellenőrizzük (VIII.1.1.2. pont). Az inszert PCR termékénél kb. 200 bp-ral hosszabb terméket várunk.

VIII.1.1.4. Etanol precipitáció

VIII.1.1.4.1. Kiindulási reakció elegy

| | |
|-------------------------|---------|
| Na-acetát (3 M; pH 4,6) | 3 µL |
| etil alkohol (95%-os) | 62,5 µL |
| dH ₂ O | 14,5 µL |
| <hr/> | |
| tisztítandó minta | 20 µL |

VIII.1.1.4.2. Precipitáció menete

1. A reakció elegyet 20 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk.
2. 20 percig 14 000 g sebességgel 20°C-on centrifugáljuk, majd a felülúszót leöntjük.
3. A pellettez 250 µL 70 %-os etanolt adunk.
4. 10 percig 14 000 g sebességgel 20°C-on centrifugáljuk, majd a felülúszót leöntjük.
5. A csöveket vákuumcentrifugában kb. 12 percig szárítjuk.
6. A pelletet további felhasználásig -20°C-on tároljuk.

VIII.1.1.5. Szekvenca-analízis

Minden esetben a Sanger-féle stop-nukleotidos módszer automatizált változatát alkalmazzuk. A kérdéses DNS-szakasszal olyan PCR amplifikációt végzünk, amiben nem csak dezoxi-nukleotidok (dNTP-k), hanem lézerrel gerjeszthető csoportokat tartalmazó dideoxi-nukleotid-analógok is vannak, amelyek beépülésükkor megállítják a polimerizációt. Így különböző hosszúságú, a beépült nukleotid-analógnak megfelelően különböző gerjesztési színű fragmenteket kapunk, amelyek később kapilláris elektroforézissel szétválaszthatók (VIII.1.1.6. pont).

A szekvenciák egyértelmősége érdekében a szekvenáló reakcióban mindig csak az egyik primert használjuk, ahogy ezt a VIII.1.3.3. pont reakcióelegyénél láthatjuk. A templátot a reakció előtt mindig megtisztítjuk a PCR-M™ Clean Up System (Viogene) segítségével, annak leírása szerint. Az amplifikációt a VIII.1.4.5. pont hőprofilja szerint végezzük.

A különböző hosszúságú és jelölésű termékek elválasztását a VIII.1.1.6. pontban leírtaknak megfelelően történik. A kapott nyers szekvenciákat minden esetben a kromatogramokkal összevetve javítjuk.

VIII.1.1.6. Kapilláris elektroforézis

VIII.1.1.6.1. Elektroforézisnek alávetett elegyek

VIII.1.1.6.1.A. TRFLP

| | |
|--------------------------------|------------|
| formamid | 12 µL |
| TAMRA 500 (Applied Biosystems) | 0,65 µL |
| minta | 0,5 – 4 µL |

A TAMRA 500 egy molekulásúly standard, melyben TAMRA (karboxi-tetrametil-rodamin) fluoreszcens festékkel jelölt meghatározott hosszúságú, 35 – 500 bázishossz közötti DNS fragmentek találhatóak. Mivel a TAMRA az általunk használt TET-jelöléstől eltérő hullámhosszon fluoreszkál, lehetővé válik a TRFLP csúcsok méretének meghatározása. A minta mennyiségét a megadott tartományban empirikusan határozzuk meg úgy, hogy a TRFLP mintázatban a jelek se túl gyengék ne legyenek, mert az rontja a módszer érzékenységét, se túl erősek („túllőtt csúcsok”), mert akkor se a fragmentek pontos méretét, se egymáshoz viszonyított arányukat nem lehet meghatározni.

VIII.1.1.6.1.B. Szekvencia-analízis

Az etanol precipitáció pelletjét 24 µL Template Suppression reagensben (Applied Biosystems) oldjuk fel.

