

XXXII. OTDK Biológia Szekció, Pécs

2015. április 8-10.

A cekendi csurgalékvíz mikrobiális diverzitásának vizsgálata különleges tenyésztési technikákkal

Szerzők:

Fikó Dezső Robert,

Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Műszaki és Társadalomtudományi Kar,
Csíkszereda, Fenntartható biotechnológiák MSc I. év;

Tankó György,

Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Műszaki és Társadalomtudományi Kar,
Csíkszereda, Fenntartható biotechnológiák MSc I. év;

Témavezetők:

dr. Máthé István egyetemi docens,

dr. Kovács Erika egyetemi adjunktus,

Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Műszaki és Társadalomtudományi Kar,
Csíkszereda, Biomérnöki Tanszék;

Tartalomjegyzék

Kivonat	3
1. Bevezető	4
1.1. A csurgalékvíz jellemzése	6
1.2. A csurgalékvíz főbb komponensei és környezeti hatásuk	7
1.3. A csurgalékvíz mikrobiológiája	9
2. Célkitűzések	9
3. Anyag és módszer	10
3.1. A mintavételi helyszín jellemzése	10
3.2. Kémiai vizsgálati módszerek	10
3.2.1. Mintavételezés	10
3.3. A csurgalékvíz fiziko-kémiai paramétereinek meghatározása	11
3.3.1. Helyszíni mérések	11
3.3.2. Laboratóriumi vizsgálatok	11
3.4. Mikroorganizmusok izolálása	12
3.5. <i>In situ</i> tenyésztés és izolálás	14
3.6. Csíraszám meghatározása	15
3.7. A baktériumok molekuláris szintű meghatározása 16S riboszomális DNS szekvenálással	15
3.8. Agaróz gélelektroforézis (AGE)	16
3.9. Polimeráz láncreakció (PCR)	16
3.10. Baktériumtörzsek identifikálása	17
4. Eredmények és kiértékelésük	18
4.1. Fiziko-kémiai tulajdonságok kiértékelése	18
4.2. A csíraszám meghatározás eredményei	20
4.3. Az izolálás és baktériumtörzsek azonosításának eredményei	20
4.3.1. Potenciálisan új baktériumtörzsek	20
5. Következtetések	27

6. Köszönetnyilvánítás	28
7. Irodalomjegyzék.....	29
8. Mellékletek.....	31

Kivonat

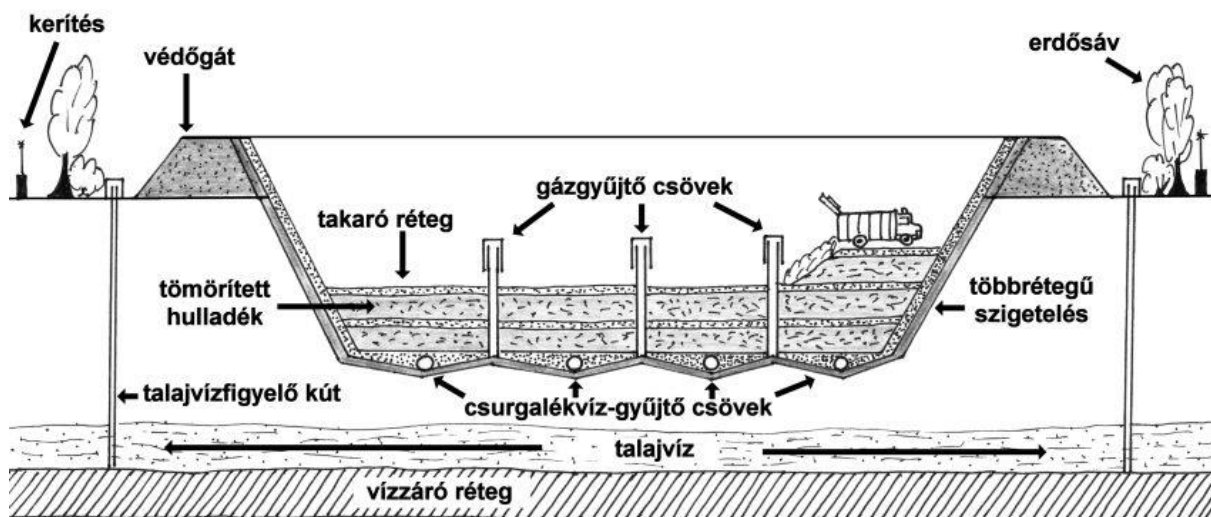
Kutatásunk célja a cekendi hulladéktározó csurgalékvizében előforduló mikrobiális közösség biodiverzitásának, működésének a feltárása, jó biodegradációs képességgel rendelkező baktériumtörzsek izolálása. A hagyományos mikrobiális izolálási technikák mellett újszerű, *in situ* tenyésztési módszert is alkalmaztunk. A helyszíni vizsgálatok során elvégeztük a csurgalékvíz fiziko-kémiai vizsgálatait, mely adatok a laboratóriumi tenyésztés alapjául szolgáltak speciális agar illetve gelzán alapú táptalajok összeállításában. Az *in situ* tenyésztés során poliuretán kockákat itattunk át egyedi összetételű táptalajokkal, amelyeket egy hónapon keresztül a csurgalékvizes reaktor medencéjében inkubáltuk, majd ezekről izoláltunk baktériumtörzseket. A mikrobák identifikálása 16S rDNS báziselemzés alapján történt.

A fiziko-kémiai eredmények alapján elmondható, hogy a cekendi csurgalékvíz nitrogén, foszfor valamint szervesanyag tartalma magas. A csurgalékvíz tenyészthető mikrobaközössége nagy diverzitású, a 73 izolált baktériumtörzs 42 különböző fajhoz tartozik, közülük több feltehetően a tudomány számára új faj. A kimutatott baktériumok változatos anyagcserével rendelkeznek, előfordulnak közöttük jó szervesanyagbontók (szénhidrát-, zsírsav-, fehérje-bontók), denitrifikálók, nitrátredukálók.

1. Bevezető

A szilárd hulladékgazdálkodás koncepciója az indiai városokban már Kr. e. 3500-ban megfogalmazódott, ahol a hulladéktározók szigetelését téglalapozással illetve -drénnekkel oldták meg. Ezt követően Kr. e. 1900-ban a szennyvízelvezetést (a vízöblítéses illemhelyeket is beleértve) is megoldották Knossos városában, valamint a Római Birodalomban bevezették a szemetelés szabályozását (Foo és Hameed, 2009). Manapság az egész világon, de a kevésbé fejlett országokban, a hulladék depóniákba való tárolása még mindig a legkézenfekvőbb hulladékártalmatlanítási megoldás (Fernandes et al., 2013). Napjainkban a szilárd kommunális hulladék 80%-a kerül lerakásra bármilyen előválogatás nélkül (Ziyang et al., 2009).

A hulladéklerakó mind fizikai, kémiai és biológiai szempontból komplex heterogén rendszer, amelyre hatást gyakorolnak a hidrológiai viszonyok, a hulladék összetétele, tömörsége, a hőmérséklet és a szezonális nedvességtartalom változás (Foo és Hameed, 2009). Az 1. ábra egy korszerű hulladéklerakót ábrázol a kiszolgáló berendezésekkel együtt. Az újszerű hulladéklerakók környezetkárosító hatásának csökkentése érdekében többrétegű fóliarétegekkel szigetelik (lásd 2. ábra), így megakadályozható a csurgalékvíz talaj, felszíni- és talajvízbe történő migrációja. A hulladéklerakók aljzatának szigetelésére legelterjedtebben valamilyen ásványi anyagú szigetelő rétegre helyezet geomembránt használnak, ami mintegy barrierként szolgál a hulladéklerakó és a természetes környezet között (Hoor és Rowe, 2012).

