

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Hulladéklerakók mikrobiológiai szempontú jellemzése

Microbiological examination of dump sites

Lisóczkiné Halász Judit

Témavezetők:

Dr. Balázs Sándor és *Dr. Lakatos Gyula*
főiskolai tanár egyetemi docens



DEBRECENI EGYETEM
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
Debrecen, 2009

1. Bevezetés, célkitűzés

A víz, a levegő és a talaj természetes tisztulása során, hosszú időn át „feldolgozta” az odakerült hulladékot anélkül, hogy a növényekre, az állatokra, és rajtuk keresztül közvetve vagy közvetlenül az emberre károsan hatottak volna. Az elmúlt évtizedek urbanizációs folyamatai, és a műszaki-tudományos fejlődés hatására fokozódott a termelés-fogyasztás, ennek következtében az ember és környezete közötti harmonikus kapcsolat megbomlott.

Az ember az indokoltnál nagyobb ütemben sajátítja ki a természeti erőforrásokat, egyre nagyobb mértékben alakítja át a természetből kitermelt anyagokat, valamint a természetes anyagoktól eltérő összetételű termékeket állít elő. A természetidegen anyagok termelésével, ill. felhasználásával létrejött hulladék egyre nagyobb mennyiségben és térben koncentráltan kerül az ökoszisztémákba.

Mindezek következtében a hulladék vagy nem alkalmas arra, hogy bekapcsolódjék a természetes körfolyamatokba, vagy ha igen, akkor olyan mértékben zavarokat okoz, hogy ezért hatását a természetes körfolyamatok már nem képesek ellensúlyozni, károsítja a természeti környezet elemeit, veszélyezteti magát az embert is.

A talajok szerkezetét, vízháztartását, tápanyagmegkötő képességét meghatározó lipidek és humuszanyagok képződése nagyjából a mikrobák működésének eredménye (Jandl et al., 2004). A mikroorganizmusok egy része különösen érzékeny a környezeti hatásokra, melyekre adott válaszukat, a biomassza, a közösségi struktúra és különböző aktivitások, valamint különböző biomarkerek változása tükröz (White et al., 1998). Meg kell ismerni, hogyan változnak fiziológiai biokémiai jellemzői a mikroorganizmusoknak, különösen hangsúlyozva a zsírsav komponenseiket, hiszen ezek az élőlények a biogeokémiai folyamatokat és a különböző ökoszisztémák produktivitását adják (Halbritter és Uzinger, 2005).

A szennyezések hatásai az in-situ mikrobiótára általában folytonosak, és hosszabb idő alatt az általuk indukált változások integrálódnak a közösségek struktúrájába és aktivitásába (Smith et al., 1986). Szennyezés hatására eltűnnek, felbukkannak mikroorganizmusok, illetve speciális anyagcsere aktivitások jelennek meg (Ringelberg et al., 2001). Jelenleg nincs általánosan elfogadott protokoll a mikrobiális ökológia monitorozására. A tenyésztési és izolálási módszerek értékes információt adnak a mikroorganizmusok jelenlétéről és potenciális aktivitásáról, de az is ismert, hogy egy baktériumtenyészet kevésbé tükrözi az in-situ diverzitási és aktivitási szintet (American Academy of Microbiology, 2002).

A talaj mikrobiológiai állapota fontos szerepet játszik a fenntartható mezőgazdasági földhasználatban, felhasználható egy korai változás indikátoraként a talaj ökológiai állapotának jelzésére. A talaj-mikrobióta mennyiségi viszonyait, struktúráját és funkcióit célzó vizsgálatok komoly bioindikációs értékűek, jelentős gyakorlati jelentőséggel bírnak, amennyiben egy talaj állapotát, egy kezelés vagy szennyezés hatását kívánjuk megismerni. Ilyen esetekben, könnyen kimutatható, jól követhető és lehetőleg kvantitatív mérhető markerekre, indikátorokra van szükség, melyekből a talaj belső történéseire, állapotára következtethetünk, és abból viselkedését megfelelő megbízhatósággal megadhatjuk.

A környezet állapotának monitorozásában alkalmazott indikátoroknak alkalmasnak kell lenniük arra, hogy jelezzék az ökoszisztéma folyamataiban, szerkezetében bekövetkező strukturális és funkcionális változásokat, érzékenynek kell lenniük a környezetgazdálkodásban és a klímában bekövetkező változásokra. Könnyen mérhető, reprodukálható, és mind helyi, mind nemzetközi szinten alkalmazható kell lenniük (Neher, 2001).

A legutóbbi időkben a talaj fizikai, kémiai paramétereit (pH, CEC, felvehető tápanyagok, szerves széntartalom) használják a környezeti stresszhatások monitorozására a talaj ökoszisztémában. Ezek a paraméterek nem elég érzékenyek a talaj állapotában bekövetkező változások korai előrejelzésére.

Ezzel szemben a talaj mikrobiális közössége sokkal gyorsabban reagál a zavarásra (Atlas, 1984), és e változások leírása szükséges az ökoszisztéma állapotának fenntartásához. Hagyományosan mikrobiális szinten a stresszre adott választ a folyamatok szintjén vizsgálják, számszerűen megadva a mikroorganizmusok számát, a légzés intenzitását és az enzimek aktivitását (Parkinson és Coleman, 1991), melyek segítségével képet kaphatunk a teljes populáció méretéről és a teljes aktivitási értékekről.

Ezek nem elég érzékeny indikátorok (Hargreaves, 2003) a funkciók, folyamatok sokasága és a közösségeken belüli komplex interakciók miatt. A környezetet érő terhelések monitorozása során a mikrobiális közösség egészét kell vizsgálni, amely diverz élőlényekből áll, a diverzitás meghatározásával információt kaphatunk az ökoszisztémában zajló folyamatokról. A mikrobiális közösségek diverzitásának megváltozása környezeti stresszre, zavarásra, hosszú távú hatásokra segíthet megérteni a talajban lejátszódó szukcessziós folyamatokat a mikrobiális közösségen belül.

A PLFA (phospholipid fatty acid) vizsgálat megbízható módszer a mikroba közösségek diverzitás változásának a feltárására, ugyanakkor mégsem hagyhatóak el a különböző fizikai és kémia vizsgálatok a talajállapot felmérése során.

A disszertáció az alábbi kérdésekre kíván választ adni:

- a mikrobiológiai módszerek alkalmasak e a szennyezés hatására a talaj mikroflórájában bekövetkező változások feltárására, előrejelzésére,
- a hulladékelhelyezés hatására hogyan változik a talaj mikroflórájának mennyiségi és minőségi összetétele,
- a hulladékból származó szerves- és szervesetlen anyagok, szennyezők hogyan hatnak a talajenzimek aktivitására,
- milyen folyamatok állnak a mikroflóra és enzim aktivitások megváltozásának hátterében,
- a hulladék mint szennyező milyen változást okoz a talaj mikroorganizmus közösségeinek PLFA (phospholipid fatty acid) mintázatában,
- a biomarker foszfolipid zsírsav-metilészterek mennyiségének és arányainak változása a hulladék szennyező hatásának tükrében,

- van-e összefüggés a szennyezés és a hulladéklerakók talajában felszaporodó *Bacillus* nemzetségbe tartozó fajok zsírsavösszetételének változása között.

2. Anyag és módszer

2.1. Mintavételi helyek

Mintavételi helyeink Szabolcs-Szatmár-Bereg megye kis településeinek közelében lévő legális és felhagyott, de illegálisan használt hulladéklerakók voltak Gelénes, Beregdaróc és Beregsurány külterületén. A Beregsurányi hulladéklerakó a községtől délkeletre található, elhagyott folyómeder feltöltésével jött létre. A Beregdaróci hulladéklerakó egy korábbi agyagnyerő gödör, kommunális hulladékkal feltöltve, ahol a szukcesszió előrehaladott állapotban van. A Gelénesi hulladéklerakó a Gelénes-barabási út mentén szakszerűen kiépített regionális hulladéklerakóként működik. A telepet nemes nyár (*Populus spp.*) takaró fásítás fedi, a szél megtörésére és a hulladék széthordásának megakadályozására. A Kontroll terület Beregdaróc községtől dél-keletre, az ukrán-magyar határ mentén található, az alföldi gyertyános-tölgyesek (*Querceto robori-Carpinetum*) egyetlen, többé-kevésbé eredeti formájában megmaradt foltja.

2.2. Vizsgálati módszerek

Az alkalmazott módszerek a hazai és nemzetközi tudományos gyakorlatban elfogadottak. Meghatároztuk a talajok összes tenyészhető mikroba számát, a fajok százalékos megoszlását a talaj két mélységében (Szegei, 1979). A foszfatáz (Krámer és Erdei, 1959), az invertáz (Schinner and Mersi, 1990), a dehidrogenáz (Mersi and Schinner, 1991) és a celluláz (Unger, 1979) enzimek aktivitását mértük a hulladéklerakók és a Kontroll terület talajaiban.