VIII.1.1.6.2. Elektroforézis elegyek előkészítése

1. A 0,6 mL-es speciális csövekbe (Applied Biosystems) mért elegyeket 5 percig 95°C-on denaturáljuk.
2. A denaturált mintákat azonnal jégre rakjuk.
3. A csöveket megfelelő sorrendben az ABI Prims™ 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems) automatikus mintaadagoló tálcájába rakjuk, és elindítjuk a vizsgálatot.

VIII.1.1.6.3. Kapilláris elektroforézis paraméterei

| | TRFLP | Szekvencia-analízis |
|------------------------|---|-----------------------------|
| Futtató polimer | POP ^{§§} 4™ (Applied Biosystems) | POP 6™ (Applied Biosystems) |
| Feszültség | 15 kV | 12,2 kV |
| Hőmérséklet | 60°C | 50°C |
| Idő | 28 perc | 110 perc |

§§ Performance Optimized Polymer

VIII.1.2. Primerek és restrikciós endonukleázik jellemzői

VIII.1.2.1. A használt primerek szekvenciája

| Név | Pozíció | Szekvencia |
|----------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| 27F | <i>E. coli</i> : 8-27 | 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3 |
| 519R | <i>E. coli</i> : 519-536 | 5'-GWA TTA CCG CGG CKG CTG-3' |
| amoA-1F | <i>Nsm. europaea</i> : 332-349 | 5'-GGG GTT TCT ACT GGT GGT-3' |
| amoA-2R | <i>Nsm. europaea</i> : 802-822 | 5'-CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC-3' |
| M13F | | 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3' |
| M13R | | 5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3' |

K= G vagy T; S= G vagy C; W = A vagy T.

VIII.1.2.2. A használt restrikciós endonukleázok tulajdonságai

| Név | Hasítóhely | Ajánlott puffer | Ajánlott inkubációs hőmérséklet és mód |
|---------------------|--------------------------|---------------------|---|
| <i>AluI</i> | 5' AG [^] CT 3' | Tango TM | 37°C; 0,6 mL-es cső; vízfürdő |
| <i>BsuRI</i> | 5' GG [^] CC 3' | R | 37°C; 0,6 mL-es cső; vízfürdő |
| <i>Csp6I</i> | 5' G [^] TAC 3' | B | 37°C; 0,6 mL-es cső; vízfürdő |
| <i>Hin6I</i> | 5' G [^] CGC 3' | Tango TM | 37°C; 0,6 mL-es cső; vízfürdő |
| <i>MspI</i> | 5' C [^] CGG 3' | Tango TM | 37°C; 0,6 mL-es cső; vízfürdő |
| <i>TaqI</i> | 5' T [^] CGA 3' | <i>TaqI</i> | 65°C; 0,2 mL-es cső; fűtött tetejű PCR készülék |
| <i>Tas</i> | 5' [^] AATT 3' | B | 65°C; 0,2 mL-es cső; fűtött tetejű PCR készülék |

VIII.1.3. Az alkalmazott molekuláris biológiai reakciók összetétele

VIII.1.3.1. PCR (*Taq* DNA Polymerase LC recombinant, Fermentas)

| | |
|---|--------|
| 10X puffer | 5 µL |
| MgCl ₂ (25 mM) | 4 µL |
| dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP mind 1 mM) | 10 µL |
| forward primer (0,03 mM) | 0,5 µL |
| reverse primer (0,03 mM) | 0,5 µL |
| <i>Taq</i> polimeráz (1 U/µL) | 1 µL |
| dH ₂ O | 28 µL |
| templát | 1 µL |
| <hr/> | |
| végtérfogat | 50 µL |

VIII.1.3.2. RT (RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase, Fermentas)

| | | |
|--------|--|--------|
| 1. mix | RNS templát | 5 µL |
| | random hexamer primer (100 µM) | 1 µL |
| | dH ₂ O | 6 µL |
| <hr/> | | |
| 2. mix | 5X puffer | 4 µL |
| | RiboLock™ RNáz inhibitor (2 U/µL) | 0,5 µL |
| | dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP mind 10 mM) | 2 µL |
| | RevertAid™ H Minus M-MuLV reverz transzkriptáz | 1 µL |
| <hr/> | | |
| | végtérfogat | 20 µL |