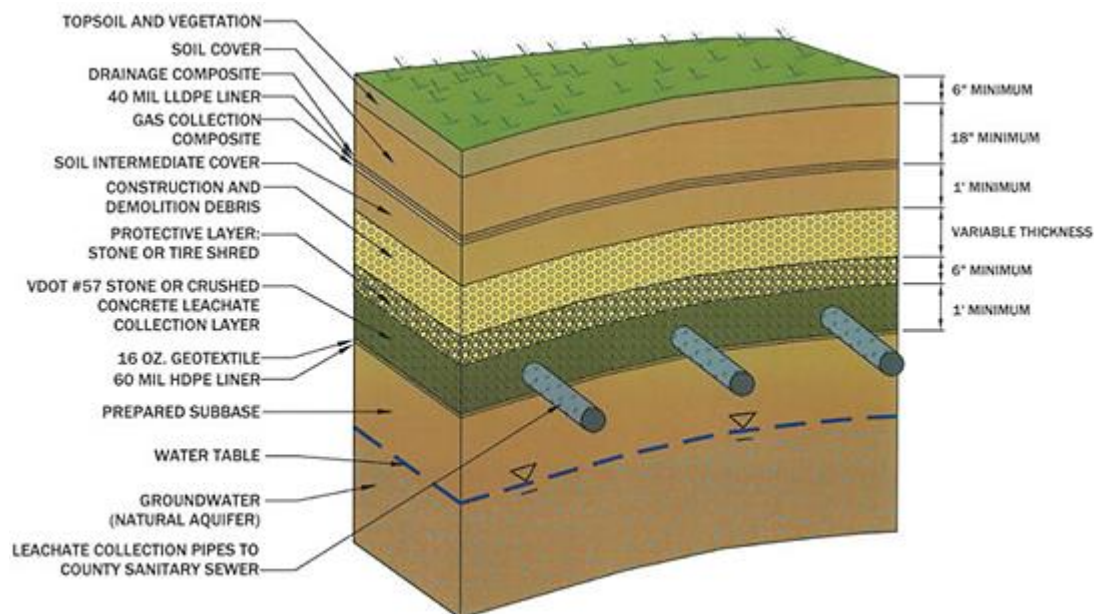


1. ábra. A hulladéklerakó szerkezeti felépítése.

(Forrás: www.hulladek-suli.hu)

A hulladék lebomlása során keletkező gáz a depóniagáz, valamint a keletkező folyadék a csurgalékvíz (Camba et al., 2014). A hulladéklerakók legtoxikusabb alkotója a csurgalékvíz,

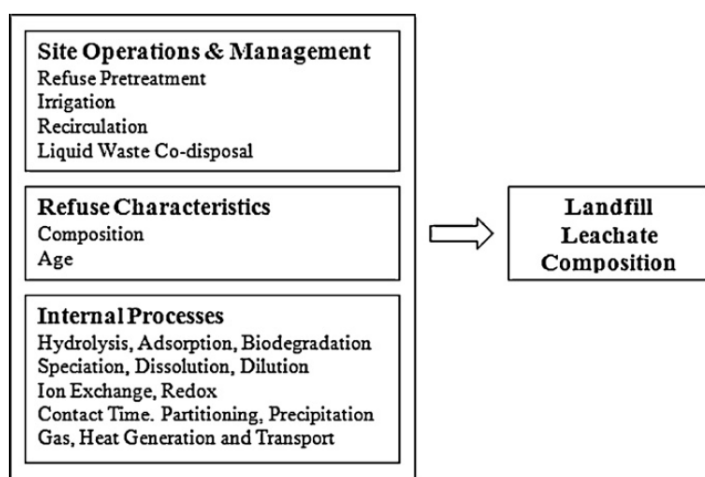
ami az összetételében magas koncentrációban megtalálható mérgező és karcinogén komponenseknek tulajdonítható, mint például a nehézfémek és szerves anyagok.



2. ábra. Hulladéklerakók szigetelési rendszere

(Forrás: www.theeastendlandfill.com)

Továbbá, a csurgalékvíz mikroorganizmusokkal is terhelt, megemlíthetjük az aerob, pszichrofil és mezofil, a coliform és fekálcoliform, valamint a spóráképző baktériumokat, beleértve a *Clostridium perfringens*-t és a fonalas gombákat is (Gajski et al., 2012). A csurgalékvíz összetételét számos tényező befolyásolja, mint például a hulladéklerakó kora, a csapadékmennyiség, az évszakos vízmozgások, valamint a hulladék típusa és összetétele is (lásd 3. ábra).



3. ábra. A csurgalékvízösszetételét meghatározó tényezők.

(Forrás: Foo és Hameed, 2009)

A kommunális hulladéklerakók csurgalékvizéből több mint 200 szerves vegyületet identifikáltak. A kémiai oxigén igény (KOI) 140-152000 mg/L, míg az ammónia-nitrogén 50-2200 mg/L koncentráció között mozog. Erre az extrém élőhelyre jellemző az elektron donorok (ammónium) felhalmozódása, míg az elektron akceptorokból hiány van (Foo és Hameed, 2009). Általában a csurgalékvíz szén-nitrogén aránya, és alkalinitása alacsony, így a konvencionális nitrifikációs és denitrifikációs eljárásokon alapuló tisztítási eljárások nehézkesek (Puig et al., 2012). Számos szennyező képes szelektivitást kiváltani vagy a mikrobiális anyagcsere-folyamatokat befolyásolni, amely meghatározza a mikrobák közötti kölcsönhatásokat és az együttélést is.

Ezek a szélsőséges és változékony élőhelyeken különböző mikroorganizmusok élnek együtt és egymással kölcsönhatásban. Számos tanulmány számol be a hulladéklerakók különböző mélységeiben, a csurgalékvízben, és a depónia alatti talajrétegekben előforduló mikrobiotáról. Molekuláris módszerekkel kimutattak *Clostridium*-ot, metanogén és metanotróf populációkat is.

Mivelhogy a csurgalékvíz a környezetre nézve potenciális szennyezőforrásként tekinthető, és befolyásolja a vízi ökoszisztémák biodiverzitását, továbbá a táplálékláncot is, kezelése elengedhetetlen a befogadóba kerülése előtt (Gajski et al., 2012).

A biológiai kezelésen alapuló szennyvíztisztítás egyszerűsége, megbízhatósága és magas költséghatékonysága miatt legáltalánosabban alkalmazott módszer, amely lehetővé teszi a szervesanyag és nitrogén eltávolítását a csurgalékvizekből (Puig et al., 2012).

Gyakorlati szempontból fontos a hulladéklerakók csurgalékvíz mikrobiális közösségének feltárása a hulladéklerakóban lezajló biodegradációs folyamatok megértése érdekében.

1.1. A csurgalékvíz jellemzése

A csurgalékvizet általánosan úgy jellemezhetjük, mint az a hulladéklerakóból vagy szemétteléből távozó szennyezett folyadék, amely származhat a csapadék hulladékokon való átszivárgásából, a biodegradációs folyamatok révén keletkező vízből, valamint magából a hulladékból is (Foo és Hameed, 2009; Zhang et al., 2012).

Konkrétabban, a csurgalékvíz egy olyan szerves és ásványi komponenseket tartalmazó elegy, amely akkor keletkezik, amikor a víz áthatol a hulladék rétegeken, kiold számos szennyező komponenst és ezáltal összetett kölcsönhatások mennek végbe. A nedvességtartalom elég magas ahhoz, hogy ez a folyadék a gravitáció és a kicsapódás, a csapadék, az öntözés, a

hóolvadás, a recirkuláció, a folyékony hulladék, a talajvíz beáramlása hatására áramlani kezdjen.

Normális körülmények között, a csurgalékvíz alávándorol a hulladéktömeg pórusain, és a korszerűen kialakított hulladéklerakók szigetelése által összegyűjtve az alacsonyabb szintekre igyekeznek, ahol végül egy aknában vagy tároló tartályba gyűl össze. Így a lehetséges mennyisége a vízmérleg alapján becsülhető, ami magába foglalja a hulladéklerakóba bemenő, a biokémiai folyamatok során felhasznált és a vízgőz által eltávozott vizet is (Foo és Hameed, 2009).