A talajminták mikrobiális közösségeinek összetételét a talajminták zsírsav-metilészter tartalmának feltárásával határoztuk meg. A lipidek extrakciója és a keletkezett zsírsav-metilészterek szétválasztása Sasser (1990) valamint Ibekwe és Kennedy (1998) módszereivel történt. A mintavételi helyek talaj-mikroorganizmus közösségeinek PLFA mintázatban bekövetkező változásokat főkomponens analízissel értékeltük.

A mintavételi helyek talajából és a növények felszínéről izolált *Bacillus* nemzetségbe tartozó fajok zsírsav profilját összehasonlítottuk. A vizsgálat a zsírsav profilban a szennyezés hatására bekövetkező változások feltárására irányult. Hét a *Bacillus* genusba tartozó fajt vizsgáltunk: *Bacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus firmus*, *Bacillus licheniformis*. A különböző mintavételi helyekről származó azonos fajba tartozó baktériumok, és törzstenyészetből (Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye) származó törzsek zsírsav profilját hasonlítottuk össze, klaszter analízissel. A talajok enzimaktivitási-értékei és nehézfém-tartalma közötti összefüggés matematikai értékelése korrelációs vizsgálatokkal történt.

3. Eredmények

3.1. Mikroorganizmus vizsgálatok értékelése

A szemétklerakók talajában a mikroba populációk kis változatossággal és ezzel egy időben az egyes mikrobák nagy számával jellemezhető. A szennyezett területek talajának összes mikroba száma nagyobb a talaj felső rétegében (20 cm), mint a Kontroll terület azonos mélységében ($5,48 \times 10^4$). Legnagyobb Beregsurány ($2,06 \times 10^5$) területén ezt követi Gelénes ($1,85 \times 10^5$) majd Beregdaróc ($1,26 \times 10^5$). Különbség van a két talajmélység között, a felső rétegben nagyobb az összes baktériumszám, mint az alsó rétegben (50 cm).

A hulladéklerakókon változatos a szemét (hulladék) mennyiségi és minőségi összetétele. A hulladékból származó nagy szervesanyag tartalom és a nehézfémek jelentik a két fő szennyező forrást, azonban az arányokat illetően vannak különbségek a mintavételi helyek között. A hulladék szervesanyag-tartalma a talajba jutva könnyen hasznosítható táplálékforrás a mikroorganizmusok számára, lassítja, illetve kivédi a nehézfémek toxikus hatását. A mintavételi helyek talaj-mikroorganizmus közösségeinek összetételét a területek növény borítása illetve a szeméttel együtt kijutatott mikroorganizmusok együttesen alakítják ki. A Kontroll összes mikrobaszáma kisebb a hulladéklerakókhoz képest. Ennek oka a terület hulladékmentessége illetve az érintetlen erdőtalajokra jellemző mikroflóra összetétel. Beregdaróc felszámolt hulladéklerakó, felszínének nagy részét már visszahódította az erdő. A Beregsurányi és Gelénesi lerakók növényflórájában megtalálhatóak a korábbi erdős vegetáció elemei. Fontos tényező, hogy a hulladék szervesanyag tartalma a talajba jutva könnyen hasznosítható táplálékforrást jelent a mikroorganizmusok számára.

Az izolált és meghatározott baktérium nemzetségek százalékos megoszlása a hulladéklerakók talajában Gram-pozitív baktérium túlsúlyt jeleznek. A vizsgálatokból megállapítottuk, hogy a szennyezések hatására az *Actinomyces* és *Pseudomonas* nemzetségek aránya csökkent, míg a hatékonyabb túlélőképességgel rendelkező *Bacillus* nemzetség százalékos aránya növekedett.

A talaj alsóbb rétegeiben hasonló nemzetségbeli megoszlásokat mértünk. Ezeken, a területeken a szemét elhelyezése évek óta folyik és a hulladékból származó szervesanyagok leszivárognak az alsóbb rétegekbe. A hulladék okozta változások a mélyebb rétegekben is kifejtik hatásukat. A három hulladéklerakó talajában mindenütt előfordul az *Enterobacter* nemzetség. A legnagyobb mennyiségben Beregsurány területén ezt követi Beregdaróc, majd Gelénes. Az enterobaktériumok a talajban elsősorban a szerves háztartásihulladék-maradványokon szaporodnak fel.

3.2. Enzim aktivitás vizsgálatok értékelése

3.2.1. Celluláz aktivitás

A Kontroll celluláz aktivitása (42,9%) nagyobb, mint a hulladékot tartalmazó talajoké. A hulladéklerakók talajainak celluláz aktivitása nem tért el nagymértékben egymástól, kivételt képez a Gelénesi hulladéklerakó (20,9%) ahol kisebb a többi területhez képest. A Beregdaróci

(38,9%) területén mért celluláz aktivitás megközelítette a Kontroll területen mért celluláz aktivitást. A celluláz enzim aktivitásában mért különbségek háttérében a szennyezés mellett a területek növényborítása áll. A Kontroll nagy aktivitási értékét a szeméthyány és a nagy mennyiségű avar adja. A hulladéklerakókra is jellemző a fás növényzet viszont ezeken, a helyeken a szemét borítás dominál. A Beregdaróci használaton kívüli hulladéklerakó nagy része talajtakaróval fedett, növényzettel borított.

3.2.2. Foszfátáz aktivitás

A kontroll területen ($2,12 \text{ P}_2\text{O}_5/\text{g}/2\text{h}$) mért nagy foszfátáz aktivitást csak a Beregdaróci ($0,98 \text{ P}_2\text{O}_5/\text{g}/2\text{h}$) hulladék lerakó talajának foszfátáz aktivitása közelítette meg. A Beregsurányi ($0,06 \text{ P}_2\text{O}_5/\text{g}/2\text{h}$) és Gelénesi ($0,78 \text{ P}_2\text{O}_5/\text{g}/2\text{h}$) területek talajában ezektől szignifikánsan kisebb értéket mértünk. A kontroll területeken mért nagy foszfátáz aktivitást a dús, elsősorban erdős makrovegetáció adja. Ettől kisebb az érték a Beregdaróci területen, ahol a fás vegetáció újra kialakulóban van. Beregsurányban és Gelénesen a növényborítás mellett a szemét borítás dominál.

3.2.3. Invertáz aktivitás

A Kontroll ($10,24 \text{ mg glükóz}/10\text{g}/4\text{h}$) terület invertáz aktivitása szignifikánsan nagyobb a hulladéklerakók talajainál, kivételt képez a Beregdaróci ($9,73 \text{ mg glükóz}/10\text{g}/4\text{h}$) terület. A legkisebb invertáz aktivitást a Gelénesi ($5,12 \text{ mg glükóz}/10\text{g}/4\text{h}$) hulladéklerakó területén mértük, ettől szignifikánsan nagyobb a Beregsurányi ($7,25 \text{ mg glükóz}/10\text{g}/4\text{h}$) hulladék lerakó invertáz aktivitása. A mezőgazdasági gyakorlatban az invertáz enzimet a talaj termékenységének meghatározására használják. A nagy invertáz-aktivitás a felszíni flóra intenzív fejlődésével is magyarázható. A Kontroll esetében ez az erdővel való borítottságnak is köszönhető. A Gelénesen mért kisebb invertáz aktivitás oka, hogy tömörre vált a talaj az állandó nehézgépjármű forgalom, és a szemét kezelésére használt buldózerek miatt. Hiányoznak a talaj összetételéből a könnyen felvehető, mobilizálható szervesanyagok, illetve csökken a talaj levegő tartalma, amelyek gátolják az invertáz enzim működését.

3.2.4. Dehidrogenáz aktivitás

A dehidrogenáz enzim aktivitása jól tükrözi a talajok szervesanyag tartalmának különbségeit. Ennek megfelelően a dehidrogenáz enzim esetében jelentősek a különbségek a szennyezett területek és a Kontroll terület ($117,5 \text{ } \mu\text{g INTF}/\text{g}$) enzim aktivitásában. A legnagyobb értéket a Beregsurányban ($247,5 \text{ } \mu\text{g INTF}/\text{g}$). A legkisebb értéket Gelénesen ($131,5 \text{ } \mu\text{g INTF}/\text{g}$) mértünk. A kettő közé eső értéket mértük Beregdarócon ($185,5 \text{ } \mu\text{g INTF}/\text{g}$), amely terület átmenet a két szeméttelap között.

A talajok mikrobiológiai aktivitása a talajok lebontható szervesanyag tartalmával hozható összefüggésbe, és mindkettőre utal a dehidrogenáz aktivitás. A Beregsurányi illegálisan működő szeméttelakóra a szervesanyagok előrehaladott lebomlása illetve eleve könnyen bonthatósága jellemző. A terület szervesanyag terhelését növeli az ide kihordott kommunális szennyvíz. Beregdaróc területe földdel, növényekkel borított, a korábban itt

elhelyezett hulladék mineralizációja megindult. A Gelénesi hulladéklerakó területén elsősorban műanyag hulladékot és kevés könnyen bontható szervesanyagot találtunk. Ennek következtében a talajában mért dehidrogenáz aktivitás nem különbözik szignifikánsan a kontroll területtől. Az itt mért aktivitási értékek, a talaj eredeti aktivitását tükrözik.