VIII.1.3.3. Szekvenáló reakció (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems)

| | |
|--------------------|-------|
| 5X puffer | 3 µL |
| Ready Reaction mix | 2 µL |
| dH ₂ O | 8 µL |
| templát | 6 µL |
| <hr/> | |
| végtérfogat | 20 µL |

VIII.1.3.4. Restriktációs hasítás (Conventional restriction enzymes, Fermentas)

| | |
|-------------------|---------|
| puffer | 2 µL |
| Enzim (10 U/µL) | 0,1 µL |
| dH ₂ O | 11 µL |
| templát | 7 µL |
| <hr/> | |
| végtérfogat | 20,1 µL |

VIII.1.4. Alkalmazott reakció hőprofilok

VIII.1.4.1. PCR *amoA* gén genomi és nem-genomi DNS-ből való amplifikációjára

| | | | |
|-----------|------|--------|---------------------|
| 35 ciklus | 95°C | 5 min | kezdeti denaturáció |
| | 57°C | 45 sec | anneláció |
| | 72°C | 30 sec | extenzió |
| | 94°C | 1 min | denaturáció |
| | 60°C | 45 sec | anneláció |
| | 72°C | 10 min | végző extenzió |

VIII.1.4.2. PCR 16S rRNS gén genomi DNS-ből való amplifikációjára

| | | | |
|-----------|------|--------|---------------------|
| 32 ciklus | 98°C | 5 min | kezdeti denaturáció |
| | 94°C | 10 sec | <i>Taq</i> bemérés |
| | 94°C | 30 sec | denaturáció |
| | 52°C | 30 sec | anneláció |
| | 72°C | 1 min | extenzió |
| | 72°C | 10 min | végző extenzió |

VIII.1.4.3. PCR M13 primerrel és 16S rRNS gén nem-genomi DNS-ből (cDNS, klón vagy PCR termék) való amplifikációjára

| | | | |
|-----------|------|--------|---------------------|
| 32 ciklus | 95°C | 5 min | kezdeti denaturáció |
| | 94°C | 30 sec | denaturáció |
| | 52°C | 30 sec | anneláció |
| | 72°C | 30 sec | extenzió |
| | 72°C | 7 min | végző extenzió |

VIII.1.4.4. RT reakció random hexamer primerekkel

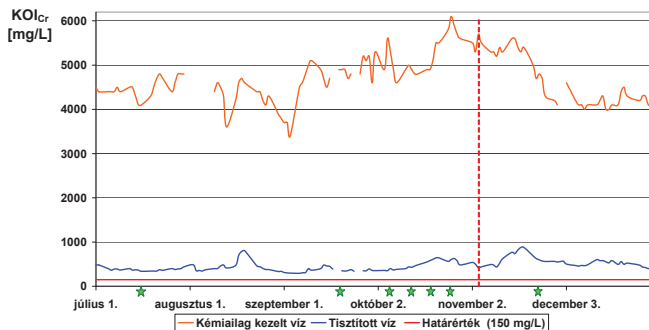
| | | | |
|-------------|------|--------|---------------------|
| 1. mix | 65°C | 5 min | kezdeti denaturáció |
| 1. + 2. mix | 25°C | 10 min | anneláció |
| | 45°C | 60 min | extenzió |
| | 70°C | 10 min | enzim denaturáció |

VIII.1.4.5. Szekvenáló reakció

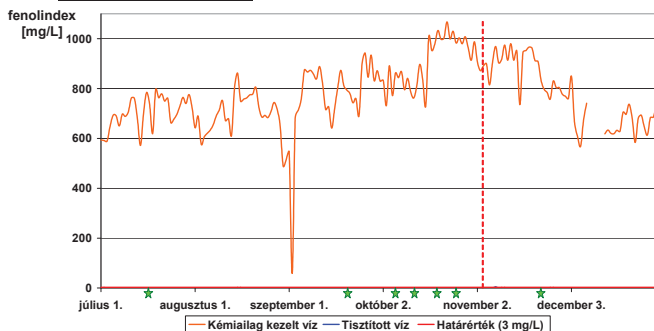
| | | | |
|-----------|------|--------|-------------|
| 28 ciklus | 96°C | 10 sec | denaturáció |
| | 50°C | 5 sec | anneláció |
| | 60°C | 4 min | extenzió |