1.2. A csurgalékvíz főbb komponensei és környezeti hatásuk

A csurgalékvíz összetételének ismerete utal a hulladéklerakóban lejátszódó folyamatok típusára és állapotára, valamint a hulladék-mátrix oldhatóságára, továbbá útmutatásul szolgálhat egy esetleges havária esetén elvégezendő szükséges beavatkozásra.

A vegyes hulladéknak köszönhetően, a csurgalékvíz különböző szennyezőanyagokat tartalmaz, amelyeket 4 főcsoportra bonthatunk (Fernandes et al., 2013):

- oldott szervesanyag;
- szervesetlen makrovegyületek (tápanyagok);
- nehézfémek;
- szervesetlen és szerves xenobiotikumok.

A csurgalékvíz legnagyobb hányadát az oldott szerves anyag teszi ki, amely összetétele nagyon változó vegyületeket tartalmaz, a metántól (CH_4), az egyszerű illékony zsírsavakon át egészen a nagy molekulatömegű komplex molekulákig terjed, amelyeket aromás szénhidrogének, fenolok, alifás klórvegyületek, fulvo- és huminsavak alkotják.

Egy másik fontos összetevő a szervesetlen makro vegyületek csoportja, ide tartoznak a kalcium (Ca^{2+}), magnézium (Mg^{2+}), nátrium (Na^+), kálium (K^+), ammónium (NH_4^+), vas (Fe^{2+}), mangán (Mn^{2+}), klorid (Cl^-), szulfát (SO_4^{2-}) és hidrogén-karbonát (HCO_3^-) ionok, amelyekhez társulnak a nehézfémek is (arzén, kadmium, króm, kobalt, réz, ólom, higany, nikkel és cink).

A szerves xenobiotikumok aránya kevés, származhatnak a háztartások hulladékából, az ipari vegyszerekből, valamint a feldolgozóipar iszapjából is, és a szerves szénhidrogének, a fenolok, alifás klórvegyületek széles skáláját foglalják magukba.

A csurgalékvizet legjobban a kémiai-oxigénigénnyel (KOI), az összes szerves szén, biológiai-oxigénigény (BOI), a BOI/KOI arány, pH, oldott lebegőanyag, ammónium-nitrogén

($\text{NH}_4^+ - \text{N}$), Kjeldahl nitrogén, baktérium csíraszám, turbiditás és nehézfém tartalommal jellemezhetjük (Foo és Hameed, 2009).

A hulladéklerakóban zajló degradációs folyamatok, négy egymásra épülő szakaszban valósulnak meg:

1. aerob szakasz; 2. hidrolízis és fermentációs szakasz; 3. anaerob acetogenezis szakasz; és 4. anaerob metánképzés szakasz. Az egyes szakaszok között dinamikus egyensúly áll fenn, és mindegyik szakasz az előző szakasztól függ. A kémiai környezet változása meghatározza a mikrobiális közösség változását is, ami a továbbiakban a depóniagáz és csurgalékvíz keletkezését befolyásolja.

Az 1. táblázat foglalja össze a fiatal, középkorú és stabilizált hulladéklerakók csurgalékvizének jellemző összetételét. A fiatal acetogén hulladéklerakó csurgalékvizét magas kémiai-oxigénigény (KOI) (30000-60000 mg/L), biológiai-oxigénigény (BOI) (4000-13000 mg/L), mérsékelt magas ammónium nitrogén (500-2000 mg/L), magas BOI/KOI arány (ami elérheti a 0,4-0,7-es értéket) és pH=4 jellemzi, magas biodegradábilis illékony zsírsav koncentráció mellett. A metántermelési szakaszban, a csurgalékvizben jelentős mennyiségben felhalmozódnak az ellenálló, nehezen kezelhető, magas KOI értékű anyagok, bomlanak az illékony zsírsavak, a szervesanyag mennyiség csökken, a pH értéke 7 fölé növekedik.

Az idő előrehaladtával (20-50 év) és az anaerob bontás dominálásával a csurgalékvíz stabilizálódik, magas molekulatömegű (nehezen bontható fulvo- és huminsavak) anyagok halmozódnak fel, az ammónium-nitrogén 3000-5000 mg/L, mérséklődik a KOI (5000-20000 mg/L) és a BOI/KOI arány 0,1-re csökken (Foo és Hameed, 2009).

1. táblázat. A csurgalékvíz fontosabb jellemzői a hulladéklerakó életkorához viszonyítva (Foo és Hameed, 2009).

Csurgalékvíz típusa	Fiatal	Középkorú	Stabilizált
Kor (évek)	<5	5-10	>10
pH	<6,5	6,5-7,5	>7,5
KOI (mg/L)	>10,000	4,000-10,000	<4000
BOI ₅ /KOI	0,5-1,0	0,1-0,5	<0,1
Szerves vegyületek	80%-ban illékony zsírsavak	5-30% illékony zsírsav + fulvo- és huminsavak	Fulvo- és huminsavak
Ammónia-nitrogén (mg/L)	<400	–	>400
Összes szerves szén/KOI	<0,3	0,3-0,5	>0,5
Kjeldahl nitrogén (g/L)	0,1-0,2	–	–
Nehézfémek (mg/L)	Kevéstől mérsékeltig	Kevés	Kevés
Biodegradálhatóság	Jelentős	Közepes	Alacsony

A gyengén irányított hulladéklerakók csurgalékvíze potenciális hidrogeológiai szennyező forrást jelenthet. A csurgalékvíz kikerülhet a környezetbe, a felszín alatti víztesteket szennyezheti, így jelentős mennyiségű szinergista, karcinogén, akut toxicitást, és genotoxicitást kiváltó vegyülettel terhelheti a környezetünket. Relatív sok, több mint 100 veszélyes vegyületet azonosítottak a heterogén hulladéklerakók csurgalékvizéből (aromás vegyületek, halogénezett vegyületek, fenolok, növényvédőszeres, nehézfémek és ammónium-ion), melyek közül számos akkumulálódni képes és fenyegetést jelent a vízi életformákra, ökológiára, táplálékláncre (Foo és Hameed, 2009; Gajski et al., 2012).

1.3. A csurgalékvíz mikrobiológiája

A baktérium és archea közösségek benépesítik a kommunális hulladéklerakó minden részét, szerepük van a biodegradációs folyamatokban, valamint a metánképzésben is.

Függetlenül a hulladéklerakók földrajzi helyétől és a mikrobiális tenyésztési módszerektől, elmondható, hogy túlnyomó többségben a *Firmicutes*-törzsek, továbbá a *Bacillaceae* és a *Clostridiaceae*-család tagjai vannak jelen, majd ezt követi az *Actinobacteria* és csekélyebb mennyiségben a *Proteobacteria*-törzsek képviselői.

Egy másik közös vonás az, hogy az archeák diverzitása a *Methanomicrobiales* és *Methanosarcinales* rend tagjaira korlátozódik, és e két rend domináns nemzetsége a *Methanoculleus* és *Methanosarcina* (Krishnamurthi és Chakrabarti, 2012).

A hulladéklerakó és csurgalékvíz mikrobiális diverzitását korábban csak tenyésztésen alapuló módszerekkel vizsgálták. A hagyományos tenyésztésen-alapuló technikák korlátai miatt a csurgalékvíz mikrobiális közösségét illetően ismereteink korlátozottak, így fontos olyan új tenyésztési technikák kifejlesztése, amely segítségével a nem ismert baktériumok feltárhatók és tulajdonságaik vizsgálhatók. Az újszerű molekuláris módszerekkel történő vizsgálatok lehetővé teszik a tenyésztésbe nem vihető mikrobák feltárását, de hátrányuk, hogy nem kapunk tiszta tenyészetet, ezért szükséges a tenyésztési technikák újítása, fejlesztése.