3.3. A talajok nehézfém tartalma

A talajok fémtartalmának meghatározása során az egyes fémek koncentrációjában jelentős eltéréseket mértünk. A talajokban a vas fordul elő a legnagyobb mennyiségben minden hulladéklerakón (Beregdaróc 913,2 mg/kg, Beregsurány 890,5 mg/kg, Gelénes 787,1 mg/kg), meghaladva a Kontroll (616,8 mg/kg) terület talajának vas tartalmát. A kadmium szignifikánsan kevés a Kontroll (0,0 mg/kg) területen és a Gelénesi (0,2 mg/kg) hulladéklerakó talajában is, ellentétben a Beregsurányi (2,2 mg/kg) és Beregdaróci (1,8 mg/kg) hulladéklerakókkal. Az ólom hasonló tendenciát mutat, mint a vas és a kadmium. A hulladéklerakók (Beregsurány 22,1 mg/kg, Beregdaróc 13,7 mg/kg, Gelénes 7,18 mg/kg) talajában szignifikánsan több az ólom, mint a Kontroll (5,39 mg/kg) terület talajában. A cink és a réz mennyiségei között kicsi az eltérés a hulladéklerakók és a Kontroll terület talaja között.

3.4. Korrelációs vizsgálatok

A kapott eredmények közötti összefüggések matematikai értékelésére korrelációs vizsgálatot végeztünk a talaj felső 20 cm-ből vett talajminták enzimaktivitásának és fémtartalmának mért eredményeiből. A korrelációs vizsgálatok alapján pozitív korreláció van a talaj celluláz- és foszfatáz-aktivitása között $r = 0,74$, valamint a celluláz- és invertáz-aktivitás $r = 0,26$, a foszfatáz- és invertáz-aktivitás $r = 0,24$ között. Negatív korrelációval jellemezhető a talajok dehidrogenáz-aktivitása és a többi vizsgált enzimek közötti kapcsolat. Pozitív a korreláció a dehidrogenáz enzim aktivitása és az összes mikroba szám között.

A vizsgált hulladéklerakók talajában az ólom és a kadmium mennyisége különbözött szignifikánsan a Kontroll terület talajától. A celluláz, invertáz és foszfatáz enzimek aktivitásában érvényesült a nehézfémek toxikus hatása, minden hulladéklerakó talajában szignifikánsan kisebb ezen enzimek aktivitása a Kontrollhoz képest.

A celluláz enzim negatív korrelációban van a cinkkel ($r = -0,76$) és a kadmiummal ($r = -0,53$). Az invertáz enzimre az ólom ($r = -0,49$) és a kadmium ($r = -0,55$) fejt ki gátló hatást. A foszfatáz enzim a kadmiummal van negatív korrelációban ($r = -0,62$). A dehidrogenáz enzim és a kadmium esetében a negatív korreláció ($r = -0,73$) nem érvényesül. Moreno et al. (2003) szerint a Cd gátlólag hat a dehidrogenáz enzim aktivitására a talaj magas szervesanyag tartalma mellett is. Eredményeink azt mutatják, hogy az enzim aktivitása minden hulladéklerakón nagyobb, mint a Kontroll területen annak ellenére, hogy a szervesanyagok eloszlása nem homogén a lerakókon. A dehidrogenáz enzim aktivitása, összefügg a talaj aerob kemoorganotróf mikroorganizmusainak összmennyiségével, ami magyarázza a magas

dehidrogenáz-aktivitást a szeméttelpek talajában, a felvehető szervesanyag tartalom mellett, valamint a magas Cd tartalom ellenére is, a kontroll terület dehidrogenáz aktivitásához képest.

3.5. PLFA vizsgálat

A PLFA vizsgálat eredményei összhangban állnak a hagyományos, tenyésztéses módszerrel kapott eredményekkel. A szennyezett területeken (Beregsurány 79,35%; Gelénes 76,13%; Beregdaróc 58,35%) szignifikánsan nagyobb a Gram-pozitív baktériumokat jelölő biomarker zsírsavak százalékos aránya a Kontroll területhez (44,73%) képest. A szeméttelpek talajára a Gram-pozitív baktériumok jellemzőek, ezen belül is a hatékonyabb túlélő képességgel rendelkező *Bacillus* genus dominál.

A Gram-negatív baktériumok mennyisége esetén fordított a tendencia. A legnagyobb a Kontroll terület (21,35%) értéke, ami szignifikánsan nagyobb a szeméttelpek talajában mérténél (Beregsurány 4,25%; Gelénesi 6,36%). A Beregdaróci (14,21%) minta a két előző hulladéklerakótól szignifikánsan eltér, értéke a Kontroll területtől kisebb.

Az *Actinomycetes* családot jelölő biomarker zsírsavak relatív mennyisége a szeméttelpekről származó mintáknál nem tér el szignifikánsan egymástól, Beregdaróc (4,25%), Beregsurány (2,05%), Gelénes (3,25%), míg tőlük szignifikánsan nagyobb a Kontroll területen (9,12%).

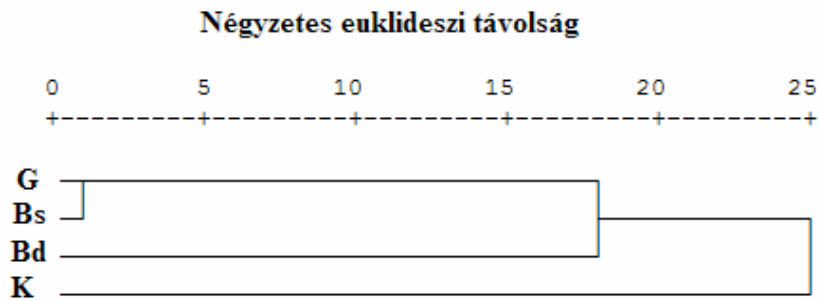
A gombáknál hasonló a tendencia, a legnagyobb a Kontroll területen (4,61%), ezt követi a három szeméttelpepről származó minta (Gelénes 1,70%; Beregsurány 1,54%; Beregdaróc 1,99%) amelyek nem térnek el szignifikánsan egymástól.

A baktériumokat jelölő zsírsav biomarkerek és a gomba biomarkerrel megadható a gomba/baktérium arány. Az arány szignifikánsan legnagyobb a Kontroll (0,0699) területen. A szeméttelpek talajára jellemző (Beregdaróc 0,0270, Beregsurány 0,0184, Gelénes 0,0209), hogy nem különböznek szignifikánsan egymástól, szignifikánsan kisebbek viszont a Kontroll területtől. A gombák számának csökkenését a hulladéklerakók talajában a zavarás intenzitás növekedése adja, azokon a területeken, ahol jelentős a gépjármű forgalom és a talaj bolygatása, ami kedvezőtlen hatással van a gomba micéliumok fejlődésére. A talajok nehéz fém tartalmára is érzékenyebben reagálnak a gombák.

A baktériumok 16:1 ω 7 és 18:1 ω 7 zsírsavainak megnövekedett *transz/cisz* izomer aránya környezeti stresszt jelez (Heipieper et al., 1996). Az általunk vizsgált hulladéklerakók talajában a 16:1 ω 7 és 18:1 ω 7 zsírsavak esetében megnőtt a *transz/cisz* izomerizációs arány a Kontroll területhez viszonyítva. A 16:1 ω 7 esetén a Gelénesi (2,5601) és Beregsurányi (2,4323) mintavételi helyek talajában szignifikánsan nagyobb *transz/cisz* izomer arány jellemző, a Beregdaróci (1,9235) és a Kontroll (1,6449) területhez viszonyítva. A 18:1 ω 7 zsírsav *transz/cisz* izomer aránya a hulladéklerakók (Beregdaróc 1,1044; Beregsurány 1,1114; Gelénes 1,1254) talajában szignifikánsan nagyobb a Kontroll (0,5886) területhez képest.

3.6. Klaszter analízis

A főkomponens értékek átlagának klaszter analízisével csoportokba soroltuk a négy különböző mintavételi helyről származó eredményeket, a mintavételi helyek hasonlósági viszonyainak feltárása érdekében. Az összehasonlítás alapja a PLFA analízis eredményeként kapott mikrobiális közösség-összetétel. A dendrogram alapján (1. ábra) a legnagyobb hasonlóság a Beregsurányi és a Gelénesi minta között van, tőlük különbözik a Beregsurányi minta és mind a három szeméttelep, nagymértékben különbözik a Kontroll területtől.



1. ábra. A mintavételi helyek csoportosítása a főkomponens értékek átlagának klaszter analízisével

Az egyes mintavételi helyekre jellemző zsírsavak meghatározásához elvégeztük a főkomponens súlyok klaszter analízisét. A Kontroll területre a Gram-negatív baktériumok biomarker zsírsavai cy17:0, cy19:0, C17:0, C18:1 ω 7c, C18:1 ω 7t mellett az *Actinomycetese*ket jelölő két zsírsav biomarker 10Me17 és 10Me16 és a gomba biomarker 18:2 ω 6 jellemző. A harmadik *Actinomycetes* biomarker zsírsav 10Me18, a Beregsurányi mintavételi helyre jellemző, a Gram-negatív baktériumokat jelölő 16:1 ω 7t és 16:1 ω 7c és Gram-pozitívokra jellemző i-15:0 zsírsavak mellett. A Gram-pozitív baktériumok biomarker zsírsavai a Gelénesi és Beregsurányi mintavételi helyek között oszlanak meg. Az a-17:0, i-16:0 és C15:0 zsírsavak a Gelénesi, az a-15:0, i-16:1 és i-17:0 zsírsavak a Beregsurányi mintavételi helyre jellemzőek leginkább.