VIII.2. Az ISD-K szennyvízkezelő fizikai és vízkémiai paramétereinek az alakulása a vizsgált időszakban^{***}

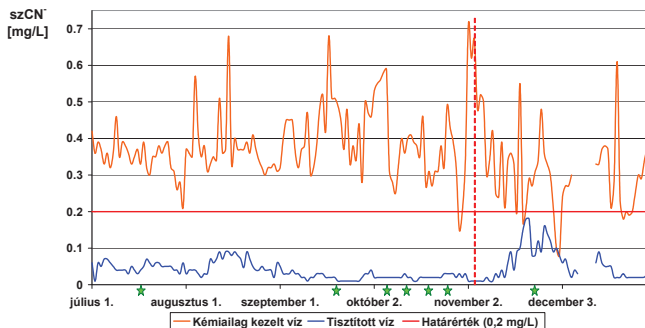
VIII.2.1. KOI érték alakulása



VIII.2.2. Fenolindex alakulása

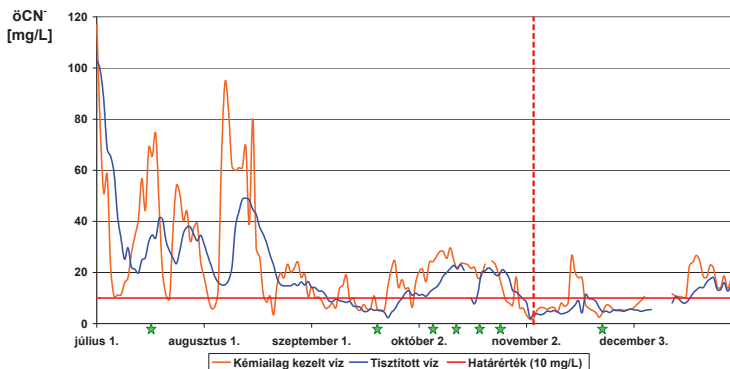


VIII.2.3. Szabad cianid koncentráció alakulása

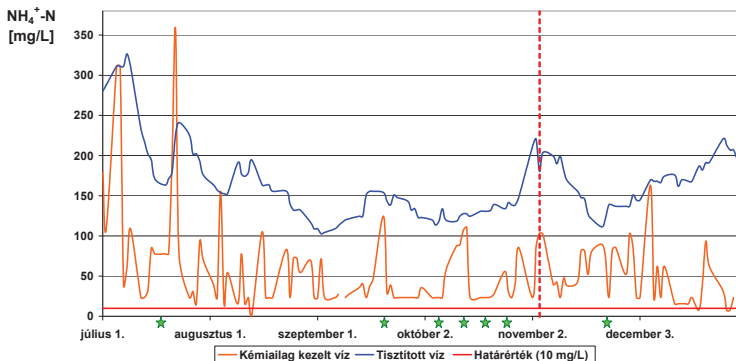


^{***} Független piros szaggatott vonallal jelölve az egylépcsős üzemmenetről kétlépcsősre való átállás időpontja.

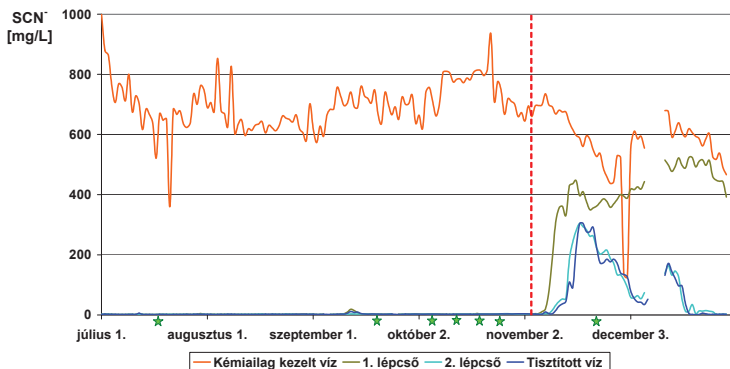
VIII.2.4. Összes cianid koncentráció alakulása