2. Célkitűzések

- a cekendi csurgalékvíz fiziko-kémiai jellemzése, és mikrobiális diverzitásának vizsgálata;
- újszerű tenyésztésen-alapuló technikák kifejlesztése ismert illetve a tudomány számára új baktériumfajok izolálása céljából;

- a szennyezett környezetből származó baktériumok izolálása és azonosítása, jó biodegradációs képességgel rendelkező törzsek szelektálása további bioremediációs célokra.

3. Anyag és módszer

3.1. A mintavételi helyszín jellemzése

Kutatásunk során a mintákat a cekendi hulladéktározó csurgalékvizéből gyűjtöttük. A cekendi hulladéktározó Romániában, Hargita megye dél-nyugati részén, Székelyudvarhelytől 6 km-re keletre található a Cekend-fensíkon. Földrajzi koordinátái 46°18'15,31" É-i szélesség és 25°22'55,9" K-i hosszúság. A hulladéktározó 2009-óta működik és az első európai normáknak is megfelelő hulladéktározó Hargita megyében. A tározó összkapacitása közel 1 millió m³, 20 ha alapterületű, amelyből jelenleg 5,5 ha van beépítve, e területen található egy gyűjtőcella, tartalék tározók, csurgalékvíz-medence, csapadékvíz-medence és a kiszolgáló épületek.



4. ábra. A cekendi regionális hulladéklerakó és környezete.

(Forrás: www.pamoramio.com)

3.2. Kémiai vizsgálati módszerek

3.2.1. Mintavételezés

A vízmintákat egy szakaszos betáplálású (Sequencing Batch Reactor, SBR) biológiai medencéből vettük, a medence 1200 m³ térfogatú, 18,5 m hosszú, 14,5 m széles, 3 m mély, és 15 m³/nap térfogatáramra van méretezve. A tisztítás a következő szakaszokból áll:

1. Anoxikus fázis, amely során denitrifikáció történik (nitrát-, nitrit-nitrogénátalakítás N₂-gázzá), amely 8 órát tart;
2. Aerob fázis, levegőztetéssel megoldott szerves anyag eltávolítás (8 óra);

3. Fázisszéttválasztás, eleveniszap és az előtisztított szennyvíz szeparációja anaerob körülmények között. A kezelt szennyvíz a székelyudvarhelyi kommunális csatornarendszerbe kerül (4 óra);

4. A fölősiszap eltávolítása (4 óra).



5. *ábra.* A cekendi csurgalékvizes reaktormedence, előtérben a hat „mikrobiális csapda”

A kevertetett csurgalékvizes reaktorból a vízkémiai illetve mikrobiológiai vizsgálatokhoz szükséges mintákat 2013. június 20.-án és 2013. július 20.-án vettük akkumulátorhoz kapcsolt búvárszivattyú segítségével, majd a mintákat steril műanyag edényekben lehűtve szállítottuk, a feldolgozásig 4°C-on tároltuk.

3.3. A csurgalékvíz fiziko-kémiai paramétereinek meghatározása

3.3.1. Helyszíni mérések

A víz fiziko-kémiai paramétereit *Hanna HI 9828 hordozható multiparaméteres mérőkészülék* segítségével végeztük, melyek során mértük a víz hőmérsékletét, pH-ját, oldott oxigén tartalmát és vezetőképességét.

3.3.2. Laboratóriumi vizsgálatok

A vízkémiai tulajdonságok meghatározására (NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- , Fe, Cl_{tot} , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , KOI) *Hanna HI 83099* típusú spektrofotométert és *Hanna kit*-eket használtunk, a gyártó előírásainak megfelelően.



6. ábra. Hanna HI 9828 hordozható multiparaméteres mérőkészülék (balra), és Hanna HI 83099 spektrofotométer (jobbra).

(Forrás: www.hannainst.com)

3.4. Mikroorganizmusok izolálása

A tápközegek elkészítésének alapjául az R2A tápoldat szolgált (Medium 830, www.DSMZ.de), de figyelembe vettük a csurgalékvíz fiziko-kémiai tulajdonságait (pH, szervesanyag-, N-, P-tartalom) és ennek megfelelően módosítottuk a jellemzőit (pl. csökkentettük a szerves komponensek arányát, változtattunk a pH-n) (lásd 2. táblázat). A táptalaj szilárdításához az agaron kívül gelzánt is használtunk.

A vízmintákból hígítási sorokat készítünk (10^{-5} -ig) majd a 2. táblázatban található (CA, CG) szilárd táptalajokra szélesztettünk 0,1 mL vízmintát. Az így előkészített lemezzagarokat több héten át szobahőmérsékleten (20-25°C) inkubáltuk. A különböző morfológiájú telepeket felvettük és szélesztési technikával tiszta baktériumtörzseket izoláltunk, amelyeket kémcsövekben ugyanazon táptalajon tároltunk.

Az izolált baktériumokat az adott táptalajokon és kémcsövekben 4°C-on, ugyanakkor, -84°C-on Thermo Fisher Scientific „Protect Plus Bacterial Preservation System” gyöngyökben és az izolált DNS-eket -20°C-on tároltuk.

2. táblázat. A baktériumok izolálására használt táptalajok összetétele

Tápközeg	Összetétel
<i>R2A tápleves</i>	- 0,5 g élesztőkivonat, - 0,5 g pepton, - 0,5 g kazein hidrolizátum, - 0,5 g glukóz, - 0,5 g keményítő, - 0,3 g nátrium piruvát, - 0,05 g magnézium szulfát, - 0,3 g K₂HPO₃ - 1,33 g CaCl₂ - pH = 7,2, 25°C-on - autoklávozás 121°C-on, 15 percig
<i>CA táptalaj</i>	- 360 mL az R2A tápoldatból - 1,81 g NH₄Cl - 1L-ig desztillált víz hozzáadása - pH=8, steril NaOH oldattal - autoklávozás 121°C-on 15 percig - szilárdításhoz 20 g agar
<i>CG táptalaj</i>	- 360 mL az R2A tápoldatból - 1,81 g NH₄Cl - 1L-ig desztillált víz hozzáadása - pH=8, steril NaOH oldattal - autoklávozás 121°C-on 15 percig - szilárdításhoz 10 g gelzán

Rövidítések: CA-Cekend Agar, CG-Cekend Gelzán



7. ábra. A poliuretán hab átitatása a megfelelő tápközegben

3.5. *In situ* tenyésztés és izolálás

Az előbbieken ismertetett izolálási módszeren kívül, alkalmaztunk egy másik módszert is, egy úgynevezett *in situ* tenyésztési módszert. A módszer alapja, hogy poliuretán-habból 4x4x1 cm-es kockaidomokat készítettünk (Márialigeti et al., 2013), úgynevezett biológiai csapdákat. Az elkészített csapdákat 0,3 mm átmérőjű horgászszinórral és 15 mm átmérőjű acélsavarokkal együtt 121°C-on sterilizáltuk autoklávban 15 percig. Ezután a 2-es táblázatban szereplő steril táptalajokba merítettük a csapdákat, lehűtöttük és steril Petri-csészékben tároltuk.

A csapdákat a helyszínen úgy helyeztük el, hogy a víz felszíne alatt kb. 40 cm-re legyenek, ugyanakkor alkalmaztunk egy harmadik, tápoldatot nem tartalmazó csapdát is, összesen 6 db-ot (lásd 8. ábra). A kihelyezett csapdákat 1 hónapig hagytuk a helyszínen, 2013. június. 20 és 2013. július. 20 között, majd a mintavételezés befejeztével steril Petri-csészékben a laboratóriumba szállítottuk további feldolgozásra. A csapdából kis darabokat vágunk le, majd steril hígítási sort készítettünk. Az 2. táblázatban található tápoldatokból szilárd táptalajokat készítettünk (agar és gelzán segítségével), majd ezekre oltottunk át az oldatokból. Az így előkészített táptalajokat ragasztószalaggal lezártuk, majd szobahőmérsékleten több hétig inkubáltuk, végül izoláltuk a baktérium telepeket.