A kommunális hulladéklerakók PLFA mintázatának megváltozása nem csak a mikroba közösségek összetétel-változásának eredménye, hanem a környezeti feltételek megváltozásának is, amelyek megváltoztatják a baktériumok sejtmembránjának zsírsav összetételét. Vizsgálatainkban a különböző mintavételi helyekről származó *Bacillus* törzsek zsírsav összetételét is összehasonlítottuk. Az adott fajon belül a különböző mintavételi helyekről származó törzsek zsírsav összetétele szignifikánsan eltér egymástól ($p < 0,05$). A változásban érintett zsírsavak skálája széles, mind minőségben mind mennyiségben, mindig az adott faj illetve hulladéklerakó függvénye. Az egy fajba tartozó törzseknél a zsírsav összetétel alapján, rokonsági kapcsolat mutatható ki, de zsírsav profiljukban változás következik be a környezeti tényezők hatására. A baktériumok zsírsav összetételét a genetikai adottságon túl a környezetben található könnyen felvehető tápanyagok mennyiségi és minőségi összetétele illetve a hulladéklerakókra jellemző szennyező, toxikus anyagok is meghatározzák.

Hasonló eredményről számol be Frostegård et al. (1993). A baktériumok zsírsav profiljában bekövetkező változások módosulásokat idézhetnek elő az adott baktérium faj funkciójában, fertőzőképességében. A megváltozott zsírsav összetétel eredményezi, hogy a szennyezett területekről származó baktériumok jobban látható telepeket képeznek, agar lemezre való szélesztés során. Ennek következménye, hogy a szennyezetlen területeken általában kevesebb az összes baktériumszám (CFU) a szennyezethez képest.

Ezek a változások fontosak abban, hogy alkalmazkodjanak a megváltozott környezeti feltételekhez. A szennyezett területek megváltozott mikroflórája a területek újra művelésbe kerülésével befolyásolhatja a talaj állapotát. A mikroorganizmusok diverzitása, az egyes fajok az anyagkörforgalmi rendszerben betöltött szerepének, feladatának megfelelő módon való végrehajtása, fontos tényező a talaj homeosztázisa szempontjából. Mivel a baktériumok működésén alapul olyan, alapvető talaj funkciók megléte, mint a szén és nitrogén körforgalom illetve a szervesanyag transzformáció (Parkinson és Coleman, 1991). Ezért a baktériumok zsírsav összetételének megváltozása indikátora lehet a talajt érő környezeti terheléseknek: mint a nehézfém szennyezés, a hulladék lerakás, a szerves szennyezőanyag bejutás stb.

A foszfolipid zsírsavak a talaj mikroorganizmusok mennyiségileg jól meghatározható biomolekulái, gyors turn over-ük miatt jól jellemzik mind mennyiségileg, mind minőségileg az adott élő mikroorganizmus közösséget, magas indikációs értékkel rendelkeznek a mikrobiális közösségek leírásában, monitorozásában, fiziológias és stressz körülmények között egyaránt. Ugyanakkor a PLFA biomarker analízis számos korláttal rendelkezik, ami szűkíti a használatát mind helyi, mind globális szinten. A biomarkerek értelmezését segítő adatbázis tiszta tenyészetekből származó zsírsavakra épül.

Hosszú távon a PLFA módszer környezeti monitorozásban való alkalmazásának érdekében, szükség van a PLFA könyvtár bővítésére természetes forrásból származó baktériumok zsírsav profiljával. A stressz biomarkerek változásának kalibrálása a különböző ökológiai rendszerekben, különböző talaj típusokban, különböző éghajlati viszonyok között nagy kihívást jelent a jövő számára, mind helyi mind nemzetközi szinten.

Új tudományos eredménynek tekintjük:

- A szennyezések hatására az *Actinomyces* és *Pseudomonas* nemzetségek aránya csökkent, míg a *Bacillus* nemzetség aránya növekedett.
- A hulladék megváltoztatja a talajenzimek aktivitását, jelentősen csökkenti a celluláz, a foszfatáz, az invertáz aktivitásokat a dehidrogenáz enzim aktivitása viszont nőtt a Kontroll területhez képest.
- A talajt érő különböző szennyezések mennyiségi és minőségi változást okoznak, a talaj mikroorganizmus közösségeinek összetételében:
 - A hulladéklerakókon szignifikánsan nagyobb a Gram-pozitív baktériumokat jelölő biomarker zsírsavak mennyisége, mint a szennyezetlen területen.
 - A Gram-negatív baktériumokat, az *Actinomyceteseket*, és a gombákat jelölő biomarker zsírsavak mennyisége csökken a hulladéklerakókon.

- A gomba/baktérium arány csökken a talajban a hulladék elhelyezés, kezelés hatására.
- A 16:1 ω 7 és 18:1 ω 7 zsírsavak *transz/cisz* izomereinek aránya nő a hulladéklerakók talajában.
- A szennyezett területek PLFA mintázatának változása nemcsak a mikroba közösségek összetétel-változásának, hanem a megváltozott környezeti feltételeknek is függvénye, amelyek a hulladék minőségétől és mennyiségétől függően változtatják meg a baktériumok sejtmembránjának zsírsav összetételét.

4. Introduction

For a long time, plants, animals and humans were protected against the direct or indirect damaging effects of deposited waste, which was degraded by the natural purification processes of soil, water and air. However, as production and consumption were increased by urbanisation and technical & scientific development of the past few decades, the harmony between people and environment has loosened.

Besides inordinate exploitation of natural resources and increasing transform of natural substances, humans produce synthetic matters, the compositions of which are different from the natural materials. As a consequence of the production and use of unnatural substances, increasing amounts of wastes are spatially concentrated in the ecosystem.

On the one hand, wastes contaminate the environmental elements (i.e. water, air and soil) and as a consequence, affect huge populations and mostly have long-term effects. On the other hand, certain constituents of wastes get into the food chain through plants and animals and finally, have damaging effects on humans as well.

Various infectious diseases can be caused by the pathogen microorganisms of communal wastes.

Consequently, certain forms of wastes cannot take a part in the natural cycles, while other forms can. In the latter case, waste can disturb the natural processes to such an extent that natural cycles are not able to compensate, therefore, they cause damages in both the natural environment elements and humans.

Microorganisms form a considerable part of the Earth's biomass. Besides playing an important role in carbon cycle, microbes are responsible for the major part of N-fixation and denitrification. Microorganisms also play an important role in the formation of lipids (Jandl et al., 2004) and humus materials, which determine the structure, water balance and nutrient fixation ability of soils. Additionally, microbes remove the materials (e.g. dead biomass, animal faeces, pesticides and other antropogeneous organic and inorganic pollutants), which can modify or damage the water quality, soil and vegetation through their accumulation or persistence. Moreover, some microorganisms are particularly sensitive to environmental effects. The microbial responses for these effects are reflected by the changes of different biomarkers, activities, community structure and biomass (White et al., 1998). It is important to investigate the modifications of microorganisms under the influence of pollution, since these organisms provide the biogeochemical processes and the productivity of different ecosystems (Halbritter és Uzinger, 2005).

Generally, pollutions have continuous effects on microbiota. After a considerable time, pollutants induce changes, which are integrated to the community structure and activity (Smith et al., 1986). Besides, appearing, disappearing or becoming conspicuous in the environment, certain microorganisms show special metabolic activities under the influence of pollution (Ringelberg et al., 2001). Presently, we do not have a generally accepted protocol for the monitoring of microbial ecology. Cultivating and isolation methods provide valuable information about presence and potential activity of microorganisms, however, a single

bacteria culture just slightly reflects the in-situ diversity and activity levels (American Academy of Microbiology, 2002).

Microbiological status of the soil plays an important role in sustainable land-use, and can be used as indicator for initial changes in ecological status of the soil. Examinations of quantitative proportion, structure and functions of soil microbiota have considerable bioindicational value. In addition, these examinations are also useful from practical aspects, if soil status or effects of treatments and pollutants need to be determined. In these cases, we need easily detectable and followable, quantitative markers and indicators, which refer to the internal processes and status of soil and help to conclude on the soil behaviour reliably.

Indicators, which are used for environmental monitoring, have to be appropriate for the indication of structural and functional changes in the processes and structure of the ecosystem; have to be sensitive to changes of climate and environmental management; have to be easily measurable and reproducible; and have to be applicable on both local and international levels (Neher, 2001). Recently, physical and biochemical parameters of soil (pH, CEC, available nutrients and organic carbon content) are used for monitoring of environmental stress effects in soil ecosystems. These parameters are not sensitive enough to predict the primary modifications in soil status. Conversely, microbial community of the soil gives prompt responses (Atlas, 1984) and description of these modifications is necessary for the preservation of ecosystem status. On microbial level, responses for stress are conventionally examined through the processes, thus number of microorganisms, respiration intensity and enzyme activities are measured numerically (Parkinson and Coleman, 1991), which reflects the size of the whole population and the values of total activity.