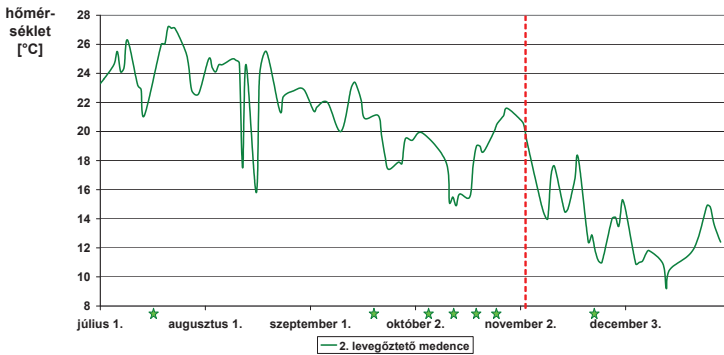
VIII.2.5. Ammónium koncentráció alakulása



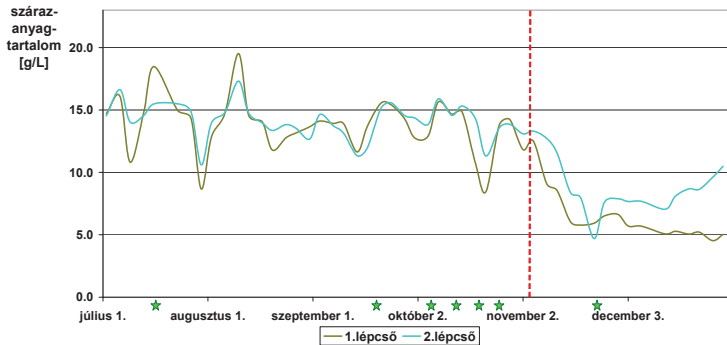
VIII.2.6. Rodanid-nitrogén koncentráció alakulása