8. ábra. *In situ* tenyésztésre előkészített csapdák

3.6. Csíraszám meghatározása

A csíraszám meghatározásához a mintából hígítási sort készítettünk 10^{-1} – 10^{-6} hígításig, majd ezekből szilárd táptalajokat tartalmazó Petri-csészékre szélesztettünk 0,1 mL-t, 3 párhuzamos ismétlést végezve. 2-3 hét szobahőmérsékleten való inkubálás után a kifejlődött telepeket *Scienceware Mini Light Box* nagyító és elektromos számláló segítségével megszámoltuk, majd egy átlagos telepszámot határoztunk meg (TKE/mL).

3.7. A baktériumok molekuláris szintű meghatározása 16S riboszomális DNS szekvenálással

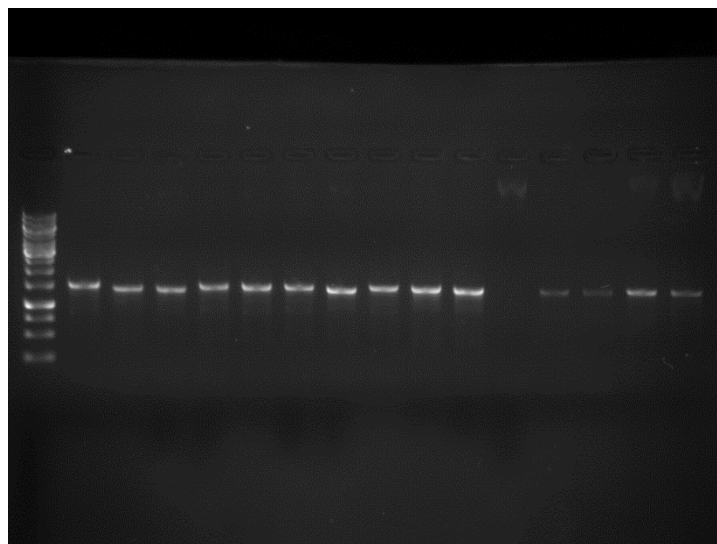
A kapott baktériumtörzsekből izoláltuk azok DNS-ét *Bioneer Accu Prep Genomic DNA Extraction Kit*-et alkalmazva, a gyártó használati utasításai követve.

Elő lépésben 1,5 mL-es Eppendorf csövekbe kimérünk 200 μ L Phosphate Buffered Saline (PBS) oldatot, melynek összetétele: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44g Na_2HPO_4 , 0,24 g KH_2PO_4 , pH=7,2 - 7,4. Ezt követően a tiszta tenyészetekből baktériumszuszpenziót oltottunk át, hozzáadtunk 20 μ L proteináz-K enzimet és 200 μ L Binding puffer oldatot, majd vortex segítségével elegyítjük. Ezek után az Eppendorf csöveket 60°C-ra beállított melegítő-rázató berendezésbe tettük 10 percre, majd 100 μ L izopropanolt adagoltunk hozzá és az oldatot egy szűrővel ellátott oszlopra pipettáztuk. 2 percre 12000 fordulat/percen (RPM) centrifugáltuk az oszlopokat, az átfolyót elöntjük, majd hozzáadunk 500 μ L W1 oldatot, ezek után 1 percre 8000 RPM-en ismét centrifugáltuk, az átfolyót elöntöttük, hozzáadtunk 500 μ L W2 oldatot és ismét 8000 RPM-en 1 percre centrifugáljuk. Az átfolyót ismét elöntöttük, üresen 12000 RPM-en centrifugáltuk az oszlopot, később 50 μ L enyhén melegített Elution Buffer oldatot pipettáztunk

az oszlop közepére, 5 percig szobahőmérsékleten tartottuk és végül 12000 RPM-en centrifugáltuk, az átfolyóban található a kivont DNS.

3.8. Agaróz gélelektroforézis (AGE)

A kapott DNS mintákat agaróz gélelektroforézissel (AGE) ellenőriztük UV detektálás segítségével. Első lépésben 1%-os agaróz gél készítettünk, 1 g agarózhoz 100 mL TAE (Tris-Acetat-EDTA) puffert adagoltunk, amelynek összetétele: 4,84 g TRIS, 1,142 mL ecetsav, 2 mL 0,5 M EDTA, pH=8. Következő lépésben a felmelegített oldatokhoz 5 µL RedSafe™ *iNtRON BIOTECHNOLOGY* Nucleic Acid Staining Solution-t adagoltunk, mely a DNS-hez kötődve UV fény hatására fluoreszkál és így lehetővé teszi detektálásukat. Az elkészített oldatot *Bio-Rad Power Pac* futtató kádba töltjük, fésű segítségével zsebeket alakítottunk ki, majd ezekbe molekulasúly markert illetve a vizsgálandó DNS izolátumokat pipettáztuk. A mintákat 90 V feszültségen 30 percig futtattuk, majd a gél *Bio-Rad Gel Doc XR* típusú UV detektáló készülékben lefényképeztük és számítógép segítségével elemeztük.



9. ábra. Az izolált DNS-ek ellenőrzése AGE segítségével.

3.9. Polimeráz láncreakció (PCR)

A baktériumok genomjának fajspecifikus 16S rDNS szakaszát 27 Forward és 1492 Reverse (*Fermentas*) univerzális primerek felhasználásával és PCR technika segítségével szaporítottuk fel. A két univerzális primer bázissorrendje, melyet a PCR reakció során alkalmaztunk a következők:

27F- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG

1492R- CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT

A DNS minták minősége szerint előkészítjük azokat a PCR technikához. 1,5 mL-es Eppendorfkba a minták száma szerint bemérünk 32,75 µL uspH_2O -t, 5 µL 10x PCR puffert,

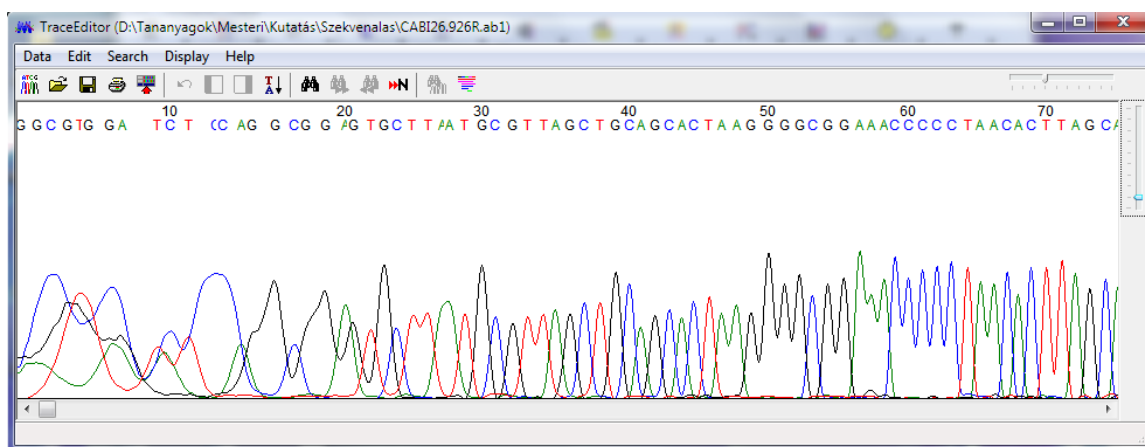
2 μL 10 mmol-os dNTP oldatot, 4 μL 25 mmol-os MgCl_2 oldatot, 2 μL 27 Forward primer oldatot, 2 μL 1492 Reverse primer oldatot és 0,25 μL Taq-polimeráz oldatot. Attól függően, hogy mennyi DNS van az adott mintákban 1, 2 vagy 3 μL DNS oldatot pipetázunk 49, 48 vagy 47 μL PCR oldathoz, vortex segítségével elegyítjük, majd egy PCR készülékbe helyezzük az Eppendorfokat és elindítjuk a programot.