These indicators are not sensitive enough (Hargreaves, 2003), as a consequence of the various functions and processes and the complex interactions within the community. Monitoring of environmental load needs the examination of the whole microbial community, since it comprises diverse organisms and determination of diversity provides information about processes of the ecosystem. As a consequence of environmental stress, disturbance and long-term effects, modifications occur in the diversity of microbial communities, which can help to understand succession processes of the soil within the microbial community. PLFA analysis is a reliable method for revealing the modifications in the diversity of microbial communities; however, various physical and chemical analyses are also necessary for the examination of soil status.

The dissertation deals with the following questions:

- Are the used microbiological methods adequate to detect and predict the modifications, which occur in soil microflora under the influence of contamination?
- What qualitative and quantitative changes occur in soil microflora under the influence of waste deposition?
- How do organic and inorganic pollutants of wastes influence the soil enzyme activities?

- What processes are responsible for the changes in microflora and enzyme activities?
- What are the polluting effects of wastes on the basis of PLFA (phospholipid fatty acid) pattern of soil microbial communities?
- With respect of the polluting effect of wastes, we examined the qualitative and proportional changes of phospholipid fatty acids, as stress biomarkers.
- Are there any relationships between polluting effects and the modifications in fatty acid composition of *Bacillus* species, which propagate in the soil of dump sites?

5. Materials and Methods

5.1. Sampling Sites

Our sampling sites were legal and abandoned but illegally used dump sites, on the periphery of Gelénes, Beregdaróc and Beregsurány, which are small settlements in Szabolcs-Szatmár-Bereg County. The dump site of Beregsurány is situated southeast of the settlement and was formed by filling of an abandoned riverbed. Formerly, the dump site of Beregdaróc had been a clay-pit, which has been filled with communal wastes. Presently, this site is in advanced stage of succession. Along the way of Gelénes-Barabás, the dump site of Gelénes functions as a properly built regional dump site. The site was afforested by poplars (*Populus spp.*) to block the winds and prevent the waste from dispersion. The control area was marked out southeast of Beregdaróc, along the Ukrainian-Hungarian frontier. It is the only part of the oak-hornbeam forest (*Querceto robori-Carpinetum*), which more or less remained in its original stage.

5.2. Experimental methods

The applied methods are accepted by both the national and the international scientific practice. Besides studying the percentage distribution of species in two soil depth, we determined the total number of culturable microbes as well (Szegi, 1979). Enzyme activities of phosphatase (Krámer and Erdei, 1959), invertase (Schinner and Mersi, 1990), dehydrogenase (Mersi and Schinner, 1991) and cellulase (Unger, 1979) were also measured in both the soil samples of dump sites and the control samples.

Composition of microbial communities in the soil samples was determined by the fatty acid methyl ester content of samples. Lipid extraction and separation of the fatty acid methyl esters were performed according to Sasser, 1990; and Ibekwe and Kennedy, 1998. Changes in the PLFA pattern of microbial communities of the sampling sites were determined by principal component analysis. We compared the fatty acid profile of *Bacillus* species of soil samples with fatty acid profile of those *Bacillus* species which were collected from the plant surfaces. The aim of the examination was to reveal the changes of fatty acid profiles, which occurred under the influence of contamination. Seven species of *Bacillus* genus were

investigated: *Bacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus firmus*, *Bacillus licheniformis*. With the help of Cluster Analysis, we compared the fatty acid profiles of certain bacteria species of the samples with fatty acid profiles of the reference cultures (Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms). Correlation analyses were used for mathematical evaluation of the relation between the enzyme activity and the heavy metal content of soils.

6. Results

6.1. Examinations of microorganisms

Microbe populations of dump soils can be characterized by high diversity and large number of individuals at the same time. In case of contaminated soils, total number of microbes in the upper layer of the soil is higher (20 cm) than at the same depth of control area (5.48×10^4). Total number of microbes is the highest on the area of Beregsurány (2.06×10^5), which is followed by Gelénes (1.85×10^5) and Beregdaróc (1.26×10^5). Differences also can be observed between the two soil depths: total number of bacteria is higher in the upper layer than in the lower layer (50 cm).

Qualitative and quantitative compositions of waste are various on the dump sites. Large organic matter content of wastes and heavy metals form the two main sources of pollution, however, proportions these are different in the sampling sites. Organic matter content of wastes is an easily utilizable nutrient source for soil microorganisms. Additionally, it delays and prevents the toxic effects of heavy metals. Composition of soil microorganism communities of sampling sites is determined by both the plant cover of the areas and the microorganisms of the waste. Control area is covered by a forest, but the total number of microbes is lower than that of dump sites, which can be also characterized by woody vegetation. This can be explained by the absence of wastes and the natural microflora, which characterizes the virgin forest soils. As Beregdaróc is an abandoned dump site, most of its area is recovered by the forest. Plant flora on the dump sites of Beregsurány and Gelénes also comprises elements of the former forest vegetation.

According to the percentage of the studied bacteria genuses, Gram-positive bacteria are dominant in the dump soils. Our results show that proportions of *Actinomyces* and *Pseudomonas* genuses decreased under the influence of contaminations, while percentage of *Bacillus* genus increased as a consequence of its more effective survival ability. Proportions of genuses in lower soil layers were similar to that of surface layers. On these areas, wastes have been dumped for years and their organic matters infiltrate into the lower soil layers as well. Modifications, which are caused by wastes, also have effects on the lower soil layers. *Enterobacter* genus can be detected in the soil of all three areas. It can be observed in the largest proportion on the area of Beregsurány, which is followed by Beregdaróc and Gelénes. Enterobacteria primarily propagate on the remains of domestic wastes.

6.2. Examinations of enzyme activities

6.2.1. Cellulase activity

Cellulase activity is higher on the control area (42.9%) than on dump sites. There are not significant differences among the cellulase activities of dump soils, with the exception of Gelénes (20.9%), where cellulase activity is lower than on the other sites. Cellulase activity on the area of Beregdaróc (38.9%) approximates the cellulase activity of the control area. Besides contamination, differences in the cellulase activity can be also explained by the plant cover of the areas. High cellulase activity of control area is derived from the absence of wastes and the huge amount of leaf litter. Dump sites also have woody vegetation cover, but waste cover is dominant on these areas. Most of the unused dump site of Beregdaróc is covered by soil and vegetation.

6.2.2. Phosphatase activity

High phosphatase activity of the control area (2.12 $P_2O_5/g/2h$) was approximated by only the phosphatase activity of the dump soil of Beregdaróc (0.98 $P_2O_5/g/2h$). Phosphatase activity was significantly lower in the soil of Beregsurány (0.06 $P_2O_5/g/2h$) and Gelénes (0.78 $P_2O_5/g/2h$). High phosphatase activity of the control area can be explained by the dense and primarily woody vegetation cover. The phosphatase activity was lower on the area of Beregdaróc, where recovering of woody vegetation has been started. Besides vegetation cover, waste cover is dominant on the areas of Beregsurány and Gelénes.

6.2.3. Invertase activity

Invertase activity of the control area is significantly higher (10.24 mg glucose/10g/4h) than that of dump sites, with the exception of Beregdaróc (9.73 mg glucose/10g/4h). The lowest invertase activity was measured on the dump site of Gelénes (5.12 mg glucose/10g/4h), while invertase activity on the dump site of Beregsurány (7.25 mg glucose/10g/4h) is significantly higher. In agricultural practice, invertase activity is used for the determination of soil fertility. High invertase activity can be also explained by intensive growth of the surface flora. In case of the control area, high invertase activity is a consequence of forest cover as well. Lower invertase activity of the dump site of Gelénes can be explained by the compactness of soil, which resulted from the perpetual presence of heavy good vehicles and bulldozers. Besides the absence of easily mobilisable organic matters, the reduced air content of soil also inhibits the functioning of invertase enzyme.

6.2.4. Dehydrogenase activity

Dehydrogenase activity reveals the differences in the organic matter content of the soil. As a consequence, dehydrogenase activities show significant differences between the contaminated sites and the control area (117.5 $\mu\text{g INTF/g}$). Highest value was measured in Beregsurány (247.5 $\mu\text{g INTF/g}$), while the lowest activity was measured in Gelénes (131.5 $\mu\text{g INTF/g}$). Dehydrogenase activity of Beregdaróc was 185.5 $\mu\text{g INTF/g}$, as this site is in intermediate position between the two previous areas.

Microbial activity of soils is connected to the degradable organic material content of the soil and both of them can be characterized by the dehydrogenase activity. On the illegal dump site of Beregsurány, organic materials are in advanced stage of degradation or these materials originally are in an easily degradable stage. On this area, load of organic matters is also increased by the communal wastewater deposition. Dehydrogenase activity of Beregdaróc can be explained by the abandoned status of the dump site, where the area is covered by soil and plants and mineralisation of the formerly deposited wastes has already begun. On the dump site of Gelénes, we can primarily find synthetic wastes and a few easily degradable organic materials. Consequently, there are not significant differences in the dehydrogenase activity of this site and that of the control area. On this dump site, dehydrogenase activities reflect the original activity of the soil.