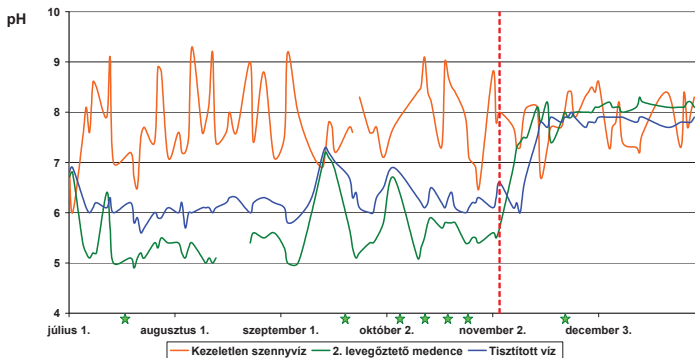
VIII.2.7. Hőmérséklet



VIII.2.8. Szárazanyagtartalom



VIII.2.9. pH érték alakulása



VIII.3. Gyakran használt rövidítések jegyzéke

| | |
|------------------------|--|
| AmoA | ammónia-monooxigenáz A alegysége (dőlt betűvel az azt kódoló gén) |
| anammox | anaerob ammónia-oxidáció |
| AOA | ammónia-oxidáló archeák |
| AOB | ammónia-oxidáló baktériumok |
| BOI₅ | biológiai oxigénigény (20°C-on, öt napos mérés) |
| bp | Bázispár |
| C23O | katekol 2,3- dioxigenáz |
| DEPC | Dietilpirokarbonát |
| DGGE | denaturáló grádiens elektroforézis |
| DLVO | Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek flokkulációt leíró modell |
| DpSzT | Dél-pesti Szennyvíztisztító Telep |
| EBPR | serkentett biológiai foszfáteltávolítás (Enhanced Biological Phosphate Removal) |
| EPS | extracelluláris polimerek (Extracellular Polymeric Substances) |
| FISH | fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció |
| FISH-MAR | fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció - mikroautoradiográfia |
| GAO | glikogén akkumuláló szervezetek (Glycogen Accumulating Organism) |
| ISDK | ISD Kocszoló Kft. (ISD DUNAFERR Zrt. alvállalata) |
| KK | kémiailag kezelt víz (ISD-K előkezelt, biológiai egységre befolyó szennyvíze) |
| KOI | kémiai oxigénigény |
| LE | lakosegényérték (szennyvíz) |
| NOB | nitritoxidáló baktériumok |
| PAO | polifoszfát akkumuláló szervezetek (Polyphosphate-Accumulating Organism) |
| PCR | polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction) |
| PHA | polihidroxí-alkanoát |
| PHB | polihidroxí-butirát |
| PVPP | polivinil-polipirrolidon |
| RDP | Ribosomal Database Project (rRNS szekvencia adatbázis) |
| RFLP | restriktív fragmenthossz polimorfizmus (Restriction Fragment Length Polymorphism) |
| RI | recirkuláltatott iszap |
| RT | reverz transzkripció |
| SIP | stabil izotóp próba |
| TGGE | termális grádiens gélelektroforézis |
| TRF | terminális restriktív fragment |
| TRFLP | terminális restriktív fragment hossz polimorfizmus (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) |
| VKI | EU Víz Keretirányelve |

IX. ÖSSZEFOGLALÓ

Az elmúlt évtizedekben a mikrobiális ökológia hatalmas fejlődésen ment keresztül. Mégis, gyors és egyszerű, szennyvíztisztítás mikrobiológiai kutatásában használható monitorozó eljárásokra továbbra is nagy az igény. Ezen értekezésben a TRFLP molekuláris ujjlenyomat módszer alkalmazhatóságát elemeztük egy kommunális szennyvíztisztító biofilmes nitrifikáló medencéinek és egy ipari (kokszolóművi) eleveniszapos szennyvízkezelőnek a vizsgálatán keresztül.

A kommunális szennyvíztisztítóknál általánosan tapasztalható az elfolyók ammónium koncentrációjának évszakos ingadozása. Munkánk során az ammónia-monooxigénáz (*amoA*) gén alapú TRFLP eljárás fejlesztéseként egy több mint ezer szekvencia TRF adatait tartalmazó adatbázist hoztuk létre, amelynek segítségével az ujjlenyomatok domináns csúcsai könnyen azonosíthatók. Az így végzett azonosítás ellenőrzésére RFLP segítségével szelektált monomolekuláris klónok szekvencia-analízist végeztünk el. A kifejlesztett módszerrel két egymást követő évben követtük nyomon a nitrifikáló medencék AOB közösségét.

Az első évben TRFLP mintázat alapján 4-5 különböző, a *Nitrosomonas europaea* és *Nsm. oligotropha* ágakba tartozó AOB csoportot azonosítottunk a medencékben. A klónok szekvencia-analízise azonban csak két csoport jelenlétét igazolta, továbbá pszeudo-TRF-eket mutatott ki a közösségi ujjlenyomatokban. A következő évben, a medencék üzemeltetésében végzett fejlesztéseket követően a közösséget már csak egy domináns, biofilmekhez köthető, kizárólag tenyésztetlen tagokból álló *Nsm. europaea* ágba tartozó filotípus jellemezte.

A kokszolóművi szennyvíztisztítóban egy fenollal, rodaniddal, cianáttal és ammóniummal erősen szennyezett vizet kezelnek. Az eleveniszapos tisztítás hatására a legtöbb szennyező megfelelő hatásokkal eltávolítódik, a rodanid esetében azonban előfordulnak időszakos kilengések. Munkánk célja a levegőztetett medencék, ezeddig ismeretlen mikrobiótájának a megismerése, és a rodanidbontás hatásokromlás okainak a feltárása volt. Ehhez a közösséget kódolt és expresszált 16S rRNS gén TRFLP ujjlenyomat alapján követtük nyomon, valamint domináns tagjait klónszekvenciák segítségével azonosítottuk.