3. táblázat. A PCR reakció során használt program

Lépés	Hőmérséklet	Idő	Ismétlés
Inicializálás	94°C	3 min	1
Denaturálás	94°C	30 sec	30
Primer bekötődés	46°C	30 sec	30
Elongáció	72°C	1 min	30
Végleges elongáció	72°C	7 min	1
Tároló hőmérséklet	4°C	-	-

3.10. Baktériumtörzsek identifikálása

A baktériumtörzsek 16S riboszomális DNS-ének bázissorrend elemzését az LGC Genomics (Németország) cég végezte.



9. ábra. Szekvenciák kiértékelése MEGA6 program segítségével

A 16S rDNS szekvenciánkat a MEGA6 (Tamura et al., 2011) ingyenesen hozzáférhető program segítségével dolgoztuk fel (lásd. 9. ábra) és az EzTaxon (Kim et al., 2012) internetes adatbázisában már meglévő szekvenciákhoz illesztettük. 97 százalékérték feletti szekvencia-hasonlóság esetén törzseink faji szintű identifikálása vált lehetővé.

4. Eredmények és kiértékelésük

4.1. Fiziko-kémiai tulajdonságok kiértékelése

A fiziko-kémiai vizsgálatokat 2013. június 20.-án és 2013. július 20.-án végeztük, ezen adatokat az 4. táblázatban rögzítettük.

4. táblázat. A fontosabb fiziko-kémiai tulajdonságok összefoglaló adatai

Fiziko-kémiai tulajdonságok	Cekendi ülepítő medence	
	2013.06.20.	2013.07.20.
DO (mg/L)	0	0
DO (%)	0	0
pH	8,68	8,45
T (°C)	22,96	22,75
ORP (mV)	7,08	16,47
Konduktivitás (μS/cm)	11658,48	11823,54
NO ₂ ⁻ (mg/L)	33	92
NO ₃ ⁻ (mg/L)	23,2	1040
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	<1	160
Fe (μg/L)	8360	20960
Cl _{tot} (mg/L)	0,32	<0,01
NH ₄ ⁺ (mg/L)	206,4	609,6
KOI (mg/L)	2104	5200
BOI (mg/L)	421	1045
Turbiditás (NTU)	151	187
PO ₄ ³⁻ (mg/L)	0,29	200

Mindkét mintavételi időpont esetében látható (4. táblázat), hogy a csurgalékvizes medencében az oldott oxigén (DO) koncentrációja 0 mg/L. Az oldott oxigén hiánya összefügg a viszonylag magas (≈23°C) hőmérséklettel és a magas szervesanyag tartalommal.

Az első mérés a csurgalékvizes reaktor anoxikus fázisában történt, ezt az oldott-oxigén koncentrációja is bizonyítja, mivelhogy nincs levegőztetés csak keverés így kevés oxigén oldódik be. A beoldódott oxigén mennyiségét az ammónia oxidálása (nitrifikáció) csökkenti leginkább, mivelhogy a BOI/KOI arány 0,2 körüli érték, így kevés a biológiailag bontható szerves anyagra elhasználható oxigén. Az ammónia koncentrációja, a pH és a hőmérséklet kedvez az kemolitoautotróf nitrifikáló baktériumoknak, így az oxigén nagy részét ők használják

el. Az első mérés esetében a nitrát koncentráció számottevően alacsonyabb, mint a második alkalommal mért érték, ez annak tulajdonítható, hogy első alkalommal az anoxikus körülményeken zajló denitrifikáció után történt a mérés, így végbemehetett a nitrát átalakulása nitrogénné, ami távozik a rendszerből. A második alkalom esetén a mérés az aerob fázis elején történt, így növekedik a nitrát mennyisége, mivelhogy az ammónia oxidálása intenzívebben zajlik. A második alkalom esetén mért magasabb KOI és BOI érték a korábbi eszéseknek köszönhető, ugyanis a hulladéklerakón áthaladó esővíz hatására megnő az oldott szerves anyag, ami az ammónia koncentrációjának növekedését is előidézi, az ammonifikációs folyamatok révén (Rafizul és Alamgir, 2012).

A csurgalékvíz pH-ja az egyik legfontosabb paraméter, ami meghatározza a csurgalékvízben előforduló vegyületek koncentrációját. Alacsony pH értékek mellett a fémek mobilitása megnő, ez főképp a fiatal hulladéklerakókra jellemző. A kommunális hulladék talajt és szervesanyagot is tartalmaz, melyek szorpciós kapacitása megnő magas pH értékek mellett. A hulladéklerakóban az anaerob savtermelő szakaszban keletkező zsírsavak bomlása következtében a pH értéke megugrik 7 és 8 közötti értékekre, ami a metanogén mikroorganizmusok tevékenységének tulajdonítható, így megnő a depóniagáz metántartalma és csökken a csurgalékvíz hidrogén és széndioxid tartalma (Rafizul és Alamgir, 2012).

A cekendi csurgalékvíz pH-ja enyhén bázikus ($\text{pH} \approx 8,5$). Ez a viszonylag magas pH érték a hulladéklerakó korához (5 év) képest magasnak mondható, a (Abd El-Salam és I. Abu-Zuid, 2014) szakirodalomban talált értékekhez képest ≈ 1 egységgel eltér. A pH értéke az acetogenezisfázis végére is utalhat, ami a szerves savak elbomlását jelzi. A magas pH, és az ammónia koncentrációból is arra következtethetünk, hogy a cekendi hulladéklerakó stabilizálódott, és a csurgalékvíz összetételét a környezeti hatások változása befolyásolja.

A víz hőmérséklete nem mutat jelentős változást a két mérési időpont között, mindkét esetben 23°C , ami a nitrifikáció szempontjából kedvező. A hőmérséklet jelentősen befolyásolja a víz gázoldó képességét, a mikrobiális anyagcsere folyamatok sebességét valamint a szerves illetve szervesetlen anyagok oldhatóságát.

A mért vezetőképesség mindkét alkalommal viszonylag magas értékű, eltérés a két időpont között nem jelentős. A vezetőképesség e magas értékei az összes sótartalommal, a makromolekulák bontásával hozható összefüggésbe, a biodegradáció során keletkezett szerves savak hozzájárulhatnak a vezetőképességhez növekedéséhez (Zhao et al., 2013).

A redox-potenciál (ORP) értéke pozitív ($+7,08 \text{ mV}$), így a csurgalékvízben oxidáló jellegű körülmények uralkodnak. A későbbi időpontban látható, hogy ez az érték növekedik ($+16,47 \text{ mV}$), ami a biodegradáció előrehaladását jelentheti.

Zhang et al. (2011) szerint a hulladéklerakó mikrobiális közösségének diverzitásában a pH, az oxigén-, és a metán-tartalom a kritikus tényezők. Ugyanakkor a KOI is fontos paraméter, általában a magasabb KOI értékekhez magasabb mikrobiális diverzitás társítható (Zhang et al., 2011). Az ammónium-ion egy másik tényező, amely inhibálja az anaerob bontást. (Kawai et al., 2012).

4.2. A csíraszám meghatározás eredményei

A cekendi hulladéktározó csurgalékvizéből vett minták csíraszámait az 5. táblázatban találhatók meg. Megfigyelhető, hogy a gelzán tartalmú táptalajokon magasabb a baktériumok száma, ugyanakkor az is látható, hogy a júliusi mintákban magasabb a csíraszám, ami a magasabb KOI-val és BOI-val függhet össze.

5. táblázat: Csíraszámok a különböző táptalajokon

Helyszín/Táptalaj		Csíraszám (TKE/mL)	
		2013.06.18	2013.07.19
Cekend	CA	$8,93 \cdot 10^6$	$2,66 \cdot 10^7$
	CG	$1,14 \cdot 10^7$	$1,66 \cdot 10^8$

4.3. Az izolálás és baktériumtörzsek azonosításának eredményei

A Petri-csészékben levő telepeket morfológiai jellemzőik alapján választottuk ki, amelyeket a 16S rDNS szekvenálás, a MEGA6 ingyenes program és EzTaxon adatbázis segítségével sikerült azonosítanunk. A cekendi hulladéktározó csurgalékvizéből összesen 73 törzset izoláltunk, amelyek 42 különböző baktériumfajhoz tartoznak. A 73 törzsből 47-et agar tartalmú táptalajról, míg 26-ot gelzán tartalmú táptalajról izoláltunk.