6.2.5. Heavy metal content of soils

Significant differences could be measured in the heavy metal contents of soils. On every dump site, iron can be found in the largest quantities. The iron content of dump sites (Beregdaróc 913.2 mg/kg, Beregsurány 890.5 mg/kg, Gelénes 787.1 mg/kg) exceeds the iron content of the control area (616.8 mg/kg). In contrast with the dump sites of Beregsurány (2.2 mg/kg) and Beregdaróc (1.8 mg/kg), cadmium content is significantly low on the control area (0.0 mg/kg) and in the dump soil of Gelénes (0.2 mg/kg). Tendencies of lead content are similar to that of iron and cadmium content. Dump soils (Beregsurány 22.1 mg/kg, Beregdaróc 13.7 mg/kg, gelénes 7.18 mg/kg) contain significantly more lead than the control area (5.39 mg/kg). Copper and zinc content of dump sites is similar to the copper and zinc content of the control area.

6.3. Correlation analyses

For mathematical evaluation of the results we used correlation analyses. These analyses were done on the basis of the enzyme activities and metal concentrations, which were measured from the soil samples of the upper soil layer (20 cm). Analyses showed positive correlation between the cellulase and phosphatase activities ($r = 0.74$), the cellulase and invertase activities ($r = 0.26$) and the phosphatase and invertase activities ($r = 0.24$), while the connection between dehydrogenase activity and other enzyme activities can be described with

negative correlation. There was also positive correlation between dehydrogenase enzyme activity and the total number of microbes.

Lead and cadmium concentrations of the examined dump soils were significantly different from those of the control area. Toxic effect of heavy metals influenced the cellulase, invertase and phosphatase activities, therefore these enzyme activities are significantly lower in all dump soils than on the control area.

Cellulase enzyme showed negative correlation with zinc ($r = -0.76$) and cadmium ($r = -0.53$). Invertase enzyme is inhibited by lead ($r = -0.49$) and cadmium ($r = -0.55$). Phosphatase enzyme is in negative correlation with cadmium ($r = -0.62$). In case of dehydrogenase enzyme and cadmium, negative correlation ($r = -0.73$) is not effective. According to Moreno et al. (2000), Cd inhibits the dehydrogenase enzyme activity, even when large amount of organic matters is available in the soil. According to our results, the enzyme activity of all the dump soils is higher than that of the control area; however, distribution of organic matters is not homogenous on the dump sites. Dehydrogenase enzyme activity is correlated with the total number of chemoorganotrophic microorganisms. This explains the high dehydrogenase activity of dump soils, which is higher than on the control area, in spite of the available organic matters and the high cadmium content.

6.4. PLFA analysis

Results of PLFA analysis are in conformity with the results of the conventional culturing methods. On the contaminated sites (Beregsurány 79.35%; Gelénes 76.13%; Beregdaróc 58.35%), percentage of biomarker fatty acids, which indicates the presence of Gram-positive bacteria, is significantly higher than on the control area (44.73%). Dump soils are characterized by Gram-positive bacteria and dominated by *Bacillus* genus, which has more effective survival ability.

In case of Gram-negative bacteria, inverse tendency can be shown. Highest values were measured on the control area (21.35%), which is significantly higher than the results of larger dump sites (Beregsurány 4.25%; Gelénes 6.36%). Results of Beregdaróc (14.21%) are significantly different from the two other sites and do not exceed the control value.

Relative amount of biomarker fatty acids, which indicates the presence of *Actinomycetes* family, does not show significant differences (Beregdaróc 4.25%; Beregsurány 2.05%; Gelénes 3.25%), while control value is significantly higher (9.12%).

The same tendency can be observed in case of fungi: the highest value was measured on the control site (4.61%), while results of the three dump sites (Gelénes 1.70%; Beregsurány 1.54%; Beregdaróc 1.99%) do not show significant differences.

Fungal/bacterial ratio can be given by the help of fungal biomarkers and bacterial fatty acid biomarkers. This ratio is outstandingly high on the control area (0.0699). Results of dump soils do not show significant differences (Beregdaróc 0.0270, Beregsurány 0.0184, Gelénes 0.0209), however these are remarkably lower than results of the control area. In dump soils, the decreasing number of fungi can be explained by the increasing intensity of disturbance. On these sites, motor-vehicle traffic and disturbing of the soil have negative

effect on the development of fungal mycelia. Fungi are also sensitive to the heavy metal content of the soil.

Environmental stress is indicated by the increased ratio of trans/cis isomers of 16:1 ω 7 and 18:1 ω 7 fatty acids in the bacterial cell membranes. Trans/cis isomer ratio of 16:1 ω 7 and 18:1 ω 7 fatty acids is higher in the dump soils than on the control area. In case of 16:1 ω 7, trans/cis isomer ratio is significantly higher in the samples of Gelénes (2.5601) and Beregsurány (2.4323) than in case of Beregdaróc (1.9235) and the control area (1.6449). In case of 18:1 ω 7 fatty acid, trans/cis isomer ratio is significantly higher in dump soils (Beregdaróc 1.1044; Beregsurány 1.1114; Gelénes 1.1254) than in control samples (0.5886).

6.5. Cluster analysis

To reveal the similarities, we clustered the results of the four different sampling sites with cluster analysis of the average values of the principal components. The basis of the comparison was the microbial community structure which was resulted from the PLFA analysis. According to the dendrogram (Fig.1.), the largest similarity can be observed between the samples of Beregsurány and Gelénes, while Beregdaróc is different from the two previous sampling sites. All three sampling sites are considerably different from the control area.

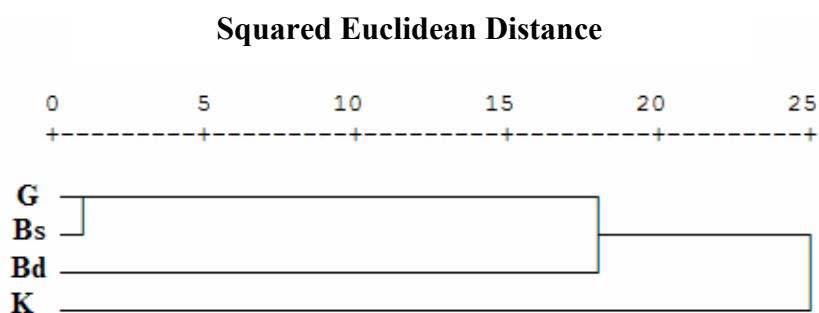


Figure 1. Cluster analysis of sampling sites on the basis of the average values of principal components

Cluster analysis of principal component weights was also carried out to determine the fatty acids which characterize the sampling sites. Control area (Fig.2.) is characterized by the fatty acids of Gram-negative bacteria (cy17:0, cy19:0, C17:0, C18:1 ω 7c, C18:1 ω 7t), the two fatty acid biomarkers of *Actinomyces* (10Me17 and 10Me16) and the fungal biomarker (18:2 ω 6). Besides Gram-negative bacterial biomarkers (16:1 ω 7t and 16:1 ω 7c) and Gram-positive fatty acid biomarkers (i-15:0), samples of Beregdaróc are characterized by the third *Actinomyces* biomarker fatty acid (10Me18). Biomarker fatty acids of Gram-positive bacteria are distributed between the sampling sites of Gelénes and Beregsurány. The a-17:0, i-16:0 and C15:0 fatty acids can be found mostly in the samples of Gelénes, while a-15:0, i-16:1 and i-17:0 fatty acids are mainly found in the samples of Beregsurány.

Modifications in the PLFA patterns of contaminated areas can be explained by both the changes in the composition of microbial communities and the changes of environmental conditions, which modify the fatty acid composition of bacterial cell membranes. During our

examinations, we also compared the fatty acid composition of *Bacillus* stocks of the different sampling sites. Within a given species, there are significant differences among the stocks of different sampling sites ($p < 0.05$). Considering the differences, a wide range of fatty acids could be observed both qualitatively and quantitatively. Presence of a given fatty acid depends on the given species as well as the dump site. Stocks of a given species show relationship on the basis of fatty acid composition; however fatty acid profiles change under the influence of environmental factors. Besides genetic conditions, fatty acid composition of bacteria is determined by the contaminants and toxic materials of dump sites as well as the easily available nutrients of the environment.

Frostegård et al. (1993/b) published analogous results. Changes in the fatty acid profile of bacteria can modify the function and pathogenicity of a given species. As a consequence of modified fatty acid composition, bacteria of contaminated areas form more visible colonies during the dispersion on agar-agar lamellae. Therefore, unpolluted areas can be described with lower total number of bacteria (CFU) than polluted areas, during the dispersion.