Eredményeink alapján stabil működés esetén a közösség domináns tagjának a fenoldegradáló *Comamonas badia* bizonyult, míg csökkent rodanidbontással jellemzett időszakban helyét a szintén fenolbontó *Pseudomonas putida* vette át. A közösség 90 %-át sikeresen azonosítottuk, így a rodanidbontó *Thiobacillus* nemzetség tagjait is. Az RNS alapú ujjlenyomatok sokkal változatosabbak voltak időben, mutatva ezzel ennek az alkalmazásnak az előnyeit aktivitás monitorozás esetén. A rodanidbontás visszaesés legfőbb okaként a hirtelen hőmérséklet csökkenést, és az azzal párhuzamosan végzett üzemmenet váltást találtuk.

Összességében eredményeink alapján a TRFLP eljárást alkalmaznánk találtuk, mint közösség monitorozó módszert. Kidolgoztunk egy gyors és egyszerű AOB közösség monitorozó eljárást, amellyel igazoltuk egy műszaki fejlesztés kedvező mikrobiológiai hatását. A kokszolóművi szennyvíz esetén feltártuk a rodanidbontás hatásokromlásának okait, és megoldására olyan javaslatot tudtunk tenni, amely a későbbiekben hosszútávon megoldotta azt.

X. SUMMARY

In the last decades microbial diversity analyses have developed in an extremely fast way. However, quick and easy methods suitable for regular checks of biological systems like wastewater treatment facilities are still demanded. In this thesis the use of TRFLP molecular fingerprinting technique was tested as a monitoring tool to analyze the ammonia-oxidizing bacteria (AOB) of the nitrifying basins of a communal wastewater treatment plant and to follow up the bacterial changes of an activated sludge treating the effluent of a coke plant.

In communal wastewater treatment ammonium concentration in the effluent shows seasonal fluctuation, therefore monitoring of the AOB is greatly needed. In our work TRFLP analysis of the ammonia-monooxygenase (*amoA*) gene was improved by creating a database of the possible TRFs of more than 1000 *amoA* sequences. The phylogenetic affiliation of the groups corresponding to the dominant TRFs was deduced from the database and the results were compared with cloning-sequencing method. The developed monitoring system was used two follow up the changes of the AOB community of the nitrifying basins for 2 years.

The first year five different groups corresponding to *Nitrosomonas europaea* and *Nsm. oligotropha* lineage were present in the samples. The sequence analysis of the clones confirmed the deduced phylogenetic affiliation of two phylotypes, but also helped us identify the presence of pseudoTRFs in the fingerprints. Next year, following an operational upgrade, nitrogen-removal occurred in the basins and only members of a biofilm related, uncultured phylotype of *Nsm. europaea* lineage were detected in the samples.

In the case of the coke plant's effluent the activated sludge process has to treat a high strength wastewater containing phenols, cyanide, thiocyanate and ammonium. The biological treatment usually removes phenols but the removal efficiency of thiocyanate is unbalanced. The aim of the monitoring was to understand the biological processes during purification, especially concerning the instability of thiocyanate removal. The temporal changes in the bacterial community were followed by TRFLP analysis of coded and expressed 16S rRNA genes. Furthermore community TRFs were identified by comparison with TRFLP pattern of clones.

Community fingerprints resulted that the aeration tanks were dominated by a phenol degrading phylotype, *Comamonas badia*. However, in the decreased thiocyanate removal samples it was substituted by *Pseudomonas sp.*. Members of the thiocyanate degrading *Thiobacillus* genus were also present in the samples. The community composition changes were more pronounced when analyzed at RNA level. It was supposed that the main reasons of unbalanced thiocyanate removal are temperature decrease and drastic changes in the operation of the plant.

In conclusion, the results of our monitoring studies proved the suitability of TRFLP as a microbial community monitoring tool. In the case of AOBs, a suitable monitoring system was developed and the biological efficacy of an operational upgrade was confirmed. While in the case of coke plant's effluent the microbial reasons of the reduced thiocyanate removal were revealed, a technological solution was proposed and successfully applied to solve the problem.