4.3.1. Potenciálisan új baktériumtörzsek

Az azonosítás során abban az esetben, ha az EzTaxon adatbázisban egy adott baktériumtörzs 16S rDNS hasonlósága az adatbázisban szereplő ismert fajhoz képest kevesebb, mint 97%, akkor nagy valószínűséggel elmondható, hogy új fajról van szó. Esetünkben a 42 fajból 9 különböző fajhoz tartozó törzsnek kisebb a hasonlósága, mint 97% (a 8. táblázatban félkövér betűkkel jelölve), amelyek feltehetően új fajok, ezek közül 5 törzset gelzános és 4 törzset pedig agaros táptalajon izoláltunk.

A 47 táptalajról izolált törzs közül 10 az *in situ* biológiai csapdákról származik, amelyek közül egy új fajnak bizonyult (CAJI-36), a többi 3 új faj a vízmintákból származik (CAI-18b; CAII-60; CAII-66). A 26 gelzánt tartalmazó táptalajon szaporított törzsek közül 7 a csapdából származik, ebben az esetben a potenciálisan 5 új faj a vízmintákból származik (CGI-09; CGI-

42; CGII-45; CGII-47; CGII-59). Az alábbi törzsek esetében elmondható – a nagyon alacsony bázispár hasonlóság miatt –, hogy nagy valószínűséggel nemcsak új fajokról van szó, de akár új nemzettségbe is tartozhatnak.

CGI-42 – *Herbaspirillum massiliense* (95,11% hasonlóság),

CGII-45 – *Herbaspirillum massiliense* (95,33% hasonlóság),

CGI-09 – *Oxalicibacterium horti* (91,72% hasonlóság),

CAII-66 – *Chelatococcus asaccharovorans* (95,17% hasonlóság).

A potenciálisan új fajok validitásáról pontosabb információkat csak komplexebb vizsgálatok után lehet mondani (morfológiai-, biokémiai-, sejtfalösszetétel vizsgálatok, DNS-DNS hibridizáció, stb).

6. táblázat. Az azonosított baktériumtörzsek összefoglaló táblázata és jellegzetes tulajdonságaik.

Identifikált baktériumfajok	Hőmérséklet (°C)	Aerob/Anaerob	pH	Szénforrásésenergiaforrás	Keményítő-bontás	Nitrát redukálás	Kazein bontás
<i>Acinetobacter towneri</i>	37-41			laktát és piruvát			
<i>Aquamicrobium aerolatum</i>	10-30	aerob	5,5-10	-			
<i>Bacillus mojavenensis</i>	5-50	aerob	5,3-5,7	L-arabinóz, cellobióz, fruktóz, glükóz, galaktóz, maltóz, mannitol, mannóz, L-ramnóz, ribóz, szalicin, szorbitol, szukróz, trehalóz	+	+	+
<i>Bacillus safensis</i>	10-50	aerob	5-6	D-glükóz, glicerol, L-arabinóz, ribóz, D-xilóz, galaktóz, fruktóz, mannóz, inzitol, mannitol, maltóz, szukróz, trehalóz, amigdalín, arbutin, szalicin, cellobióz,	-	-	+
<i>Bacillus stratosphericus</i>	8-37		6-10				
<i>Bacillus subtilissubsp.inaquosorum</i>	15-55	fakultatív aerob		citrát, amigdalín, glikogén, melibióz, D-glükóz, cellobióz, D-mannitol, D-szorbitol	+	+	+
<i>Bacillus thuringiensis</i>	10-37						
<i>Brevundimonas nasdae</i>	10–30	aerob		acetát, piruvát, metilpiruvát, szukcinát, aminosavak		-	
<i>Castellaniella defragrans</i>	30	fakultatív anaerob		acetát, propionát, aminobutirát, citrát, fumarát, glutarát, DL-3-hidroxi-butirát, DL-lactát, L-malát, 2-oxoglutarát, piruvát, L-alanin, L-aszpartát, L-leucin, L-ornitin, L-prolin, L-szerin		+	
<i>Castellaniella ginsengisoli</i>	25-42		5-9	adipát, kaprát, citrát, glukonát, laktát, L-malát, 3-4-hidroxi-benzoát, DL-3-hidroxi-butirát, acetát, fenilacetát, propionát, L-arabinóz, D-glükóz, maltóz, D-	-	+	-

				mannóz, D-mannitol, L-alanin, L-prolin, L-szerin			
<i>Chelatococcus daeguensis</i>	20-51		5,5-10			+	
<i>Herbaspirillum massiliense</i>	30-37	aerob				-	
<i>Hydrogenophaga taeniospiralis</i>				szerves savak, aminosavak, pepton		+	
<i>Hyphomonas polymorpha</i>	22-42	aerob	7-8	glutaminsav, aszparaginsav, metionin, szerin		+	-
<i>Jonesia denitrificans</i>	30-37	fakultatív anaerob		nem ismert			
<i>Luteimonas marina</i>	20-40	aerob	6-10	L-alanil-glicine, L-arabinóz, cellobióz, a-ciklodextrin, dextrin, gentiobióz, D-glükóz, L-glutaminsav, glicil L-aszpartán, maltóz, melibióz, L-prolin, L-serin, szukcinsav, Tween 40			
<i>Mesorhizobium australicum</i>			5,5-9	arabinóz, b-gentiobióz, melibióz, maltóz, szukróz, trehalóz			
<i>Oxalicibacterium horti</i>	25		7	Oxalát, DL-lactát, glycollát, DL-malát, succinát		-	
<i>Paracoccus alkenifer</i>			6-9	Laktát, piruvát, butirát, hidroxibutirát, aszparagin, metanol, etanol, aceton		+	
<i>Paracoccus chinensis</i>	25-40	aerob	6-9	D-fruktóz, D-galaktóz, D-xilóz, melibióz, laktóz, keményítő, maltóz, D-mannóz, D-ribóz		+	+
<i>Paracoccus homiensis</i>	10-40	aerob	5-9	D-fruktóz, D-galaktóz, D-xilóz, melibióz, laktóz, keményítő, maltóz, D-mannóz, D-ribóz, D-glükóz, D-szorbitol, inozitol, szalicin, inulin, glukonát, L-alanin, L-histidin, L-prolin, L-tirozin, L-azsparagin, piruvát, citrate, acetát			

<i>Paracoccus rnarciusii</i>		aerob		glükóz, fructóz, galaktóz, mannóz, arabinóz			
<i>Parapusillimonas granuli</i>	25-37	fakultatív anaerob	6,5-7,5	D-glükóz, D-szorbitol, adipát, fenilacetát, nátrium- acetát, tejsav, 3-hidroxibenzoészav, 3-hidroxibutírsav, ketoglukonát, almasav, citrát, propionsav, valeriánsav , L-prolin, L-alanin, Lserin, L-histidin		-	
<i>Pseudomonas caeni</i>	4-37	aerob	6–10	Caprate és almasav			
<i>Psychrobacter pulmonis</i>	30-37	aerob				+	
<i>Pusillimonas harenae</i>	15-45	aerob	5–9	almasav, adipic sav		-	
<i>Pusillimonas ginsengisoli</i>	15-40	aerob	5,5-9	acetát, adipát, L-alanin, citrát, 3-hidroxibutirát, DL-laktát, L-malát, fenilacetát, L-prolin, propionát, L-szerin			
<i>Rubellimicrobium roseum</i>	25-30	aerob	6,5-9	D-galaktóz,D-arabinóz, L-rammóz, fruktóz, metanol, acetát, citrate, almasav			
<i>Rufibacter tibetensis</i>	18-33		6-8	D-glükóz, L-arabinóz, D-maltóz			+
<i>Sanguibacter soli</i>	37	aerob	5-9	acetát, L-arabinóz, D-glükóz, maltóz, D-mannóz, szukróz, glikogén			
<i>Simplicispira psykro</i>	10-40			Tween 40, 80, piroszőlósav, szukcinsav-monometilészter, a-hiroxibutírsav, b-hidroxibutírsav, DL-tejsav, L-prolin és 2,3-butanediol		+	
<i>Steroidobacter denitrificans</i>	20-38		6,1-7,8				

A legtöbb általunk izolált baktérium (54 törzs) a *Proteobacteria* csoportba tartozik, az összes baktérium ebben a törzsben Gram-negatív, legtöbbjük csillókkal rendelkezik, fakultatív anaerob, kemoautotróf, de megtalálhatók heterotrófok is (*Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2006). A *Parapusillimonas* nemzetségnek jelenleg egy faja ismert. A *Parapusillimonas granuli* fakultatív anaerob, heterotróf baktérium (Kim et al., 2010).