By the help of these modifications, bacteria can adapt to the changes of the environment. Modified microflora of the contaminated sites may influence the soil status in case of recultivation. Considering the homeostasis of the soil, diversity of microorganisms and the role and function of a given species in matter cycles are important factors. Such essential soil functions as the carbon and nitrogen cycle or the transformation of organic matters are based on the bacterial processes (Parkinson and Coleman, 1991). Therefore, changes in the fatty acid composition of bacteria can indicate such environmental load on soils as heavy metal contamination, waste deposition and organic pollutants, etc.

Phospholipid fatty acids as biomolecules of soil microorganisms can be properly determined quantitatively. As a consequence of the fast turnover, these fatty acids qualitatively and quantitatively characterize the given microbial community. PLFA have high indicational value in describing and monitoring of microbial communities, under both physiological and stress conditions. However, PLFA biomarker analysis has several restrictions, which limit its application on both local and global levels. Database for the evaluation of biomarkers is based on fatty acids which are derived from pure cultures. For the sake of the long-term application of PLFA method in environmental monitoring, it is necessary to complete the PLFA database with fatty acid profiles of bacteria which are derived from natural sources. Calibration of stress biomarkers in different ecological systems and different soil types, under different climatic conditions is a huge challenge for the future on both national and international levels.

The following conclusions are considered to be new scientific results:

- Proportions of *Actynomices* and *Pseudomonas* genuses decreased, while proportion of *Bacillus* genus increased under the influence of contaminations.
- Wastes modified the soil enzyme activities and considerably decreased the cellulase, phosphatase and invertase activities, while dehydrogenase activity increased as compared to the control area.

- Different soil pollutions lead to qualitative and quantitative changes in the composition of soil microbial communities.
- Quantity of biomarker fatty acids, which indicates Gram-positive bacteria, is significantly higher on dump sites than in unpolluted areas.
- Quantity of biomarker fatty acids, which indicates Gram-negative bacteria, *Actinomycetes* and fungi, decreases on dump sites.
- Fungal/bacterial ratio decreases in the soil as a consequence of waste deposition and treatment.
- Trans/cis isomer ratio of 16:1 ω 7 and 18:1 ω 7 fatty acids increases in the dump soils.
- Modifications in the PLFA patterns of contaminated areas can be explained by both the changes in the composition of microbial communities and the changes of environmental conditions, which modify the fatty acid composition of bacterial cell membranes.

7. Irodalom / References

- American Academy of Microbiology, 2002. Microbial ecology and genomics: a crossroads of opportunity. A Report from the American Academy of Microbiology. ASM Press, Washington, D.C.
- Atlas, R.M. 1984. Use of microbial diversity measurements to assess the environmental stress. In: Current Perspectives in Microbiol Ecology (Eds. Klug, M.J. and Reddy, C.A.), American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Frostegard, A., Tunlid, A., Baath, E., 1993. Phospholipids fatty acid composition, biomass and activity of microbial communities from two soil types exposed to different heavy metals. *Soil Biol. Biochem.* 25. 723–730.
- Halbritter, A., Uzinger, N. 2005. A talaj-mikrobióta vizsgálata foszfolipidek alapján. I. Szükségesség és alkalmazási lehetőségek. *Agrokémia és talajtan.* 54. 257-576.
- Hargreaves, P., Brookes, R., Ross, P.C., Poulton, P.R. 2003. Evaluating soil microbial biomass carbon as an indicator of longterm environmental change. *Soil Biol. Biochem.* 35. 401–407.
- Heipieper, H.J., Meulenbeld, G., Oirschot, Q.V., de Bont, J.A.M. 1996. Effect of environment factors on trans/cis ratio of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12. *Appl. Environ. Microbiol.* 62. 2773–2777.
- Ibekve, A.M., Kennedy, A.C. 1998. Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as a tool to investigate community structure of two agricultural soils. *Plant Soil.* 206. 151-161.
- Jandl, G.P., Leinweber, H., R. Schulten, Eusterhues, K. 2004. The concentration of fatty acids in organo-mineral particle-size fractions of a Chernozem. *European J. Soil Sci.* 55. 459-469.
- Krámer, M., Erdei, G., 1959. Application of the method of phosphatase activity determination in agricultural chemistry. *Soviet Soil Sci.* 9. 1100-1103.
- Mersi Von W., Scinner, F. 1991. An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with idonitrotetrazolium chlorid. *Biology and Fertility of Soils.* 11. 216-220.
- Moreno, J.L., Garcia, C., Hernandez, T. 2003. Toxic effect of cadmium and nikkell on soil enzymes and the influence of adding sewage sludge. *Eur. L. Soil. Sci.* 54. 377-386.
- Neher, D.A., 2001. Role of nematodes in soil health and their use as indicator. *J. Nematol.* 33. 161–168.
- Parkinson, D., Coleman, D.C., 1991. Microbial communities, activity és biomass. *Agric. Ecosyst. Environ.* 34. 3–33.
- Ringelberg, D.B., Talley, J.W., Perkins, E.J., Tucker, S.G., Luthy, R.G., Bower, E.J., Fredrickson, H.L., 2001. Succession of phenotypic, genotypic, and metabolic community characteristic during the in-vitro bioslurry treatment of PAH-contaminated sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67. 1542-1550.

- Sasser, M. 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Newark, DE: Microbial ID, 1990 Tech. Note #101.
- Schinner F., Mersi von W. 1990. Xylanase-, CM-cellulase- and invertase activity in soil, an improved method. *Soil Biol Biochem* 22. 511-515.
- Smith, G.A., Nickels, J.S., Kerberg, B.D., Davis, J.D., Collins, S.P., 1986. Quantitative characterization of microbial biomass és community structure in subsurface material: a prokaryotic consortium responsive to organic contamination. *Can. J. Microbiol.* 32. 104-111.
- Szegi, J., 1979. Talajmikrobiológiai vizsgálati módszerek. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest.
- Unger-féle cellulózteszt módszer a talajbiológiai aktivitás meghatározására. In: Szegi. 1979. Talajmikrobiológiai vizsgálati módszerek. 245-247. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest.
- White, D.C., Cecily, A.F., Leung, K.T., Macnaughton, S.J. 1998. In situ microbial ecology for quantitative appraisal, monitoring, és risk assessment of pollution remediation in soils, subsurface, the rhizosphere and in biofilms. *J. Microbiol. Methods.* 32.93-105.

8. Tudományos tevékenység jegyzéke

8.1. A témában megjelent előadások, posztterek

- Halász J., Balázs S.: Hulladéklerakók szennyezőinek monitorozása. (A növények nehézfém tartalmának és a filloszféra mikroorganizmusainak vizsgálata.) A Magyar Tudomány Napja. Nyíregyháza 2004. november 9.
- Balázs, S., Boiko, N., L. Halász, J., Márta D. Tóth, Simon, L.: Impacts of metals on the microbiological conditions in the water of the upper stretch of River Tisza and River Szamos. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica.* 52, 2005. pp. 53-54.
- L. Halász, J., D Tóth, M., Balázs, S., Rohr, R.: Environmental microbiological studies on landfill sites. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica.* 52, 2005. pp. 9-10.
- Balázs, S., L. Halász, J., Chonka, I., Anzhela Kolesnyk, D. Tóth, M., Boiko, N.: Microbiological monitoring of landfill in Bereg region. *Acta Microbiologica et Immunologica.* 53, 2006. pp. 242-243.
- L. Halász, J., D. Tóth, M., Ostap Patsula, Terek, O., H.E.A.F. Bayoumi Hamuda, Balázs, S. 2007. The metal uptake of plants on the landfill sites in Bereg county, Plant Ontogenesis in Natural and Transformed Environments. Physiological, Biochemical and Ecological Aspects”III. International Conference in Ivan Franko National University of L’viv.
- L. Halász, J., Chonka, I., D. Tóth, M., Boyko, N., Balázs, S. 2007. Microorganisms and enzyme activities in soil on the landfill sites in Bereg county. Practical Solution for Managing Optimum C and N Content in Agricultural Soils IV., Prague.
- L. Halász, J., Szathmáry, M., Dinya, Z., Máthé, E., Balázs, S. 2007: Application of a new method: Determination of fatty acid composition in bacterial cell membrane using GC technique. 7th Balaton Symposium, On High-performance separation methods. Siófok.
- L. Halász, J., Szathmáry, M., D. Tóth, M., Z. Dinya, S. Balázs 2008: Effect of pollution in the fatty acid composition of soil Bacillus strains. VII. Alps-Adria Scientific Workshop. Stara Lesna, Slovakia.
- L. Halász Judit, Kotroczó Zsolt, D. Tóth Márta, Vince György, Nadya Boyko, Balázs Sándor 2008: Hulladéklerakók talaj mikroorganizmus közösségeinek és enzim aktivitásának vizsgálata a Felső-Tisza árterein. Talajtani Vándorgyűlés, Nyíregyháza.
- L. Halász J., Szathmáry M., N. Uhrin H., Demeter I., Máthé E., Dinya Z., Balázs S. 2008: Szennyezett talajok baktérium flórája és elemösszetétele közötti összefüggések vizsgálata ICP-OES és XRF technikákkal. 51. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés, Nyíregyháza.
- L. Halász, J., Szathmáry, M., D. Tóth, M., Kotroczó, Zs., Dinya, Z., Balázs, S. 2008. Changes in the fatty acid composition of bacillus strains in contaminated soils. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése. Keszthely.

8.2. A témában megjelent szakcikk

- L. Halász, J., Chonka, I., D. Tóth, M., Boyko, N., Balázs, S. 2008: Microorganisms and enzyme activities in soil on the landfill sites in Bereg county. *Archives of Agronomy and Soil Science.* Volume 54, Issue 5, 465–479.

L. Halász, J., Szathmáry, M., D. Tóth, M., Dinya, Z., Balázsy, S. 2008: Effect of pollution in the fatty acid composition of soil Bacillus strains. Cereal Research Communications. Volume 36, Suppl. 1827-1831. [IF: 1.190/2007].

L. Halász Judit, Kotroczó Zsolt, D. Tóth Márta, Vince György, Nadya Boyko, Balázsy Sándor 2008: Hulladéklerakók talaj mikroorganizmus közösségeinek és enzim aktivitásának vizsgálata a Felső-Tisza árterein. Talajvédelem Különszám. 281-291.

8.3. A témában megjelent könyvrészlet

Balázsy, S., L. Halász, J. Filloszfera rosztlin zabrudnyennih teritorij vernovo potisszja. In: N. Boyko-S. Balázsy (Eds.): Zabrudnovacsi ta ih vplivi na ekologiesno vrazlivi ekosisztemi vernovo potisszja. Uzsgorod-Nyíregyháza, 2008. pp. 269-287. ISBN: 978-963-7336-96-6.

Balázsy, S., L. Halász, J. A filloszféra. In: Balázsy Sándor-Boyko Nadiya (Eds.): Szennyeződések, szennyezők, hatások a Felső-Tisza-vidék ökológiailag érzékeny területein. Nyíregyháza, 2007, Bessenyei György Könyvkiadó. pp. 219-234. ISBN: 978-963-7336-96-6.

8.4. Egyéb előadások, poszterek

D. Tóth, M., L. Halász, J., Balázsy, S., Rohr, R. The metal content and the microorganisms on the phyllosphere of ragweed plants (*Ambrosia elatior* L.) in ruderal environments. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica. 52, 2005. pp. 25-26.

D. Tóth, M., L. Halász, J., Rohr, R., Hosam E.A.F. Bayoum, Balázsy S.: Isolation, Identification and Characterization of phyllospheric microbial population in ragweed (*Ambrosia elatior* L.) grown in contaminated areas. Acta Microbiologica et Immunologica. 53, 2006. pp. 257-258.

D. Tóth, M., L. Halász, J., Rohr, R., Hosam E.A.F. Bayoum, Balázsy S.: The relationship between the direct environment and the microorganism of pollen surface of ragweed on ruderal sites. Acta Microbiologica et Immunologica. 53, 2006. 249.

D. Tóth, M., L. Halász, J., Ostap Patsula, Olga Terek, H.E.A.F. Bayoumi Hamuda, Balázsy, S. 2007. Effect of metal contaminated soil on the uptake of ragweed, Plant Ontogenesis in Natural and Transformed Environments. Physiological, Biochemical and Ecological Aspects"III. International Conference in Ivan Franko National University of L'viv.

D. Tóth, M., L. Halász, J., H.E.A.F. Bayoumi Hamuda, Balázsy, S. 2007. Phyllospheric microbial populations of ragweed (*Ambrosia elatior* L.) plant grown in toxic metal contaminated areas. Practical Solution for Managing Optimum C and N Content in Agricultural Soils IV., Prague.

D. Tóth, M., L. Halász, J., Kotroczó, Zs., Vincze, Gy., Simon, L. 2008: Effect of cadmium, nickel, copper and zinc on metal uptake of ragweed (*Ambrosia elatior* L.) in pot experiments. VII. Alps-Adria Scientific Workshop. Stara Lesna, Slovakia.

Fekete, I., Varga, Cs., L. Halász, J., Kramperger, Zs., Krausz, E. 2008: Study of litter decomposition intensity in litter manipulative trials in Síkfőkút cambials. VII. Alps-Adria Scientific Workshop. Stara Lesna, Slovakia.

Kotroczó Zs., L. Halász, J., Krakomperger Zs., Fekete I., D. Tóth M., Vince Gy., Varga Cs., Balázsy S., Tóth J. A. 2008: Erdőtálatj szerves-anyag mennyiségének változása avarmanipulációs kísérletek hatására (Síkfőkút Project). Talajtani Vándorgyűlés, Nyíregyháza.

D. Tóth Márta, L. Halász Judit, Kotroczó Zsolt, Vince György, Simon László, Balázsy Sándor 2008: A talaj fémzennyezésének hatása parlagfű (*Ambrosia elatior* L.) fémtartalmára tenyészedényes kísérletben. Talajtani Vándorgyűlés, Nyíregyháza.

N. Uhrin H., Szathmáry M., Vigh Sz., Demeter I., L. Halász, J., Dinya Z., Máthé E. 2008: Növényi anyagok antioxidáns aktivitásának UV-VIS spektrofotometriás vizsgálata. 51. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés, Nyíregyháza.

Varga Csaba, N. Uhrin H., Szathmáry M., Demeter I., L. Halász, J., Dinya Z., Máthé E. 2008: Talajok elem- és nyomelem tartalmának XRF és ICP-OES vizsgálata. 51. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés, Nyíregyháza.

- Varga Csaba, T. Tilistyák J., N. Uhrin H., Szathmáry M., L. Halász J., Vigh Sz., Demeter I., Dinya Z., Máthé E. 2008: Gabonafélék és örleményeik elem- és nyomelem tartalmának vizsgálata. 51. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés, Nyíregyháza.
- Demeter Ibolya, Varga Csaba, Nagyné Uhrin Henriett, Vigh Szabolcs, L. Halász Judit, Szathmáry Mónika, Kelemen Péter, Krecz Ágnes, Dinya Zoltán, Máthé Endre 2008: A Termo – Energo – System Kft Vásárosnamény és környéki Agro – energetikai programjához kapcsolódó XRF és ICP - OES módszerekkel végzett talaj- és vízvizsgálatok eredményei. 51. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés, Nyíregyháza.
- Szathmáry M. , N. Uhrin H., Demeter I., ifj. Dinya Z., L. Halász J., Dinya Z., Váradi Gy. Máthé E. 2008: Dió, dió-olaj szerves és szervetlen összetevőinek vizsgálata. 51. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés, Nyíregyháza.
- Kotroczó, Zs., Koncz, G., L. Halász, J., Fekete, I., Krakomperger, Zs., D. Tóth, M., Balázs, S., Tóth, J. A. (2008): Litter decomposition intensity and soil organic matter accumulation in síkfőkút dirt site. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése. Keszthely.
- D. Tóth, M., L. Halász, J., Kotroczó, Zs., Vincze, Gy., Simon, L., Balázs, S. 2008: Correlations between metal contamination of soil and microbial colonies of ragweed (*Ambrosia elatior* L.) in pot experiments. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése. Keszthely.
- Kotroczó Zs., Krakomperger Zs., Veres Zs., Vasenszki T., L. Halász J., Koncz G., Papp M., Tóthmérész B., Tóth J.A. (2008): Talajlégzés vizsgálatok hosszú-távú avarmanipulációs modellkísérletekben. Magyar Természetvédelmi Biológiai Konferencia. 2008. Nyíregyháza.

8.5. Egyéb szakcikk

- D. Tóth, M., L. Halász, J., H.E.A.F. Bayoumi Hamuda, S. Balázs 2009: Phyllospheric microbial populations of ragweed (*Ambrosia elatior* L.) plant grown in toxic metal contaminated areas. Archives of Agronomy and Soil Science. Volume 55, Issue 2, 217-231.
- D. Tóth, M., L. Halász, J., Kotroczó, Zs., Vincze, Gy., Simon, L. 2008: Effect of cadmium, nickel, copper and zinc on metal uptake of ragweed (*Ambrosia elatior* L.) in pot experiments. Cereal Research Communications. Volume 36, Suppl. 619-623. [IF: 1.190/2007].
- Fekete, I., Varga, Cs., L. Halász, J., Krakomperger, Zs., Krausz, E. 2008: Study of litter decomposition intensity in litter manipulative trials in Síkfőkút cambials. Cereal Research Communications. Volume 36, Suppl. 1779-1783. [IF: 1.190/2007].
- Kotroczó Zsolt, L. Halász Judit, Krakomperger Zsolt, Fekete István, D. Tóth Márta, Vincze György, Varga Csaba, Balázs Sándor, Tóth J. Attila. 2008: Erdőtálg szerves-anyag mennyiségének változása avarmanipulációs kísérletek hatására (Síkfőkút Project). Talajvédelem Különszám. 431-444.
- D. Tóth Márta, L. Halász Judit, Kotroczó Zsolt, Vince György, Simon László, Balázs Sándor 2008: A talaj fémzennyezésének hatása parlagfű (*Ambrosia elatior* L.) fémtartalmára tenyészedényes kísérletben. Talajvédelem Különszám. 227-237.