14 izolátum a *Firmicutes* törzshöz tartozik. A rendszertani csoport a nevét a latin firmus (erős) és cutis (bőr) szavakból kapták, mely az erős sejtfalukra utal, a legtöbb faj ugyanis Gram-pozitív. Többségük endospórát képez, a *Clostridia* faj tagjai anaerobok, míg *Bacilli* faj tagjai aerobok. Előfordulnak a talajban, vizekben, több képviselőjük patogén.

A *Bacteroidetes* törzshöz tartozó *Flavobacteriaceae* család tagjai általánosan előfordulnak vizes környezetekben, élőlényekben patogénként vagy szimbiotaként egyaránt leírtak ide tartozó fajokat. Szerves makromolekulák bontására exoenzimik segítségével képesek. Proteolitikus enzimet termelő hideg- és sókedvelő baktériumok tartoznak közéjük, amelyek lehetnek aerobok, mikroaerofilek vagy anaerobok (Bernardet és Nakagawa, 2006). A *Flavobacterium* nemzetség tagjai többségében kemoheterotróf szervezetek, kimutatták jelenlétüket élőbevonatokban, sőt előfordulnak szennyvíztisztítóban is (Bernardet és Bowman 2006).

Az *Actinobacteria* törzs tagjai Gram-pozitívak, talajban és vizekben is előfordulnak, aerobok, sok biológiailag aktív anyagot képesek termelni, nagyon sok esetben pozitívan befolyásolva a környező növényeket, ugyanakkor az antimikrobiális hatású termékeik jelentős fajjává emelik a tudomány számára (Ventura et al., 2007).

Mikrobiológiai eredményeinket Krishnamurthi és Chakrabarti (2013) a Chandigarh-ban (India) található hulladéklerakó csurgalékvizéből izolált mikrobiotával összehasonlítva, elmondható, hogy *Bacillus safensis* és *Bacillus subtilis* közös fajokon kívül más faji szintű hasonlóság nem tapasztalható. Ez feltehetően a hulladék eltérő minőségével valamint a klíma és meteorológiai viszonyok eltéréseivel magyarázható.

A mi esetünkben nitrát redukáló baktériumokat is izoláltunk, mint például a *Castellaniella defragrans*, *Chelatococcus daeguensis*, *Hydrogenophaga taeniospiralis*. Nagy valószínűséggel ezekre épül az izolált denitrifikáló baktériumok - mint például a *Bacillus mojavensis*, *Bacillus subtilis*, *Paracoccus alkenifer*, *Pseudomonas caeni* - aktivitása, melyek segítik a SBR medencében levő csurgalékvíz fölös nitrogén eltávolítását N₂ formában.

A szervesanyag bontására számos baktériumfaj képes, ezek közül megemlíthetjük a *Castellaniella defragrans*, *Paracoccus homiensis* törzseket, amelyeknek nagy szerepük lehet a SBR medence szervesanyag eltávolításában.

A *Firmicutes* filogenetikai csoportba tartozó baktériumtörzsek az összes (73) izolátum 19,18%-át alkotják (lásd 7. táblázat). Liu et. al., (2011) a dongyangi (Kína) hulladéklerakó üledékét tanulmányozták, esetükben a 283 baktériumtörzsből 70 tartozik a *Firmicutes* csoportba, ez 24,72%-át alkotja az összes általuk kimutatott baktériumnak. A dongyangi hulladéklerakó üledékében e csoport képviselői fordultak elő a legnagyobb csíraszámban. A cekendi hulladéklerakó csurgalékvizében a legnagyobb számban a *Proteobacteria* törzs képviselői fordulnak elő, az összes izolált baktérium 72,60%-a ide tartozik. Ez azzal magyarázható, hogy az üledékben anaerob körülmények uralkodnak, amely kedvez a *Firmicutes* törzsbe tartozó mikrobáknak. A *Proteobacteria* törzs fajainak kedvezőbbek a fakultatív anaerob körülmények.

Liu et. al., (2011) tanulmánya esetében a 283 baktériumtörzsből 66 tartozik a *Proteobacteria* törzshöz, amely 23,32%-a az összesnek. Így a dongyangi hulladéklerakó üledékében ez a második legdiverzebb törzs a *Firmicutes* törzs után. A cekendi hulladéklerakó csurgalékvizében a *Proteobacteria* törzs mutatja a legnagyobb diverzitást. Esetünkben a *Proteobacteria* törzs α -, β -, γ -*Proteobacteria* csoportokra osztható. A csoportban a β -*Proteobacteria* képviselői fordulnak elő a legnagyobb számban, az összes izolált baktérium 41,10%-át, míg a *Proteobacteria* törzsnek a 56,60%-át alkotják. A dongyangi hulladéklerakóban is a β -*Proteobacteria* volt a domináns csoport. Továbbá, Liu et. al., (2011) kimutattak δ -*Proteobacteria* és ε -*Proteobacteria* törzshöz tartozó fajokat is, amelyek a mi esetünkben nem voltak kimutathatók. Az *Actinobacteria* és *Bacteroidetes* törzsekbe tartozó baktériumtörzsek száma az előbbi két törzshöz képest csekély, mind a cekendi, mind a dongyangi minták esetében számuk alacsony (Liu et al., 2011).

7. táblázat. Az izolált törzsek filogenetikai besorolásának összesített táblázata

Filogenetikai besorolás	Törzsek száma	Törzsek aránya (%)
Firmicutes	14	19,18
Proteobacteria	53	72,60
α -Proteobacteria	16	21,92
β -Proteobacteria	30	41,10
γ -Proteobacteria	7	9,59
Actinobacteria	3	4,11
Bacteroidetes	3	4,11
Összesen	73	100

5. Következtetések

- A csurgalékvíz BOI/KOI aránya, a pH, az ammónia-tartalom értékei is azt mutatják, hogy a cekendi hulladéklerakó stabilizálódott, és a metántermelés szakaszában van,
- az aerob bakteriális összcsíraszám viszonylag magas, 10^7 - 10^8 nagyságrendű. Ugyanazon összetételű tápközeg mellett a gelzánnal szilárdított táptalajon magasabb a csíraszám az agaroshoz képest,
- A csurgalékvíz tenyészthető aerob baktérium-közössége nagy diverzitású, a 73 izolált baktériumtörzs 42 különböző fajhoz tartozik,
- Az újszerű tenyésztési módszerek használatával, mind az agaros mind a gelzános táptalajról 4-4 új fajhoz tartozó baktériumtörzset sikerült izolálni, amelyek egymástól is különböznek. Ezek közül 4 törzs (CGI-42, CGII-45, CGI-09, CAII-66) valószínűleg új nemzetséget is képvisel.
- A kimutatott baktériumok változatos anyagcserével rendelkeznek, előfordulnak közöttük jó szervesanyag bontók (szénhidrát-, zsírsav-, fehérje-bontók), denitrifikálók, nitrátredukálók.

A kutatásaink további célja jó biodegradációs (főként fenolbontó) képességgel rendelkező baktériumtörzsek szelektálása és jellemzése, amelyek oltóanyagként felhasználhatók szennyezett területek bioremediációja során.